

Université de Montréal

Le rôle et la régulation du *pyroglutamylated RF-amide peptide* dans le tissu adipeux lors de l'obésité

par

Christian Jossart

Faculté de pharmacie

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

Août, 2012

© Christian Jossart, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Le rôle et la régulation du *pyroglutamylated RF-amide peptide* dans le tissu adipeux lors
de l'obésité

Présentée par :
Christian Jossart

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Levesque PhD, président-rapporteur
Huy Ong PhD, directeur de recherche
Sylvie Marleau PhD, co-directrice
Marc Servant PhD, co-directeur
David St-Pierre PhD, membre du jury
Hubert Vaudry PhD, examinateur externe
Jean-Marc Lavoie PhD, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'obésité est définie comme un surplus de masse adipeuse. Cette condition représente un problème de santé publique devenu pandémique dans les pays industrialisés. Elle prédispose à des maladies potentiellement mortelles comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et la stéatose hépatique non-alcoolique.

L'accumulation du tissu adipeux intra-abdominal, formé d'adipocytes, est corrélée avec la résistance à l'insuline. L'augmentation de la masse adipeuse se fait par l'hyperplasie des préadipocytes, la différenciation des préadipocytes en adipocytes et l'hypertrophie des adipocytes. La différenciation des préadipocytes se fait selon l'adipogenèse qui est régulée par une multitude de facteurs, mais qui est inhibée par les stimuli inflammatoires qui sont aussi responsables de la résistance à l'insuline et de l'apparition des problèmes de santé liés à l'obésité.

Nous avons identifié un nouveau système de régulation autocrine/paracrine de l'adipogenèse dans les cellules du tissu adipeux. Le *pyroglutamylated RF-amide peptide* (QRFP), qui était connu pour son rôle dans la régulation de l'appétit, est un activateur de l'adipogenèse par l'activation de son récepteur, le *G protein-coupled receptor 103* (GPR103). Le QRFP est exprimé dans les macrophages et les adipocytes alors que le GPR103 de sous-type b est exprimé dans les adipocytes seulement. Un traitement des adipocytes avec le QRFP augmente le captage des acides gras, l'accumulation de lipides ainsi que l'expression et l'activité de l'enzyme LPL. Le QRFP augmente aussi l'expression des gènes des transporteurs d'acides gras CD36 et FATP1, de l'enzyme activatrice d'acides gras ACSL1 et des facteurs de transcription PPAR- γ et C/EBP- α , qui sont tous impliqués dans l'adipogenèse. En plus de ses effets sur l'adipogenèse, le QRFP possède aussi un effet inhibiteur sur l'activité lipolytique induite par les catécholamines.

Nous avons montré que l'expression du QRFP est diminuée dans le tissu adipeux des souris obèses. Selon nos résultats, cette diminution pourrait être expliquée par une

augmentation des endotoxines circulantes chez les obèses, appelée endotoxémie métabolique, qui agirait, entre autres, par l'induction des interférons dans les macrophages. Les voies de signalisation de ces effets ont aussi été identifiées. Nous avons montré un autre exemple de stimulus inflammatoire qui régule les signaux adipogènes à la baisse.

Mots-clés : GPR103, QRFP, obésité, adipocytes, macrophages, adipogenèse, endotoxémie métabolique, interférons, inflammation

Abstract

Obesity is defined as an excess of fat tissue mass. Obesity is a public health problem which became pandemic in developed countries. The condition of obesity predisposes to potentially fatal diseases like type 2 diabetes, cardiovascular diseases and non-alcoholic steatohepatitis.

The increase in intra-abdominal adipose tissue mass is intimately associated with the development of insulin resistance. An increase in fat tissue mass occurs by preadipocytes hyperplasia, preadipocytes differentiation into adipocytes and adipocyte hypertrophy. The differentiation of preadipocytes occurs during adipogenesis and is regulated by multiple factors but inhibited by inflammatory stimuli that are responsible for insulin resistance and the emergence of obesity-related dysfunctions.

We identified a new autocrine/paracrine system of regulation of adipogenesis in adipose tissue cells. The pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP), previously known for its role in the regulation of appetite, is an activator of adipogenesis by activating its receptor, G protein-coupled receptor 103 (GPR103). QRFP is expressed in adipocytes and macrophages whereas the GPR103 subtype b is expressed in adipocytes only. Treatment of adipocytes with QRFP increases fatty acids uptake, lipid accumulation, LPL enzyme expression and activity. QRFP upregulates gene expressions of fatty acids transporters CD36 and FATP1, of the fatty acid activating enzyme ACSL1 and of transcription factors PPAR- γ and C/EBP- α , which are all involved in adipogenesis. In addition to its effects on adipogenesis, QRFP shows an inhibitory effect on lipolytic activity induced by catecholamines.

We have shown that QRFP expression is decreased in adipose tissues of obese mice. According to our results, this decrease could be explained by an increase of circulating endotoxins in obesity, called metabolic endotoxemia, which mediate its effect, in part, by the induction of interferons in macrophages. Signaling pathways of these effects have been

identified. We demonstrated another example of inflammatory stimulus downregulating adipogenic signals.

Keywords : GPR103, QRFP, obesity, adipocytes, macrophages, adipogenesis, metabolic endotoxemia, interferons, inflammation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Chapitre I : Introduction.....	1
1. L'obésité et ses conséquences métaboliques.....	2
1. 1. L'obésité.....	3
1. 1. 1. Les tissus adipeux et leurs implications patho-physiologiques.....	4
1. 1. 1. 1. Le tissu adipeux intra-abdominal (viscéral).....	5
1. 1. 1. 2. Le tissu adipeux sous-cutané.....	7
1. 1. 1. 3. Le tissu adipeux brun.....	7
1. 1. 2. La régulation de l'appétit.....	8
1. 1. 2. 1. Les signaux orexigènes.....	8
1. 1. 2. 2. Les signaux anorexigènes.....	13
1. 1. 3. La régulation du métabolisme par l'AMPK.....	17
1. 1. 3. 1 Les modulateurs de l'activité de l'AMPK.....	19
1. 1. 3. 2. Les effets périphériques de l'AMPK.....	21
1. 1. 3. 3. Les effets centraux de l'AMPK.....	24
1. 1. 4. L'adipogenèse.....	25
1. 1. 4. 1. L'engagement.....	26
1. 1. 4. 2. La différenciation terminale.....	29
1. 1. 4. 3. Les mécanismes de l'adipogenèse.....	32
1. 1. 5. La lipogenèse.....	36
1. 1. 6. La lipolyse.....	38
1. 1. 6. 1. La régulation de la lipolyse.....	39

1. 1. 6. 2. La signalisation de la lipolyse	40
1. 1. 7. La thermogenèse	42
1. 1. 7. 1 Le facteur PGC-1 α	43
1. 1. 7. 2 La protéine UCP-1	44
1. 1. 8. Les adipokines.....	46
1. 1. 8. 1. L'adiponectine	46
1. 1. 8. 2. La leptine.....	47
1. 1. 8. 3. Le TNF- α	48
1. 1. 8. 4. L'IL-6.....	48
1. 1. 8. 5. La MCP-1	49
1. 1. 8. 6. L'angiotensinogène.....	50
1. 1. 8. 7. Le PAI-1	50
1. 1. 8. 8. La résistine	50
1. 2. L'inflammation chronique liée à l'obésité	51
1. 2. 1. L'initiation de l'inflammation.....	51
1. 2. 2. L'infiltration des cellules immunitaires	53
1. 2. 3. L'immunité innée et le métabolisme.....	54
1. 2. 3. 1. Le <i>toll-like receptor-4</i>	55
1. 2. 3. 1. 1. La voie de signalisation de MyD88	56
1. 2. 3. 1. 2. La voie de TRIF	58
1. 2. 3. 2. Le <i>toll-like receptor-4</i> et le métabolisme	60
1. 2. 4. Les cytokines et les acides gras saturés, une boucle paracrine	61
1. 2. 5. L'endotoxémie métabolique (EM).....	63
1. 2. 6. Les interférons.....	64
1. 2. 6. 1. La signalisation des interférons.....	65
1. 2. 6. 1. 1. Les interférons de type I.....	65
1. 2. 6. 1. 2. Les interférons de type II	69
1. 2. 6. 2. Les interférons et le métabolisme	73
1. 3. La résistance à l'insuline.....	74

1. 3. 1. La signalisation de l'insuline	75
1. 3. 2. Les mécanismes de la résistance à l'insuline	77
1. 4. Le traitement pharmacologique de l'obésité	80
1. 4. 1. La théorie de l'expansabilité du tissu adipeux	82
2. Le système QRFP/GPR103	84
2. 1. La découverte du système QRFP/GPR103	86
2. 2. Le profil d'expression du QRFP et de GPR103	87
2. 2. 1. L'expression du QRFP	87
2. 2. 2. L'expression du GPR103	88
2. 2. 3. La régulation du QRFP et du GPR103	89
2. 3. Les rôles physiologiques du QRFP	90
2. 3. 1. Les effets sur le métabolisme	91
2. 3. 2. Les autres effets physiologiques	93
Chapitre II : Matériel, méthodes et résultats	95
1. Description du projet	96
1. 1. Origine du projet	96
1. 2. Objectifs généraux	97
2. Première étude	97
2. 1. Hypothèse et objectifs	97
2. 2. Contribution des auteurs	98
2. 3. GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis	100
2. 3. 1. Abstract	101
2. 3. 2. Introduction	101
2. 3. 3. Material and methods	103
2. 3. 4. Results	110
2. 3. 5. Discussion	124
2. 3. 6. Acknowledgments and footnotes	128
2. 3. 7. References	128
3. Transition vers la deuxième étude	135

4. Deuxième étude.....	135
4. 1. Hypothèse et objectifs.....	135
4. 2. Contribution des auteurs	136
4. 3. Pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP) gene is regulated by lipopolysaccharide and interferons in a cellular model of metabolic endotoxemia between macrophages and adipocytes.....	137
4. 3. 1. Abstract.....	138
4. 3. 2. Introduction.....	139
4. 3. 3. Material and methods.....	141
4. 3. 4. Results.....	146
4. 3. 5. Discussion.....	159
4. 3. 6. Acknowledgments and footnotes	163
4. 3. 7. References.....	164
Chapitre III : Discussion	172
1. Discussion du premier article.....	172
2. Discussion du deuxième article.....	176
3. Discussion intégrative et perspectives	181
4. Conclusion	194
Bibliographie.....	195
Annexe : Liste des publications	241
1. Articles scientifiques.....	241
2. Brevet.....	241

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères pour le diagnostic du SMet.....	3
Tableau 2 : Sites de liaison potentiels sur le promoteur du gène du QRFP.....	184

Liste des figures

Figure 1 : Structure cellulaire des adipocytes blancs et bruns.....	4
Figure 2 : Sites d'expression des facteurs hypothalamiques régulant l'appétit.....	9
Figure 3 : Sites d'action des facteurs hypothalamiques régulant l'appétit.....	10
Figure 4 : Régulation et effets de l'AMPK.....	18
Figure 5 : Les rôles de l'AMPK dans les tissus.....	19
Figure 6 : Effet de l'AMPK sur la β -oxydation.....	22
Figure 7 : La différenciation des adipocytes.....	26
Figure 8 : L'engagement et ses modulateurs.....	28
Figure 9 : La différenciation terminale.....	29
Figure 10 : Le captage des lipides.....	33
Figure 11 : La synthèse des triglycérides.....	35
Figure 12 : La lipogenèse.....	37
Figure 13 : La lipolyse.....	39
Figure 14 : La signalisation de la lipolyse.....	41
Figure 15 : La thermogénèse.....	45
Figure 16 : La signalisation du TLR-4 dépendante de MyD88.....	57
Figure 17 : La signalisation du TLR-4 dépendante de TRIF.....	59
Figure 18 : Boucle paracrine entre les adipocytes et les macrophages dans le tissu adipeux lors de l'obésité.....	62
Figure 19 : Signalisation classique des IFNs de type I.....	66
Figure 20 : L'activation de NF-kB par les IFNs de type I.....	68
Figure 21 : Signalisation classique des IFNs de type II.....	70
Figure 22 : Signalisations alternatives des IFNs de type II.....	72
Figure 23 : Signalisation de l'insuline.....	75
Figure 24 : La résistance à l'insuline.....	79
Figure 25 : Schématisation du preproQRFP.....	85
Figure 26 : Séquences du QRFP chez l'humain, le rat et la souris.....	85

Figure 27 : Les effets physiologiques du QRFP.....	90
Figure 28 : Schéma récapitulatif.....	181
Figure 29 : Les interactions entre l'endotoxémie et les effets du QRFP au niveau central.....	186

Liste des abréviations

ACC, acétyl-CoA carboxylase
ACSL, *long chain fatty acyl-CoA synthetase*
ACTH, *adrenocorticotrophin hormone*
AdipoR1, *adiponectin receptor 1*
AdipoR2, *adiponectin receptor 2*
ADP, adénosine diphosphate
AGL, acide gras libre
AGLC, acides gras à longue chaîne
AGPAT, 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase
AGRP, *agouti-related peptide*
Akt, *a serine/threonine kinase*
AMP, adénosine monophosphate
AMPc, adénosine monophosphate cyclique
AMPK, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*
ANP, *atrial natriuretic peptide*
AP-1, *activating protein-1*
AP2, *adipocyte protein 2*
ARC, *arcuate nucleus*, noyau arqué
ARN, acide ribonucléique
ARNm, ARN messenger
ATF-2, *activating transcription factor-2*
ATGL, *adipose triglyceride lipase*
ATP, adénosine triphosphate
BAT, *brown adipose tissue*, tissu adipeux brun
BMP, *bone morphogenetic protein*
BNP, *brain natriuretic peptide*
CaMKII, *calcium/calmodulin kinase II*

CaMKK2, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*
CART, *cocaine and amphetamine related transcript*
CCK, *cholécystokinine*
CCK-A, *cholecystokinin-A receptor*
CCL2, *CC motif chemokine ligand 2*
CCR2, *CC motif chemokine receptor 2*
CD8, *cluster of differentiation 8*
CD14, *cluster of differentiation 14*
CD36, *cluster of differentiation 36*
C/EBP, *CCAAT/enhancer binding protein*
CHO, *chinese hamster ovary*
CoA, *coenzyme A*
CPT1, *carnitine-palmitoyl-CoA transferase-1*
CREB, *cAMP response element binding*
CRF, *corticotropin releasing factor*
CRP, *C-reactive protein*
CSM, *cellule souche mésenchymateuse*
DAG, *des-acyl-ghréline*
DGAT, *diacylglycérol acyltransférase*
DMH, *dorsomedial hypothalamus*, *hypothalamus dorsomédian*
DT2, *diabète de type 2*
ELOVL6, *elongation of long chain fatty acids family member 6*
EM, *endotoxémie métabolique*
ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinase 1/2*
ERR α , *estrogen related-receptor α*
EU, *endotoxin unit*
FABP, *fatty acid-binding protein*
FABPpm, *plasma membrane fatty acid-binding protein*
FAS, *fatty acid synthase*

FAT, *fatty acid translocase*
FATP, *fatty acid transport protein*
FGF, *fibroblast growth factor*
FIAF, *fasting-induced adipose factor*
FoxO1, *forkhead box class O1*
FSH, *hormone folliculo-stimulante*
GAS, *gamma activated sequence*
GATA2, 3, *GATA-binding 2, 3*
GDF3, *growth differentiation factor 3*
GEFT, *guanine nucleotide exchange factor T*
GH, *growth hormone*
GLP-1, *glucagon-like peptide 1*
GLP1-R, *glucagon-like peptide 1 receptor*
GLP-2, *glucagon-like peptide 2*
GLP-2R, *glucagon-like peptide 2 receptor*
GLUT4, *glucose transporter 4*
GMPc, *guanosine monophosphate cyclique*
GnRH, *gonadotrophin-releasing hormone*
GPAT, *glycerol phosphate acyltransferase*
GPR103, *G protein-coupled receptor 103*
GR, *récepteur aux glucocorticoïdes*
GSK-3 β , *glycogen synthase kinase-3 β*
HAT, *histone acyltransférase*
HDAC, *histone déacétylase*
HDL-C, *high density lipoprotein-cholesterol*
hGPR103, *GPR103 humain*
HIF-1 α , *hypoxia-inducible factor-1 α*
HMG-CoA, *3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA*
HPLC, *high performance liquid chromatography*

HSL, *hormone sensitive lipase*
ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*
ICV, *intracérébroventriculaire*
Id3, *inhibitor of differentiation 3*
IFNAR1, 2, *interferon alpha/beta receptor 1, 2*
IFNGR1, 2, *interferon gamma receptor 1, 2*
IFNs- α , *interférons- α*
IFN- β , *interféron- β*
IFN- γ , *interféron- γ*
IFNs, *interférons*
IkBs, *inhibitors of κ B*
IKK, *I κ B kinase*
IKKi, *IKK-related kinase inducible*
IL-1, *interleukine-1*
IL-1ra, *interleukin-1 receptor antagonist*
IL-6, *interleukine-6*
IL-10, *interleukine-10*
IL-12, *interleukine-12*
IMC, *indice de masse corporelle*
iNOS, *inducible nitric oxide synthase*
IP-10, *interferon gamma-induced protein of 10 kDa*
IR, *insulin receptor, récepteur de l'insuline*
IRAKs, *IL-1 receptor-associated kinases*
IRF-3, *interferon regulatory factor-3*
IRFs, *interferon regulatory factors*
IRS-1, *insulin receptor substrate-1*
ISG, *interferon-stimulated gene*
ISGF3, *interferon-stimulated gene factor 3*
ISRE, *interferon-stimulated response element*

I-TAC, *interferon-inducible T-cell α chemoattractant*

J774, J774A.1

JAK, kinase de Janus

JNK, *c-Jun N-terminal kinase*

KD, *knockdown*

kDa, kilodalton

KLF, *Krüppel-like factor*

KO, *knockout*

LatH, *lateral hypothalamus*

LBP, *LPS-binding protein*

LepR, *leptin receptor*

LH, hormone lutéinisante

LKB1, *liver kinase B1*

LPL, *lipoprotein lipase*

LPS, lipopolysaccharide

LRR, *leucine rich repeat*

LXR, *liver X receptor*

MAPK, *mitogen-activated protein kinase*

MAPKK, MAPK kinase

MCH, *melanin concentrating hormone*

MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*

MD-2, *myeloid differentiation-2*

MEC, matrice extracellulaire

MEK1, *MAPK/ERK kinase 1*

MGL, monoacylglycérol lipase

MIG, *monokine induced by IFN- γ*

MMP, metalloproteinase matricielle

α -MSH, *α -melanocyte stimulating hormone*

mtTFA, *mitochondrial transcription factor A*

mTOR, *mammalian target of rapamycin*
MyD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*
Myf5, *myogenic factor 5*
MyoD, *myogenic differentiation*
NEMO, *NF- κ B essential modulator*
NF- κ B, *nuclear factor kappa-B*
NIK, *NF- κ B-inducing kinase*
NPAF, *neuropeptide AF*
NPFF, *neuropeptide FF*
NPFF-R1, 2, *neuropeptide FF receptor 1, 2*
NPR-A, *natriuretic peptide receptor-A*
NPY, *neuropeptide Y*
NRF-1, -2, *nuclear respiratory factor-1, -2*
NTS, *nucleus of the solitary tract*
OCT1, *organic cation transporter 1*
p38, *protéine kinase de 38 kDa*
p70S6K, *p70 ribosomal S6 kinase*
PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*
PAX7, *paired-box 7*
PC1, *prohormone convertase 1*
PCSK1, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*
PDE3B, *phosphodiesterase 3B*
PDK1, *phosphoinositide-dependent kinase 1*
PEPCK, *phosphoénolpyruvate carboxykinase*
PGC-1 α , *PPAR-gamma coactivator-1 α*
PGE2, *prostaglandine E2*
PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*
PKA, *protéine kinase dépendante de l'AMPc*
PKB, *protéine kinase B*

PKC, protéine kinase C
PKG, protein kinase dépendante du GMPc
PLC, phospholipase C
POMC, pro-opiomélanocortine
PP, *pancreatic polypeptide*
PP2A, protéine phosphatase 2A
PPAR, *peroxysome proliferator-activated receptor*
PRDM16, *proline/arginine domain-containing 16*
PrRP, *prolactin-releasing peptide*
PS, peptide signal
PTP1B, protéine tyrosine phosphatase 1B
PVN, *paraventricular nucleus*, noyau paraventriculaire
PYY, peptide YY
QRFP, *pyroglutamylated RF-amide peptide*
Raf1, *rapidly accelerated fibrosarcoma 1*
RANTES, *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*
RAW, RAW264.7
RB, *retinoblastoma protein*
RCPG, récepteur couplé aux protéines G
RFa, RF-amide, arginine-phenylalanine-amide
RFRP, *RF-amide-related peptide*
RIP1, *receptor-interacting protein 1*
RIP140, *receptor interacting protein 140*
ROCK2, *Rho-associated kinase 2*
RXR, *retinoid X receptor*
SCD, stéaroyl-CoA désaturase
SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
Shc, *Src homology and collagen*
SMet, syndrome métabolique

SNC, système nerveux central
SNS, système nerveux sympathique
SOCS, *suppressor of cytokine signaling*
SON, *supraoptic nucleus*, noyau supraoptique
SREBP1c, *sterol regulatory element-binding protein 1c*
STAT, *signal transducer and activator of transcription*
TAB, *TAK-binding protein*
TAK1, *transforming growth factor- β -activated protein kinase 1*
TANK, *TRAF family member-associated NF- κ B activator*
TBK1, *TANK-binding kinase 1*
TCF7L1, *T cell-specific transcription factor 7-like 1*
TG, triglycéride
TGF- β , *transforming growth factor- β*
Th1, *T-helper 1 cells*
Th2, *T-helper 2 cells*
TIRAP, *TIR- domain-containing adapter protein*
TIR, *toll/IL-1 receptor*
TLE3, *transducin-like enhancer 3*
TLR-4, *toll-like receptor-4*
TLRs, *toll-like receptors*
TNF- α , *tumor necrosis factor- α*
TNF-R, *tumor necrosis factor receptor*
TRADD, *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*
TRAF6, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*
TRAM, *TRIF-related adaptor molecule*
Treg, lymphocytes T-régulateurs
TRIF, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
TSA, trichostatine A
TSH, *thyroid-stimulating hormone*

Tyk2, *tyrosine kinase 2*

TZDs, *thiazolidinediones*

Ubc13, *ubiquitin conjugating enzyme 13*

UCP-1, *uncoupling protein -1*

Uev1A, *ubiquitin conjugating enzyme variant 1A*

VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF, *vascular endothelial growth factor*

VLDL, *very low density lipoprotein*

VMH, *ventromedial hypothalamus*, hypothalamus ventromédian

WAT, *white adipose tissue*, tissu adipeux blanc

WT, *wild type*

ZFP423, *zinc-finger protein 423*

*À tous les étudiants qui doivent faire de
longues études graduées... la fin est possible*

Remerciements

J'aimerais remercier mes nombreux directeurs. Tout d'abord, Dr Huy Ong qui m'a accueilli avec enthousiasme dans son laboratoire et qui m'a donné la chance de faire un doctorat. Ensuite mes co-directeurs, présents ou passés, pour leur aide durant ces années Sylvie Marleau, Marc Servant et Daniel Lamontagne. Je dois ensuite remercier mon directeur de maîtrise, André De Léan, qui m'a personnellement initié à la recherche en pharmacologie et qui a eu un impact majeur sur ma formation de chercheur. Mes remerciements à Normand McNicoll que j'ai côtoyé durant toutes ces années et avec qui j'ai beaucoup appris.

Je veux remercier les collègues de travail que j'ai côtoyé durant ces 10 ans et avec qui j'ai pu avoir d'intéressantes discussions scientifiques. Tout d'abord, Petra et Dilan avec qui j'ai travaillé étroitement durant ce doctorat. Ensuite tous les membres du conglomerat Ong-Marleau : Kim, David R., Patrick, Annie, Valérie, François, Sanny, David H., Ève-Marie, Roxane, Cindy, Diala, Caroline et Mansouria. Je remercie les gens du laboratoire Servant : Simon-Pierre, Annie Dou, Valérie, J-F, Myriam, Annie B-P, Priscilla, Florence, Monique, Wendy, Tasheen, Kashif et J-P. Les gens du laboratoire Moreau : Céline, Liz-Ann, Simon, Rachida, Louise, les Mathieus, et Léa. Merci aussi à d'autres personnes à la Faculté : Véronique et François (chez Turgeon); Dima et Phillipe (chez Lamontagne); Nicolas, Isabelle et Anik (chez Adam); Marie-Hélène, Marie-Christine, Maud, Pierre, Marie-Andrée, Guillaume, Nicolas, Geneviève, David, Nada (chez Leroux); François, Anne, Johanne (chez Varin), Julie-Émilie (chez De Blois), Emanuelle, Jérôme et David (chez Lévesque). Finissons avec mes anciens collègues du département de pharmacologie. Du laboratoire De Léan : Simon, Marie, Yann, Julie D., Julie N. et Hugo. Sans oublier : M-E, Tanguy et Mathieu (chez Claing), Caroline et Lucie (chez Du Souich), Claudia et Greg (chez Trudeau), Audrey (chez Haddad), Josée (chez Beaulieu). Je reconnais aussi le support de mes amis qui ont aussi fait leur Ph.D. dans d'autres départements et qui étaient dans le même bateau que moi.

Chapitre I : Introduction

Dans le but d'établir le contexte dans lequel nos études ont été faites, cette thèse débutera avec une introduction sur l'obésité et ses conséquences métaboliques. L'emphase sera portée sur les facettes de l'obésité qui ont été abordées par nos études. Par la suite, une description plus détaillée sera faite le sujet principal de cette thèse : le *pyroglutamylated RF-amide peptide* (QRFP) et son récepteur, le *G protein-coupled receptor 103* (GPR103). La partie méthodologie et résultats sera présentée sous forme d'articles scientifiques. Suivra une discussion sur les résultats et les perspectives de nos études, de même qu'une discussion sur l'impact de nos découvertes sur le traitement pharmacologique de l'obésité.

1. L'obésité et ses conséquences métaboliques

L'obésité est une maladie reconnue par l'Organisation mondiale de la santé (Heshka & Allison, 2001) et qui est en expansion fulgurante parmi les pays industrialisés. L'obésité affecte plus de 400 millions d'adultes dans le monde, selon les estimations parues en 2005. Les adultes considérés avec un surplus de poids sont au nombre de plus de 1,6 milliards. La pandémie n'épargne pas les enfants avec 20 millions des moins de 5 ans qui ont un surplus de poids. Les prédictions pour 2015 font état de 2,3 milliards d'adultes en surplus de poids et 700 millions d'obèses dans le monde (Frag & Gaballa, 2011).

Un surplus de poids est défini comme un indice de masse corporelle (IMC) compris entre 25 et 30 kg/m². L'obésité est, quant à elle, décrite comme un IMC supérieur à 30 kg/m². L'obésité est un facteur de risque pour le développement de pathologies associées comme le diabète de type 2 (DT2), les maladies cardiovasculaires et la stéatose hépatique non-alcoolique. Étant donné la morphologie variable des personnes et la distribution différentielle de leur masse grasseuse, le seul critère de l'IMC peut être trompeur pour juger de l'état de santé d'une personne. On tente plutôt de diagnostiquer le syndrome métabolique (SMet) comme facteur de risque de ces pathologies métaboliques associées à l'obésité (Leroith, 2012).

Les critères exacts définissant le SMet n'ont pas toujours fait l'objet d'un consensus dans la littérature. Dans le but d'harmoniser la définition du SMet, l'*International Diabetes Federation*, l'*American Heart Association*, la *National Institute of Heart, Lung and Blood*, la *World Heart Federation*, l'*International Atherosclerosis Society* et l'*International Association for the Study of Obesity* ont publié une déclaration conjointe en 2009 (Leroith, 2012). Les critères sont décrits dans le Tableau 1. La présence de 3 critères sur 5 peut définir le SMet. Le SMet peut ainsi être décrit comme une entité qui comprend l'obésité abdominale, l'intolérance au glucose, les dyslipidémies et l'hypertension, l'obésité étant le facteur le plus souvent présent. Avec une prévalence entre 35 et 43%, le SMet est le plus élevé chez les personnes de race blanche (Leroith, 2012).

Tableau 1 : Critères pour le diagnostic du SMet (Leroith, 2012)

Facteur de risque	Niveau
Obésité abdominale	
Tour de taille	
Homme	> 102 cm
Femme	> 88 cm
Triglycérides (mg/dL)	≥ 150
HDL-C (mg/dL)	
Homme	< 40
Femme	< 50
Pression sanguine (mmHg)	≥130/≥85
Glucose à jeun (mg/dL)	≥100

HDL-C : High density lipoprotein-cholesterol

Certaines maladies génétiques rares sont connues pour causer le SMet. Les molécules impliquées dans celles-ci seront mentionnées tout au long de cette thèse. Cependant, le SMet est le plus souvent causé par un mélange de facteurs génétiques et environnementaux (Chung & Leibel, 2008).

1. 1. L'obésité

L'obésité et le surplus de poids sont causés par un excès d'entreposage de gras corporel. Un apport énergétique nutritionnel supérieur à la dépense mène au stockage de cette énergie sous forme de TGs dans le tissu adipeux. Cette partie abordera les types de tissu adipeux, les mécanismes de stockage (l'adipogenèse et la lipogenèse) ou de distribution (lipolyse), la régulation de l'apport énergétique (l'appétit), les mécanismes de contrôle du métabolisme (catabolisme vs anabolisme), un mécanisme de dépense énergétique (la thermogenèse) ainsi que le rôle endocrinien du tissu adipeux (adipokines).

1. 1. 1. Les tissus adipeux et leurs implications pathophysiologiques

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif composé principalement d'adipocytes. Il est aussi composé des cellules de la fraction stromale vasculaire, c'est-à-dire les cellules sanguines, incluant les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les péricytes, les préadipocytes, les fibroblastes et les cellules nerveuses. La masse adipeuse est dépendante de la grosseur des adipocytes (l'hypertrophie) et de leur nombre (l'hyperplasie) (Spalding *et al.*, 2008). Alors qu'une hyperplasie du tissu adipeux résulte en une expansion physiologique d'adipocytes fonctionnels, l'hypertrophie entraîne plutôt une expansion pathologique qui amène des dysfonctions associées avec l'inflammation (Sun *et al.*, 2011).

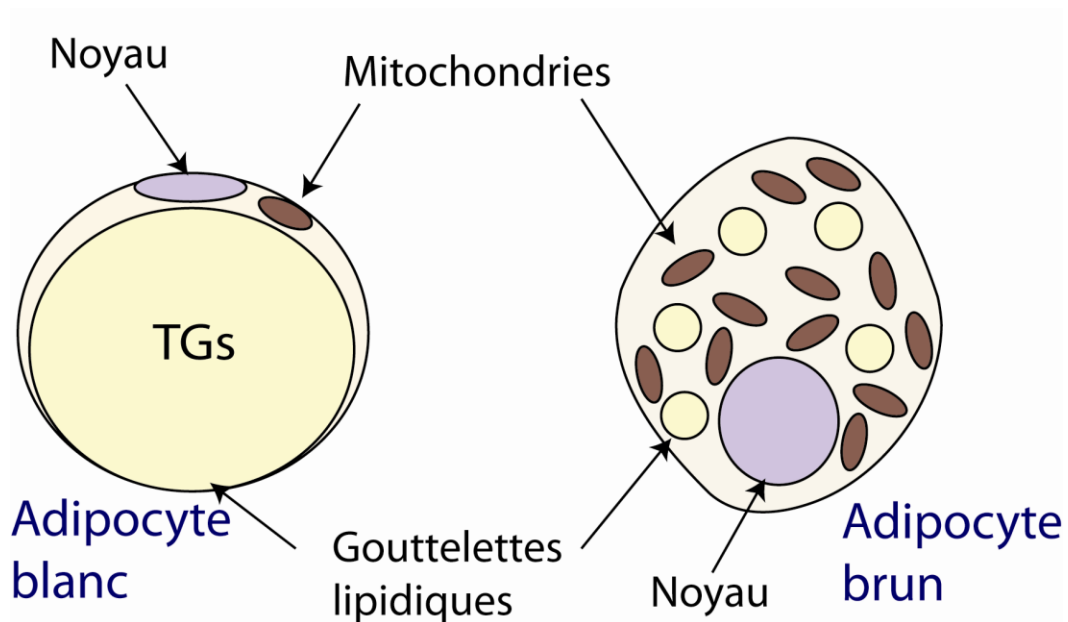


Figure 1 : Structure cellulaire des adipocytes blancs et bruns. Les adipocytes blancs et bruns diffèrent au niveau structural par leur forme, leurs gouttelettes lipidiques et leurs mitochondries. TGs, triglycérides.

Il existe deux catégories de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc (l'acronyme anglais sera utilisé pour différencier les deux tissus : *white adipose tissue*, WAT) et le tissu adipeux brun (*brown adipose tissue*, BAT). Le WAT a un rôle de réservoir d'énergie qu'il entrepose sous forme de TGs dans les adipocytes blancs. Les adipocytes blancs ont une forme sphérique et contiennent une grande gouttelette lipidique uniloculaire (Fig. 1). Le BAT, qui est composé d'adipocytes bruns, dissipe l'énergie sous forme de chaleur, un processus appelé thermogenèse. Les adipocytes bruns ont une forme polygonale et contiennent des gouttelettes lipidiques multiloculaires ainsi qu'une grande quantité de mitochondries ce qui leur donne une coloration brune (Figure 1) (Ravussin & Galgani, 2011).

La distribution du tissu adipeux dans le corps dictera son impact patho-physiologique. Ainsi, le WAT peut être sous-divisé principalement en deux sous-catégories : le tissu intra-abdominal (ou viscéral) et le tissu sous-cutané. Le tissu adipeux intra-abdominal est situé dans la cavité abdominale, en contact étroit avec les viscères. Le tissu adipeux sous-cutané est quant à lui localisé entre les muscles et la peau. Des différences entre ces deux types de WAT existent au niveau de la composition cellulaire, de la fonction endocrinienne et de l'activité lipolytique (Ibrahim, 2010).

1. 1. 1. 1. Le tissu adipeux intra-abdominal (viscéral)

Le tissu adipeux intra-abdominal représente environ 10-20 % du gras total chez l'homme et 5-8 % chez la femme (Wajchenberg, 2000). Malgré ce pourcentage minoritaire, son accumulation est fortement corrélée avec les problèmes associés à l'obésité et le SMet (Ibrahim, 2010). Ceci est la principale raison pourquoi le ratio tour de taille/tour de hanche est un meilleur prédicateur du SMet que l'IMC. En fait, l'adiposité abdominale est un prédicateur de la mortalité indépendant de l'IMC (Kuk *et al.*, 2006). Le tissu adipeux intra-abdominal est composé de différents dépôts tels que le gras omental, le gras mésentérique et le gras rétro-péritonéal (Wajchenberg, 2000). Le tissu intra-abdominal est plus vascularisé

et innervé que le sous-cutané. La circulation veineuse du gras intra-abdominal est drainée par la veine porte qui se déverse directement dans le foie. C'est pourquoi un changement du secrétome de ce tissu adipeux aura un effet hépatique immédiat (Ibrahim, 2010).

Les adipocytes contenus dans le tissu intra-abdominal sont plus souvent hypertrophiés. Ils sont gorgés de TGs et sont dysfonctionnels (Marin *et al.*, 1992). Ils sont résistants à l'insuline et ont une activité lipolytique plus élevée. Il a été montré que les adipocytes viscéraux sont plus sensibles aux stimulations lipolytiques β -adrénergiques et moins sensibles aux effets anti-lipolytiques des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques et de l'insuline (Ibrahim, 2010). Ceci peut être expliqué par une plus faible expression des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques dans ce tissu (Vohl *et al.*, 2004). En plus de l'effet sur la lipolyse, la résistance à l'insuline se fait aussi sentir au niveau du captage du glucose (Ibrahim, 2010).

Les adipocytes du tissu viscéral expriment moins de facteurs de transcription favorisant l'adipogenèse, comme la *CCAAT/enhancer binding protein- α* (C/EBP- α), et plus de gènes du système WNT, comme *Frizzled7*, associés avec la répression de la différenciation, comparativement aux adipocytes du tissu sous-cutané (Vohl *et al.*, 2004).

Au niveau de la sécrétion d'adipokines, le tissu viscéral est plus actif que le tissu sous-cutané. Il est aussi plus fortement infiltré par les cellules immunitaires. Ainsi l'adiponectine, la *C-reactive protein* (CRP), le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6), la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), l'angiotensinogène et le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) sont plus fortement exprimés dans le tissu intra-abdominal que dans le sous-cutané (Ibrahim, 2010).

Une perte de poids présente une diminution (en %) plus rapide au niveau viscéral qu'au niveau sous-cutané. La façon de perdre ce poids n'influe pas sur cette diminution (Ibrahim, 2010).

1. 1. 1. 2. Le tissu adipeux sous-cutané

Le tissu adipeux sous-cutané représente environ 80% de la masse totale de gras corporel. Contrairement au WAT intra-abdominal, le tissu sous-cutané est drainé par les veines de la circulation, ce qui entraîne moins de conséquences métaboliques directes. Les adipocytes du tissu sous-cutané sont souvent petits et agissent comme des capteurs d'acides gras libres (AGLs) pour empêcher leur dépôt dans les tissus non-adipeux. Ils sont aussi plus sensibles à l'insuline que les adipocytes du tissu intra-abdominal qui sont souvent hypertrophiés (Ibrahim, 2010).

Le tissu sous-cutané joue un rôle endocrinien moins important que le viscéral. Toutefois, la leptine circulante est majoritairement sécrétée par les adipocytes sous-cutanés (Ibrahim, 2010).

1. 1. 1. 3. Le tissu adipeux brun

Le BAT n'a pas un rôle de stockage d'énergie comme le WAT. Il joue plutôt un rôle de producteur de chaleur et est donc un consommateur d'énergie (Ravussin & Galgani, 2011).

Jusqu'à récemment, on croyait que le BAT chez l'humain n'était présent que chez le nouveau-né. Pour assurer sa thermorégulation, le nouveau-né doit produire beaucoup de chaleur d'où la présence d'une appréciable quantité de BAT. Après seulement quelques mois de vie, la thermogenèse et la forte dépense énergétique qui y est associée diminuent. La quantité de BAT diminue progressivement avec le temps et c'est pourquoi on croyait ce tissu absent chez l'adulte. Les nouvelles technologies, telle que la tomographie par émission de positrons, ont permis de revisiter cette croyance en 2007 (Nedergaard *et al.*, 2007). L'humain adulte possède deux types de dépôt de BAT : les dépôts distincts et les dépôts diffus. Les dépôts distincts sont situés dans les régions supraclaviculaire-cervicale, périrénale/surrénale et paravertébrale, autour des vaisseaux sanguins majeurs comme les carotides, sous-clavières, intercostales et rénales (Ravussin & Galgani, 2011). Les dépôts diffus sont en coexistence avec les autres types cellulaires dans le tissu musculaire

squelettique et le WAT. Les deux types de dépôts sont soupçonnés de provenir de la différenciation de types cellulaires différents avec une expression différentielle de gènes, notamment du *myogenic factor 5* (Myf5) exprimé seulement dans les dépôts distincts (Ravussin & Galgani, 2011). Au fur et à mesure que l'obésité progresse, l'activité métabolique du BAT diminue (Stephens *et al.*, 2011).

1. 1. 2. La régulation de l'appétit

L'apport nutritionnel représente un côté de la balance énergétique. Son contrôle a donc un impact significatif sur l'obésité. La régulation de l'appétit consiste en une intégration de signaux provenant de la disponibilité des nutriments, du poids corporel et de l'adiposité. Ainsi, les signaux proviennent de multiples parties du corps pour agir sur le système nerveux central (SNC). Les signaux régulant l'appétit peuvent être activateurs (orexigènes) ou inhibiteurs (anorexigènes). L'intégration de ces signaux se fait principalement au niveau de l'hypothalamus, mais aussi au niveau du complexe vagal dorsal. Étant partiellement situé en dehors de la barrière sang-cerveau, le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus est reconnu pour intégrer la multiplicité des signaux régulant l'appétit (Small & Bloom, 2004).

Étant donné les multiples facteurs affectant l'appétit, le but de cette partie est de comprendre les principaux mécanismes centraux agissants au niveau du noyau arqué (ARC). Il sera aussi question des facteurs périphériques qui modulent l'appétit. Les sites d'expression des facteurs hypothalamiques régulant l'appétit au niveau du ARC sont schématisés dans la Figure 2. Les sites d'actions sont résumés dans la Figure 3.

1. 1. 2. 1. Les signaux orexigènes

Plusieurs facteurs orexigènes centraux ont été identifiés dont le neuropeptide Y (NPY), le *agouti-related peptide* (AGRP), les orexines, la *melanin concentrating hormone*

(MCH), la galanine, les opioïdes endogènes et les endocannabinoïdes. Le QRFP fait aussi partie de ce groupe. Provenant principalement de la périphérie, la ghréline et l'adiponectine sont aussi des hormones orexigènes (Arora & Anubhuti, 2006).

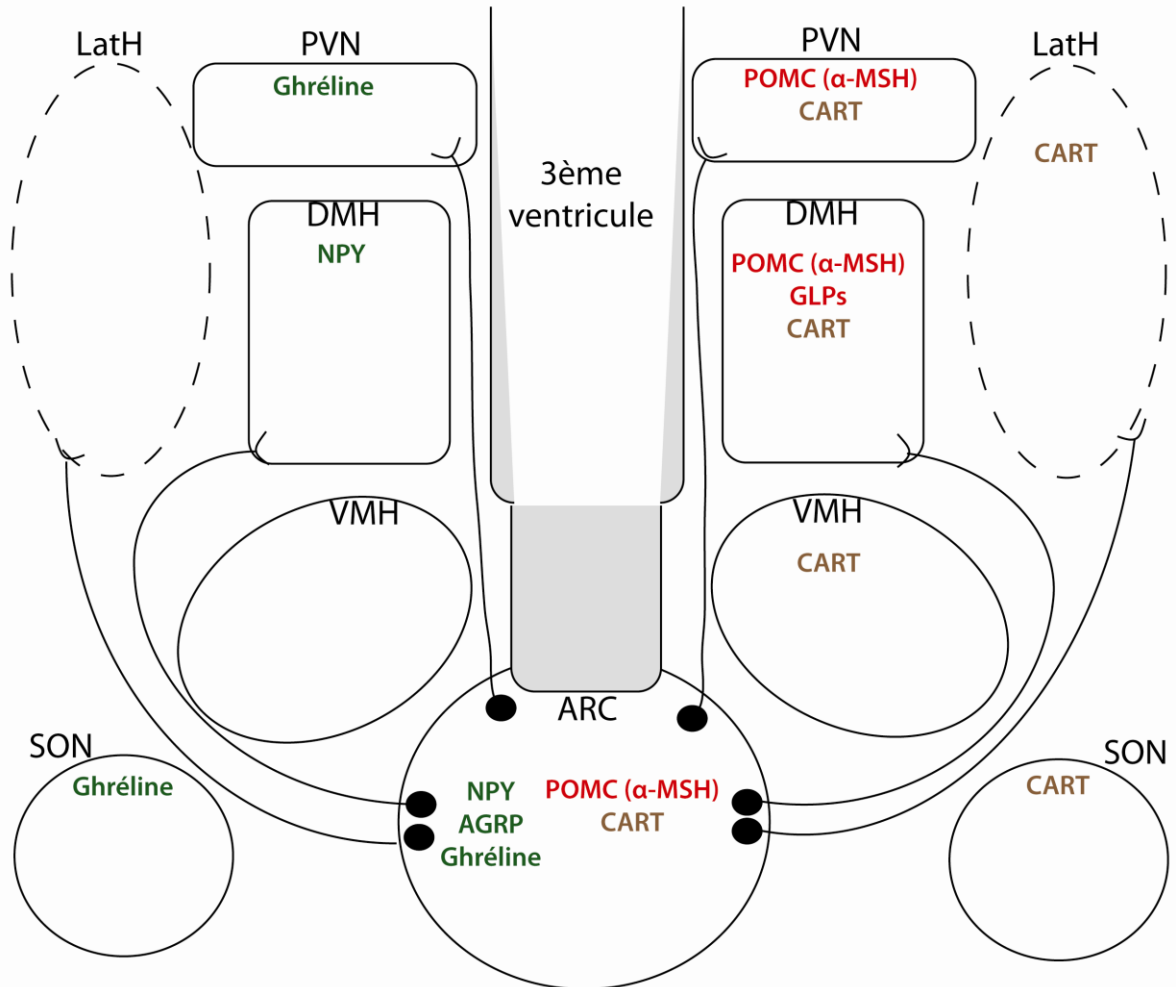


Figure 2 : Sites d'expression des facteurs hypothalamiques régulant l'appétit. Les facteurs orexigènes sont à gauche et en vert. Les facteurs anorexigènes sont à droite et en rouge. Le *cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART), dont l'effet sur l'appétit n'est pas clair, est en brun. AGRP, *agouti-related peptide*; ARC, noyau arqué; DMH, hypothalamus dorsomédian; GLPs, *glucagon-like peptides*; LatH, hypothalamus latéral; α-MSH, *α-melanocyte stimulating hormone*; NPY, neuropeptide Y; POMC, pro-opiomélanocortine; PVN, noyau paraventriculaire; SON, noyau supraoptique; VMH, hypothalamus ventromédian. Figure inspirée de Parker et Bloom (Parker & Bloom, 2012).

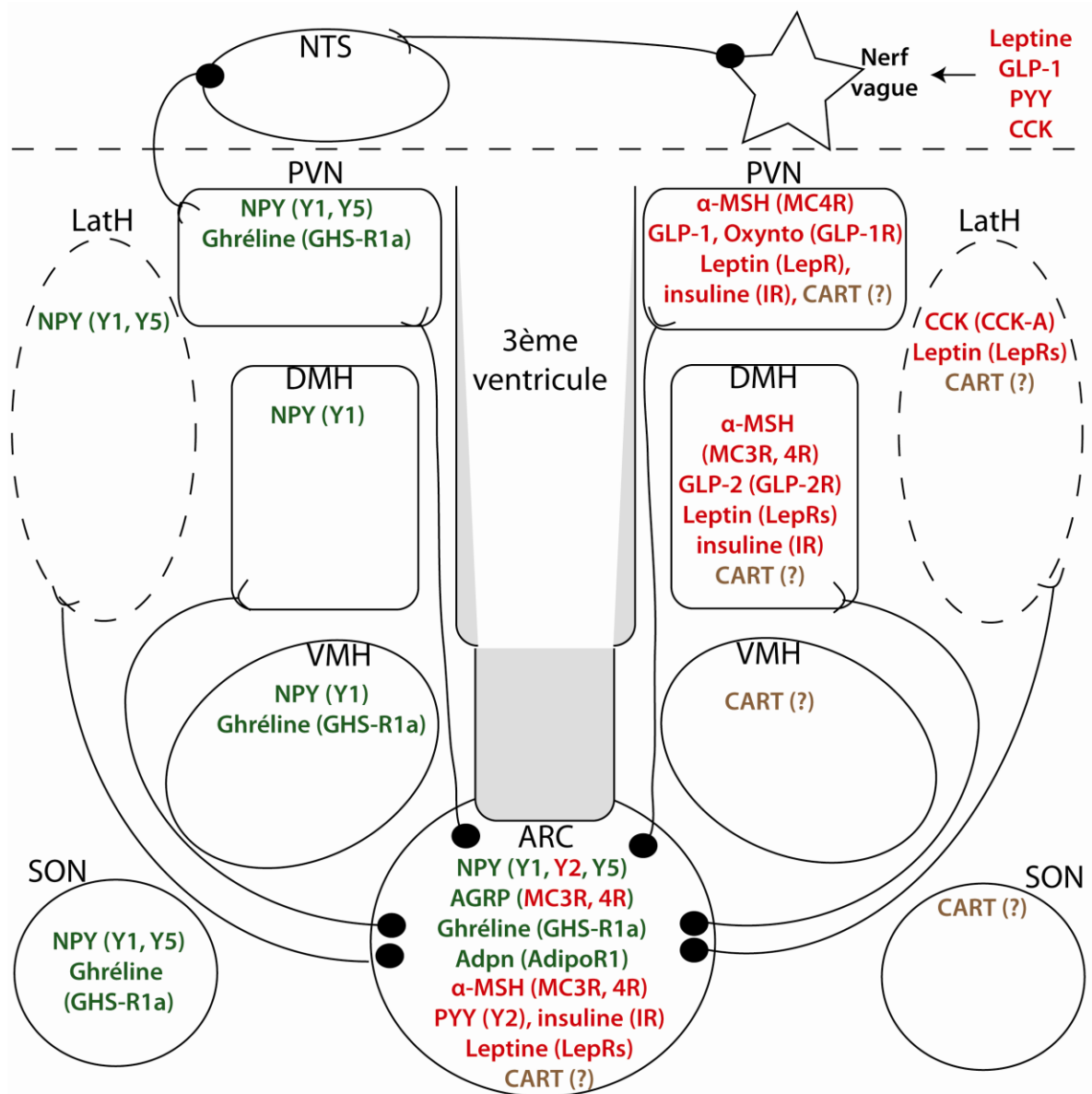


Figure 3 : Sites d'action des facteurs hypothalamiques régulant l'appétit. Les facteurs et récepteurs orexigènes sont à gauche et en vert. Les facteurs et récepteurs anorexigènes sont à droite et en rouge. Le *cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART), dont l'effet sur l'appétit n'est pas clair, est en brun. Les récepteurs impliqués sont entre parenthèses. AdipoR1, *adiponectin receptor 1*; Adpn, adiponectine; AGRP, *agouti-related peptide*; ARC, noyau arqué; CCK, cholecystokinine; CCK-A, *cholecystokinine-A receptor*; DMH, hypothalamus dorsomédian; GHS-R1a, *growth hormone secretagogue-receptor 1a*; GLP-1, *glucagon-like peptide-1*; GLP-2, *glucagon-like peptide-2*; GLP-1R, *glucagon-like*

peptide-1 receptor; GLP-2R, *glucagon-like peptide-2 receptor*; IR, *insulin receptor*; LepRs, *leptin receptors*; LatH, hypothalamus latéral; MC3R, *melanocortin-3 receptor*; MC4R, *melanocortin-4 receptor*; α -MSH, *α -melanocyte stimulating hormone*; Oxynto, oxyntomoduline; NPY, neuropeptide Y; NTS, *nucleus of the solitary tract*; POMC, pro-opiomélanocortine; PVN, noyau paraventriculaire; PYY, peptide YY; SON, noyau supraoptique; VMH, hypothalamus ventromédian; Y1, Y2, Y5, récepteurs Y1, Y2, Y5 du NPY. Figure inspirée de Parker et Bloom (Parker & Bloom, 2012).

Le NPY est le peptide le plus abondant de l'hypothalamus et est reconnu comme un des facteurs les plus orexigènes (Edwards *et al.*, 1999). Le noyau arqué (ARC) est le site principal où sont situés les neurones NPY positifs. Les neurones NPY projettent dans d'autres noyaux de l'hypothalamus reconnus pour l'activation de l'appétit dont le noyau paraventriculaire (PVN), l'hypothalamus dorsomédian (DMH) et l'aire latérale de l'hypothalamus (LatH). L'activation des neurones NPY positifs a aussi comme effet d'inhiber par hyperpolarisation les neurones pro-opiomélanocortine (POMC) positifs et GABAergiques du ARC qui médient un effet anorexigène (Roseberry *et al.*, 2004). Une administration intracérébroventriculaire (ICV) de NPY chez le rat produit une augmentation puissante et prolongée de la consommation de nourriture (Clark *et al.*, 1984). Une administration chronique mène à l'hyperphagie, l'obésité et une diminution de la thermogénèse (Stanley *et al.*, 1986). L'expression hypothalamique du NPY se trouve à être augmentée dans des modèles animaux où l'appétit est augmentée (Wilding *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1989). Curieusement, les souris déficientes en NPY n'ont pas de phénotype au niveau de l'appétit et du poids corporel dans des conditions normales (Erickson *et al.*, 1996). Leur appétit est cependant diminué lors d'un jeûne, suggérant un rôle biologique plus important dans cette situation (Bannon *et al.*, 2000).

Le NPY lie les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6. L'effet orexigène du NPY est médié par les récepteurs Y1 exprimés dans le ARC, le VMH, le DMH, le PVN, le LatH et le noyau supraoptique (SON), ainsi que par les récepteurs Y5 exprimés dans le ARC, le PVN, le LatH et le SON (Parker & Bloom, 2012). Le récepteur

Y2, exprimé dans le ARC, agirait comme un autorécepteur inhibiteur de la sécrétion du NPY (Broberger *et al.*, 1997). En état de jeûne, l'expression des récepteurs diminue alors que celle du NPY augmente (Kalra *et al.*, 1991).

Le deuxième facteur orexigène d'importance dans le ARC est le AGRP. Le AGRP est exprimé exclusivement dans le ARC et se colocalise avec les neurones NPY positifs. Le AGRP agit comme un antagoniste endogène du *melanocortin-3 receptor* (MC3R) (Ollmann *et al.*, 1997) et un agoniste inverse du *melanocortin-4 receptor* (MC4R) (Nijenhuis *et al.*, 2001), qui sont deux récepteurs anorexigènes. L'injection de AGRP par la voie ICV augmente la consommation de nourriture pour une longue période, jusqu'à une semaine (Rossi *et al.*, 1998). L'administration chronique mène à l'obésité (Small *et al.*, 2001). Comme dans le cas des souris déficientes en NPY, les souris déficientes en AGRP n'ont pas de phénotype particulier au niveau du poids ou de l'appétit (Qian *et al.*, 2002). Le AGRP serait donc un modulateur de l'appétit, sans être nécessaire pour sa stimulation (Parker & Bloom, 2012).

La ghréline est une hormone circulante sécrétée principalement par l'estomac (Kojima *et al.*, 1999). La ghréline est aussi exprimée dans l'hypothalamus au niveau du ARC, du PVN et du SON (Mondal *et al.*, 2005). Une administration centrale ou périphérique de ghréline augmente la consommation de nourriture, le poids corporel et diminue l'utilisation des graisses (Tschop *et al.*, 2000). La ghréline active le RCPG GHS-R1a qui est exprimé, entre autres, dans le SON, le VMH, le ARC et le PVN (Parker & Bloom, 2012). La ghréline agirait sur l'appétit par la production de NPY et de AGRP dans le ARC (Chen *et al.*, 2004). Les niveaux circulants de ghréline augmentent durant le jeûne et diminuent suivant un repas (Ariyasu *et al.*, 2001). Les personnes obèses ont des niveaux circulants diminués de ghréline (Tschop *et al.*, 2001b).

L'adiponectine est une adipokine, elle est sécrétée principalement par les adipocytes. Malgré que ses actions bénéfiques sur le métabolisme amènent une réduction du poids corporel (Fruebis *et al.*, 2001), il a été montré récemment que l'adiponectine

présente un effet orexigène médié par le *adiponectin receptor 1* (AdipoR1) exprimé dans le ARC. Cette action serait dépendante de la sécrétion de l'AGRP (Guillod-Maximin *et al.*, 2009; Kubota *et al.*, 2007).

1. 1. 2. 2. Les signaux anorexigènes

Les principaux facteurs anorexigènes centraux sont la *α-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH), les *glucagon-like peptides* (GLPs), le *corticotropin releasing factor* (CRF), la sérotonine, l'oxytocine et la neurotensine. Provenant de la périphérie, il y a les GLPs, l'oxyntomoduline, le peptide YY (PYY), la cholecystokinine (CCK), le *pancreatic polypeptide* (PP), la leptine, l'insuline et l'amyline.

La α -MSH est un produit de clivage post-traductionnel du gène POMC. Dans l'hypothalamus, elle est exprimée dans le DMH, le PVN et le ARC (Parker & Bloom, 2012). Au niveau du ARC, la α -MSH se colocalise avec le *cocaine and amphetamine related transcript* (CART). L'injection de α -MSH dans le ARC, le PVN ou le DMH amène une diminution de la consommation de nourriture (Kim *et al.*, 2000). La α -MSH active les récepteurs MC3R et MC4R. Tel que mentionné précédemment, le AGRP agit comme un antagoniste et un agoniste inverse, respectivement, de ces récepteurs. Au niveau hypothalamique, le MC4R est exprimé dans le ARC, le PVN et le DMH (Kishi *et al.*, 2003). Le MC3R est, quant à lui, exprimé dans le ARC et le DMH (Roselli-Rehfuß *et al.*, 1993). Les souris déficientes en MC3R ont un poids corporel et une masse adipeuse un peu plus élevés, mais sans hyperphagie, suggérant un rôle moins important pour ce récepteur dans l'appétit (Chen *et al.*, 2000a). Les souris déficientes en MC4R montrent un phénotype obèse et hyperphagique (Huszar *et al.*, 1997). Cependant, leur réponse à un agoniste des récepteurs à la mélanocortine entraîne une diminution de seulement 3% de l'appétit contre 20% pour les souris de type sauvage (Chen *et al.*, 2000b). Mentionnons quelques maladies génétiques en rapport avec la mélanocortine qui causent l'obésité. Les mutations fonctionnelles du MC4R causent une obésité juvénile sévère et représentent environ 4% de ces cas cliniques (Farooqi *et al.*, 2000). De même, le syndrome de déficience en POMC

cause une obésité sévère précoce, une insuffisance surrénalienne et des cheveux roux (Krude *et al.*, 1998). La prohormone convertase 1 (PC1, aussi connu sous le nom de *proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*, PCSK1) clive le produit du gène POMC pour produire l'adrénocorticotrophine (ACTH). L'ACTH est ensuite clivé par la carboxypeptidase E pour générer la α -MSH (Bicknell, 2008). La PC1 est aussi impliquée dans le clivage de la proinsuline en insuline (Goodge & Hutton, 2000). Les personnes déficientes en PC1 sont sévèrement obèses, ont une déficience en glucocorticoïdes, souffrent d'hypogonadisme et d'hypoglycémie postprandiale (Jackson *et al.*, 1997).

Dans l'hypothalamus, le CART est exprimé dans le ARC, le PVN, le SON, le LatH, le VMH et le DMH (Koylu *et al.*, 1997). Dans le ARC, le CART se colocalise avec la POMC. Dans le PVN, le CART se colocalise avec l'oxytocine et la vasopressine. Dans le LatH, il se colocalise avec la MCH (Vrang *et al.*, 1999). L'effet du CART sur l'appétit est fortement controversé. L'injection de CART par voie ICV fait diminuer la consommation de nourriture (Lambert *et al.*, 1998). Au contraire, des injections locales dans différents noyaux tels que le ARC, le VMH, le PVN, le SON, le DMH et le LatH ont résulté en un effet orexigène retardé (Abbott *et al.*, 2001). Les souris déficientes en CART ne démontrent pas de phénotype au niveau de l'appétit (Wierup *et al.*, 2005). Le récepteur du CART n'a pas été identifié. Toutefois le CART semble avoir des effets sur l'hypothalamus et dans le tronc cérébral, ce qui pourrait expliquer un effet différentiel sur l'appétit selon la méthode d'administration (Parker & Bloom, 2012).

Les GLPs proviennent du SNC et de la périphérie. Le GLP-1 et le GLP-2 proviennent du même gène que le glucagon. Ils sont exprimés dans les cellules « L » de l'intestin et dans le tronc cérébral. Suite à un repas, les GLPs sont sécrétés dans la circulation par l'intestin. Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions comme l'homéostasie du glucose, la vidange gastrique, la sécrétion d'insuline et la régulation de l'appétit (Arora & Anubhuti, 2006). L'administration centrale de GLP-1 (Kinzig *et al.*, 2002) ou de GLP-2 (Schmidt *et al.*, 2003) amène un signal de satiété. La distribution du GLP-1 et du GLP-2 dans le SNC se colocalise parfaitement avec une grande concentration dans le DMH. Ayant des récepteurs différents avec des patrons d'expression différents, le GLP-1 semble médier

son effet par le PVN alors que le GLP-2 agirait sur le DMH (Tang-Christensen *et al.*, 2001).

Provenant du même gène que les GLPs et le glucagon, l'oxyntomoduline est aussi sécrétée par les cellules « L » suite à un repas (Ghatei *et al.*, 1983). L'oxyntomoduline a un effet anorexigène qui semble être partiellement dépendant du GLP-1R, le récepteur des GLPs (Baggio *et al.*, 2004). Toutefois, comme les effets centraux des GLPs et de l'oxyntomoduline sont différents, il pourrait exister un récepteur pour l'oxyntomoduline inconnu jusqu'à présent (Field *et al.*, 2009).

Le PYY est de la même famille que le NPY. Il existe sous deux formes circulantes, le PYY₁₋₃₆ et le PYY₃₋₃₆. Cette dernière est une forme qui résulte d'un clivage par la dipeptidyl peptidase IV (Eberlein *et al.*, 1989). Comme le NPY, les PYYs agissent sur les récepteurs Y du NPY au niveau hypothalamique (Le Roux & Bloom, 2005). L'administration centrale du PYY₁₋₃₆ semble avoir un effet orexigène (Hagan, 2002). Le PYY₃₋₃₆ aurait toutefois un effet inhibiteur sur les neurones NPY positifs et un effet activateur sur les neurones POMC positifs (Le Roux & Bloom, 2005). Comme les GLPs, le PYY est aussi sécrété par les cellules « L » intestinales, surtout dans la partie distale de l'intestin (Ekblad & Sundler, 2002). Le PYY est sécrété après un repas et atteint sa concentration circulante maximale après 1-2 heures (Adrian *et al.*, 1985a). La quantité de PYY sécrétée est proportionnelle à la valeur énergétique du repas (Lin & Chey, 2003). L'administration de PYY diminue la consommation de nourriture, retarde la vidange gastrique, retarde la sécrétion gastrique et pancréatique et augmente l'absorption intestinale (Adrian *et al.*, 1985b; Batterham *et al.*, 2002). La perfusion de PYY fait chuter les niveaux plasmatiques de ghréline. Ainsi, le PYY₃₋₃₆ servirait de signal de satiété signifiant la fin d'un repas avec un effet indirect partiel sur la ghréline (Batterham *et al.*, 2003). Chez les personnes obèses, les niveaux de PYY circulants, avant et après un repas, sont plus bas (Batterham *et al.*, 2003).

La CCK est un peptide sécrété par les cellules « I » de la partie proximale de l'intestin. Sa sécrétion est stimulée en réponse aux nutriments et sa concentration

plasmatique reste élevée jusqu'à 5 heures après le repas (Liddle *et al.*, 1985). La CCK serait un signal de satiété et influencerait la taille des repas (Crawley & Corwin, 1994). La CCK agirait directement sur le SNC, notamment au niveau du LatH, mais aussi par l'entremise du nerf vague (MacLean, 1985).

Le PP est sécrété par les cellules « F » situées en périphérie des îlots pancréatiques et aussi par le colon (Ekblad & Sundler, 2002). La concentration plasmatique de PP augmente après l'ingestion de nutriments et demeure élevée jusqu'à 6 heures après un repas. Sa sécrétion est aussi proportionnelle à la teneur énergétique du repas (Track *et al.*, 1980). Son administration périphérique a pour effet de diminuer la consommation de nourriture (Asakawa *et al.*, 2006). Cet effet serait médié en partie par le nerf vague (Asakawa *et al.*, 2003) et par le récepteur Y4 du NPY (Lin *et al.*, 2009). Les souris déficientes en PP n'ont toutefois pas de phénotype particulier au niveau du poids ou de l'appétit (Wortley *et al.*, 2007).

La leptine est une hormone produite par le gène *ob* (Zhang *et al.*, 1994) et sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, mais aussi par l'estomac, le placenta, les glandes mammaires et le follicule ovarien (Trayhurn *et al.*, 1999). La production de leptine corrèle avec la masse adipeuse (Maffei *et al.*, 1995). La leptine possède plusieurs effets métaboliques qui seront décrits plus tard dans cette thèse. Chez le rongeur, une déficience en leptine (*ob/ob*) ou en son récepteur (*db/db*) mène à l'hyperphagie, à l'obésité et au DT2 (Coleman, 2010). Chez l'humain, il existe aussi des mutations de la leptine qui amènent une obésité juvénile sévère et un hypogonadisme (Montague *et al.*, 1997). La leptine circulante est transportée à travers la barrière hémato-encéphalique par un mécanisme saturable (Banks *et al.*, 1996). Les récepteurs de la leptine, les LepRs qui incluent au moins 3 isoformes, sont exprimés dans l'hypothalamus, plus précisément dans le ARC, le PVN, le DMH et le LatH (Arora & Anubhuti, 2006). La leptine aurait comme effet de diminuer la sécrétion de NPY, de MCH, d'orexines et de AGRP et d'augmenter la sécrétion de α -MSH, de CART et de CRH (Jequier, 2002).

L'insuline est sécrétée par le pancréas suite à un repas (Polonsky *et al.*, 1988). Les niveaux circulants d'insuline sont proportionnels à l'adiposité (Bagdade *et al.*, 1967). L'obésité viscérale est cependant associée avec une résistance à l'insuline (Porte, Jr. *et al.*, 2002). L'insuline pénètre la barrière hémato-encéphalique par l'entremise d'un transporteur (Baura *et al.*, 1993). Le récepteur de l'insuline (IR) est exprimé dans plusieurs régions du cerveau, incluant le ARC, le PVN et le DMH (Marks *et al.*, 1990). L'administration d'insuline par voie ICV diminuerait l'expression du NPY et augmenterait l'expression de POMC (Air *et al.*, 2002; Benoit *et al.*, 2002). La délétion sélective du IR dans le SNC amène une obésité et une dyslipidémie (Bruning *et al.*, 2000).

Comme l'insuline, l'amyline est sécrétée par les cellules β du pancréas en réponse à un repas et possède un effet anorexigène (Bhavsar *et al.*, 1998). L'amyline semble médier son effet central sur la *area postrema* du cerveau (Lutz, 2005). L'amyline semble agir par la modulation de facteurs périphériques et centraux qui agissent sur l'appétit tels que la CCK, le glucagon, les systèmes sérotoninergique, histaminergique et dopaminergique (Arora & Anubhuti, 2006).

1. 1. 3. La régulation du métabolisme par l'AMPK

L'*adenosine monophosphate activated protein kinase* (AMPK) est la protéine qui contrôle le métabolisme d'une cellule. L'AMPK est une enzyme ubiquitaire de la famille des kinases qui catalyse la phosphorylation de protéines-cibles dont l'activité sera modulée. L'AMPK est maintenant reconnue pour son rôle majeur dans la balance énergétique, tant au niveau périphérique que central. En effet, elle régule le métabolisme dans les tissus périphériques, mais aussi la consommation de nourriture au niveau du système nerveux central. Elle joue le double rôle de senseur et de régulateur du métabolisme (Kahn *et al.*, 2005). Globalement, l'activation de l'AMPK dans les tissus périphériques active les voies cataboliques productrices d'adénosine triphosphate (ATP) et inhibe les voies anaboliques consommatrices d'ATP. Au niveau central, cette activation

amène une augmentation de la consommation de nourriture (Carling, 2004). Le rôle de cette kinase semble primordial puisque des protéines homologues sont retrouvées dans tous les organismes eucaryotes (Hardie, 2004b).

La régulation de l'activité de l'AMPK est contrôlée principalement par le rapport adénosine monophosphate (AMP):ATP dans la cellule, c'est à dire son état énergétique (Figure 3). Lorsque la quantité d'ATP est grande, l'ATP inhibe directement l'AMPK qui peut lier l'AMP ou l'ATP de façon mutuellement exclusive. L'utilisation de l'ATP par la cellule mène à la formation de l'adénosine diphosphate (ADP). Cet ADP est ensuite transformé en AMP par l'adénylate kinase ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$), une réaction presque à l'équilibre (Hardie & Hawley, 2001). Ainsi, lorsque la consommation d'ATP est grande, le rapport AMP:ATP augmente et l'AMPK est activée. L'ATP n'inhibe plus l'AMPK et l'AMP active directement l'AMPK. L'AMPK peut aussi être activée suite à sa phosphorylation, sur la thréonine-172 chez les mammifères, par une kinase en amont. La *liver kinase B1* (LKB1) et la *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* (CaMKK2) ont été identifiées comme des kinases de l'AMPK (Carling *et al.*, 2008).

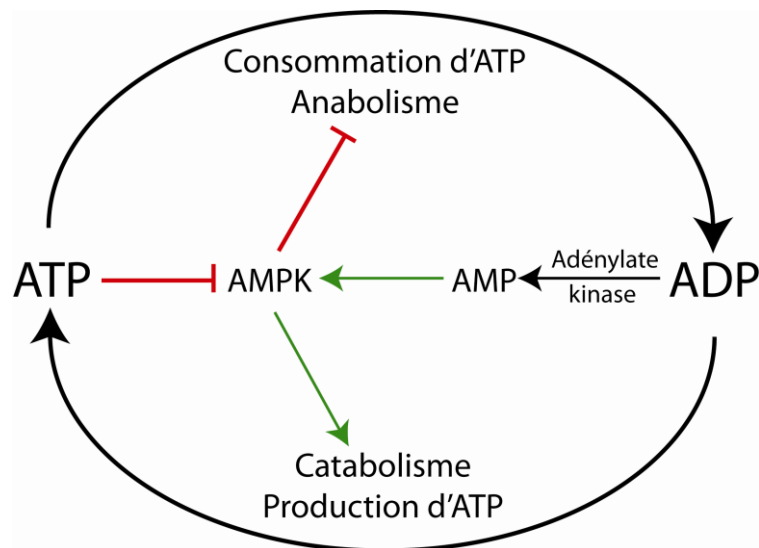


Figure 4 : Régulation et effets de l'AMPK. ADP, adénosine diphosphate; AMP, adénosine monophosphate; AMPK, adenosine monophosphate activated kinase; ATP, adénosine triphosphate. Figure modifiée de Hardie et al. (Hardie, 2004b).

1. 1. 3. 1 Les modulateurs de l'activité de l'AMPK

Tous les stress cellulaires qui affectent le rapport AMP:ATP vont affecter l'activité de l'AMPK. Ainsi, l'hypoxie, l'ischémie, la déplétion de glucose intracellulaire, l'empoisonnement métabolique et le stress oxydatif, qui ont tous pour effet de diminuer la synthèse d'ATP, activent l'AMPK (Hardie, 2004b). Un stress hyperosmotique a aussi pour effet d'activer l'AMPK, sans toutefois avoir un impact sur le rapport AMP:ATP (Fryer *et al.*, 2002). Les effets de l'activation de l'AMPK sur différents tissus sont résumés dans la Figure 5.

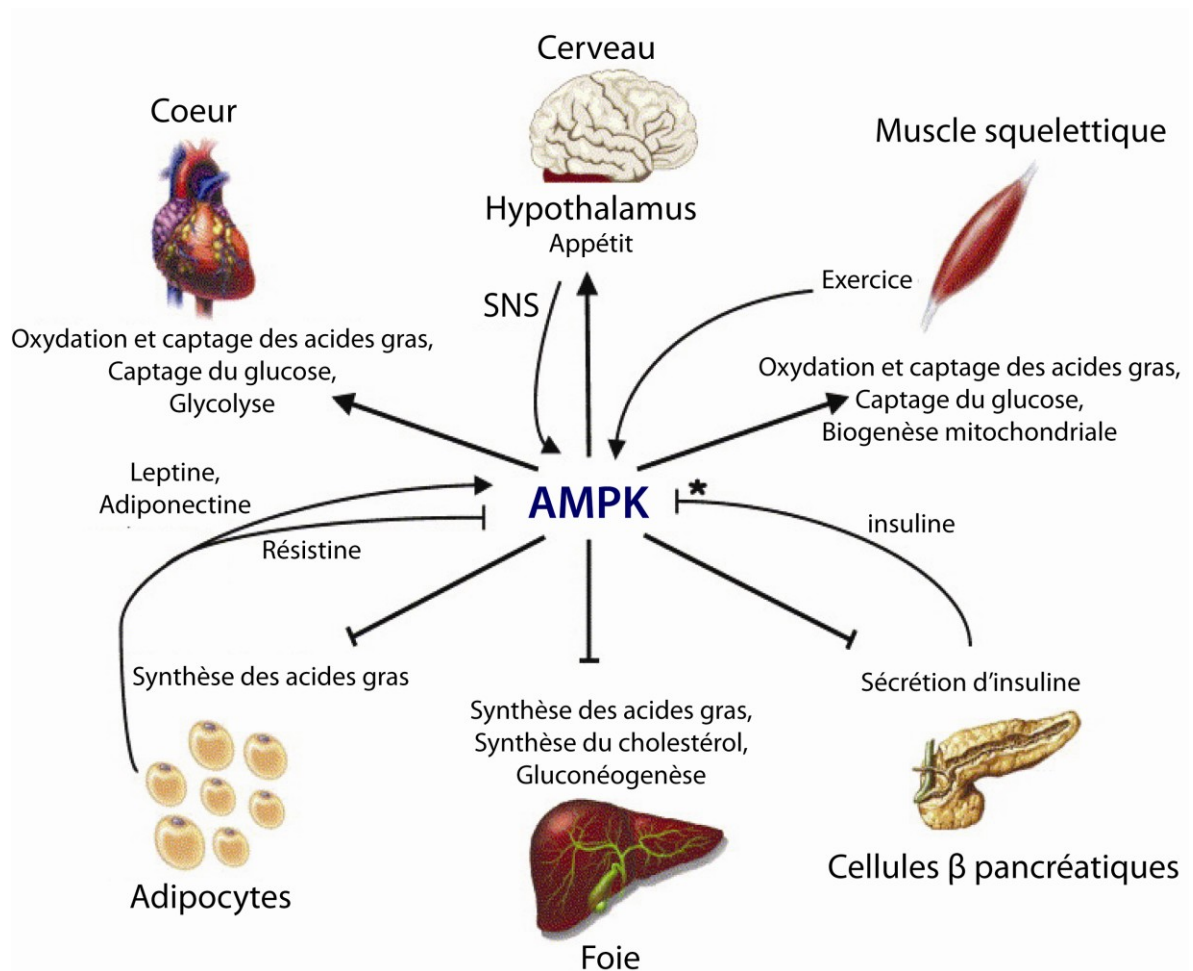


Figure 5 : Les rôles de l'AMPK dans les tissus. * L'action de l'insuline sur l'AMPK se fait au niveau du cœur et de l'hypothalamus seulement. SNS, système nerveux sympathique. Figure modifiée de Kahn *et al.* (Kahn *et al.*, 2005).

L'exercice physique et la contraction musculaire stimulent de façon physiologique l'activité de l'AMPK. La stimulation de l'AMPK est proportionnelle à l'intensité de l'exercice. En plus de la forte consommation d'ATP, qui cause une augmentation du rapport AMP:ATP, le rapport créatine:phosphocréatine activerait l'AMPK (Aschenbach *et al.*, 2004). L'exercice physique a aussi pour effet d'activer l'AMPK dans le foie et les tissus adipeux. Cet effet serait médié par la sécrétion d'IL-6 par les muscles squelettiques et par la diminution des substrats circulants (Kelly *et al.*, 2004). L'activation de l'AMPK par l'activité physique module l'expression de gènes qui augmentent l'oxydation des acides gras, la biogenèse des mitochondries et l'entrée de glucose dans les muscles squelettiques. L'AMPK serait responsable de l'expression des gènes adaptatifs à l'entraînement. Il semble donc que l'AMPK serait, en partie, responsable des effets bénéfiques de l'activité physique (Aschenbach *et al.*, 2004). L'AMPK se trouve à être activée par deux médicaments antidiabétiques, la metformine et les thiazolidinediones (TZDs) (Fryer *et al.*, 2002).

La leptine est une adipokine qui contribue à la régulation de la consommation de nourriture, le contrôle du poids corporel et le métabolisme. Elle stimule l'oxydation des acides gras, le captage de glucose et empêche l'accumulation des lipides dans les tissus non-adipeux (Friedman & Halaas, 1998). La leptine active l'AMPK en périphérie d'une façon directe, mais transitoire, mais aussi d'une façon indirecte, mais prolongée, en stimulant le système nerveux sympathique (SNS) dans l'hypothalamus. De façon directe, la stimulation de l'AMPK par la leptine se fait via une augmentation du rapport AMP:ATP. La stimulation indirecte de l'AMPK par le SNS se ferait via les récepteurs α -adrénergiques musculaires, sans changement du rapport AMP:ATP (Minokoshi *et al.*, 2002).

L'adiponectine est aussi une adipokine. Elle a pour effet d'augmenter l'oxydation des acides gras, l'entrée de glucose et d'inhiber la gluconéogenèse (Berg *et al.*, 2001;Combs *et al.*, 2001;Fruebis *et al.*, 2001). La liaison de l'adiponectine à ses récepteurs, AdipoR1 dans le muscle squelettique et AdipoR2 dans le foie, stimule l'activité de l'AMPK. Cette activité de l'AMPK est nécessaire pour médier les effets cellulaires de

l'adiponectine dans le muscle et le foie. Cette activation est associée à une augmentation du rapport AMP:ATP (Yamauchi *et al.*, 2002).

La résistine est une adipokine sécrétée par les adipocytes chez les rongeurs. Cette adipokine cause une inhibition de l'effet de l'insuline sur le foie et le muscle squelettique (Rabe *et al.*, 2008). Il a été montré que la résistine diminue la phosphorylation de l'AMPK dans le foie de rongeurs (Kahn *et al.*, 2005). Cependant, la corrélation entre les niveaux de résistine et les pathologies métaboliques chez l'humain reste très controversée (Rabe *et al.*, 2008).

L'insuline aurait un effet inhibiteur sur l'AMPK dans le cœur, alors qu'elle n'a aucun effet sur l'AMPK dans les tissus adipeux ou les muscles squelettiques (Kahn *et al.*, 2005).

Les agonistes β -adrénergiques stimulent l'AMPK dans les adipocytes. Aussi, comme mentionné précédemment, les agonistes α -adrénergiques, de même que la plupart des récepteurs couplés à la protéine $G_{\alpha q}$, stimulent l'AMPK dans le muscle squelettique (Kahn *et al.*, 2005).

L'action de la ghréline sur l'AMPK périphérique est plutôt complexe. La ghréline lie le GHS-R1a, qui est couplé à la protéine $G_{\alpha q}$. Dans le cœur, la ghréline semble stimuler l'activité de l'AMPK. Au contraire, la ghréline semble inhiber l'activité de l'AMPK dans le foie et le tissu adipeux. La ghréline ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de l'AMPK dans le muscle squelettique (Kola *et al.*, 2005).

1. 1. 3. 2. Les effets périphériques de l'AMPK

L'AMPK agit sur le métabolisme des lipides en stimulant l'oxydation des acides gras. L'AMPK est connue pour phosphoryler et ainsi inhiber l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) dans le muscle, le coeur et le foie. Cette enzyme contrôle la conversion de l'acétyl-

CoA en malonyl-CoA. La conséquence de l'inhibition de l'ACC est donc une diminution du malonyl-CoA. Le malonyl-CoA ne peut donc plus exercer son inhibition sur la carnitine-palmitoyl-CoA transférase 1 (CPT1). La CPT1 sert à faire la navette des acides gras à longue chaîne (AGLCs) entre le cytosol et la mitochondrie sous forme d'acylcarnitine. Suite à l'activation de l'AMPK, les acyl-CoA peuvent ainsi servir de substrats pour la β -oxydation à l'intérieur de la mitochondrie et fournir de l'ATP pour la cellule. Certains des effets de la leptine et de l'adiponectine sur le métabolisme des lipides seraient médiés par ce mécanisme (Kahn *et al.*, 2005).

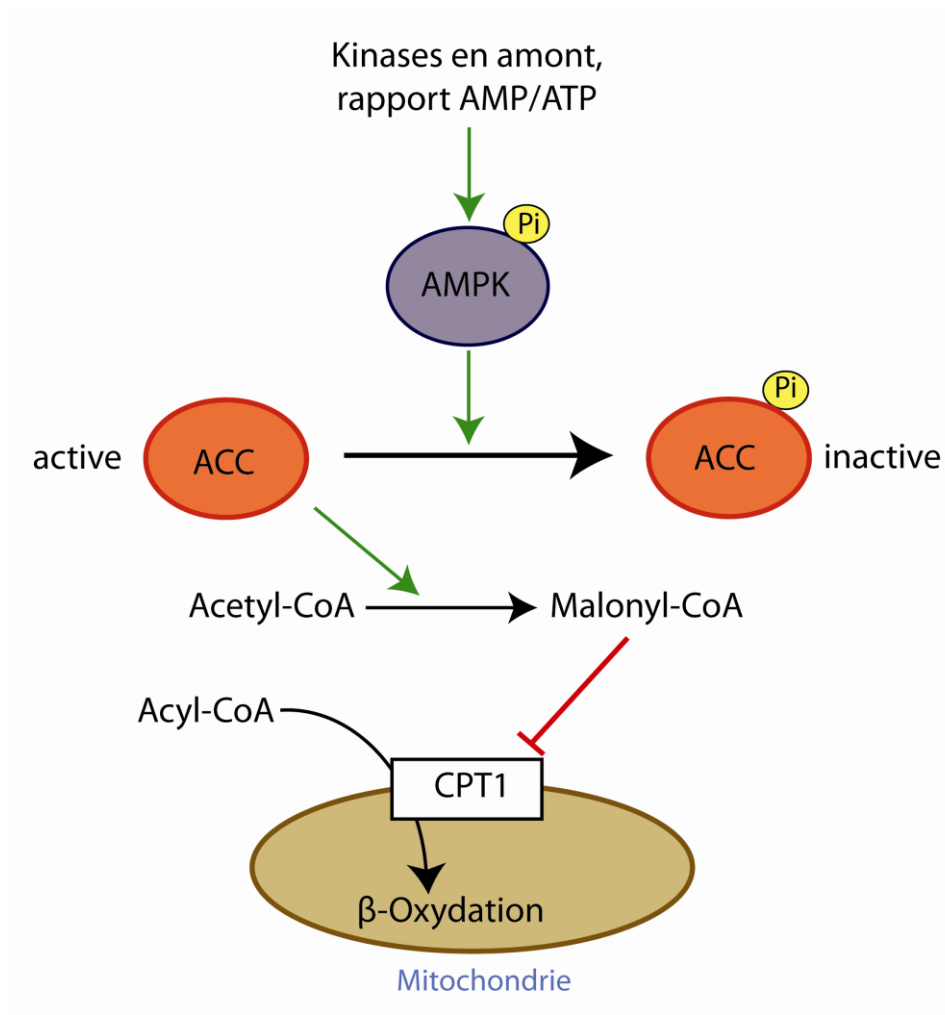


Figure 6 : Effet de l'AMPK sur la β -oxydation. L'AMPK inactive l'ACC qui a un effet inhibiteur sur l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie, et donc sur la β -oxydation, via la formation de malonyl-CoA. ACC, acétyl-CoA carboxylase; AMP, adénosine

monophosphate; ATP, adénosine triphosphate; CPT1, carnitine-palmitoyl-CoA transférase
1. Figure modifiée de Kahn et al. (Kahn *et al.*, 2005).

L'AMPK médie d'autres mécanismes impliqués dans le métabolisme des lipides. L'AMPK a comme substrat la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), une enzyme importante dans la biosynthèse des isoprénoïdes et du cholestérol. L'AMPK phosphoryle et inactive la HMG-CoA réductase. L'AMPK a aussi des effets à long terme dans le foie en réprimant l'expression de l'ACC et de la *fatty acyl synthase* (FAS), des enzymes qui servent à la synthèse des acides gras à longue chaîne (Hardie, 2004a). Dans le muscle cardiaque, l'AMPK va augmenter l'expression et la translocation du *cluster of differentiation 36* (CD36) qui sert à l'entrée des acides gras dans la cellule (Chabowski *et al.*, 2006;Luiken *et al.*, 2003). L'AMPK a aussi comme effet d'inactiver la *glycerol phosphate acyl transferase* (GPAT) qui sert à la synthèse des TGs (Hardie, 2003).

L'AMPK agit aussi sur le métabolisme du glucose par des mécanismes de phosphorylation rapides et par la régulation de certains gènes qui ont des effets à plus long terme. Encore une fois, l'AMPK active le catabolisme et inhibe l'anabolisme du glucose, et ce, dans plusieurs tissus (Hardie, 2003).

Dans le muscle squelettique et le coeur, l'activation de l'AMPK mène à l'augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule en augmentant la translocation de son transporteur GLUT4 à la membrane. L'AMPK augmente aussi la transcription du gène de GLUT4 (Hardie, 2004a). Dans le muscle squelettique, la glycogène synthase est aussi directement inhibée par phosphorylation, inhibant ainsi la glycogénèse (Kahn *et al.*, 2005). De plus, la transcription du gène de l'hexokinase, impliquée dans la glycolyse, est augmentée. Dans le coeur, l'AMPK active directement la 6-phosphofructo-2-kinase, augmentant la glycolyse (Hardie, 2003).

Dans le foie, l'AMPK réprime la transcription des gènes d'enzymes impliqués dans la gluconéogenèse comme la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (Hardie, 2004a).

Il a été démontré dans un modèle cellulaire de myocytes que l'AMPK phosphoryle l'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1) sur un résidu sérine ce qui augmenterait la liaison de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) sur IRS-1. L'AMPK aurait donc un effet sensibilisateur à l'insuline (Jakobsen *et al.*, 2001). L'AMPK a aussi un effet sur les cellules β du pancréas en inhibant la sécrétion de l'insuline ainsi que l'expression de son gène (Carling, 2004).

1. 1. 3. 3. Les effets centraux de l'AMPK

L'AMPK régule la consommation de nourriture au niveau hypothalamique (Minokoshi *et al.*, 2004). L'AMPK hypothalamique est régulée par les hormones et les nutriments en circulation. Une AMPK active dans l'hypothalamus, surtout au niveau du ARC, amène un signal orexigène. L'activation de l'AMPK modulerait l'expression de NPY, de AGRP, POMC et de CART. Les hormones orexigènes, comme la ghréline, les glucocorticoïdes, l'adiponectine, et l'hypoglycémie activent l'AMPK dans l'hypothalamus. Le glucose et les hormones anorexigènes, comme la leptine, l'insuline, le GLP-1 et les estrogènes, inhibent l'AMPK dans l'hypothalamus (Kahn *et al.*, 2005). L'action orexigène de l'AMPK dans l'hypothalamus serait dépendante de son effet sur le métabolisme des lipides, c'est-à-dire un effet dépendant de la voie ACC-malonyl CoA-CPT1 (Dzamko & Steinberg, 2009).

1. 1. 4. L'adipogenèse

L'adipogenèse désigne la transformation de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) en adipocytes (Figure 7). Les CSMs proviennent des cellules souches embryonnaires. Par la suite, les CSMs peuvent se différencier en chondrocytes, en myoblastes, en ostéoblastes ou en préadipocytes. Malgré leurs fonctions différentes, les adipocytes bruns et les adipocytes blancs partagent plusieurs étapes semblables de différenciation. L'adipogenèse se fait en deux étapes, l'engagement et la différenciation terminale (Cristancho & Lazar, 2011).

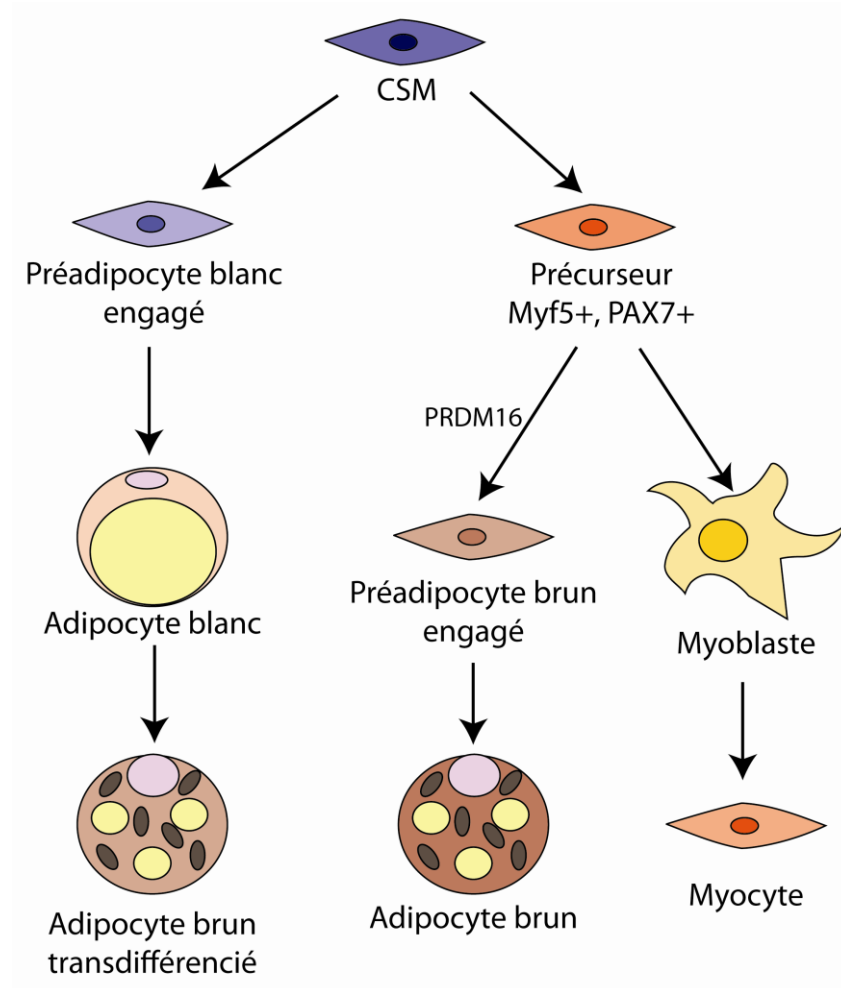


Figure 7: La différenciation des adipocytes. Les CSM peuvent devenir des préadipocytes blancs ou un précurseur des préadipocytes bruns et des myoblastes selon l'expression des gènes Myf5 et PAX7. Le choix entre les préadipocytes bruns et les myoblastes se fait selon l'expression de PRDM16. CSM, cellule souche mésenchymateuse; Myf5, *myogenic factor 5*; PAX7, *paired-box 7*; PRDM16, *PR domain-containing 16*. Figure inspirée de Cristancho et Lazar (Cristancho & Lazar, 2011).

1. 1. 4. 1. L'engagement

L'étape de l'engagement est le passage des CSMs en préadipocytes. Les CSMs sont des cellules pluripotentes qui se différencient pour s'engager vers la formation d'une cellule

avec une fonction plus définie. Suite à cette étape, la cellule n'est pas complètement différenciée, mais son destin est décidé. Dans le cas des préadipocytes blancs, il faudra une stimulation adipogène pour compléter la différenciation terminale et devenir un adipocyte blanc.

La formation de préadipocytes commence à se faire durant la partie tardive de la gestation jusqu'à l'adolescence (Tang *et al.*, 2008). Rendu à l'âge adulte, le nombre de préadipocytes varie peu avec un roulement de 10% par année (Spalding *et al.*, 2008). Lors d'une prise de poids induite par la diète, le nombre d'adipocytes augmente (Tchoukalova *et al.*, 2010). Lors de la perte de poids, le nombre d'adipocytes demeure le même, mais leur volume diminue (Faust *et al.*, 1978).

Du point de vue cellulaire, les adipocytes bruns dans le BAT ont plus de ressemblance avec les muscles squelettiques qu'avec les adipocytes blancs. Le facteur de transcription Myf5 est exprimé dans les adipocytes bruns et les myocytes alors qu'il ne l'est pas dans les adipocytes blancs (Seale *et al.*, 2008). Les CSMs se différencient en une cellule précurseur qui exprime Myf5 et *paired-box 7* (PAX7) (Lepper & Fan, 2010). Cette cellule peut ensuite devenir un préadipocyte brun ou un myoblaste. Le choix entre ces deux types de cellules se fait selon l'expression ou non de *PR domain-containing 16* (PRDM16) (Seale *et al.*, 2008). Les adipocytes bruns contenus dans le WAT sont différents de ceux contenus dans le BAT du point de vue développemental. Les adipocytes bruns du WAT proviennent plutôt de la transdifférenciation d'adipocytes blancs qui acquièrent un phénotype d'adipocytes bruns (Barbatelli *et al.*, 2010).

Plusieurs facteurs influencent l'induction de l'engagement d'une CSM en préadipocyte. Il a été démontré que les voies de signalisation du gène WNT, les voies de signalisation de la superfamille de *transforming growth factor-β* (TGF-β), la composition et la rigidité de la matrice extracellulaire, le contact cellule-cellule, la forme de la cellule et la présence de facteurs de transcription, comme la *zinc-finger protein 423* (ZFP423) et le *T cell-specific transcription factor 7-like 1* (TCF7L1), ont tous un rôle à jouer dans

l'engagement (Cristancho & Lazar, 2011). Un résumé de ces modulateurs de l'engagement est décrit par la Figure 8.

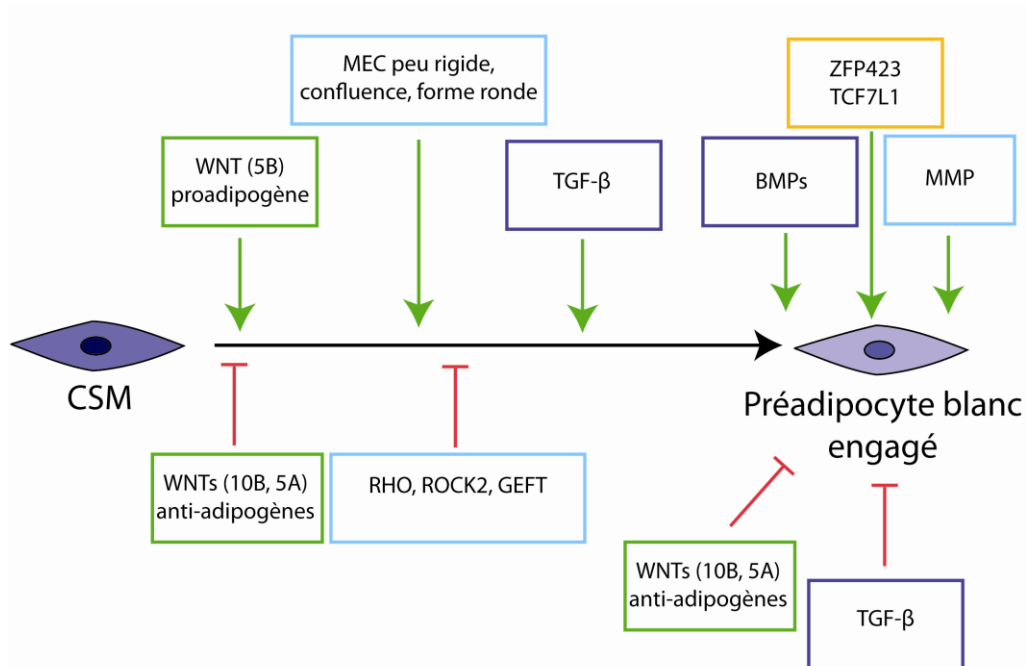


Figure 8 : L'engagement et ses modulateurs. Les activateurs sont dans la partie supérieure, les inhibiteurs dans la partie inférieure. Les facteurs agissant sur la matrice extracellulaire et la structure de la cellule sont encadrés en bleu. Les facteurs de la famille de WNT sont encadrés en vert. Les facteurs de la famille de TGF-β sont encadrés en violet. Les facteurs de transcription sont encadrés en jaune. Certains modulateurs agissent sur l'engagement alors que d'autres agissent sur le devenir du préadipocyte blanc engagé. BMPs, *bone morphogenetic proteins*; CSM, cellule souche mésenchymateuse; GEFT, *guanine nucleotide exchange factor T* ; MEC, matrice extracellulaire; MMP, métalloprotéinase matricielle; ROCK2, *Rho-associated kinase 2*; TCF7L1, *T cell-specific transcription factor 7-like 1*; TGF-β, *transforming growth factor-β*; ZFP423, *zinc-finger protein 423*. Figure inspirée de Cristancho et Lazar (Cristancho & Lazar, 2011).

1. 1. 4. 2. La différenciation terminale

La dernière étape pour la formation d'un adipocyte consiste en une cascade transcriptionnelle complexe qui mènera à l'induction des gènes du phénotype d'adipocyte mature tels que l'*adipocyte protein 2* (AP2) (aussi appelée *fatty acid-binding protein 4*, FABP4), le GLUT4, la leptine ou l'adiponectine (Cristancho & Lazar, 2011). Les principaux facteurs de transcription impliqués dans cette différenciation sont le *peroxysome proliferator-activated receptor-γ* (PPAR-γ) et les C/EBP-α, C/EBP-β et C/EBP-δ (Lefterova *et al.*, 2008). Un schéma de l'activation de ces facteurs de transcription est résumé par la Figure 9.

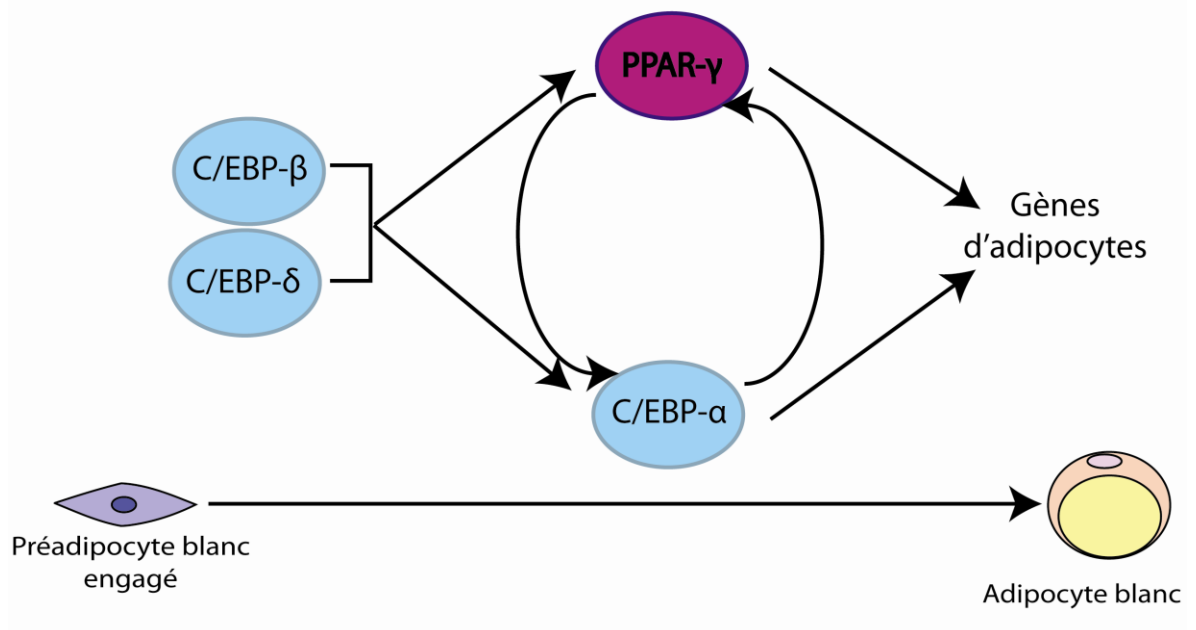


Figure 9 : La différenciation terminale. Les C/EBP-β et -δ activent la transcription de PPAR-γ et de C/EBP-α. PPAR-γ active la transcription de C/EBP-α et vice-versa. Ces deux facteurs de transcription induisent la transcription des gènes adipocytaires. C/EBP-α, -β, -δ, CCAAT/enhancer binding protein-α, -β, -δ; PPAR-γ, *peroxysome proliferator-activated receptor-γ*. Figure inspirée de Farmer (Farmer, 2006).

L'utilisation de modèles *in vitro* de préadipocytes, les lignées cellulaires 3T3-L1 et 3T3-F442A, a facilité l'étude des mécanismes de la différenciation terminale (Green & Kehinde, 1975). Lorsqu'à confluence, ces cellules engagées peuvent être différenciées en adipocytes avec un mélange adipogène composé de sérum bovin foetal, de dexaméthasone, d'isobutylméthylxanthine et d'insuline. Après la stimulation avec le cocktail adipogène, les cellules entreprennent au moins deux cycles de division cellulaire selon une étape appelée expansion clonale. Pendant cette étape, la cellule exprime des régulateurs du cycle cellulaire ainsi que des facteurs de transcription adipogènes qui facilitent l'expression de PPAR- γ et des C/EBPs. La différenciation terminale s'en suit (Farmer, 2006).

Le facteur C/EBP- β est faiblement exprimé dans les préadipocytes engagés. Avec des stimuli adipogènes, d'autres facteurs de transcription, tels que C/EBP- δ , le *signal transducer and activator of transcription 5A* (STAT5A), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et le *retinoid X receptor* (RXR), sont activés et recrutés aux sites de liaison avec C/EBP- β . C/EBP- β et ses partenaires activent, entre autres, l'expression de PPAR- γ et C/EBP- α (Siersbaek *et al.*, 2011a). Les stimuli adipogènes ont aussi pour effet d'augmenter l'expression et l'activité de C/EBP- β . Cela peut être fait par l'activation du *cAMP-response element binding* (CREB) (Zhang *et al.*, 2004), de la Janus kinase 2 (JAK2) avec STAT3 (Zhang *et al.*, 2011), des *Krüppel-like factors* (KLFs) pro-adipogènes (Birsoy *et al.*, 2008) et de Krox-20 (Chen *et al.*, 2005). L'activité de C/EBP- β est aussi régulée par des modifications post-traductionnelles. Les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) et la *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3 β) sont connues pour activer C/EBP- β par phosphorylation, ce qui est nécessaire pour sa liaison à l'ADN (Tang *et al.*, 2005). Les glucocorticoïdes régulent aussi l'activité transcriptionnelle de C/EBP- β en activant son acétylation et en empêchant son interaction avec une histone déacétylase (HDAC), qui agit comme un co-répresseur transcriptionnel (Wiper-Bergeron *et al.*, 2003). D'autres protéines membres de la famille des C/EBPs, comme C/EBP- γ ou *C/EBP homologous protein* (CHOP) seraient plutôt des inhibiteurs de l'activité de C/EBP- β et donc des inhibiteurs de l'adipogenèse (Darlington *et al.*, 1998).

La régulation de C/EBP- δ est moins bien connue. C/EBP- δ semble être induit rapidement par les glucocorticoïdes (Yeh *et al.*, 1995). C/EBP- α est quant à lui exprimé plus tardivement dans la différenciation et son expression est régulée directement par C/EBP- β (Tang *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription PPAR- γ est essentiel et suffisant à la différenciation des adipocytes (Rosen *et al.*, 1999). Étant de la famille des récepteurs hormonaux nucléaires, il doit s'hétérodimériser avec le RXR pour pouvoir lier l'ADN et avoir une activité transcriptionnelle (Tontonoz *et al.*, 1994a). PPAR- γ existe sous deux isoformes : PPAR- γ 1 et PPAR- γ 2. PPAR- γ 1 est exprimé dans les adipocytes mais aussi dans plusieurs types cellulaires comme les préadipocytes et les cellules dérivées des CSMs (Chawla *et al.*, 1994). PPAR- γ 2 est exclusivement exprimé dans les adipocytes (Tontonoz *et al.*, 1994b). L'expression de PPAR- γ serait activée par les C/EBPs et le GR lors de stimuli adipogènes (Siersbaek *et al.*, 2011b). Dans la phase précoce de la différenciation terminale, un ligand endogène de PPAR- γ semble être produit par l'activation par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Tzamelis *et al.*, 2004). L'activité de PPAR- γ est aussi régulée par GATA-binding 2 (GATA2) et GATA3 qui sont des facteurs de transcription inhibiteurs de l'activation de PPAR- γ qui doivent être réprimés pendant la différenciation (Tong *et al.*, 2000). Au contraire, *transducin-like enhancer 3* (TLE3) est un co-activateur de PPAR- γ qui doit être induit pour permettre la différenciation (Villanueva *et al.*, 2011).

Le facteur de transcription *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c) serait aussi impliqué dans l'adipogenèse. Il induirait l'expression de PPAR- γ ainsi que la production d'un ligand endogène de PPAR- γ (Kim & Spiegelman, 1996; Kim *et al.*, 1998b). SREBP1c serait aussi responsable de la biosynthèse des lipides activée par l'insuline (Kim *et al.*, 1998a).

PPAR- γ et C/EBP- α seraient responsables de 60% des gènes induits durant la différenciation terminale (Lefterova *et al.*, 2008). PPAR- γ et les C/EBPs s'induisent mutuellement dans une rétroaction positive importante pour la différenciation terminale et pour maintenir l'expression des gènes d'adipocytes (Steger *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 1999).

Dans les adipocytes matures, la présence de PPAR- γ est nécessaire pour la survie de ces cellules (Imai *et al.*, 2004).

Les adipocytes bruns requièrent aussi PPAR- γ (Nedergaard *et al.*, 2005) et les C/EBPs (Tanaka *et al.*, 1997) pour leur différenciation. Le facteur de transcription ZFP423 (Gupta *et al.*, 2010) et la voie de signalisation de WNT (Longo *et al.*, 2004) sont aussi importants pour le développement du BAT. L'expression de gènes différents entre les adipocytes blancs et les bruns est expliquée par l'activité de PRDM16. Ce facteur de transcription s'associe avec C/EBP- β (Kajimura *et al.*, 2009) pour induire la transcription de gènes communs, comme PPAR- γ ou AP2, mais aussi de gènes spécifiques aux adipocytes bruns comme la *uncoupling protein-1* (UCP-1) (Seale *et al.*, 2008). PRDM16 s'associe aussi avec PPAR- γ pour la transcription de gènes spécifiques aux adipocytes bruns et avec la *C-terminal binding protein 1* (CTBP1) et CTBP2 pour réprimer la transcription de gènes spécifiques aux adipocytes blancs (Kajimura *et al.*, 2008). Le *PPAR- γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) est un autre facteur de transcription clé des adipocytes bruns qui s'associe avec PPAR- γ (Puigserver *et al.*, 1998). PGC-1 α ne jouerait pas un rôle important lors de l'adipogenèse, mais plutôt dans le maintien de l'expression des gènes propres aux adipocytes bruns (Uldry *et al.*, 2006).

1. 1. 4. 3. Les mécanismes de l'adipogenèse

Les adipocytes emmagasinent les lipides selon deux mécanismes : le captage des lipides circulants et la lipogenèse (Lafontan, 2008). PPAR- γ et C/EBP- α induisent l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse, le captage, le transport et le stockage des lipides (Lefterova *et al.*, 2008).

La plupart des lipides emmagasinés dans les adipocytes proviennent de la circulation. Le captage des lipides se fait à partir des chylomicrons et des *very low density lipoproteins* (VLDLs) circulants suite à un repas (Figure 10). Les lipides contenus dans ces lipoprotéines voyagent sous forme estérifiées, c'est-à-dire sous forme de TGs. Pour pouvoir

être utilisés par les tissus, ces TGs devront être hydrolysés en acides gras libres (AGLs). C'est le rôle de la lipoprotéine lipase (LPL), produite par les adipocytes et présente à la surface des cellules endothéliales, de catalyser cette réaction (Olivecrona *et al.*, 1997). L'activité de la LPL, qui est stimulée par l'insuline et dont l'expression dépend de PPAR- γ , est donc une étape limitante pour le captage des lipides (Wang & Eckel, 2009).

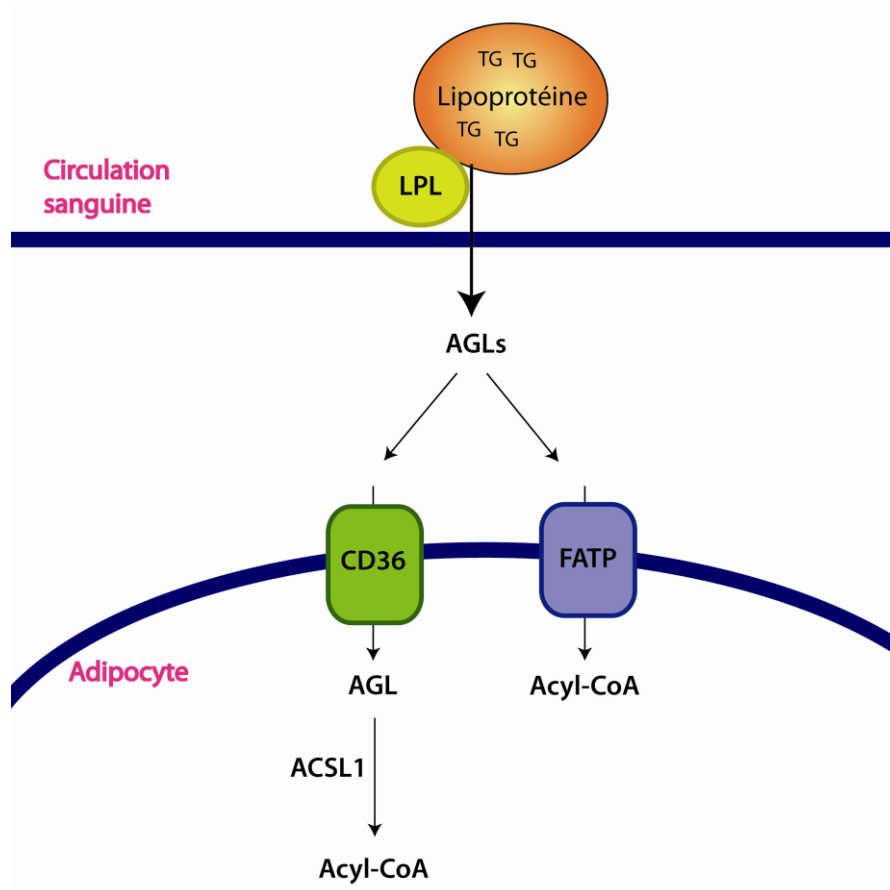


Figure 10 : Le captage des lipides. Les TGs contenus dans les lipoprotéines sont hydrolysés par la LPL présente à la surface des vaisseaux sanguins. Les AGLs peuvent être transportés dans la cellule par le CD36 et ensuite être activés par l'ACSL1. Dans le cas où le transport se fait par les FATPs, l'AGL est activé par la FATP qui a une activité acyl-CoA synthétase. ACSL1, *long chain acyl-CoA synthetase 1*; AGL, acide gras libre; CD36, *cluster of differentiation 36*; CoA, coenzyme A; FATP, *fatty acid transport protein*; LPL, lipoprotéine lipase; TG, triglycéride.

Les AGLs utilisent ensuite des transporteurs pour faciliter leur entrée dans la cellule. Les *fatty acid transport proteins* (FATPs) sont des protéines transmembranaires qui servent de transporteurs pour les acides gras à longue chaîne (AGLCs), mais qui possèdent aussi une activité acyl-CoA synthétase (Gimeno, 2007). Le CD36, aussi appelé *fatty acid translocase* (FAT) pour son rôle de transporteur, est exprimé sur les adipocytes et il sert aussi au transport des AGLCs (Febbraio *et al.*, 1999). L'expression de la FATP1 et du CD36 est induite par PPAR- γ (Motojima *et al.*, 1998). La FABP de la membrane plasmique (FABPpm) (Zhou *et al.*, 1992) et la cavéoline-1 (Trigatti *et al.*, 1999) ont aussi été identifiées comme des transporteurs d'acides gras dans les adipocytes et sont induits durant la différenciation. Leur rôle est cependant moins bien connu.

Le transport des AGLCs à travers la membrane plasmique est rapidement suivi de leur thioestérification, c'est-à-dire l'ajout d'une CoA par une acyl-CoA synthétase. Cette étape, aussi appelée activation, est nécessaire pour l'utilisation des AGLCs par la cellule. Elle influence la quantité d'AGLCs qui peut pénétrer dans la cellule et y demeurer. La thioestérification peut être faite par les FATPs, qui possèdent cette activité enzymatique, ou par la *long chain acyl-CoA synthetase 1* (ACSL1) (Watkins, 1997). La ACSL1 est induite par PPAR- γ (Schoonjans *et al.*, 1995).

Pendant le processus de différenciation, les acyl-CoA formés après la thioestérification vont servir à la synthèse de triglycérides (Figure 11). Dans les adipocytes, cette synthèse se fait selon la voie du glycérol phosphate et elle est consommatrice d'énergie. La première étape de cette voie consiste à ajouter un acide gras, sous forme d'acyl-CoA, au glycérol-3-phosphate pour former un acide lysophosphatidique. Cette étape est catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). Par la suite, un deuxième acyl-CoA est ajouté à cette molécule par la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour produire le phosphatidate. Le phosphatidate est ensuite déphosphorylé par la lipine pour générer le diacylglycérol. Finalement, le troisième acyl-CoA est ajouté par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) pour former un TG (Takeuchi & Reue, 2009). *In*

in vivo, un traitement avec un agoniste de PPAR- γ augmente l'expression et l'activité de GPAT1 et GPAT3, de la lipine-1 et des DGAT1 et 2 dans le WAT (Festuccia *et al.*, 2009).

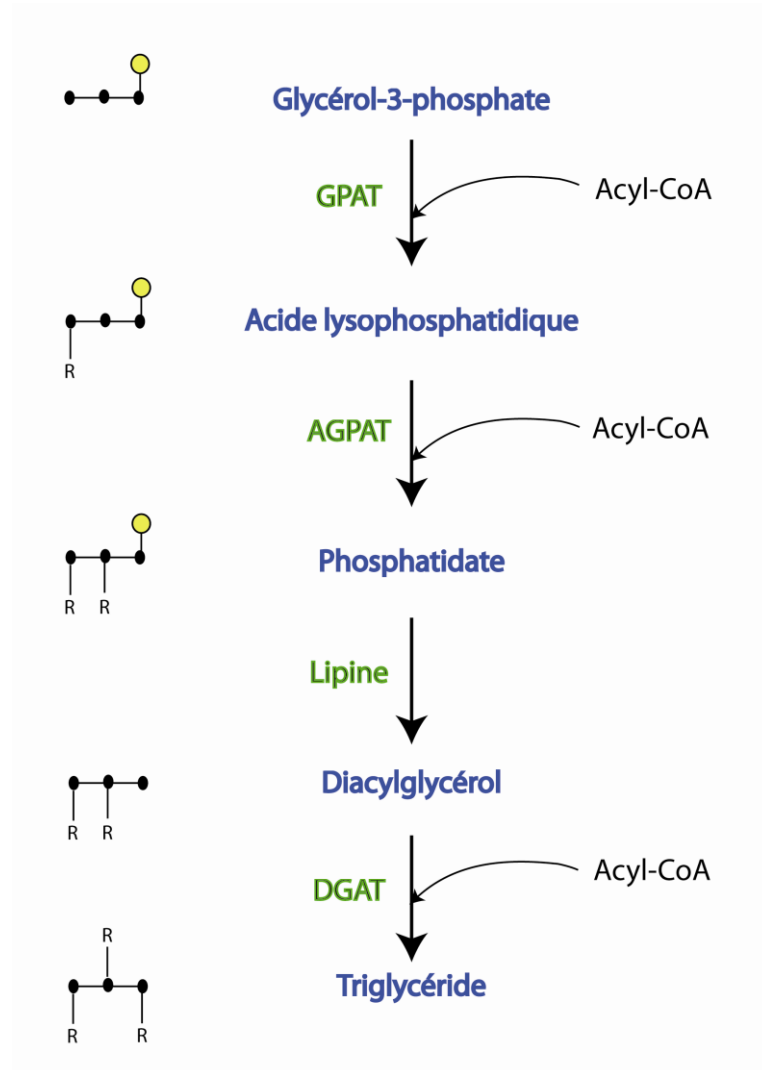


Figure 11 : La synthèse des triglycérides. Schéma de la synthèse à partir du glycérol-3-phosphate et des acyl-CoA. Les molécules sont schématisés à gauche où les carbones du glycérol sont représentés par des points noirs, les phosphates par des cercles jaunes et les acides gras par des chaînes « R ». AGPAT, 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase; CoA, coenzyme A; DGAT, diacylglycérol acyltransférase; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase.

Plusieurs protéines nécessaires au stockage des lipides sont aussi induites pendant la différenciation. Mentionnons les FABPs qui lient et influencent le métabolisme des acides gras intracellulaires (Boord *et al.*, 2002) et la périlipine qui entoure les gouttelettes lipidiques et qui est impliquée dans la lipolyse (Arimura *et al.*, 2004).

1. 1. 5. La lipogenèse

Les adipocytes matures sont impliqués dans la captation du glucose grâce à l'expression de GLUT4. Le rôle des adipocytes est de stocker des réserves d'énergie sous forme de TGs. Ainsi, environ 50% du glucose est utilisé pour la synthèse de glycérol et d'acides gras destinés à la formation de TGs. Environ 30 % est destiné à la β -oxydation pour produire l'énergie nécessaire à la synthèse des TGs et aux autres fonctions cellulaires. Le reste est utilisé pour la synthèse du lactate et du glycogène (DiGirolamo *et al.*, 1992).

La lipogenèse *de novo* se trouve à être le processus de synthèse d'acides gras à partir d'intermédiaires du métabolisme du glucose. Ce processus anabolique consomme de l'énergie et est stimulé par une surconsommation de nourriture, surtout riche en glucides. Au niveau hormonal, l'insuline, le glucagon, les hormones thyroïdiennes et les catécholamines sont des modulateurs de la lipogenèse (Girard *et al.*, 1994). Au niveau transcriptionnel, les facteurs de transcription qui régulent les enzymes de la lipogenèse sont le *liver X receptor* (LXR), le SREBP1c et le *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) (Strable & Ntambi, 2010). Les acides gras non-estérifiés ont un effet inhibiteur sur la lipogenèse, selon une rétroaction négative (Jump, 2004).

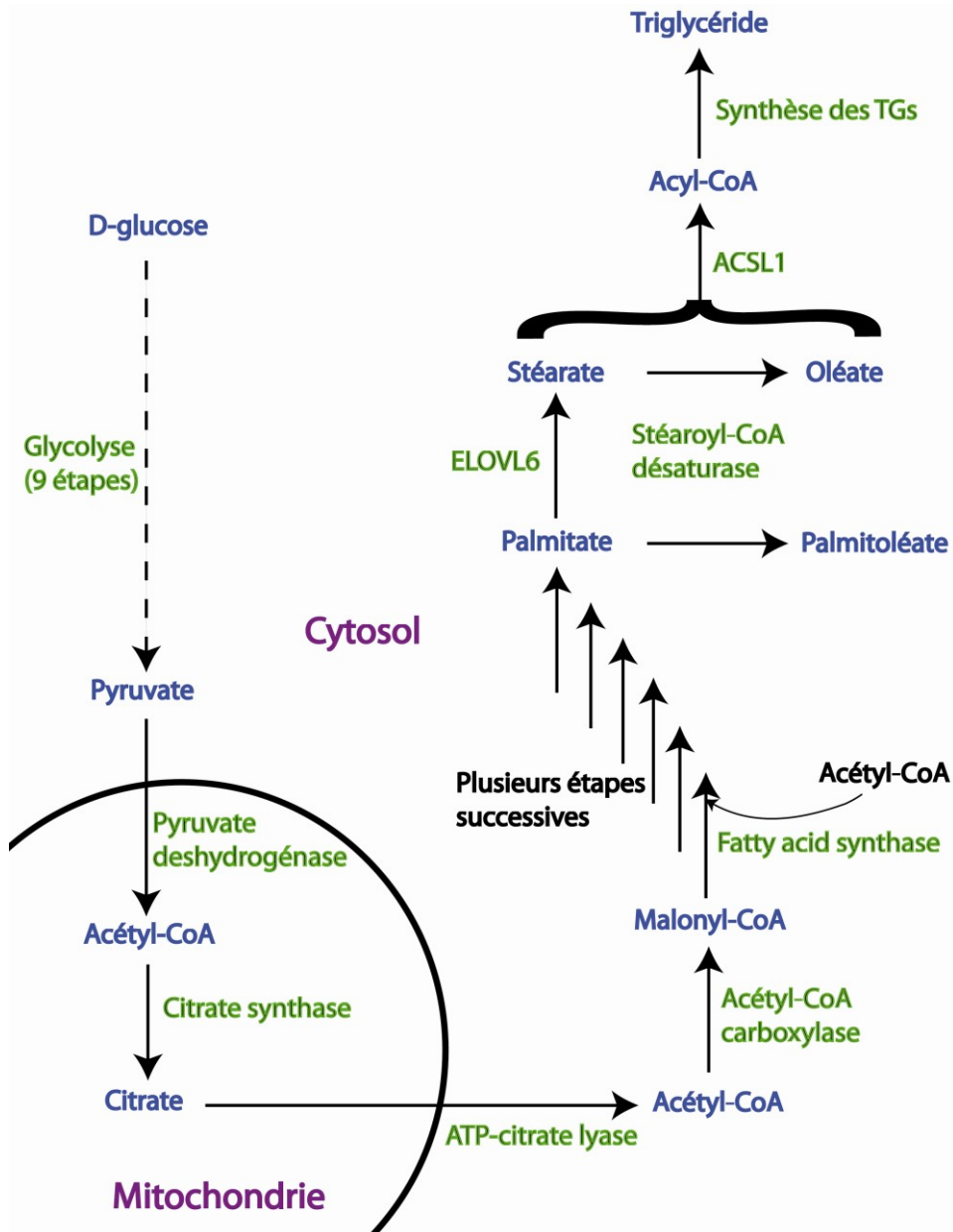


Figure 12 : La lipogenèse. Schématisation de la transformation du glucose en acides gras (palmitate, stéarate, oléate, palmitoléate) puis en triglycérides. Les enzymes impliquées sont en vert. ACSL1, *long chain acyl-CoA synthetase 1*; ATP, adénosine triphosphate; CoA, coenzyme A; ELOVL6, *elongation of long chain fatty acids family member 6*; TGs, triglycerides. Figure inspirée de Strable et Ntambi (Strable & Ntambi, 2010).

La lipogenèse débute avec le glucose qui subit la glycolyse (Figure 12). Après les 9 étapes de ce processus, le glucose est transformé en pyruvate. Le pyruvate pénètre la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA par le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA est ensuite transformé en citrate par la citrate synthase lors de la première étape du cycle de Krebs. Le citrate peut sortir de la mitochondrie pour ensuite être retransformé en acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase. L'acétyl-CoA est transformé en malonyl-CoA par l'entremise de l'ACC. La condensation d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA est catalysée en plusieurs étapes par la FAS pour former le palmitate, un acide gras de 16 carbones. Le palmitate peut être allongé de nouveau par la *elongation of long chain fatty acids family member 6* (ELOVL6) pour former du stéarate. Le stéarate et le palmitate peuvent être désaturés par la stéaroyl-CoA désaturase (SCD) pour former de l'oléate et du palmitoléate, respectivement. Le palmitate, le stéarate, le palmitoléate et l'oléate peuvent ainsi être activés par l'ACSL1 pour ensuite être estérifiés en triglycéride (Strable & Ntambi, 2010).

1. 1. 6. La lipolyse

La lipolyse est un processus catabolique qui a pour effet de mobiliser les lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques pour permettre leur utilisation comme source d'énergie. La lipolyse peut être vue comme l'inverse de la biosynthèse des triglycérides (Figure 13). Ainsi, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et en acides gras. L'*adipose triglyceride lipase* (ATGL), aussi appelée desnutrine, catalyse la première étape qui consiste en l'hydrolyse du triacylglycérol en diacylglycérol. Le deuxième acide gras est ensuite libéré du diacylglycérol par la *hormone sensitive lipase* (HSL) pour former le monoacylglycérol. Le dernier acide gras est hydrolysé par la monoacylglycérol lipase (MGL) qui libérera aussi le glycérol (Ahmadian *et al.*, 2010).

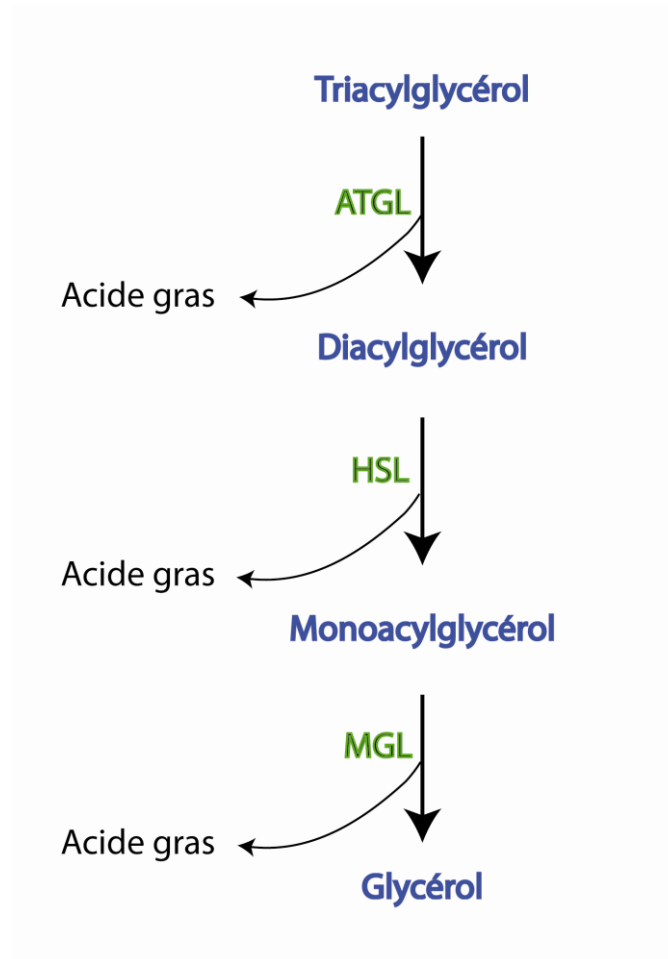


Figure 13 : La lipolyse. Schématisation de l'hydrolyse des triglycérides en 3 étapes par 3 enzymes différentes (en vert) qui libèrent un acide gras à chaque étape. ATGL, *adipose triglyceride lipase*; HSL, *hormone sensitive lipase*; MGL, *monoacylglycérol lipase*.

1. 1. 6. 1. La régulation de la lipolyse

Comme on pourrait s'y attendre, la lipolyse est augmentée en période de jeûne et de demande énergétique et est diminuée après un repas. Les hormones jouent un rôle-clé dans la régulation de la lipolyse. En période de demande énergétique, la lipolyse est stimulée principalement par les catécholamines qui activent les récepteurs β -adrénergiques fortement exprimés à la surface des adipocytes (Ahmadian *et al.*, 2010). Il a aussi été démontré que

les glucocorticoïdes, qui sont plus élevés en période de jeûne, activent la lipolyse par une augmentation de l'expression de l'ATGL (Villena *et al.*, 2004). Chez l'humain, il semble que les peptides natriurétiques semblent jouer un rôle important dans l'activation de la lipolyse (Sengenès *et al.*, 2003). Mentionnons d'autres hormones, comme l'ACTH, la MSH, la thyroid-stimulating hormone (TSH), la prostaglandine E2 (PGE2) (à une concentration > 10 mM), l'endothéline-1, la leptine et la *growth hormone* (GH), qui sont aussi décrits comme des activateurs de la lipolyse (Chaves *et al.*, 2011). Dans un contexte plus pathophysiologique, les cytokines pro-inflammatoires ont un effet pro-lipolytique dont les conséquences sur l'inflammation seront discutées plus loin dans cette thèse.

Après un repas, donc en période postprandiale, l'insuline circulante élevée est le principal inhibiteur de la lipolyse. L'adénosine, le NPY, le PYY, la PGE2 (à une concentration < 10 mM) et le lactate ont aussi des effets inhibiteurs sur la lipolyse (Chaves *et al.*, 2011).

1. 1. 6. 2. La signalisation de la lipolyse

Pour comprendre les mécanismes de régulation, il faut comprendre la signalisation menant à la lipolyse (Figure 14). La lipolyse est principalement activée en réponse à l'activation des récepteurs β -adrénergiques (β_1 , β_2 , β_3) par les catécholamines. Ces RCPGs sont couplés à la protéine G α_s qui active l'adénylate cyclase et la production d'AMPc. L'AMPc stimule l'activité de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Une fois activée, la PKA active par phosphorylation la HSL. La HSL est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du diacylglycérol en monoacylglycérol, l'étape limitante de la lipolyse. La PKA phosphoryle aussi la périlipine A, la protéine qui entoure les gouttelettes lipidiques des adipocytes. La phosphorylation de la périlipine A induit un changement conformationnel qui permet l'accès des TGs aux lipases pour leur hydrolyse.

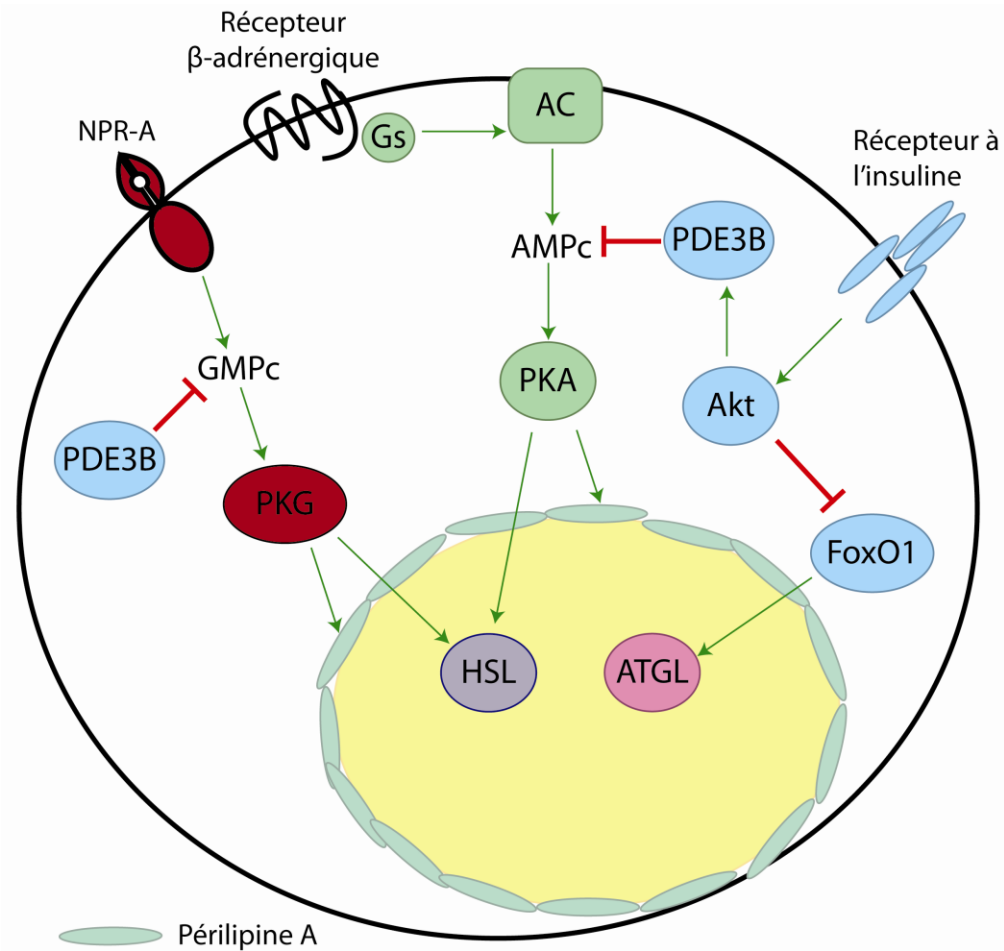


Figure 14 : La signalisation de la lipolyse. La lipolyse est principalement activée par les catécholamines et les peptides natriurétiques. L'activation des récepteurs β -adrénergiques mène à l'augmentation de l'AMPc ce qui active la PKA qui phosphoryle la périlipine A et la HSL. L'activation du NPR-A augmente le GMPc qui active la PKG. La PKG phosphoryle aussi la périlipine A et la HSL. L'insuline, qui inhibe la lipolyse, diminue l'AMPc par l'activation de la PDE3B. De plus, l'insuline inhibe FoxO1 qui induit la transcription de l'ATGL. AC, adénylate cyclase; Akt, *a serine/threonine protein kinase*; ATGL, *adipose triglyceride lipase*; FoxO1, *forkhead box class O1*; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; HSL, *hormone sensitive lipase*; PDE3B, phosphodiesterase 3B; PKA, protéine kinase dépendante de l'AMPc; PKG, protéine kinase dépendante du GMPc; NPR-A, *natriuretic peptide receptor-A*. Figure inspirée de Chaves et al. (Chaves *et al.*, 2011).

Les peptides natriurétiques, comme l'*atrial natriuretic peptide* (ANP) ou le *brain natriuretic peptide* (BNP), lient et activent le *natriuretic peptide receptor-A* (NPR-A) à la surface des adipocytes. Ce récepteur possède un domaine catalytique guanylate cyclase intracellulaire qui produira du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) suite à son activation. Le GMPc active la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). Il s'en suit la phosphorylation de la périlipine A et de la HSL, de façon PKG dépendante (Sengenès *et al.*, 2003).

L'insuline inhibe la lipolyse suite à la liaison du IR. Le récepteur à l'insuline induit l'activation de la PI3K et de *a serine/threonine protein kinase* (Akt) aussi connue comme la protéine kinase B (PKB). L'Akt a comme substrat la phosphodiesterase 3B (PDE3B) qu'elle active. La PDE3B est une enzyme qui dégrade l'AMPc et le GMPc. Une augmentation de l'activité de cette enzyme réduit donc l'activation de la cascade de la lipolyse par les catécholamines et les peptides natriurétiques (Chaves *et al.*, 2011). L'activation de Akt par l'insuline inhibe aussi le facteur de transcription *forkhead box class O1* (FoxO1), un inducteur de la transcription de l'ATGL, ce qui a pour effet de diminuer la lipolyse (Chakrabarti & Kandror, 2009).

Le TNF- α est un activateur de la lipolyse impliqué dans le syndrome métabolique. Ses effets sur la lipolyse semblent se faire à plusieurs niveaux dans la signalisation. Le TNF- α activerait la lipolyse en diminuant l'expression de la PDE3B, de la périlipine A et de la protéine G α_i , inhibitrice de l'adénylate cyclase. Le TNF- α activerait aussi l'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) ce qui mène à la formation de GMPc par les guanylate cyclases solubles. Ceci a donc un effet activateur sur la lipolyse (Chaves *et al.*, 2011).

1. 1. 7. La thermogénèse

La thermogénèse est le phénomène selon lequel de la chaleur est produite par la dissipation d'énergie. Ainsi, un être vivant dans lequel a lieu des réactions chimiques reliées à son métabolisme basal crée une certaine quantité de chaleur dans un

environnement à température neutre. C'est ce que l'on appelle la thermogénèse obligatoire. Dans un environnement froid, le corps utilise d'abord le frissonnement pour produire de la chaleur. Suite à une adaptation, le corps utilise d'autres moyens pour produire de la chaleur, impliquant l'activité thermogène du BAT (Stephens *et al.*, 2011).

Depuis la découverte du BAT chez l'humain adulte, la thermogénèse est de plus en plus étudiée pour son potentiel thérapeutique dans l'obésité. Une augmentation de la masse du BAT pourrait augmenter significativement la dépense énergétique d'un individu. La différenciation des adipocytes blancs en adipocytes bruns serait une avenue intéressante pour améliorer le métabolisme d'une personne obèse (Stephens *et al.*, 2011).

Les adipocytes bruns diffèrent des blancs par l'expression de gènes qui leur sont propres. Le PGC-1 α régule la transcription de gènes propres aux adipocytes bruns, alors que la UCP-1 joue un rôle central dans la thermogénèse (Stephens *et al.*, 2011). Le rôle de ces deux protéines sera décrit plus en profondeur.

1. 1. 7. 1 Le facteur PGC-1 α

Le PGC-1 α fut le premier marqueur des adipocytes bruns identifié. Il est responsable de la transcription des gènes impliqués dans la thermogénèse, la biogénèse mitochondriale et la β -oxydation. Comme son nom l'indique, PGC-1 α agit en modifiant l'activité transcriptionnelle de PPAR- γ (Ravussin & Galgani, 2011). L'expression ectopique de PGC-1 α dans des adipocytes blancs résulte en l'expression de marqueur d'adipocytes bruns comme la UCP-1 (Puigserver *et al.*, 1998). L'expression de PGC-1 α dans d'autres types cellulaires augmente la respiration cellulaire et la biogénèse mitochondriale (Scarpulla, 2002). L'expression de PGC-1 α est stimulée par le froid, la triiodothyronine (T3) et la stimulation β -adrénergique (Wu & Boss, 2007). Les TZDs induisent l'expression de PGC-1 α ainsi que des gènes de la thermogénèse dans le WAT, ce qui améliorerait le profil métabolique après ce traitement (Tontonoz & Spiegelman, 2008).

PGC-1 α agit sur la biogenèse mitochondriale en augmentant l'expression et l'activité de facteurs de transcription comme le *nuclear respiratory factor-1* (NRF-1) et -2, le *mitochondrial transcription factor A* (mtTFA) et le *estrogen related-receptor α* (ERR α). Ces facteurs contrôlent l'expression des protéines mitochondriales à partir du génome nucléaire et mitochondrial. Le rôle de PGC-1 α dans la thermogénèse passe par la transcription du gène de UCP-1 (Wu & Boss, 2007).

L'activité de PGC-1 α est régulée par la *receptor interacting protein 140* (RIP140) qui lie directement PGC-1 α et qui antagonise son activité transcriptionnelle. Il a aussi été démontré que la *retinoblastoma protein* (RB) agit comme un répresseur de PGC-1 α . L'inactivation de cette protéine ou l'inhibition de son expression favorise une différenciation vers un phénotype d'adipocyte brun, une activation mitochondriale et une dépense énergétique accrue (Vila-Bedmar & Fernandez-Veledo, 2011).

1. 1. 7. 2 La protéine UCP-1

La UCP-1 est une protéine découplante encastrée dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle joue le rôle central dans la thermogénèse. Deux autres sous-types de UCPs ont été identifiés, UCP-2 et UCP-3, toutefois ils ne semblent pas être impliqués dans la fonction thermogène du BAT (Azzu & Brand, 2010).

Pour comprendre le rôle de la UCP-1, il faut comprendre le processus de fabrication d'ATP dans la mitochondrie selon la phosphorylation oxydative (Figure 15). Les molécules d'ATP sont synthétisées par la F_0/F_1 ATP synthase, une enzyme qui est aussi encastrée dans cette membrane interne mitochondriale. Cette enzyme fonctionne grâce à un gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Ce gradient de protons (ions H^+) est généré par la chaîne de transport d'électrons selon un processus oxydatif. Ces protons peuvent utiliser deux façons pour rétablir l'équilibre électrochimique de part et d'autre de la membrane intérieure. La première est la F_0/F_1 ATP synthase qui catalysera la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et d'un phosphate. La

deuxième sera une protéine découplante comme UCP-1 qui permettra le transport des protons en dissipant cette énergie sous forme de chaleur (Azzu & Brand, 2010).

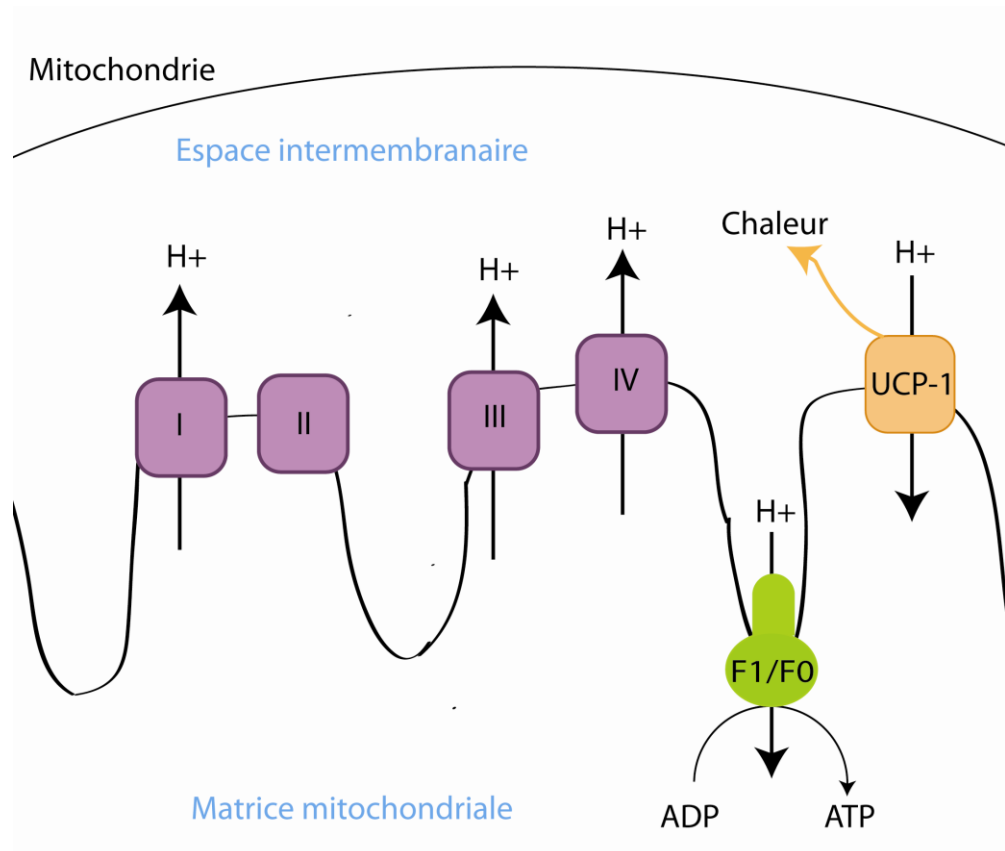


Figure 15 : La thermogénèse. La chaîne de transport d'électrons (complexes I, II, III et IV) crée un gradient électrochimique de protons (H⁺). Cette énergie électrochimique sert à former de l'ATP par la F1/F0 ATP synthase. Les protons peuvent aussi utiliser la UCP-1 pour retourner dans la matrice mitochondriale ce qui émet de la chaleur. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; F1/F0, F1/F0 ATP synthase; UCP-1, *uncoupling protein-1*.

L'expression de la protéine UCP-1 est régulée par le froid. Cette régulation est médiée par les catécholamines libérées par l'innervation sympathique du BAT. Les catécholamines activent les récepteurs β -adrénergiques, donc activent aussi la lipolyse. Les voies d'activation de la PKA et de la protéine kinase de 38 kDa (p38) activeraient aussi PGC-1 α , le *activating transcription factor-2* (ATF-2) et CREB, qui sont nécessaires à la transcription de UCP-1 (Azzu & Brand, 2010). Les acides gras libérés par la lipolyse ont un rôle à jouer dans l'activation des facteurs de transcription tels que PPAR- γ , mais aussi dans l'activation du découplage mitochondrial (Locke *et al.*, 1982).

Il existe une certaine controverse dans la littérature selon laquelle UCP-1 et la thermogénèse seraient augmentées par un apport nutritionnel élevé (Rothwell & Stock, 1979). En d'autres mots, le BAT compenserait pour une trop grande absorption d'énergie. Cette affirmation a cependant été réfutée par plusieurs études chez des rongeurs soumis à plusieurs types de diètes enrichies (Kozak, 2010).

1. 1. 8. Les adipokines

Le tissu adipeux est un organe endocrinien important. Les molécules sécrétées par les adipocytes sont appelées adipokines. Ces molécules possèdent des fonctions endocriniennes ou des fonctions paracrines/autocrines qui sont souvent modulées par l'obésité. Plus de 50 adipokines ont été identifiées (Trayhurn & Wood, 2004), ainsi seulement les plus caractérisées seront décrites ici.

1. 1. 8. 1. L'adiponectine

L'adiponectine est sécrétée presque exclusivement par les adipocytes blancs dans lesquels elle représente le transcrit le plus abondant. L'adiponectine est une hormone circulante que l'on retrouve en grande quantité dans le plasma. Elle peut exister sous forme

de trimère ou d'hexamère, que l'on appelle les faibles poids moléculaires, ou encore de multimères plus importants (12- à 18-mères) appelés les hauts poids moléculaires. L'adiponectine de hauts poids moléculaires jouerait un rôle métabolique plus important (Simpson & Whitehead, 2010). Il y a une corrélation négative entre le poids corporel et les niveaux d'adiponectine circulants. L'hypoadiponectinémie est associée avec le SMet, le DT2, l'hypertension, la dyslipidémie, la stéatose hépatique et la maladie ischémique cardiaque (Gnacinska *et al.*, 2009). L'adiponectine lie deux récepteurs, le AdipoR1, qui est ubiquitaire, et le AdipoR2, qui est surtout exprimé dans le muscle et le foie. Comme mentionné précédemment, l'adiponectine stimulerait l'activité de l'AMPK dans ces tissus, augmentant ainsi l'oxydation des acides gras, l'entrée de glucose et inhibant la gluconéogenèse. L'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline dans les cas d'obésité (Yamauchi *et al.*, 2002). L'adiponectine augmenterait aussi les HDL plasmatiques (Schulze *et al.*, 2005). L'adiponectine a aussi un effet anti-inflammatoire et antiathérogène en diminuant l'adhésion des monocytes, en diminuant la transformation des macrophages en cellules spumeuses, en diminuant l'activation des cellules endothéliales et en diminuant l'expression du TNF- α (Trayhurn & Wood, 2004).

1. 1. 8. 2. La leptine

La leptine est majoritairement sécrétée par le WAT sous-cutané. La leptine joue un rôle inhibiteur sur l'appétit. La leptine est connue pour activer les neurones POMC/CART positifs du ARC par l'activation de l'AMPK. Elle active aussi la sécrétion de α -MSH dans la circulation (Ahima *et al.*, 2000). Cette activation centrale augmenterait la thermogenèse périphérique via le SNS (Richard *et al.*, 2010). La leptine active l'AMPK en périphérie de façon directe, mais aussi par le SNS. Au niveau du muscle, elle stimule donc l'oxydation des acides gras, le captage de glucose et empêche l'accumulation des lipides dans les tissus non-adipeux (Friedman & Halaas, 1998). Au niveau du muscle, du foie et des cellules β du pancréas, la leptine diminue la quantité intracellulaire de lipides et augmente la sensibilité à l'insuline (Minokoshi *et al.*, 2002). Les niveaux de leptine circulante augmentent avec la

taille des adipocytes. Les personnes obèses ont donc des quantités circulantes de leptine plus élevées (Bakker *et al.*, 2004). Les personnes obèses semblent toutefois développer une résistance à la leptine. Cette résistance serait causée par l'action du *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) qui est induit par la leptine (Howard & Flier, 2006). L'insuline stimule la sécrétion de la leptine, en retour la leptine inhibe la sécrétion d'insuline par le pancréas (Fruhbeck & Salvador, 2000). Les niveaux de leptine diminuent lors d'un jeûne (Ronti *et al.*, 2006).

1. 1. 8. 3. Le TNF- α

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui possède plusieurs fonctions immunitaires. Le TNF- α est sécrété par les adipocytes mais aussi, et surtout, par les macrophages du tissu adipeux (Trayhurn & Wood, 2004). Le TNF- α dans le tissu adipeux jouerait un rôle principalement autocrine/paracrine (Gnacinska *et al.*, 2009). Il augmente la sécrétion des autres cytokines pro-inflammatoires et diminue celle des cytokines anti-inflammatoires. Le TNF- α est connu pour induire la lipolyse, l'apoptose et inhiber l'adipogenèse des adipocytes (Stryjecki & Mutch, 2011). Le TNF- α a été la première molécule issue du tissu adipeux qui fût identifiée comme un lien moléculaire entre l'obésité et la résistance à l'insuline (Katsuki *et al.*, 1998). La neutralisation du TNF- α chez le rat obèse améliore la sensibilité à l'insuline. Le niveau d'expression du TNF- α dans le tissu adipeux corrèle positivement avec l'obésité et l'hyperinsulinémie. Ce niveau baisse après une perte de poids (Ronti *et al.*, 2006).

1. 1. 8. 4. L'IL-6

L'IL-6 est une cytokine sécrétée par le tissu adipeux et retrouvée dans la circulation. Environ 30% du total circulant proviendrait du tissu adipeux. Les cellules de la fraction stromale vasculaire, comme les macrophages, les leucocytes et les cellules endothéliales

sont responsables de la majorité de la production d'IL-6 par le tissu adipeux (Stryjecki & Mutch, 2011). L'IL-6 joue un rôle dans l'inflammation, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire et les mécanismes de défense de l'hôte (Eder *et al.*, 2009). L'IL-6 possède une activité pro-lipolytique et est un inhibiteur de l'adipogenèse. L'administration d'IL-6 cause une hyperglycémie et une résistance à l'insuline (Gnacinska *et al.*, 2009). Les niveaux circulants d'IL-6 corrélaient positivement avec l'obésité et la résistance à l'insuline et diminuent avec la perte de poids. Le TNF- α et l'IL-6 sont deux stimulateurs de la sécrétion d'IL-6 *in vitro* (Eder *et al.*, 2009) ce qui installerait un cercle vicieux sur la sécrétion de cette dernière. L'IL-6 diminue l'expression d'adiponectine (Gnacinska *et al.*, 2009).

1. 1. 8. 5. La MCP-1

La MCP-1, aussi appelée *CC motif chemokine ligand 2* (CCL2), est un facteur chimiotactique impliqué dans le recrutement des monocytes et des lymphocytes T à un site de blessure ou d'infection. Elle est exprimée par les muscles lisses et squelettiques, les cellules endothéliales et les adipocytes. Son récepteur, le *CC motif chemokine receptor 2* (CCR2), est exprimé par les cellules immunitaires, le muscle squelettique et les adipocytes (Sell & Eckel, 2007). Les niveaux circulants de MCP-1 sont élevés chez les personnes obèses ou diabétiques. Aussi, l'expression de MCP-1 est plus élevée dans les tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux des personnes obèses. La majorité de MCP-1 sécrétée par le tissu adipeux ne provient cependant pas des adipocytes, mais de la fraction stromale vasculaire. Dans les adipocytes, l'insuline, la GH, le TNF- α et l'IL-6 induisent l'expression de MCP-1 *in vitro*. Les adipocytes hypertrophiés sécrètent plus de MCP-1 et plus de cytokines pro-inflammatoires en général. Une perte de poids cause une diminution de MCP-1, ainsi qu'une diminution de macrophages dans le tissu adipeux. En dehors de son effet chimiotactique, la MCP-1 semble aussi avoir un effet direct sur les adipocytes et les muscles squelettiques en inhibant la captage du glucose (Sell & Eckel, 2007).

1. 1. 8. 6. L'angiotensinogène

L'angiotensinogène est un précurseur de l'angiotensine II, un peptide vasoconstricteur. La majorité de l'angiotensinogène circulant provient du foie, mais le tissu adipeux est la deuxième source en importance (Ronti *et al.*, 2006). L'angiotensinogène circulant est plus élevé chez les personnes obèses. Le niveau circulant d'angiotensinogène corrèle avec la pression sanguine. Chez la souris, la surexpression spécifique de l'angiotensinogène dans le tissu adipeux cause l'hypertension, mais aussi une augmentation de la masse adipeuse (Massiera *et al.*, 2001a). La délétion de l'angiotensinogène cause l'hypotension et la résistance à l'obésité induite par la diète (Massiera *et al.*, 2001b). L'angiotensine II est proposé comme un facteur trophique local du tissu adipeux (Ronti *et al.*, 2006).

1. 1. 8. 7. Le PAI-1

Le PAI-1 est un régulateur de la fibrinolyse. Il inhibe la conversion du plasminogène en plasmine. La présence de PAI-1 est donc pro-thrombotique. Le PAI-1 est exprimé dans le foie, les cellules endothéliales, les thrombocytes et le tissu adipeux (Rondinone, 2006). La majeure partie du PAI-1 provenant du tissu adipeux est sécrété par la fraction vasculaire stromale. Les niveaux de PAI-1 circulants et les niveaux de PAI-1 dans le tissu adipeux corrént positivement avec le SMet (Alessi *et al.*, 2007). Les études sur les souris déficientes en PAI-1 ont cependant montré des résultats contradictoires en ce qui a trait à l'effet du PAI-1 sur l'obésité (Rondinone, 2006).

1. 1. 8. 8. La résistine

Le rôle de la résistine dans l'obésité a été bien caractérisé chez la souris. Les souris obèses ont plus de résistine circulante que les souris minces. L'administration de résistine entraîne une résistance à l'insuline au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu

adipeux (Gnacinska *et al.*, 2009). Chez la souris obèse, la neutralisation de la résistine améliore la sensibilité à l'insuline (Ronti *et al.*, 2006). Des études *in vitro* ont aussi associé la résistine avec la dysfonction endothéliale et l'inflammation alors que la résistine semblerait causer la dyslipidémie *in vivo* (Rondinone, 2006). Chez l'humain, le lien entre la résistine et le SMet est beaucoup moins clair. La production de la résistine par les adipocytes ainsi que la corrélation entre l'obésité et la résistine circulante demeurent un sujet de controverse. Il semble toutefois que la résistine est plus fortement exprimée dans le tissu adipeux viscéral des personnes obèses (Gnacinska *et al.*, 2009). Il est aussi intéressant de noter que les endotoxines augmentent la production de résistine par les macrophages *in vitro* et le niveau de résistine circulante *in vivo* (Rondinone, 2006).

1. 2. L'inflammation chronique liée à l'obésité

Lorsqu'elle est accompagnée du SMet, l'obésité est caractérisée par une inflammation systémique chronique et par l'inflammation locale du tissu adipeux. Cette inflammation serait une cause potentielle des maladies associées à l'obésité comme l'athérosclérose ou le DT2 (Hotamisligil, 2006). Cette section tentera de survoler les mécanismes du développement de cette inflammation au niveau du tissu adipeux.

1. 2. 1. L'initiation de l'inflammation

Plusieurs types cellulaires coexistent dans le tissu adipeux. Plusieurs de ces cellules, comme les macrophages, les lymphocytes T, les adipocytes ou les cellules endothéliales sont toutes susceptibles de jouer un rôle dans une réaction inflammatoire (Maury & Brichard, 2010). Dans un tissu adipeux sain, l'inflammation est contrôlée par les macrophages résidents polarisés M2 aussi appelés « alternativement activés ». Les macrophages M2 expriment l'arginase, une enzyme qui bloque l'activité de la iNOS, et des cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) et l'*interleukin-1 receptor*

antagonist (IL-1ra) (Gordon, 2007). Les lymphocytes T résidants dans le tissu adipeux ont un phénotype *T-helper 2* (Th2) ou régulateurs (Treg) qui sécrètent aussi des cytokines anti-inflammatoires (Kaminski & Randall, 2010). La composition cellulaire du tissu adipeux évolue au fur et à mesure que s'installe l'obésité et l'inflammation.

L'obésité est caractérisée par une augmentation du nombre d'adipocytes différenciés, c'est-à-dire l'hyperplasie. De plus, la grosseur des adipocytes, donc leur hypertrophie, augmente lorsque les cellules se gorgent de triglycérides. Cette hypertrophie est associée avec un changement des adipokines sécrétées. La quantité de cytokines pro-inflammatoires et de MCP-1 est plus élevée dans les adipocytes hypertrophiés. Cette augmentation serait causée par une hyperactivation du *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B) et de la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). La MCP-1 agit comme un chimioattracteur pour les monocytes/macrophages (Maury & Brichard, 2010). L'expression du facteur *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), un chimioattracteur des lymphocytes, est aussi augmenté par l'hypertrophie (Kaminski & Randall, 2010).

Les cytokines pro-inflammatoires des adipocytes auront un effet activateur sur les cellules endothéliales du tissu adipeux. L'activation des cellules endothéliales mène à l'expression des molécules d'adhérence, de facteurs chimiotactiques et de cytokines. Cela causera une augmentation de l'adhésion et de la migration de monocytes/macrophages dans le tissu adipeux (Sengenès *et al.*, 2007). Il a été démontré que les niveaux circulants des formes solubles de l'*intercellular adhesion molecule -1* (ICAM-1), de la *vascular cell adhesion protein-1* (VCAM-1) et de la E-sélectine sont augmentés chez les personnes obèses (Ferri *et al.*, 1999).

L'expansion rapide du tissu adipeux cause une hypoxie locale dans le tissu adipeux. Cette hypoxie serait exacerbée par une diminution du flux sanguin causée par l'adhésion de leucocytes aux cellules endothéliales activées (Maury & Brichard, 2010). Chez les sujets obèses, l'expression du *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), un facteur de transcription qui régule l'homéostasie de l'oxygène, est plus élevée dans le tissu adipeux sous-cutané (Cancello *et al.*, 2005). *In vitro*, l'hypoxie diminue l'expression d'adiponectine et augmente

l'expression de PAI-1, de TNF- α , de l'interleukine-1 (IL-1), de l'IL-6, de MCP-1, de TGF- β , de HIF-1 α , de *glucose transporter 1* (GLUT1) et de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dans les adipocytes. L'hypoxie *in vitro* augmente aussi l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages (Maury & Brichard, 2010). L'expansion du tissu adipeux nécessite l'activation de l'angiogénèse (Rupnick *et al.*, 2002).

Les stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydatif sont aussi connus pour activer NF- κ B et les MAPKs. Ces phénomènes sont donc aussi susceptibles de faire partie de l'initiation de l'inflammation (Hotamisligil, 2006).

1. 2. 2. L'infiltration des cellules immunitaires

L'obésité est associée avec l'infiltration de macrophages dans le tissu adipeux. L'infiltration des macrophages corrèle positivement avec la taille des adipocytes et l'IMC (Weisberg *et al.*, 2003). Les macrophages s'infiltrent préférentiellement dans le tissu adipeux viscéral plutôt que sous-cutané (Maury & Brichard, 2010). Cette infiltration a aussi pour effet de changer la balance des macrophages M1 et M2. En effet, les macrophages qui s'infiltrent dans le tissu adipeux obèse sont polarisés M1, aussi appelés «classiquement activés», c'est-à-dire qu'ils expriment la iNOS et des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (Lumeng *et al.*, 2007).

Il a été démontré récemment que les lymphocytes T sont aussi présents dans le tissu adipeux, surtout viscéral. Chez les personnes obèses, il y a une augmentation des lymphocytes T dans le tissu adipeux (Nishimura *et al.*, 2009) qui peut résulter d'une augmentation de l'infiltration ou de la prolifération. L'augmentation des lymphocytes T dans le tissu adipeux précède l'infiltration des macrophages. De plus, l'infiltration des macrophages semble être dépendante des lymphocytes T CD8 positifs chez la souris (Nishimura *et al.*, 2009). Une diète riche en gras augmente le nombre de lymphocytes T exprimant l'interféron- γ (IFN- γ), donc d'un phénotype *T-helper 1* (Th1), et diminue les lymphocytes T avec un phénotype Th2 dans le tissu adipeux. Chez la souris, l'IFN- γ est

nécessaire pour l'accumulation des macrophages et une haute expression de TNF- α , MCP-1 et RANTES. La leptine est aussi connue pour activer les cellules T et favoriser un phénotype Th1 (La Cava & Matarese, 2004). Les lymphocytes Treg, considérés comme suppresseurs de la réponse immunitaire, présents dans le tissu adipeux viscéral sont diminués chez les personnes obèses. Cette observation pourrait être expliquée par l'effet antiprolifératif de la leptine sur les Treg. Chez la souris, la quantité de Treg dans le tissu adipeux viscéral corrèle inversement avec la résistance à l'insuline (Kaminski & Randall, 2010).

1. 2. 3. L'immunité innée et le métabolisme

Avant de poursuivre l'explication des mécanismes de l'inflammation au niveau du tissu adipeux, il faut d'abord expliquer le rôle de l'immunité innée dans cette réponse inflammatoire.

Les adipocytes et les cellules immunitaires partagent plusieurs points en commun. Des adipokines comme le TNF- α , les interleukines, l'adiponectine, la leptine et la résistine ont été identifiées et caractérisées pour leur effet sur l'inflammation. À l'inverse, les molécules impliquées dans l'inflammation ont souvent des effets métaboliques sur les adipocytes. La découverte de l'expression de *toll-like receptors* (TLRs) et d'une réponse aux lipopolysaccharides (LPS) dans les adipocytes proposait un lien entre le métabolisme et l'immunité innée. Il a aussi été observé que, lors d'une infection ou d'une septicémie, des problèmes métaboliques tels que la résistance à l'insuline ou des niveaux circulants élevés de TGs, d'AGLs et de VLDL en résultaient (Schaffler & Scholmerich, 2010).

Il est connu que les AGLs peuvent causer la résistance à l'insuline dans le foie et le muscle squelettique (Boden, 2011). Les premiers liens entre l'immunité innée et les acides gras ont été soulevés en 2001. Il a été démontré que les acides gras saturés pouvaient activer le TLR-4 et induire une réponse inflammatoire dans les macrophages (Lee *et al.*, 2001b). Par la suite, il a été démontré que les acides gras saturés pouvaient induire une

réponse inflammatoire dépendante du TLR-4 dans les macrophages et les adipocytes (Shi *et al.*, 2006). Dans les adipocytes 3T3-L1, les acides gras saturés activent le NF- κ B et la synthèse de TNF- α et d'IL-6 tout en induisant une résistance à l'insuline (Song *et al.*, 2006).

1. 2. 3. 1. Le *toll-like receptor-4*

Le TLR-4 fait partie de la grande famille des TLRs, dont on connaît 12 membres chez les mammifères. Ces récepteurs jouent un rôle dans l'immunité innée en reconnaissant des patrons moléculaires conservés chez les pathogènes microbiens. L'activation des TLRs déclenche une réponse immunitaire pro-inflammatoire (Trinchieri & Sher, 2007). Le TLR-4 fut initialement identifié comme le principal récepteur du LPS (Schaffler & Scholmerich, 2010), une composante de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives, avant d'être ensuite reconnu comme un récepteur des acides gras saturés (Lee *et al.*, 2001b).

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui possèdent un domaine extracellulaire *leucine rich repeat* (LRR) et un domaine intracellulaire *toll/IL-1 receptor* (TIR). Dans le cas du LPS, d'autres corécepteurs sont nécessaires pour l'activation du TLR-4. Le LPS doit d'abord lier une protéine plasmatique, la *LPS-binding protein* (LBP), qui liera ensuite le *cluster of differentiation 14* (CD14) présent à la surface de la cellule. Le CD14 présente ensuite le complexe LPS-LBP au complexe formé par le TLR-4 et de la *myeloid differentiation protein-2* (MD-2). Suite à cette activation, le domaine TIR initie les voies de signalisation du TLR-4 en recrutant des protéines adaptatrices. Les voies de signalisation du TLR-4 peuvent être divisées en 2 grandes voies. La première est dépendante du *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88). La deuxième est indépendante de MyD88 et dépendante de *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) (Kawai & Akira, 2010).

1. 2. 3. 1. 1. La voie de signalisation de MyD88

L'activation du TLR-4 amène le recrutement de la protéine adaptatrice *TIR-domain-containing adapter protein* (TIRAP) sur son domaine TIR (Figure 16). TIRAP recrute une autre protéine adaptatrice, MyD88. MyD88 sert à son tour au recrutement des *IL-1 receptor-associated kinases* (IRAKs). Ces kinases se dissocient de MyD88 pour activer le *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6). TRAF6 forme un complexe ubiquitine ligase avec la *ubiquitin conjugating enzyme 13* (Ubc13) et la *ubiquitin conjugating enzyme variant 1A* (Uev1A) pour synthétiser des chaînes de polyubiquitine liées à la lysine 63 sur TRAF6 et IRAK1. De cette façon, TRAF6 active la *transforming growth factor- β -activated protein kinase 1* (TAK1) de façon ubiquitine dépendante. Ce sont les chaînes de polyubiquitine liées à la lysine 63 qui amènent la liaison des *TAK-binding proteins* (TABs) qui induisent l'activité de TAK1. Ces chaînes de polyubiquitines activent aussi le *NF- κ B essential modulator* (NEMO). NEMO est un régulateur essentiel du complexe *inhibitor of κ B kinase* (IKK). TAK1 peut ensuite activer IKK- β , aussi appelée IKK-2, par phosphorylation. Le complexe IKK, formé des sous-unités α , β et γ , phosphoryle à son tour les *inhibitors of κ B* (I κ Bs). La phosphorylation des I κ Bs entraîne leur dégradation et l'activation de NF- κ B. NF- κ B peut donc être transloqué au noyau et activer la transcription de gènes pro-inflammatoires. Les cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 et interleukine-12 (IL-12) sont entre autres induites par NF- κ B. TAK1 active aussi des MAPK kinases (MAPKKs) qui activent à leur tour les MAPKs JNK, p38 et *extracellular signal-regulated kinase 1 et 2* (ERK1 et ERK2). L'activation de ces MAPKs mène à l'activation subséquente de facteurs de transcription comme *activator protein-1* (AP-1) qui est aussi nécessaire pour la transcription de cytokines pro-inflammatoires avec NF- κ B (Kawai & Akira, 2006; Kawai & Akira, 2010).

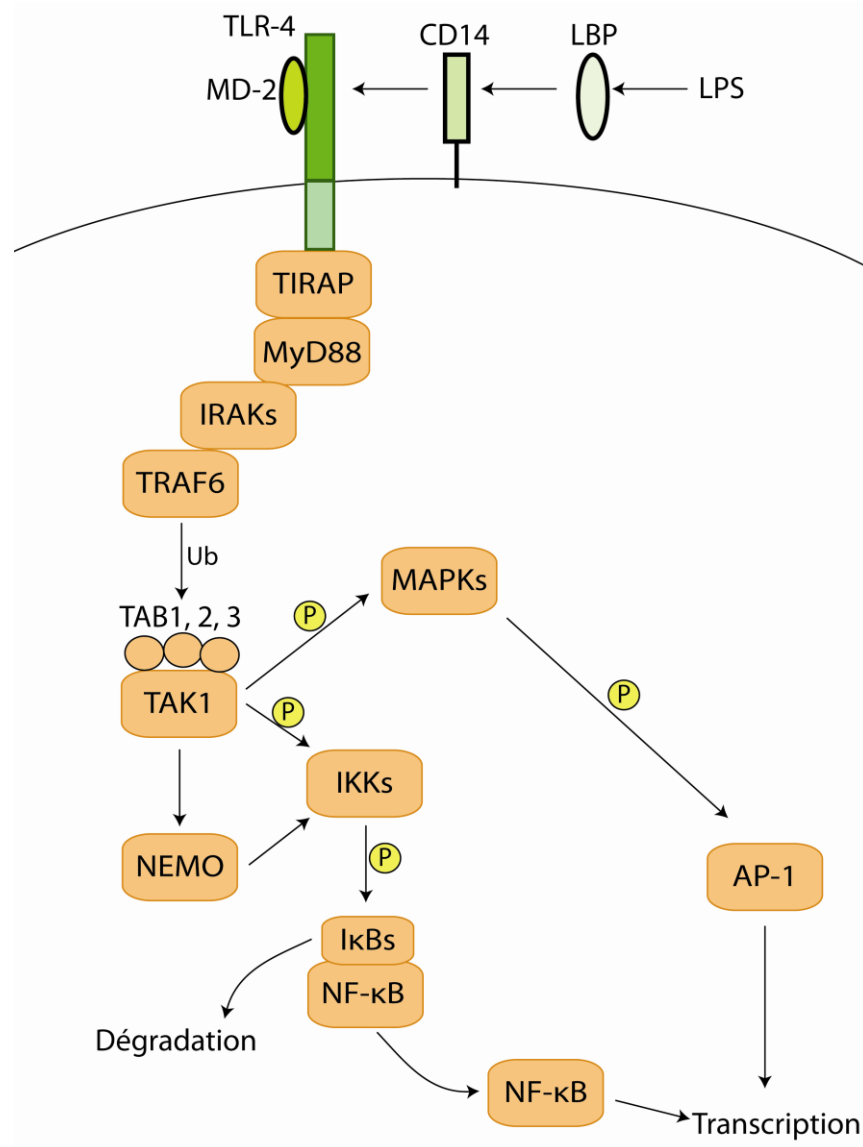


Figure 16 : La signalisation du TLR-4 dépendante de MyD88. L'activation du TLR-4 par le LPS amène le recrutement de protéines adaptatrices, TIRAP et MyD88, qui activent les IRAKs, TRAF6 et TAK1. TAK1 pourra phosphoryler les MAPKs et le complexe IKK pour permettre l'activation de AP-1 et NF-κB qui induiront la transcription des cytokines pro-inflammatoires. Les phosphorylations sont désignées par des cercles jaunes. AP-1, *activator protein-1*; CD14, *cluster of differentiation 14*; IκBs, *inhibitors of κB*; IKKs, *inhibitor of κB kinases*; IRAKs, *IL-1 receptor-associated kinases*; LBP, *LPS-binding protein*; LPS, *lipopolysaccharide*; MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*; MD-2,

myeloid differentiation protein-2; MyD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*; NEMO, *NF- κ B essential modulator*; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; TAB, *TAK-binding protein*; TAK1, *transforming growth factor- β -activated protein kinase 1*; TIRAP, *TIR- domain-containing adapter protein*; TLR-4, *toll-like receptor-4*; TRAF6, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*; Ub, ubiquitine. Figure inspirée de Kawai et Akira (Kawai & Akira, 2006;Kawai & Akira, 2010).

1. 2. 3. 1. 2. La voie de TRIF

L'activation de la voie de TRIF se fait après l'activation de la voie de MyD88. Suite à son activation, le TLR-4 subit une endocytose et forme un complexe avec la protéine adaptatrice *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) sur son domaine TIR. La protéine adaptatrice TRIF se joint aussi à ce complexe dans l'endosome. TRIF active ensuite plusieurs voies. TRIF recrute TRAF6 pour son activation. TRIF active aussi la *receptor interacting protein 1* (RIP1) dans un complexe protéique avec la protéine adaptatrice *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD) et Pellino-1. TRAF6 fait aussi partie de ce complexe nécessaire à l'activation de TAK1, du complexe IKK, de NF- κ B et des MAPKs de la même façon que dans la voie de MyD88. Plus particulièrement, TRIF se trouve à activer la *TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1* (TBK1) et la *IKK-related kinase inducible* (IKKi) par l'entremise de TRAF3. Ces kinases phosphorylent le facteur de transcription *interferon regulatory factor* (IRF-3) qui sera transloqué au noyau. L'activité de IRF-3 est reconnue pour induire d'autres IRFs de même que les interférons (IFNs) de type I, c'est-à-dire l'interféron- β (IFN- β) et les différents sous-types d'IFNs- α . En plus de l'activation des IRFs, les activités de NF- κ B et de AP-1 sont nécessaires pour la transcription des interférons de type I (Kawai & Akira, 2006;Kawai & Akira, 2010). Les interférons de type I ont divers effets biologiques, les plus connus étant sur la réponse immunitaire innée et adaptative (Theofilopoulos *et al.*, 2005).

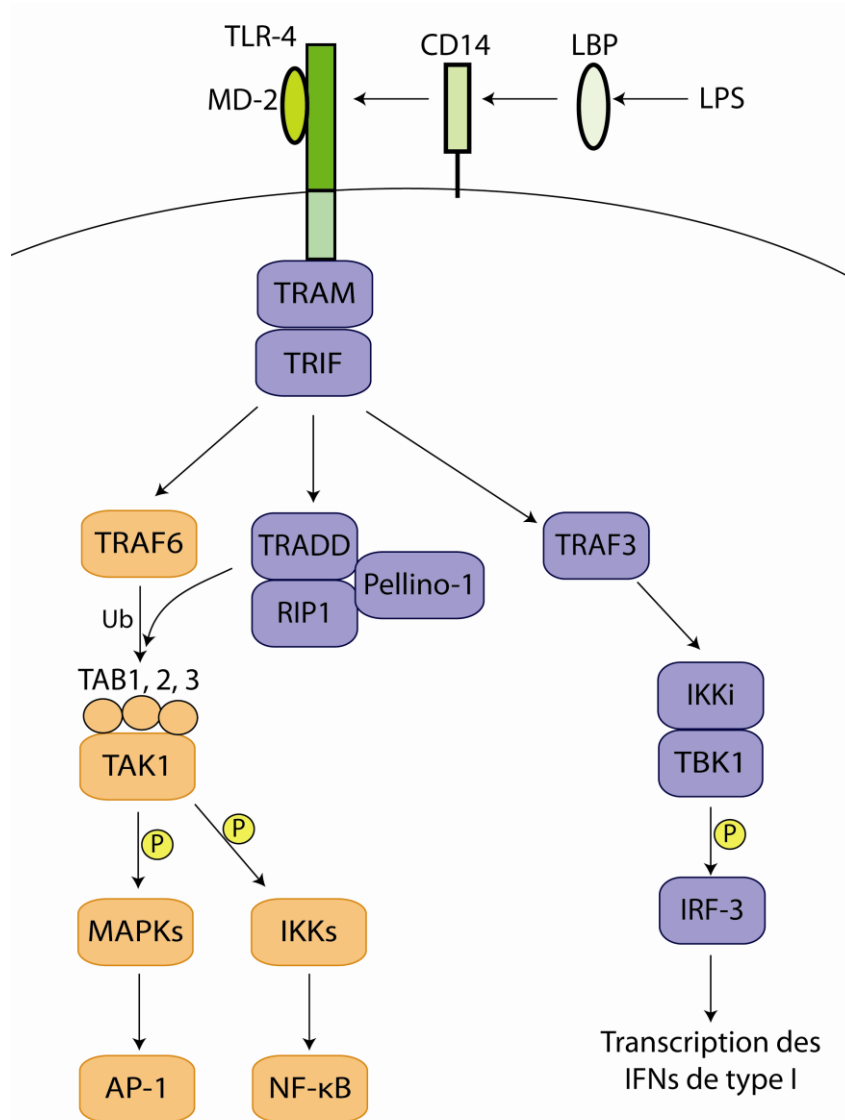


Figure 17 : La signalisation du TLR-4 dépendante de TRIF. L'activation du TLR-4 par le LPS amène le recrutement de protéines adaptatrices, TRAM et TRIF, qui activent les TRAF6, le complexe TRADD-RIP1-Pellino-1 et TRAF3. L'activation de TAK1 par TRAF6 et le complexe TRADD-RIP1-Pellino-1 permettra l'activation de AP-1 et NF-κB comme dans la voie dépendante de MyD88. D'autre part, TRAF3 pourra activer IRF-3 par l'entremise de IKKi et TBK1 ce qui induira les IFNs de type I. Les phosphorylations sont désignées par des cercles jaunes. AP-1, *activator protein-1*; CD14, *cluster of differentiation 14*; IFNs, interférons; IKKi, *IKK-related kinase inducible*; IKKs, *inhibitor of κB kinases*;

IRF-3, *interferon regulatory factor-3*; LBP, *LPS-binding protein*; LPS, *lipopolysaccharide*; MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*; MD-2, *myeloid differentiation protein-2*; NF- κ B, *nuclear factor-kappa B*; RIP1, *receptor interacting protein 1*; TAB, *TAK-binding protein*; TAK1, *transforming growth factor- β -activated protein kinase 1*; TBK1, *TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1*; TLR-4, *toll-like receptor-4*; TRADD, *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*; TRAF, *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; TRAM, *TRIF-related adapter molecule*; TRIF, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ; Ub, ubiquitine. Figure inspirée de Kawai et Akira (Kawai & Akira, 2006; Kawai & Akira, 2010).

1. 2. 3. 2. Le *toll-like receptor-4* et le métabolisme

Après la découverte du lien entre les lipides saturés et le TLR-4, plusieurs études sur le lien entre le TLR-4 et le métabolisme ont été réalisées. Au niveau de l'expression, le TLR-4 est plus fortement exprimé dans les adipocytes différenciés que dans les préadipocytes chez l'humain (Fain, 2010). Chez les sujets obèses, l'expression du TLR-4 est augmentée dans les monocytes, les leucocytes sanguins et le muscle squelettique. Une perte de poids fait diminuer l'expression du TLR-4 des monocytes (Fresno *et al.*, 2011). Il a été montré que l'expression du TLR-4 est augmentée dans le tissu adipeux de souris obèses génétiquement ou induites par la diète (Shi *et al.*, 2006). Une glycémie élevée augmente l'expression des TLRs des macrophages *in vivo* et *in vitro* (Fresno *et al.*, 2011). L'activation du TLR-4 dans les adipocytes 3T3-L1 inhibe la différenciation et est associée avec une diminution de l'expression de PPAR- γ (Poulain-Godefroy & Froguel, 2007). L'activation du TLR-4 avec des acides gras augmente aussi sa propre expression dans les adipocytes 3T3-L1 (Schaeffler *et al.*, 2009). L'activation du TLR-4 dans les adipocytes stimule la lipolyse (Zu *et al.*, 2009). Il a été démontré que les souris déficientes en TLR-4 sont résistantes à l'induction des cytokines pro-inflammatoires par les AGLs et à la résistance à l'insuline (Shi *et al.*, 2006; Tsukumo *et al.*, 2007). L'effet de la déficience en

TLR-4 sur l'obésité est toutefois contradictoire avec des hausses, des baisses ou l'absence d'effet, selon les études (Fresno *et al.*, 2011).

Contrairement aux acides gras saturés, les acides gras insaturés semblent inhiber l'activation du TLR-4. L'acide docosahexaénoïque, par exemple, peut inhiber l'effet du LPS et des acides gras saturés sur l'activation de NF- κ B et sur l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Lee *et al.*, 2001b; Shi *et al.*, 2006). Dans les adipocytes 3T3-L1, l'activation du TLR-4 avec le LPS n'active pas la phosphorylation de IRF-3 (Kopp *et al.*, 2010). Dans les macrophages par contre, les acides gras saturés, tout comme le LPS, activent les voies de MyD88 et de TRIF (Abe *et al.*, 2008). Au niveau de l'activation du TLR-4, il semblerait que les acides gras saturés ne lient pas directement le récepteur (Schaeffler *et al.*, 2009).

Le TLR-4 active IRF-3 qui induit la transcription des IRFs. Il a été démontré que les IRFs, qui sont tous exprimés dans les adipocytes, régulent l'adipogenèse. De plus les IRF-3 et IRF-4 ont des effets inhibiteurs sur l'adipogenèse (Eguchi *et al.*, 2008). IRF-4 serait induit par le jeûne et serait un inducteur de la lipolyse par l'induction de l'ATGL et de la HSL (Eguchi *et al.*, 2011).

1. 2. 4. Les cytokines et les acides gras saturés, une boucle paracrine

Comme mentionné précédemment, l'hypertrophie, l'hypoxie et le stress du réticulum endoplasmique dans les adipocytes augmentent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Maury & Brichard, 2010). Les macrophages M1 et les lymphocytes T s'infiltrent dans le tissu adipeux suite à ces changements (Kaminski & Randall, 2010). L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , dans le tissu adipeux induit la lipolyse de même que l'activation de NF- κ B dans les adipocytes et les macrophages. Les adipocytes sécrètent donc plus d'acides gras saturés qui sont des

ligands du TLR-4. Le TLR-4 exprimé sur les macrophages et les adipocytes peut donc être activé pour produire une quantité encore plus importante de cytokines pro-inflammatoires et pro-lipolytiques. Il s'établit donc un cercle vicieux entre les acides gras saturés et les cytokines pro-inflammatoires impliquant les macrophages et les adipocytes (Figure 18) (Suganami & Ogawa, 2010). Ce cercle vicieux ne fait qu'exacerber l'inflammation dans le tissu adipeux.

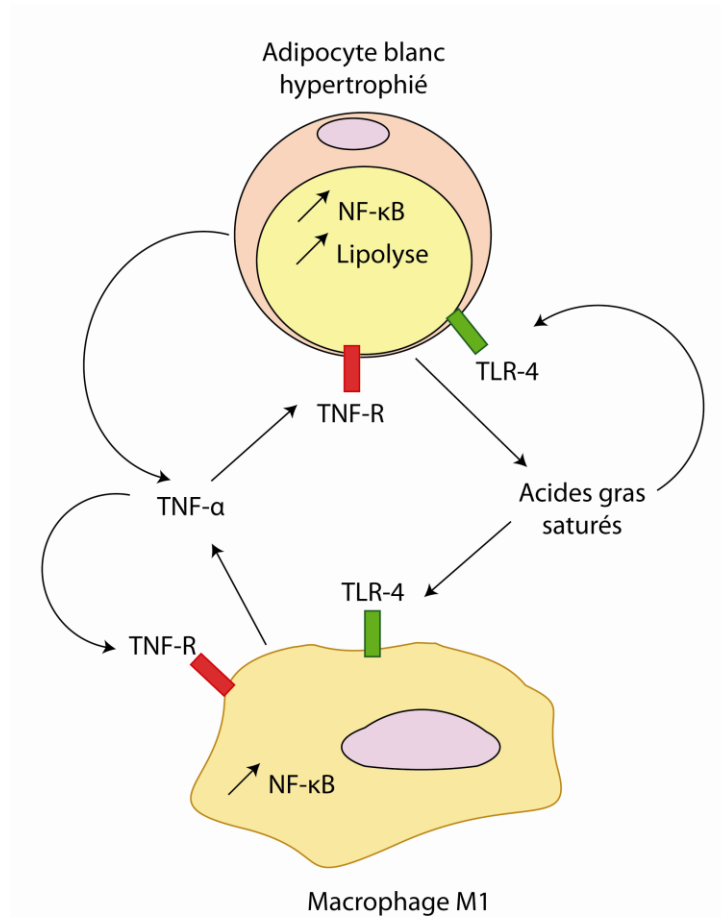


Figure 18 : Boucle paracrine entre les adipocytes et les macrophages dans le tissu adipeux lors de l'obésité. Le TNF- α , induit dans les adipocytes hypertrophiés, favorise la sécrétion d'acides gras saturés et de cytokines. Ces molécules vont favoriser la sécrétion de plus de cytokines dans les macrophages et les adipocytes. Le cercle vicieux est installé. NF- κ B, *nuclear factor-kappa B*; TLR-4, *toll-like receptor-4*; TNF- α , *tumor necrosis factor- α* ;

TNF-R, *TNF-receptor*. Figure modifiée de Suganami et Ogawa (Suganami & Ogawa, 2010).

1. 2. 5. L'endotoxémie métabolique (EM)

L'EM est un nouveau concept proposé il y a quelques années pour tenter d'expliquer l'inflammation systémique dans les cas d'obésité. Selon le groupe de Remy Burcelin, à l'origine de ce concept, l'EM débiterait dans l'intestin. Une diète riche en lipides causerait un changement du microbiote intestinal, aussi appelé « flore intestinale » (Cani *et al.*, 2008). La proportion de bactéries gram-négatives augmente. La perméabilité des jonctions cellules-cellules augmente aussi ce qui favorise la translocation de produits bactériens, comme le LPS, dans les capillaires intestinaux (Cani *et al.*, 2008). Il a été démontré qu'un changement de microbiote intestinal survient également chez les souris génétiquement obèses. Le microbiote obèse semble augmenter l'absorption d'énergie contenue dans la nourriture (Turnbaugh *et al.*, 2006). De plus, les animaux vivants dans un environnement stérile sont résistants à l'obésité induite par la diète (Backhed *et al.*, 2007). Cette résistance serait causée par deux mécanismes indépendants qui favoriseraient le catabolisme des acides gras. Le premier est une augmentation de l'expression du *fasting-induced adipose factor* (FIAF) qui est un inhibiteur circulant de la LPL. Le deuxième est une augmentation de l'activité de l'AMPK au niveau du muscle squelettique et du foie (Backhed *et al.*, 2007).

Chez la souris, l'endotoxémie, c'est-à-dire la quantité circulante d'endotoxines, fluctue en fonction du statut nutritionnel même lors d'une diète normale. La période postprandiale est marquée par une endotoxémie qui est environ 50% plus élevée par rapport à une période de jeûne. Une diète riche en lipides sur une période de 4 semaines augmente l'endotoxémie de façon chronique à environ 5 *endotoxin unit* (EU)/mL, soit de 2 à 3 fois le niveau retrouvé chez un animal sous diète normale (Cani *et al.*, 2007). Une diète riche en glucides augmente l'endotoxémie de façon beaucoup moins importante qu'une diète riche en lipides (Amar *et al.*, 2008). Une perfusion continue de LPS pour atteindre une

endotoxémie comparable à une diète riche en lipides reproduit les effets de la diète riche en lipides sur la glycémie, l'insulinémie et le gain de poids. Les macrophages infiltrés et les marqueurs d'inflammation dans le tissu adipeux ainsi que les TGs hépatiques sont aussi plus élevés. Une résistance à l'insuline au niveau du foie est aussi observée. Les souris mutantes pour le CD14 résistent aux effets métaboliques de la diète riche en lipides ou à la perfusion de LPS (Cani *et al.*, 2007). Un traitement avec des antibiotiques (ampicilline-néomycine) réduit le contenu intestinal en LPS, l'EM, l'intolérance au glucose, le gain de poids corporel, l'adiposité, l'inflammation, le stress oxydatif et l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux viscéral chez les souris nourries avec une diète riche en lipides. Tous ces paramètres, excepté la réduction de poids corporel, sont aussi améliorés chez les souris *ob/ob* sous antibiotiques (Cani *et al.*, 2008).

Chez l'humain, il a été démontré que les patients avec un DT2 ont des niveaux circulants de LPS plus élevés (Creely *et al.*, 2007). Chez des hommes en santé, l'endotoxémie est corrélée avec le contenu énergétique et le contenu en gras des repas consommés (Amar *et al.*, 2008). Une diète riche en gras pendant 1 mois fait augmenter l'endotoxémie de 71% chez des personnes en santé (Pendyala *et al.*, 2012).

1. 2. 6. Les interférons

Peu d'études ont été réalisées pour explorer les liens entre les interférons et le métabolisme du tissu adipeux. Ceci peut être expliqué, en partie, par la nouveauté des concepts d'EM, d'activation du TLR-4 par des acides gras saturés et de l'infiltration des lymphocytes Th1 dans le tissu adipeux. Avant l'émergence de ces concepts, le lien entre les interférons et les adipocytes reposait essentiellement sur une situation d'infection par un pathogène. Les IFNs sont d'abord reconnus pour leurs effets sur la prolifération et la survie cellulaire des immunocytes ainsi que sur la réponse immunitaire et antivirale (Stark *et al.*, 1998; Theofilopoulos *et al.*, 2005). Il a été démontré que l'IFN- γ favorise la polarisation des lymphocytes T en Th1 plutôt qu'en Th2. Pour se faire, l'IFN- γ augmente l'expression de

l'IL-12 et de son récepteur tout en diminuant l'expression de l'IL-4. L'IFN- γ inhibe aussi la prolifération des Th2. De plus, l'IFN- γ joue un rôle important dans l'activation des macrophages (Stark *et al.*, 1998).

1. 2. 6. 1. La signalisation des interférons

Les IFNs de type I et II activent la voie « classique » JAK-STAT, mais aussi d'autres voies alternatives moins connues.

1. 2. 6. 1. 1. Les interférons de type I

Les IFNs de type I sont induits en réponse à l'activation du TLR-4 et de IRF-3. Les IFNs sont ensuite sécrétés pour activer leur récepteur. Les nombreux sous-types d'IFNs- α et l'IFN- β activent le même récepteur hétérodimérique ubiquitaire composé des *interferon alpha/beta receptor 1* et 2 (IFNAR1/2) (Figure 19). La liaison de l'IFN se ferait sur le IFNAR2 et activerait la dimérisation du récepteur. Cette dimérisation induirait la phosphorylation des JAKs qui sont des tyrosine kinases associées à chaque sous-unité du récepteur. La tyrosine kinase 2 (Tyk2) est associée avec le IFNAR1 alors que la Janus kinase 1 (JAK1) est associée au IFNAR2. L'activation des JAKs par leur transphosphorylation amène la phosphorylation du domaine intracellulaire du IFNAR1. Avant l'activation du récepteur, les STAT1 et STAT2 sont associés, inactifs, sur le IFNAR2. Une fois phosphorylé, le IFNAR1 devient un site de liaison pour le STAT2 qui sera lui aussi phosphorylé. Le STAT2 phosphorylé recrute le STAT1 qui sera phosphorylé à son tour. L'hétérodimère formé des STAT1-STAT2 phosphorylés se dissocie du récepteur pour transloquer au noyau où il s'associe avec le IRF-9. Le complexe formé de STAT1, STAT2 et IRF-9 se nomme *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3). ISGF3 lie les régions promotrices contenant les *interferon-stimulated response elements* (ISREs) pour induire les gènes stimulés par les IFNs, c'est-à-dire les *interferon-stimulated genes* (ISGs). Les IFNs

de type I sont aussi capables d'activer la formation d'homodimères STAT1-STAT1 qui peuvent activer la transcription d'ISGs possédant une *gamma activated sequence* (GAS), présente habituellement sur les gènes régulés par l'IFN- γ (Theofilopoulos *et al.*, 2005).

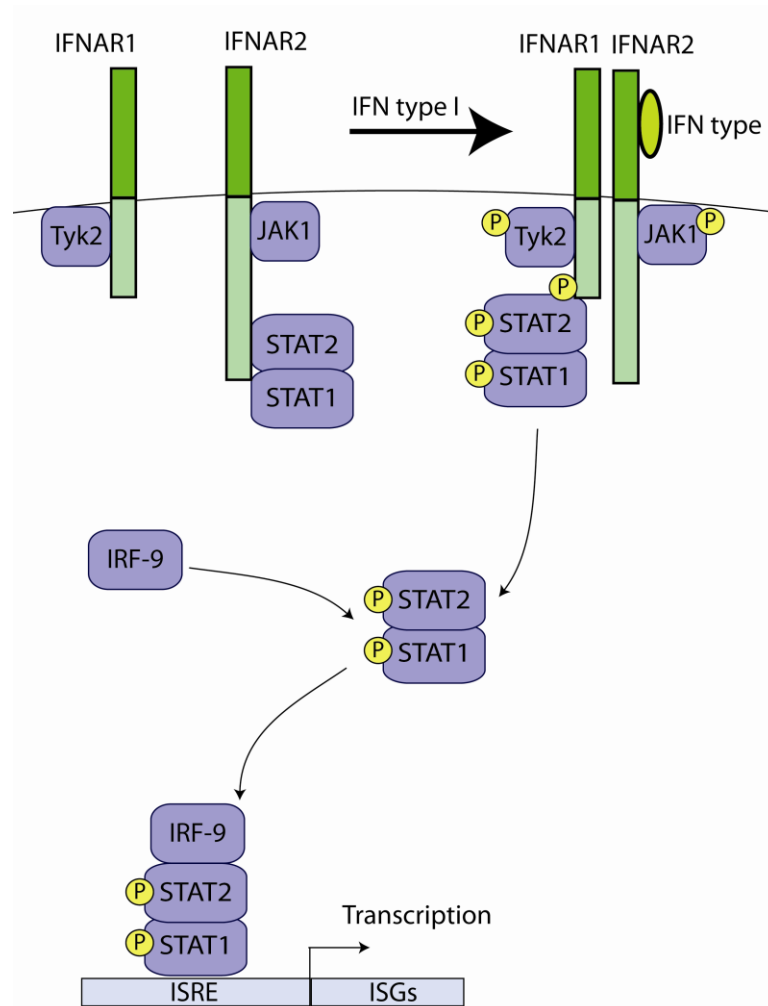


Figure 19 : Signalisation classique des IFNs de type I. La liaison de l'IFN amène la dimérisation du récepteur ce qui activera les JAKs, Tyk2 et JAK1, par phosphorylation. Le IFNAR1 sera phosphorylé pour devenir un site de liaison pour STAT2 qui sera aussi phosphorylé. Le STAT1 se liera à STAT2 pour être aussi phosphorylé. Le complexe STAT1-STAT2 phosphorylé se dissocie du récepteur, transloque au noyau et s'associe avec IRF-9 pour lier les ISREs et activer la transcription des ISGs. IFN, interféron; IFNAR1/2, *IFN alpha/beta receptor 1/2*; IRF-9, *interferon regulatory factor-9*; ISGs, *IFN-stimulated*

genes; ISREs, *IFN-stimulated response elements*; JAK1, Janus kinase 1; STAT1/2, *signal transducer and activator of transcription 1/2*; Tyk2, tyrosine kinase 2. Figure inspirée de Theofilopoulos et al. (Theofilopoulos *et al.*, 2005).

Les IFNs de type I activent aussi des voies alternatives. Il est connu que les IFNs de type I activent NF- κ B (Figure 20). Deux voies distinctes seraient utilisées pour activer le NF- κ B. La première impliquerait le STAT3 qui s'associerait au IFNAR1 phosphorylé de façon Tyk2 dépendante, mais JAK1 indépendante. La liaison de STAT3 permettrait la liaison de la PI3K sur le IFNAR1. La stimulation avec les IFNs de type I active la phosphorylation de IRS-1 qui serait nécessaire pour l'activation de la PI3K. L'activation de la PI3K activerait ensuite Akt qui activerait le complexe IKK. L'activité de NF- κ B est ainsi libérée. La deuxième voie impliquerait l'activation de TRAF2 qui activerait ensuite la *NF- κ B-inducing kinase* (NIK). La NIK activerait ensuite le complexe IKK ce qui activerait aussi NF- κ B. L'activation de NF- κ B, par la voie de STAT3 ou bien celle de TRAF2, serait nécessaire pour la survie cellulaire suite à l'activation avec les IFNs (Du *et al.*, 2007).

La MAPK p38 est aussi activée par les IFNs de type I. L'activation de p38 serait nécessaire pour l'induction des ISGs et la réponse antivirale, mais aussi pour l'induction des gènes activés par NF- κ B. Les mécanismes d'activation de p38 par les IFNs, de même que les effecteurs de cette kinase, ne sont pas très bien connus. Il semble toutefois que l'activation de p38 soit dépendante de Tyk2 (Rani & Ransohoff, 2005). Pour ce qui est de la MAPK ERK, son activation par les IFNs de type I est controversée. Une étude a montré l'activation de ERK2 par l'IFN- β dans les lymphoblastes U266. ERK2 interagirait avec le IFNAR1 et STAT1. L'expression d'un dominant-négatif de ERK2 empêcherait la transcription d'un gène rapporteur par l'IFN- β (David *et al.*, 1995). D'autres études utilisant aussi des dominants négatifs de ERK2 ou encore des inhibiteurs pharmacologiques n'ont toutefois pu reproduire ces résultats sur l'activation de gènes rapporteurs (Rani & Ransohoff, 2005).

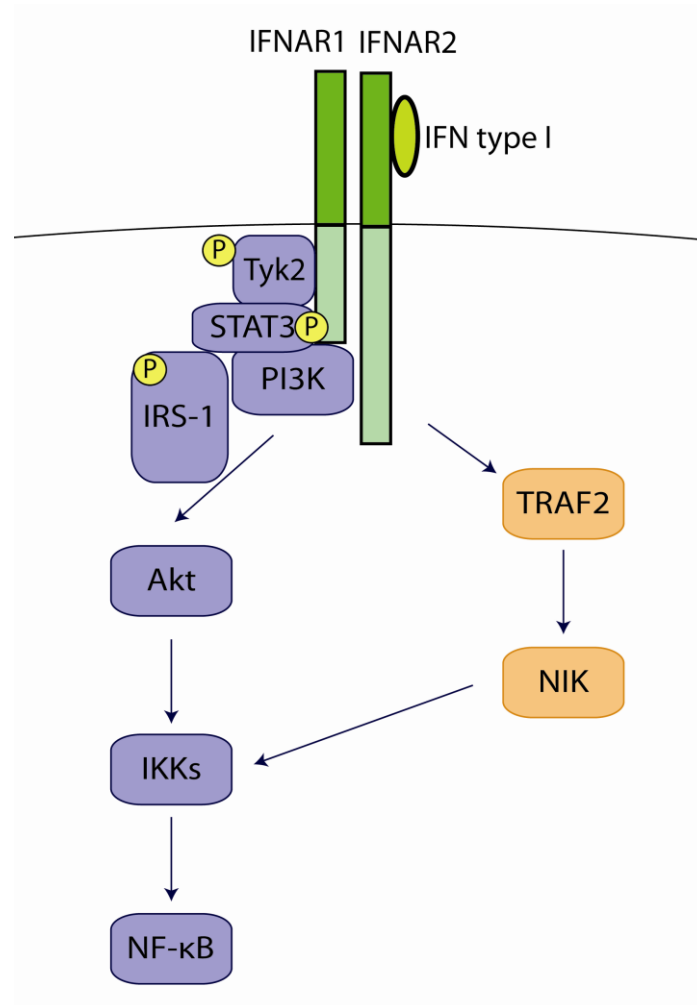


Figure 20 : L'activation de NF-κB par les IFNs de type I. Le IFNAR1 phosphorylé par Tyk2 sert de site de liaison pour STAT3. Le STAT3, en collaboration avec IRS-1 phosphorylé, permet le recrutement et l'activation de la PI3K. La PI3K active ensuite Akt qui active à son tour le complexe IKK. Une deuxième voie active le complexe IKK par l'activation de TRAF2 et de NIK. Akt, *a serine/threonine kinase*; IFN, interféron; IFNAR1/2, *IFN alpha/beta receptor 1/2*; IKKs, *inhibitor of κB kinases*; IRS-1, *insulin receptor substrate-1*; NF-κB, *nuclear factor-kappa B*; NIK, *NF-κB-inducing kinase*; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*; TRAF2, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*; Tyk2, *tyrosine kinase 2*. Figure inspirée de Du et al. (Du et al., 2007).

1. 2. 6. 1. 2. Les interférons de type II

L'IFN- γ est le seul membre des IFNs de type II. L'IFN- γ dans le tissu adipeux proviendrait principalement des lymphocytes Th1. L'IFN- γ se lierait d'abord à deux sous-unités *interferon gamma receptor 1* (IFNGR1) amenant leur dimérisation (Figure 21). Ces deux sous-unités recruteraient chacune une sous-unité *interferon gamma receptor 2* (IFNGR2). Les protéines réceptrices sont exprimées sur presque tous les types cellulaires. La dimérisation de chaque hétérodimère induirait la phosphorylation des JAKs qui leur sont associées. La JAK1 est associée avec le IFNGR1 tandis que la Janus kinase 2 (JAK2) est associée au IFNGR2. JAK2 serait d'abord phosphorylé, puis la JAK1 serait phosphorylée à son tour. Cette activation amène la phosphorylation du domaine intracellulaire du IFNGR1. Une fois phosphorylé, le IFNGR1 devient un site de liaison pour le STAT1 qui sera lui aussi phosphorylé. Les deux STAT1 phosphorylés, présents sur chacun des IFNGR1, quittent les récepteurs et forment un homodimère. Pour avoir une activité transcriptionnelle maximale, les STAT1 doivent ensuite être phosphorylés sur un résidu sérine. L'homodimère est ensuite transloqué au noyau où il lie les régions promotrices contenant une GAS pour induire les gènes stimulés par l'IFN- γ (Stark *et al.*, 1998). Il faut aussi mentionner que l'IFN- γ peut activer des gènes avec un ISRE par l'activation de l'expression des IRFs (Gough *et al.*, 2008).

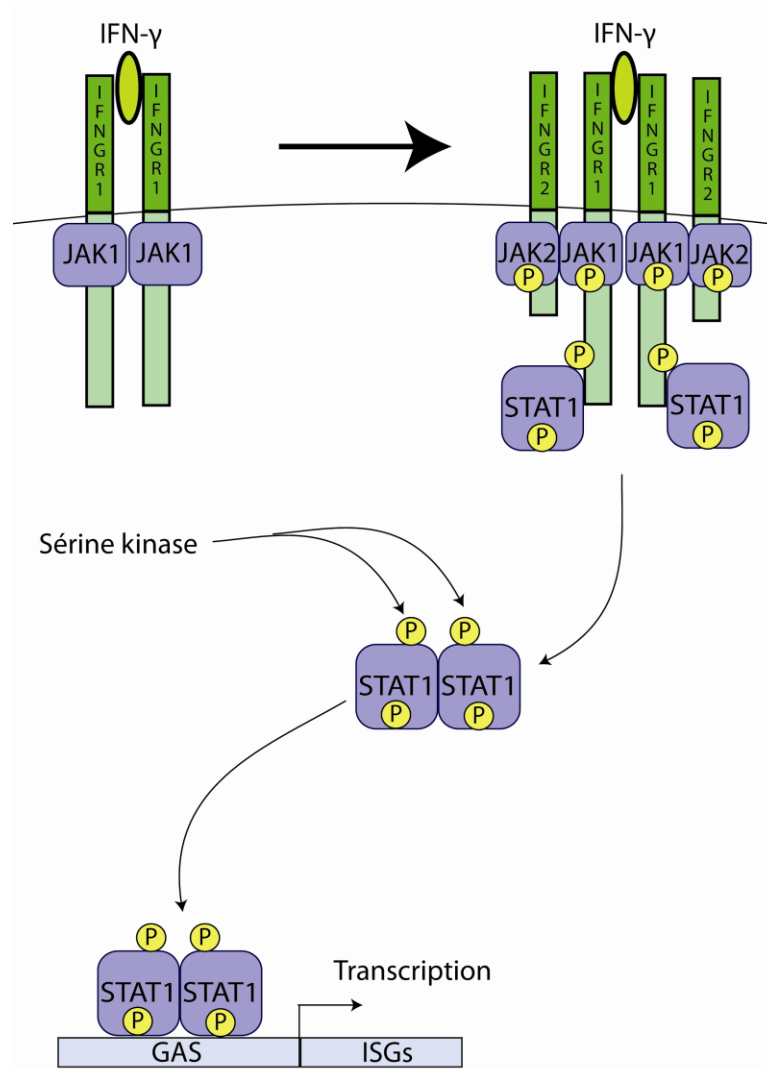


Figure 21 : Signalisation classique des IFNs de type II. La liaison de l'IFN amène la l'homodimérisation du IFNGR1, puis la formation de deux hétérodimères avec l'IFNGR2. Cette oligomérisation activera les JAKs 1 et 2 par phosphorylation. Le IFNGR1 sera phosphorylé pour devenir un site de liaison pour les STAT1 qui seront aussi phosphorylés. Les STAT1 quitteront les récepteurs pour s'homodimériser et ensuite être phosphorylés sur des résidus sérine. Le dimère de STAT1 liera les GASs et activera la transcription des ISGs. GAS, *gamma activated sequence*; IFN- γ , *interferon- γ* ; IFNGR1/2, *IFN gamma receptor 1/2*; ISGs, *IFN-stimulated genes*; JAK1/2, *Janus kinase 1/2*; STAT1, *signal transducer and activator of transcription 1*. Figure inspirée de Stark et al. (Stark et al., 1998).

En plus de la voie JAK-STAT, l'IFN- γ active plusieurs autres protéines susceptibles d'activer des voies de signalisation alternatives aux STAT1 (Figure 22). L'IFN- γ active les petites GTPases Ras et Rap1. L'IFN- γ active aussi la phosphorylation de ERK1/2 par l'entremise de la *MAPK/ERK kinase 1* (MEK1). Plusieurs mécanismes d'induction sont susceptibles d'être impliqués comme la transactivation du *epidermal growth factor receptor* (EGFR) ou l'activation de la sérine kinase *rapidly accelerated fibrosarcoma 1* (Raf1) par JAK2 qui requiert la présence de Ras (Gough *et al.*, 2008).

L'IFN- γ active des kinases de la famille de Src, qui sont des tyrosine kinases, de façon JAK dépendante. La kinase Fyn est connue pour interagir directement avec les JAKs, alors que l'activation de c-Src et de Lyn nécessiterait la phospholipase C (PLC) α ou γ . c-Src pourrait ensuite activer la kinase Pyk2 ce qui mènerait à l'activation de la voie de MAPKK6 et p38. L'activation de p38 est toutefois contredite par certaines études (Gough *et al.*, 2008).

L'IFN- γ active aussi la PI3K de façon JAK indépendante. La PI3K activerait par la suite Akt et les protéines kinase C (PKC) α , δ et ϵ . La PKC ϵ activerait la phosphorylation de ERK. Certaines études suggèrent la PI3K comme la kinase qui phosphoryle STAT1 sur la sérine 727. Il semble toutefois que plusieurs autres candidats, tel que la PKC δ , Akt, IKK ou la *calcium/calmodulin kinase II* (CaMKII) soient en lice pour cette fonction (Gough *et al.*, 2008).

NF- κ B serait activé par l'IFN- γ dans certains types cellulaires. Le complexe IKK serait activé après un traitement avec l'IFN- γ . L'activation de NF- κ B serait nécessaire pour l'induction maximale de certains ISGs. Il est intéressant de mentionner qu'une stimulation avec l'IFN- γ recruterait MyD88 sur le IFNGR1. MyD88 aurait un rôle de stabilisateur pour l'ARN messenger (ARNm) des ISGs. Le facteur de transcription AP-1 est aussi activé par l'IFN- γ . AP-1 serait activé par ERK1/2. L'activation de AP-1 est suffisante et nécessaire pour l'induction de plusieurs ISGs. Certains le sont en coopération avec STAT1, d'autres le sont indépendamment de STAT1 (Gough *et al.*, 2008).

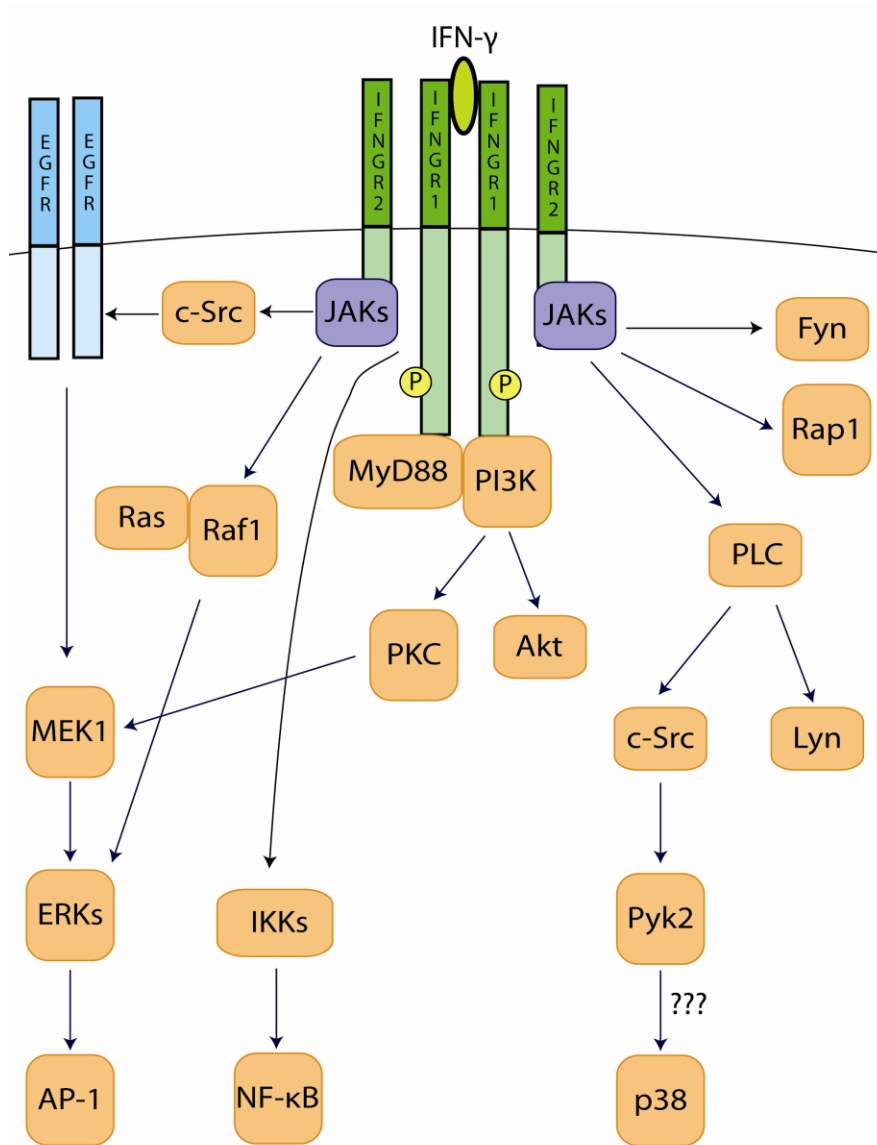


Figure 22 : Signalisations alternatives des IFNs de type II. L'IFN- γ active des petites GTPases (Ras, Rap1). L'IFN- γ active aussi des kinases de la famille de Src (c-Src, Lyn, Fyn), Pyk2, la PKC et la PLC ce qui active des voies de signalisation activant ultimement p38, ERK1/2 et AP-1. Cette activation de p38 est toutefois controversée. L'IFN- γ active aussi la voie PI3K-Akt de même que NF- κ B et MyD88. Akt, *a serine/threonine kinase*; AP-1, *activator protein-1*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; ERKs, *extracellular signal-regulated kinases*; IFN, *interféron*; IFNGR1/2, *IFN gamma receptor 1/2*; IKKs, *inhibitor of κ B kinases*; JAKs, *Janus kinases*; MEK1, *mitogen-activated protein kinase/ERK*

kinase I; MyD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*; NF- κ B, *nuclear factor-kappa B*; p38, protéine kinase de 38 kDa; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; Raf1, *rapidly accelerated fibrosarcoma 1*. Figure inspirée de Gough et al. (Gough *et al.*, 2008).

1. 2. 6. 2. Les interférons et le métabolisme

Certaines études ont établi des liens entre les IFNs et le métabolisme. Il a été démontré que l'expression de l'IFN- γ est augmentée dans le tissu adipeux de souris rendues obèses par la diète. Le traitement d'adipocytes 3T3-L1 avec l'IFN- γ induit l'expression des chimiokines *interferon gamma-induced protein of 10 kDa* (IP-10), *monokine induced by IFN- γ* (MIG), *interferon-inducible T-cell α chemoattractant* (I-TAC), MCP-1, MCP-2 et RANTES. Les souris déficientes en IFN- γ sous une diète riche en gras ont le même poids corporel que les souris *wild type* (WT), mais ont une meilleure sensibilité à l'insuline. Ceci est accompagné d'une diminution de gènes inflammatoires et une diminution du nombre de macrophages dans le tissu adipeux viscéral (Rocha *et al.*, 2008). Dans les adipocytes *in vitro*, un traitement avec l'IFN- γ diminue la sensibilité à l'insuline, diminue le stockage des TGs et diminue l'expression des gènes adipogènes tels que le PPAR- γ , l'adiponectine, la périlipine, la FAS et la LPL (McGillicuddy *et al.*, 2009). Un traitement avec des IFNs de type I amène aussi une résistance à l'insuline (Wada *et al.*, 2011). Il a été démontré que l'IFN- γ active la dégradation de PPAR γ , de C/EBP- α et de SREBP1c dans les adipocytes 3T3-L1 (Floyd & Stephens, 2002; Waite *et al.*, 2001). Les IFNs de type I et II inhibent aussi la différenciation des pré-adipocytes *in vitro* (Taylor *et al.*, 1988). Les IFNs de type I et de type II sont des activateurs de la lipolyse *in vitro* (Feingold *et al.*, 1992) et *in vivo* (Memon *et al.*, 1992).

1. 3. La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline se manifeste principalement au niveau des tissus métaboliquement actifs, c'est-à-dire le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. La résistance à l'insuline peut être considérée comme une des premières étapes menant au DT2. Dans l'ordre des choses, la résistance à l'insuline amène l'intolérance au glucose, donc une hyperglycémie, causée par un captage du glucose diminué et une gluconéogenèse augmentée. Le pancréas tente de compenser pour cette hyperglycémie en sécrétant plus d'insuline causant donc l'hyperinsulinémie. Cette charge de travail augmentée contribue à la mort des cellules β du pancréas qui s'en suit habituellement. Il y a donc une chute de la sécrétion de l'insuline et une hyperglycémie soutenue. Le patient est donc devenu diabétique (Chawla *et al.*, 2011). L'insuline n'a pas que des effets sur le métabolisme du glucose. L'insuline a aussi des effets sur la lipogenèse, le stockage des lipides, l'appétit, la différenciation et la croissance cellulaire. Ainsi l'impact de la résistance à l'insuline ne se limite pas à l'hyperglycémie. De plus, tous les effets cellulaires de l'insuline sur un tissu ne sont pas nécessairement inhibés. Par exemple, au niveau hépatique, la résistance à l'insuline se manifeste par une mauvaise inhibition de la gluconéogenèse alors que son effet sur la lipogenèse n'est pas affecté. La résistance à l'insuline n'est pas nécessairement effective dans tous les tissus non plus (Biddinger & Kahn, 2006).

La résistance à l'insuline est causée par de multiples facteurs. Les adipokines, les acides gras et les molécules inflammatoires sont considérés comme des causes extracellulaires, alors que la dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif, les stress du réticulum endoplasmique et la déposition de lipides ectopique sont considérés comme des causes intracellulaires (Chawla *et al.*, 2011). La résistance à l'insuline est fortement corrélée avec l'inflammation du tissu adipeux viscéral. Le TNF- α est sûrement le facteur entre le tissu adipeux et la résistance à l'insuline qui a été le plus caractérisé. L'inhibition du TNF- α par un anticorps semble rétablir la sensibilité à l'insuline chez les rongeurs obèses et l'améliorer chez l'humain (Hotamisligil, 2006).

1. 3. 1. La signalisation de l'insuline

La résistance à l'insuline est caractérisée par des voies de signalisation de l'insuline qui sont moins activées. Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent avoir un effet sur le signal de l'insuline. Décrivons d'abord la signalisation normale de l'insuline.

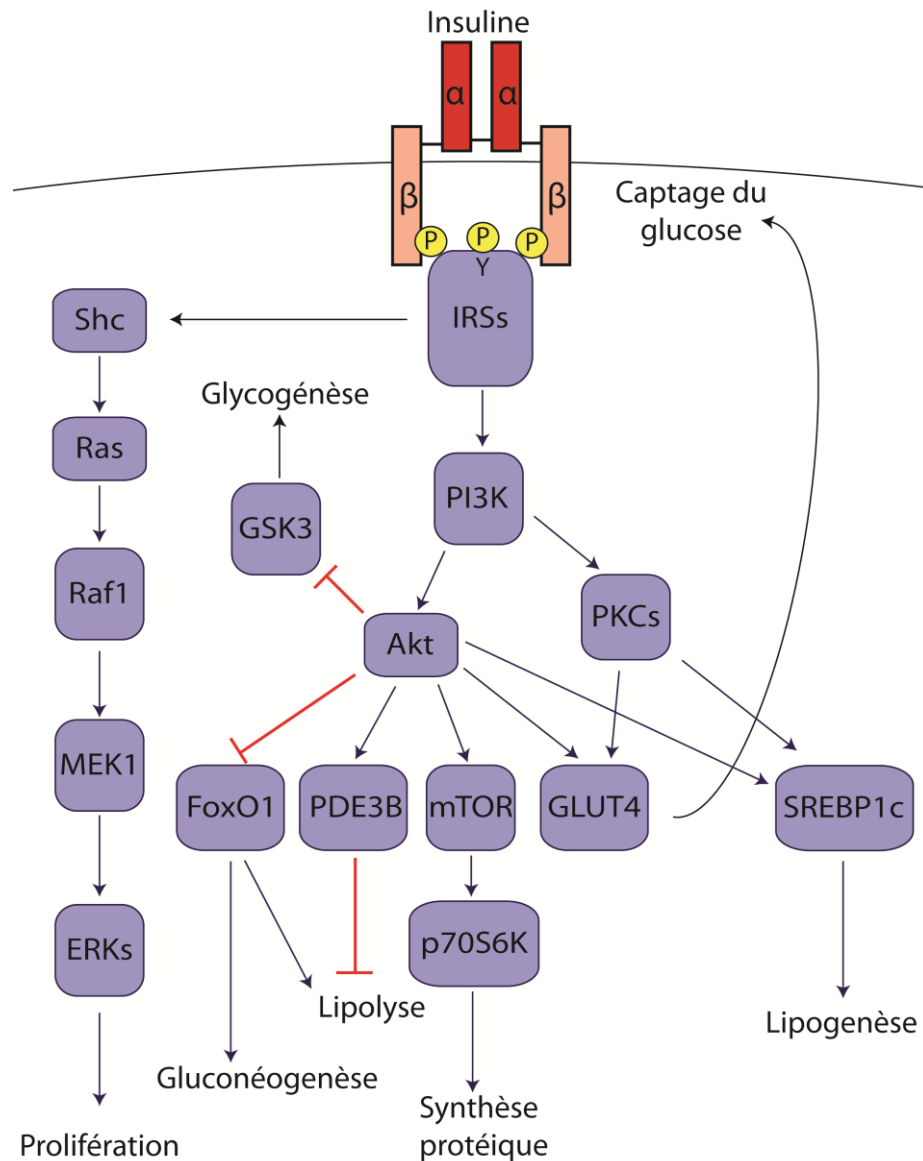


Figure 23 : Signalisation de l'insuline. L'activation du IR active son autophosphorylation et la phosphorylation des IRSs. Les IRSs peuvent activer la voie de Ras menant à l'activation des ERKs ou activer la voie de PI3K-Akt. Akt peut phosphoryler plusieurs

protéines pour activer le captage du glucose, la synthèse protéique, la lipogenèse et inhiber la glycogénèse, la gluconéogenèse et la lipolyse. L'activation des PKCs par la PI3K serait aussi importante pour activer le captage du glucose et la lipogenèse. Akt, *a serine/threonine kinase*; ERKs, *extracellular-signal regulated kinases*; FoxO1, *forkhead box class O1*; GLUT4, *glucose transporter 4*; GSK3, *glycogen synthase kinase 3*; IRSs, *insulin receptor substrates*; MEK1, *mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; PDE3B, phosphodiesterase 3B; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKCs, protéine kinases C; p70S6K, *p70 ribosomal S6 kinase*; Raf1, *rapidly accelerated fibrosarcoma 1*; Shc, *Src homology and collagen*; SREBP1c, *sterol regulatory element-binding protein 1c*. Figure inspirée de Biddinger et Kahn (Biddinger & Kahn, 2006).

L'insuline active un récepteur homodimérique, chaque monomère étant composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Figure 23). Les sous-unités α extracellulaires lient l'insuline alors que les sous-unités β intracellulaires ont une activité tyrosine kinase. La liaison de l'insuline active la transphosphorylation des sous-unités β ce qui augmente leur activité kinase. Le récepteur phosphorylera alors ses substrats, les protéines IRS, sur des résidus tyrosine. Les IRSs une fois phosphorylés lient la PI3K qui sera activée. La PI3K active l'Akt par l'entremise de la *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) (Biddinger & Kahn, 2006).

L'Akt activée phosphoryle la *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) pour la désactiver et ainsi réprimer la glycogénèse. Akt active la PDE3B pour inhiber la lipolyse. Akt phosphoryle aussi le facteur de transcription FoxO1 pour inhiber la transcription de gènes nécessaires à la gluconéogenèse, comme la PEPCK et la glucose-6-phosphatase, ou à la lipolyse, comme l'ATGL. Akt active la translocation du GLUT4 à la membrane pour permettre le captage du glucose. Akt active aussi la voie de la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) qui active la *p70 ribosomal S6 kinase* (p70S6K) augmentant la synthèse protéique. La PI3K n'active pas seulement Akt, elle active aussi les PKCs λ et ζ qui seraient aussi importantes pour la translocation du GLUT4 (Biddinger & Kahn, 2006).

L'insuline augmente la transcription, la maturation et l'activité du SREBP1c. Ces observations seraient dépendantes de l'activation du LXR, de la PI3K, de Akt et de PKC λ par l'insuline. SREBP1c joue un rôle majeur dans l'activation de la lipogenèse par l'insuline et dans la différenciation terminale des adipocytes. L'insuline active aussi ERK1/2 par l'entremise de la protéine *Src homology and collagen* (Shc) et de Ras. L'activation de ERK1/2 médie l'activité proliférative de l'insuline (Biddinger & Kahn, 2006).

1. 3. 2. Les mécanismes de la résistance à l'insuline

Les cytokines pro-inflammatoires et la rétroaction négative de la voie de signalisation de l'insuline jouent un rôle important dans la désensibilisation à l'insuline. La désensibilisation peut se faire de plusieurs façons (Figure 24).

Tout d'abord, les niveaux de protéines participant à la cascade de signalisation peuvent être diminuées soit par une diminution de leur transcription ou par une augmentation de leur dégradation (Biddinger & Kahn, 2006). Il a été démontré qu'une exposition prolongée à l'insuline induit la dégradation de IRS-1. La dégradation des IRSs est dépendante de leur ubiquitinylation. Il a aussi été démontré que les SOCS, qui sont induits par les cytokines, modulent la dégradation des IRSs (Balasubramanyam *et al.*, 2005). Le TNF- α peut diminuer l'expression de IRS-1 et de GLUT4 au niveau des adipocytes (Nieto-Vazquez *et al.*, 2008). L'expression de IRS-2 peut être inhibée par le SREBP1c dans une rétroaction négative (Biddinger & Kahn, 2006).

Les IRSs et le récepteur à l'insuline peuvent aussi subir des phosphorylations sur des résidus sérine/thréonine ce qui module leur activité. Les IRSs possèdent de nombreux sites de phosphorylation potentiels. Elles peuvent être phosphorylées par PKC, ERK, JNK, GSK3, p70S6K et IKK. Le patron de phosphorylation de l'IRS, qui peut être complexe étant donné les nombreux sites potentiels, modulera son interaction avec le récepteur à l'insuline et avec la PI3K (Tanti & Jager, 2009). La phosphorylation sur des résidus

sérine/thréonine du récepteur à l'insuline diminuera plutôt son activité tyrosine kinase (Biddinger & Kahn, 2006).

Les composantes de la voie de signalisation peuvent voir leurs interactions perturbées par d'autres protéines. Les SOCS, en plus de participer à la dégradation des IRSs, peuvent lier le récepteur à l'insuline et empêcher l'interaction entre le récepteur et les IRSs (Biddinger & Kahn, 2006).

L'activité des phosphatases aura un effet sur l'état de phosphorylation des protéines de la cascade de phosphorylation. Il est maintenant connu que les signaux inflammatoires activateurs de la voie de IKK augmentent l'expression de la *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B). Cette phosphatase déphosphoryle le récepteur à l'insuline et les IRSs sur leurs résidus tyrosine ce qui diminue leur activité (Tanti & Jager, 2009). Le TNF- α augmente la concentration de céramides ce qui active la protéine phosphatase 2A (PP2A). La PP2A diminuerait l'activité de Akt en la maintenant dans un état déphosphorylé (Nieto-Vazquez *et al.*, 2008).

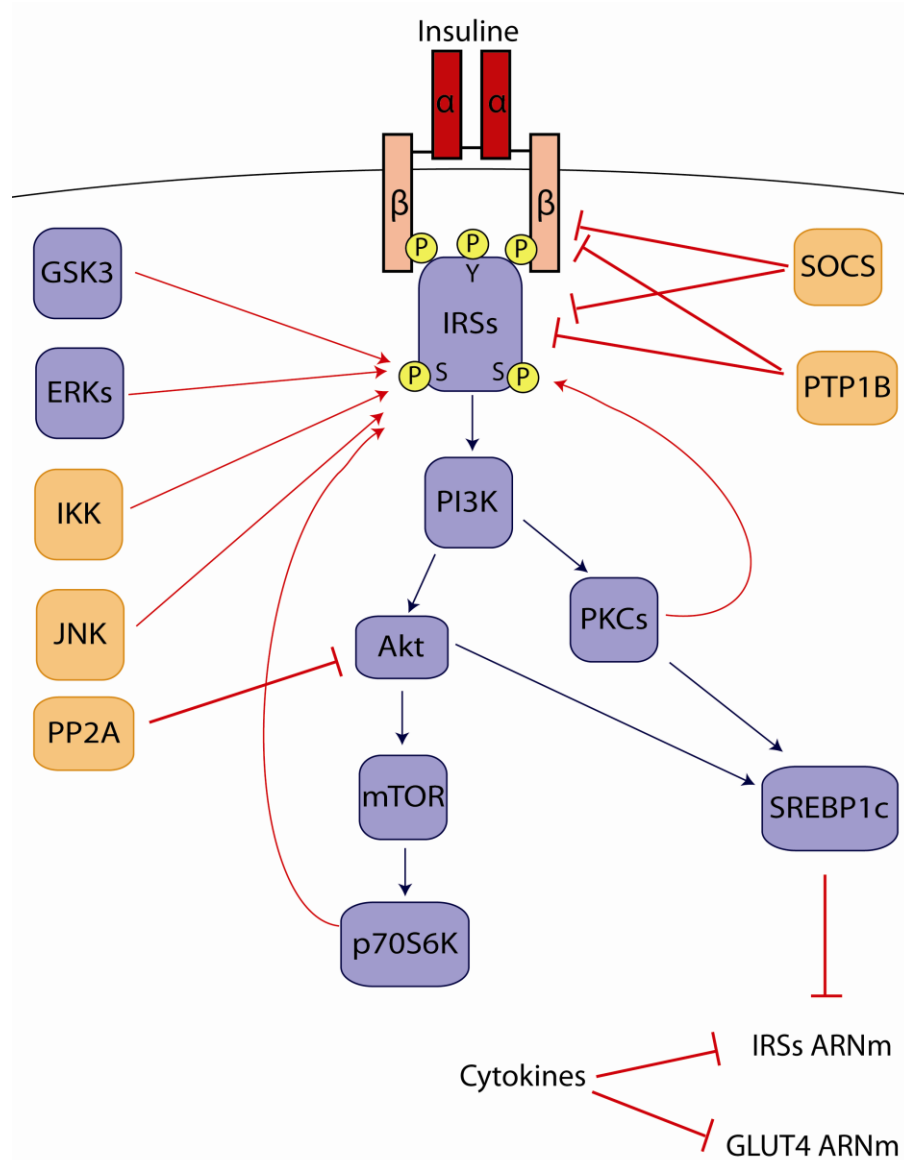


Figure 24 : La résistance à l'insuline. La voie de signalisation normale de l'insuline (en violet) peut être inhibée par rétroaction négative. Les PKCs, la p70S6K, la GSK3 et les ERKs peuvent phosphoryler les IRSs sur des résidus sérine alors que SREBP1c peut réprimer la transcription des IRSs. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent induire la phosphorylation des sérines des IRSs, par IKK ou JNK, peuvent diminuer l'expression des IRSs et de GLUT4, peuvent induire la dégradation des IRSs et diminuer l'interaction entre le IR et les IRSs, par les SOCS. Elles peuvent désactiver par déphosphorylation Akt, les IRSs et le IR par l'activation de PTP1B et PP2A. Akt, *a serine/threonine kinase*; ERKs,

extracellular-signal regulated kinases; GLUT4, *glucose transporter 4*; GSK3, *glycogen synthase kinase 3*; IKK, *inhibitor of κ B kinase*; IRSs, *insulin receptor substrates*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; PKCs, *protéines kinase C*; PP2A, *protéine phosphatase 2A*; p70S6K, *p70 ribosomal S6 kinase*; PTP1B, *protéine tyrosine phosphatase 1B*; SOCS, *suppressor of cytokine signaling*; SREBP1c, *sterol regulatory element-binding protein 1c*. Figure inspirée de Biddinger et Kahn (Biddinger & Kahn, 2006).

1. 4. Le traitement pharmacologique de l'obésité

La plupart des études pharmacologiques sur le métabolisme et l'obésité visent ultimement à découvrir de nouvelles thérapies pour ce problème de santé publique. Étant donné la prévalence de l'obésité dans les populations occidentales, un médicament efficace contre l'obésité représenterait des revenus mirobolants pour la compagnie qui le mettrait sur le marché.

Quelques médicaments ont été mis sur le marché dans le passé pour modifier la sensation de satiété. Ces médicaments modifient les systèmes de neurotransmission de la noradrénaline, de la sérotonine et de la dopamine (Ioannides-Demos *et al.*, 2011). C'est le cas de la sibutramine, un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine, qui a été mis sur le marché aux États-Unis en 1997 comme médicament diminuant la consommation de nourriture et la dépense énergétique (Derosa & Maffioli, 2012). Ce médicament a cependant été retiré du marché en 2010 parce qu'il causait des problèmes cardiovasculaires. Le rimonabant, un antagoniste du *cannabinoïd type 1 receptor* (CB1) qui diminue la consommation de nourriture, fut aussi commercialisé en Europe en 2006. L'approbation de ce médicament a été refusée aux États-Unis et au Canada et il fut retiré du marché européen en 2008 parce qu'il causait des problèmes psychiatriques (Derosa & Maffioli, 2012). La phentermine est un analogue de l'amphétamine, un sympathomimétique qui diminue la consommation de nourriture. La phentermine est présentement utilisée aux

États-Unis et en Australie, mais seulement à court terme (jusqu'à 12 semaines). Mentionnons que la phentermine a été retirée du marché européen en 1999 pour son mauvais rapport risques/bénéfices, son principal effet secondaire sérieux étant l'hypertension pulmonaire (Derosa & Maffioli, 2012). Présentement, le seul médicament anti-obésité utilisé à long terme est l'orlistat. L'orlistat est un inhibiteur des lipases pancréatiques et gastriques qui inhibe l'absorption des TGs. À cause de son mécanisme d'action, son principal effet secondaire est la stéatorrhée et les problèmes intestinaux. En plus d'avoir des effets secondaires, les médicaments sur le marché ont un effet sur le poids corporel très modeste, variant entre 1 et 9,6 kg sur 6 mois (Ioannides-Demos *et al.*, 2011). L'arrêt de la médication cause généralement un regain de poids. Il faut toutefois mentionner que les médicaments anti-obésité ont des effets bénéfiques sur d'autres paramètres comme la pression sanguine, la résistance à l'insuline et le taux de lipides sanguins (Ioannides-Demos *et al.*, 2011).

Mentionnons aussi l'utilisation du dinitrophénol pour la perte de poids dans les années 1930. Ce médicament avait pour but d'augmenter l'activité métabolique des patients. Le dinitrophénol est un découplant de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries, donc un producteur de chaleur. D'ailleurs, les effets secondaires de ce médicament étaient des sensations de chaleur et la sudation. À trop haute dose, le dinitrophénol pouvait causer une hyperthermie fatale. Il fut retiré du marché après 5 ans (Derosa & Maffioli, 2012).

Quelques médicaments sont actuellement sous étude pour être utilisés contre l'obésité. Le pramlintide est un analogue synthétique de l'amyline qui est présentement utilisé pour le DT2 et qui semble avoir des effets prometteurs sur l'obésité. Les analogues du GLP-1, le liraglutide et l'exenatide, sont aussi utilisés pour le DT2 et semblent avoir des effets bénéfiques sur le poids corporel, la pression sanguine systolique et l'hémoglobine glyquée. Une combinaison du pramlintide et de l'exenatide est également sous étude. La combinaison de pramlintide avec la metreleptine, un analogue de leptine humaine, est également étudiée pour être utilisée contre l'obésité. Certains autres médicaments potentiels sont aussi des molécules agissant principalement sur la neurotransmission. La tesofensine

est un inhibiteur du recaptage de la noradrénaline, de la dopamine et de la sérotonine qui semble supprimer l'appétit et réduire le poids corporel chez les obèses sans trop d'effets cardiovasculaires. Le bupropion, un analogue de l'amphétamine inhibant la recapture de la dopamine et la noradrénaline, en combinaison avec la naltrexone, un antagoniste du récepteur μ -opioïde, ou le zonisamide, un activateur GABAergique, sont présentement étudiés pour la perte de poids. C'est aussi le cas pour le topiramate, un agoniste GABAergique anti-épileptique, en combinaison avec la phentermine. Les combinaisons de pramlintide avec la phentermine ou avec la sibutramine sont aussi sous étude présentement (Ioannides-Demos *et al.*, 2011).

1. 4. 1. La théorie de l'expansibilité du tissu adipeux

La littérature scientifique ne fait pas consensus à propos des stratégies pharmacologiques à adopter pour contrer l'obésité. Plusieurs publications sur l'adipogenèse font mention que son inhibition constituerait une stratégie valable (Esau *et al.*, 2004;Harp, 2004). Toutefois, les recherches récentes sur l'obésité, l'inflammation et le SMet ont permis de mieux situer l'obésité en relation avec ses problèmes de santé associés. La théorie de l'expansibilité du tissu adipeux (Sorensen *et al.*, 2010;Virtue & Vidal-Puig, 2010) aborde le problème de l'obésité dans un contexte intégratif. Cette théorie propose que les tissus adipeux d'un individu ont une capacité d'expansion limitée et que c'est de l'atteinte de cette limite que découlent les problèmes de santé causés par l'obésité. Il faut comprendre que le tissu adipeux n'a pas qu'une fonction de réserve énergétique, il joue aussi un rôle protecteur pour les autres tissus vis-à-vis des effets néfastes des lipides en période postprandiale (Ibrahim, 2010). La théorie de l'expansibilité du tissu adipeux entre donc en collision de plein fouet avec une stratégie d'inhibition de l'adipogenèse pour enrayer l'obésité.

Plusieurs observations scientifiques se trouvent à appuyer la théorie de l'expansibilité du tissu adipeux. Tout d'abord, il y a les études sur le rôle de l'hypertrophie,

donc la surcharge de lipides, des adipocytes comme déclencheur de l'inflammation dans le tissu adipeux (Maury & Brichard, 2010). L'effet anti-adipogène, donc limitante de l'expansion du tissu adipeux, médié par les cytokines proinflammatoires qui sont associées avec la résistance à l'insuline va aussi dans le même sens (Gnacinska *et al.*, 2009). Il a aussi été montré que lorsque l'on croise des souris déficientes en PPAR- γ 2 avec des souris *ob/ob*, les souris obtenues ont un poids corporel diminué de moitié comparées aux souris *ob/ob*. Malgré leur obésité réduite, ces souris développent un DT2 à un âge très précoce et leur sensibilité à l'insuline est diminuée comparativement aux souris *ob/ob* (Medina-Gomez *et al.*, 2007). Un autre exemple résulte du croisement entre les souris transgéniques surexprimant l'adiponectine dans les adipocytes et les souris *ob/ob*. Ces souris ont une masse adipeuse augmentée avec une grande capacité d'expansion mais des adipocytes plus petits, un meilleur profil lipidique et un métabolisme du glucose amélioré comparé aux souris *ob/ob* (Kim *et al.*, 2007).

Dans le même sens, chez l'humain, certaines mutations dans les gènes de PPAR- γ , la lamine A et Akt2 mènent à des lipodystrophies caractérisées par une diminution de la masse adipeuse, mais une sévère résistance à l'insuline (Virtue & Vidal-Puig, 2010). On pourrait aussi voir une corrélation entre la diminution du nombre d'adipocytes dans le tissu adipeux sous-cutané avec l'âge (Spalding *et al.*, 2008) et le fait que l'âge soit un facteur de risque pour le développement du DT2 (Virtue & Vidal-Puig, 2010). Bien sûr, l'utilisation clinique des agonistes de PPAR- γ , les TZDs, fournissent aussi d'excellents arguments pour la théorie de l'expansibilité du tissu adipeux. Malgré le retrait récent de la rosiglitazone et de la troglitazone pour cause de risques cardiovasculaires et d'hépatotoxicité, la pioglitazone est toujours sur le marché (Cariou *et al.*, 2012). Les TZDs sont utilisés comme sensibilisateurs à l'insuline dans le traitement du DT2. Bien entendu, l'activation dans les adipocytes de PPAR- γ par les TZDs a pour effet d'activer l'adipogenèse et l'on observe effectivement un gain de poids chez les patients (Cariou *et al.*, 2012). D'autre part, aucun médicament visant à inhiber l'adipogenèse n'est en cours de développement.

2. Le système QRFP/GPR103

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse portent sur le récepteur GPR103 et son ligand endogène, le QRFP. Les QRFPs sont des peptides qui font partie de la famille des RF-amides qui compte 7 membres encodés par 5 gènes chez les mammifères (Chartrel *et al.*, 2006). Les peptides RF-amides sont caractérisés par une partie C-terminale se terminant avec une arginine, une phénylalanine et une fonction amide (CONH₂). Le neuropeptide AF (NPAF), le neuropeptide FF (NPFF), le *prolactin-releasing peptide* (PrRP), la kisspeptine, le *RF-amide-related peptide-1* (RFRP-1), le RFRP-3 et le QRFP font partie de cette famille. Ils possèdent tous une fonction neuroendocrinienne (Chartrel *et al.*, 2011). Le QRFP est retrouvé chez une multitude d'espèces animales comme les oiseaux (Ukena *et al.*, 2010;Tobari *et al.*, 2011), les poissons (Liu *et al.*, 2009a), la grenouille (Chartrel *et al.*, 2003) et les mammifères, incluant l'humain (Ukena *et al.*, 2011).

Deux formes du QRFP ont été identifiées comme des ligands agonistes endogènes du GPR103, le QRFP-26 et le QRFP-43 (Figure 25). Ces peptides sont aussi appelés 26RFa ou P518, pour le QRFP-26, et 43RFa, pour le QRFP-43. Les deux peptides proviennent du même gène. Le QRFP-43 est une forme allongée en N-terminal du QRFP-26 (Fukusumi *et al.*, 2003). Le QRFP-26 et le QRFP-43 ont des affinités similaires pour le hGPR103 avec des IC₅₀ de 3,2 et 0,52 nM respectivement. Leur activité agoniste est aussi comparable avec des EC₅₀ de 3,9 et 2,7 nM, respectivement, qui sont basés sur l'activation d'un gène rapporteur détectant l'activation de Gaq (Jiang *et al.*, 2003). Les séquences du QRFP chez l'humain, le rat et la souris sont montrées par la figure 26. La séquence C-terminale et la fonction amide du peptide sont cruciales pour son activité biologique (Jiang *et al.*, 2003;Le Marec *et al.*, 2011).

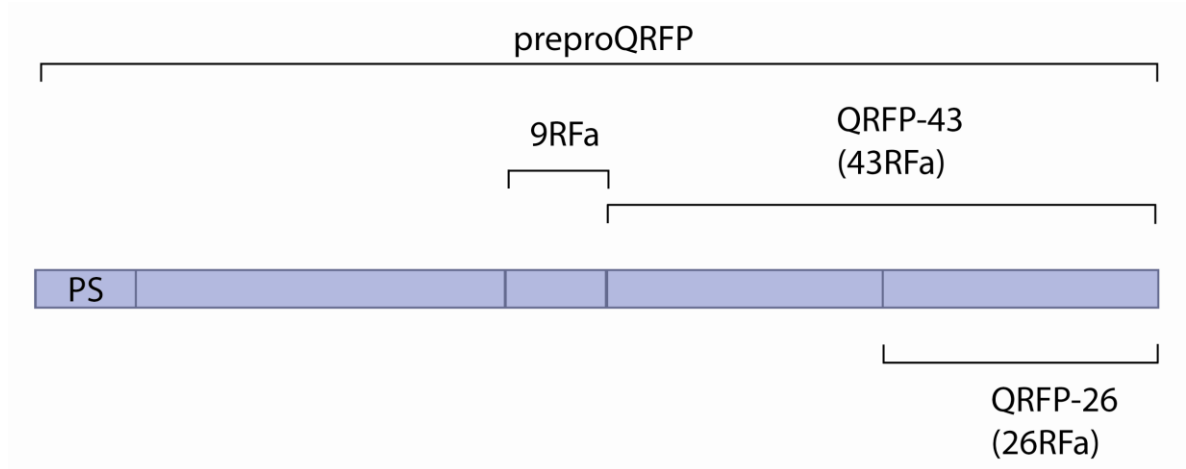


Figure 25 : Schématisation du preproQRFP. Le 9RFa n'est présent que dans la forme humaine du preproQRFP. Le QRFP-26 présente la même séquence en acides aminés que la partie C-terminale du QRFP-43. PS, peptide signal; QRFP, *pyroglutamylated RF-amide peptide*; RFa, arginine-phenylalanine amide. Figure modifiée de Chartrel et al. (Chartrel *et al.*, 2011).

	43	26	1
Humain	QDEGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF		
Rat	QDSGSEATGFLPTDSEKASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRF		
Souris	QDGSSEAAGFLPADSEKASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRF		

Figure 26 : Séquences du QRFP chez l'humain, le rat et la souris. Les résidus conservés sont en noir et les résidus variables sont en violet. Figure modifiée de Ukena et al. (Ukena *et al.*, 2011).

Deux sous-types de GPR103 existent chez les rongeurs, GPR103a et GPR103b. Une seule forme a été identifiée chez l'humain, hGPR103. Les GPR103a et GPR103b murins partagent 75% d'identité l'un pour l'autre. Leur pourcentage d'identité est de 83% et 79%, respectivement, vis-à-vis le hGPR103 (Takayasu *et al.*, 2006). Les deux sous-types de

récepteur ont une affinité et une activité agoniste semblables pour le QRFP-43 (Takayasu *et al.*, 2006). Le GPR103 est aussi été appelé AQ27 ou SP9155 dans certaines publications (Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003).

2. 1. La découverte du système QRFP/GPR103

Le récepteur GPR103 a été identifié dans le génome humain en 2001 en tant que récepteur orphelin (Lee *et al.*, 2001a). Le GPR103 est un RCPG qui partage 52% d'identité avec le NPFF receptor 2 (NPFF-R2), qui est aussi appelé GPR74 ou HLWAR77 (Chartrel *et al.*, 2011). Dans cette première étude, l'expression du GPR103 semblait limitée au SNC, plus précisément au niveau du cortex, de l'hypophyse, du thalamus, de l'hypothalamus, du prosencéphale basal, du mésencéphale et du pont (Lee *et al.*, 2001a). Ce n'est qu'en 2003, que le ligand du GPR103 a été identifié simultanément par trois groupes différents. Le groupe de Hubert Vaudry a identifié le QRFP-26 (alors appelé 26RFa) dans des extraits de cerveau de grenouille à partir d'une purification avec un antisérum contre le NPFF. Ils ont découvert l'effet orexigène du QRFP lorsqu'il fut injecté par voie ICV chez la souris. Le QRFP-26 activait la production d'AMPc dans les cellules hypophysaires de rat (Chartrel *et al.*, 2003). La compagnie pharmaceutique Schering-Plough a identifié le QRFP-26 par une méthode bioinformatique permettant d'identifier de potentiels peptides bioactifs dans le génome humain. Ils ont démontré que la séquence humaine ou murine du QRFP-26 pouvait lier et activer le GPR103a de souris transfecté dans des cellules HEK293. Le QRFP pouvait activer la mobilisation de calcium par la protéine Gαq dans ces cellules (Jiang *et al.*, 2003). La compagnie pharmaceutique Takeda a identifié le QRFP-43 par une méthode bioinformatique permettant de détecter des peptides RF-amides dans le génome humain. Les séquences du QRFP-43 humain, bovin, murin et de rat ont été clonées démontrant une partie C-terminale très conservée. Le GPR103 a été identifié comme le récepteur du QRFP. Ils ont étudié l'effet de la troncation du peptide sur son activité et son affinité. Ils ont finalement montré qu'une injection de QRFP-43 stimulait la sécrétion d'aldostérone chez le rat (Fukusumi *et al.*, 2003).

L'existence de 2 sous-types de récepteurs chez la souris (Takayasu *et al.*, 2006) et le rat (Kampe *et al.*, 2006) n'a été rapportée qu'en 2006, bien après la publication de plusieurs études sur l'expression du GPR103. Étant donnée la forte homologie entre les deux sous-types, il est difficile de tirer des conclusions sur la spécificité des analyses d'expression du GPR103 chez le rongeur sans la discrimination des deux récepteurs.

Il est intéressant de mentionner que le QRFP-26 peut lier le récepteur NPFF-R2 avec une affinité autour de 10 nM en plus d'être un bon agoniste, c'est-à-dire présentant un EC_{50} de 5,3 nM (Gouarderes *et al.*, 2007). Certains sites de liaison du QRFP-26 dans le cerveau peuvent être compétitionnés avec le NPFF ou le PrRP (Bruzzone *et al.*, 2007). Ainsi, il est possible que le QRFP-26 médie certains de ses effets physiologiques par l'activation du NPFF-R2.

2. 2. Le profil d'expression du QRFP et de GPR103

Les études sur l'expression du QRFP et du GPR103 montrent passablement de différences entre elles. Certaines études sur l'expression du GPR103 chez le rongeur peuvent toutefois avoir été biaisées par la détection des deux sous-types. Essayons de dresser un portrait de ce qui a été rapporté dans la littérature.

2. 2. 1. L'expression du QRFP

Chez l'humain, le QRFP est le plus fortement exprimé dans le cerveau. Il serait le plus fortement exprimé dans le cervelet, le bulbe rachidien, la rétine, l'hypothalamus, l'hypophyse et les noyaux vestibulaires (Jiang *et al.*, 2003). Une expression au niveau de la moelle épinière a aussi été rapportée (Bruzzone *et al.*, 2006). Au niveau de l'hypothalamus, le QRFP serait exprimé surtout dans le VMH et le PVN (Bruzzone *et al.*, 2006). En

périphérie, le QRFP serait exprimé dans la prostate, les testicules, le colon, la thyroïde, la parathyroïde, les artères coronaires et la vessie (Jiang *et al.*, 2003).

Chez la souris, le QRFP serait exprimé dans l'hypothalamus et dans la rate (Jiang *et al.*, 2003). Au niveau hypothalamique, le QRFP serait exprimé dans le LatH et le PVN. Le QRFP serait aussi exprimé dans le télencéphale, le cervelet, la moelle épinière, l'œil, les testicules (Takayasu *et al.*, 2006), la trachée, le thymus et les ganglions lymphatiques (Zhang *et al.*, 2007).

Chez le rat, le QRFP serait exprimé dans le nerf optique, l'hypothalamus, l'œil, la trachée, les glandes mammaires (Fukusumi *et al.*, 2003), le thymus, la thyroïde, la rate, le thalamus, le cervelet et la moelle épinière (Zhang *et al.*, 2007). Au niveau hypothalamique, le QRFP serait retrouvé dans le ARC et la région rétrochiasmatique (Fukusumi *et al.*, 2003). D'autres groupes ont rapporté une expression seulement dans le VMH et le LatH (Chartrel *et al.*, 2003). Un autre groupe ajoute le PVN comme région exprimant le QRFP (Kampe *et al.*, 2006).

2. 2. 2. L'expression du GPR103

Chez l'humain, le hGPR103 serait exprimé dans la rétine, le ganglion trigéminal, l'hypothalamus et les noyaux vestibulaires. En périphérie, le hGPR103 serait exprimé dans le cœur, le rein et les testicules (Jiang *et al.*, 2003). On rapporte aussi son expression dans les os (Baribault *et al.*, 2006), la moelle épinière, les glandes mammaires, les ovaires et l'urètre (Zhang *et al.*, 2007).

Chez la souris, l'expression des GPR103a et b est distribuée de façon différentielle dans plusieurs régions du cerveau (Takayasu *et al.*, 2006). Le GPR103a serait exprimé surtout dans le cervelet et le télencéphale, mais aussi dans la moelle épinière, l'œil, la glande surrénale et les testicules (Takayasu *et al.*, 2006). On parle aussi de l'expression du GPR103a dans le cortex, le noyau caudé, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus, le

mésencéphale, le tronc cérébral, le bulbe rachidien, la rétine, l'hypophyse, le thymus, le foie, le rein, la vessie (Zhang *et al.*, 2007) et dans les os (Baribault *et al.*, 2006). Le GPR103b serait exprimé dans le cervelet, le télencéphale, le PVN, le LatH, la moelle épinière, l'œil et les testicules (Takayasu *et al.*, 2006). On rapporte aussi l'expression de GPR103b dans le cortex, le noyau caudé, l'hippocampe, le thalamus, le mésencéphale, le tronc cérébral, le bulbe rachidien, le ganglion trigéminal, le ganglion spinal, l'hypophyse, les intestins, les ovaires, l'utérus, la peau et le tissu adipeux blanc (Zhang *et al.*, 2007).

Chez le rat, le GPR103a serait exprimé dans les glandes surrénales, surtout au niveau de la *zona glomerulosa*, l'hypothalamus, le thalamus, le mésencéphale, le ganglion trigéminal, les testicules, l'œil (Fukusumi *et al.*, 2003), le bulbe olfactif, le cortex, le noyau caudé, le complexe amygdalien, le bulbe rachidien, le poumon, le thymus, la rate et le tissu adipeux (Zhang *et al.*, 2007). Pour sa part, le GPR103b serait exprimé dans le bulbe olfactif, le cortex, le cervelet, le complexe amygdalien, le noyau caudé, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus, le mésencéphale, le pont, le bulbe rachidien, la moelle épinière, le ganglion trigéminal, le ganglion spinal, l'œil, l'hypophyse, le cœur, le poumon, le muscle squelettique et le tissu adipeux (Zhang *et al.*, 2007).

2. 2. 3. La régulation du QRFP et du GPR103

L'expression du QRFP est augmentée dans l'hypothalamus de souris (Takayasu *et al.*, 2006) ou de poisson (Liu *et al.*, 2009b) lorsqu'ils sont soumis à un jeûne. L'expression est aussi augmentée dans l'hypothalamus des souris obèses *ob/ob* et *db/db* (Takayasu *et al.*, 2006). Une diète riche en gras pendant 21 jours augmente l'expression du QRFP dans le VMH/ARC de rat, sans effet sur l'expression dans le LatH (Primeaux *et al.*, 2008). L'estrogène aurait aussi ce même effet (Primeaux, 2011). La diète riche en gras n'a pas d'effet sur l'expression du GPR103a (Primeaux *et al.*, 2008). Une autre étude rapporte qu'une diète riche en gras pendant 8 semaines diminue l'expression du QRFP dans le VMH, alors qu'une diète faible en gras l'augmente (Beck & Richy, 2009).

2. 3. Les rôles physiologiques du QRFP

Étant donné l'étendu de l'expression du QRFP et du GPR103, plusieurs effets physiologiques du QRFP ont été rapportés tant au niveau central que périphérique. Ces effets sont résumés dans la Figure 27.

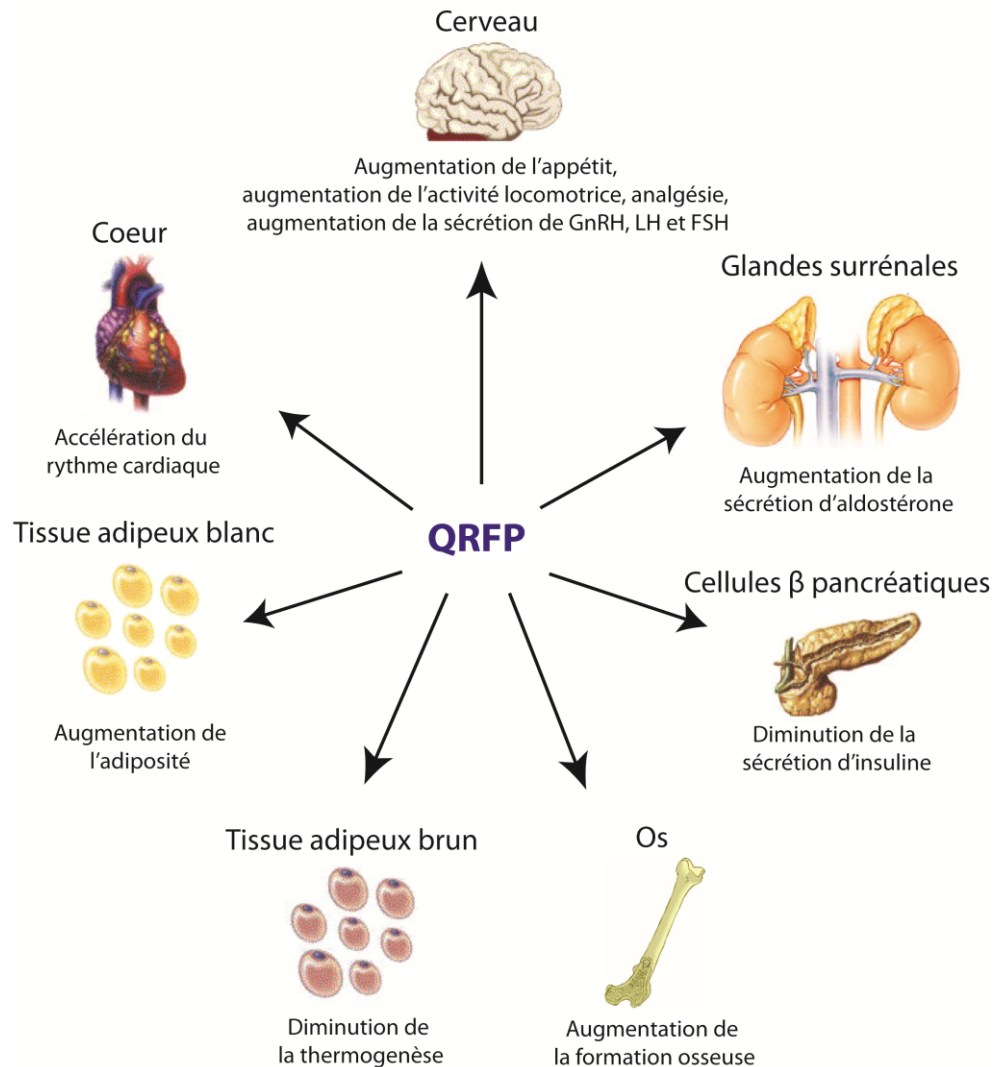


Figure 27 : Les effets physiologiques du QRFP. Des effets physiologiques pour le QRFP ont été rapportés au niveau du cerveau, du cœur, des glandes surrénales, du pancréas, des os et des tissus adipeux blancs et bruns. FSH, hormone folliculo-stimulante; GnRH, *gonadotrophin-releasing hormone*; LH, hormone lutéinisante.

2. 3. 1. Les effets sur le métabolisme

L'effet orexigène du QRFP a été un des premiers effets physiologiques rapportés (Chartrel *et al.*, 2003). L'administration aiguë de QRFP par voie ICV augmente la consommation de nourriture chez les rongeurs (Chartrel *et al.*, 2003;do Rego *et al.*, 2006;Moriya *et al.*, 2006;Takayasu *et al.*, 2006). L'effet sur cette hyperphagie est augmenté lorsque les animaux sont sous une diète enrichie en lipides (Moriya *et al.*, 2006;Primeaux *et al.*, 2008). Pour avoir un effet orexigène, le QRFP doit être administré au début de la période diurne (Kampe *et al.*, 2006;Takayasu *et al.*, 2006). La partie structurale cruciale du peptide pour son activité orexigène semble résider dans les 7 acides aminés en C-terminal puisque cette séquence est suffisante pour activer la consommation de nourriture (do Rego *et al.*, 2006). Un pseudopeptide analogue avec une plus grande stabilité et une plus grande activité agoniste a d'ailleurs été synthétisé à partir de cette séquence (Neveu *et al.*, 2012). Il est aussi intéressant de mentionner que le 9RFa, issu du prépro-peptide humain, est aussi capable d'avoir un effet orexigène chez la souris (do Rego *et al.*, 2006).

L'administration de QRFP par voie ICV augmente l'expression et la sécrétion de NPY dans le ARC, ce qui diminue l'expression de POMC et la sécrétion de α -MSH. Comme le GPR103 serait colocalisé avec les neurones NPY positifs, l'effet sur l'expression de POMC serait indirect (Lectez *et al.*, 2009). L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs du NPY inhibe l'effet du QRFP sur l'expression de POMC et sur l'augmentation de l'appétit (Lectez *et al.*, 2009;Takayasu *et al.*, 2006). Les souris déficientes en GPR103a n'ont pas de phénotype par rapport à l'appétit ce qui suppose que le GPR103a ne serait pas nécessaire pour l'effet orexigène du QRFP (Baribault *et al.*, 2006). L'effet orexigène du QRFP est indépendant de la sécrétion d'orexine dans le ARC puisque l'effet persiste dans les souris déficientes en orexine (Takayasu *et al.*, 2006).

La perfusion de QRFP-43 par voie ICV pendant 2 semaines augmente le poids corporel et la masse adipeuse, en plus d'augmenter l'appétit, chez les souris sous-diète normale (Moriya *et al.*, 2006). On observe aussi une augmentation de la glycémie, de la leptine, des TGs et du cholestérol total dans le sang. Les effets sur l'appétit et

l'augmentation de la masse adipeuse viscérale sont accentués chez les souris sous une diète modérément enrichie en gras. On note même une augmentation du poids du foie ainsi qu'une augmentation de son contenu en TGs. Les TGs plasmatiques ne sont toutefois pas changés dans cette condition de diète modérément enrichie en gras. En comparant des animaux qui consomment la même quantité de nourriture, on observe que l'augmentation de la masse adipeuse, de l'insuline, de la leptine, des TGs et du cholestérol total suite au traitement chronique avec le QRFP-43 semble indépendante de l'augmentation de l'appétit. Un traitement chronique avec le QRFP diminue aussi la thermogénèse et l'expression de UCP-1 dans le tissu adipeux brun, sans effet sur l'activité locomotrice (Moriya *et al.*, 2006).

D'autres études ont toutefois affirmé que l'administration aiguë de QRFP augmente l'activité locomotrice (do Rego *et al.*, 2006; Takayasu *et al.*, 2006). Il semble toutefois que la partie du peptide qui est cruciale pour activer la locomotion des souris, c'est-à-dire la partie N-terminale du QRFP-26, n'est pas du tout la même que celle qui est cruciale pour activer la consommation de nourriture. L'activation d'un autre récepteur que le GPR103 n'est donc pas exclue pour l'effet sur la locomotion (do Rego *et al.*, 2006). En plus d'augmenter l'activité locomotrice, l'administration de QRFP augmente la consommation d'oxygène, donc la dépense énergétique (Takayasu *et al.*, 2006).

Le QRFP aurait un effet aigu sur la sécrétion d'insuline par le pancréas. La perfusion du pancréas de rat avec le QRFP inhibe la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, l'arginine et l'exendine-4 (Egido *et al.*, 2007). L'effet sur la sécrétion d'insuline stimulée par l'exendine-4 peut être inhibé par la toxine pertussique, suggérant un mécanisme d'action dépendant de la protéine G α i. Le QRFP n'a montré aucun effet sur la sécrétion du glucagon ou sur la sécrétion d'insuline basale (Egido *et al.*, 2007).

2. 3. 2. Les autres effets physiologiques

Le QRFP stimule l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Parhar *et al.*, 2012). Une administration de QRFP, systémique ou encore par voie ICV, augmente les niveaux circulants des gonadotropines, soit l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) chez le rat (Navarro *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008). Il a été montré que le QRFP activerait aussi la sécrétion de gonadotropin-releasing hormone (GnRH) par l'hypothalamus (Patel *et al.*, 2008) en plus de stimuler directement la sécrétion des gonadotropines par l'hypophyse (Navarro *et al.*, 2006). Étant donné l'expression du GPR103 et du QRFP dans les gonades, il n'est pas exclu que le QRFP ait un effet direct sur celles-ci (Chartrel *et al.*, 2011).

Une administration périphérique de QRFP a pour effet de stimuler la sécrétion de prolactine chez les primates (Wahab *et al.*, 2012). Chez le même animal, l'administration de QRFP-26 a un effet stimulant sur la sécrétion de GH alors que le QRFP-43 a un effet inhibiteur (Qaiser *et al.*, 2012).

Il a été rapporté que l'administration systémique de QRFP stimule la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales chez le rat sans affecter la sécrétion de corticostérone ou de testostérone (Fukusumi *et al.*, 2003). Cette augmentation de l'aldostérone n'a toutefois pu être corroborée par d'autres groupes (Chartrel *et al.*, 2011).

Le QRFP jouerait un rôle dans la formation osseuse. Les souris déficientes GPR103a souffrent d'ostéopénie (Baribault *et al.*, 2006). Ces souris ont une densité osseuse diminuée, un phénomène qui est accentué chez les femelles. Les os de ces souris montrent un amincissement de la plaque ostéocondrale, un épaississement de l'os trabéculaire et une diminution des ostéoblastes (Baribault *et al.*, 2006). Étant donné que des régions de l'hypothalamus, comme le VMH, peuvent contrôler la faim et la formation osseuse, il est possible que l'effet du QRFP sur la formation osseuse soit médié via l'hypothalamus (Chartrel *et al.*, 2011). De plus, des polymorphismes dans le gène du QRFP et son promoteur ont été retrouvés chez le modèle de souris ostéopénique SAMP6. Ces souris ont

aussi démontré une expression diminuée de QRFP au niveau du foie. Ces résultats suggèrent que le QRFP serait un régulateur de la densité osseuse (Zhang *et al.*, 2007).

Il a été montré que le QRFP possède des propriétés analgésiques. Une injection intrathécale de QRFP induit un effet analgésique après une injection de formaline ou de carragénine chez le rat (Yamamoto *et al.*, 2008). L'administration du QRFP en ICV procure aussi cet effet suite à l'injection de formaline (Yamamoto *et al.*, 2009). Sur le modèle de ligature partielle du nerf sciatique, l'administration intrathécale ou par voie ICV de QRFP avait aussi un effet analgésique (Yamamoto *et al.*, 2011).

Il a été montré que l'administration de QRFP par voie ICV augmente la pression artérielle et le rythme cardiaque de manière soutenue chez la souris (Takayasu *et al.*, 2006). D'autres ont rapporté un effet biphasique, hypotenseur puis hypertenseur, sur la pression artérielle après une administration de QRFP par voie intraveineuse chez le rat. Cet effet était accompagné d'une augmentation du rythme cardiaque (Fang *et al.*, 2009). L'effet hypertenseur et l'effet tachycarde seraient médiés par le système vagal et le SNS. L'effet hypotenseur n'est toutefois pas affecté par la vagotomie ou les antagonistes des récepteurs α - et β -adrénergiques (Fang *et al.*, 2009).

Chapitre II : Matériel, méthodes et résultats

Ce chapitre sera présenté sous forme d'articles scientifiques. Le premier article a été publié dans *Molecular Endocrinology* en 2010 (Mulumba *et al.*, 2010) et j'y partage le titre de premier auteur avec Mukandila Mulumba. Le deuxième est un manuscrit qui sera soumis à *Molecular and Cellular Endocrinology*.

1. Description du projet

1. 1. Origine du projet

Les premières expériences de mon doctorat portaient sur la forme désacylée de la ghréline, la des-acyl-ghréline (DAG). Il a été montré que la DAG possède plusieurs effets biologiques *in vivo* et *in vitro* comme des effets cardiaques, une augmentation de l'adipogenèse, une diminution de la sécrétion de l'insuline et de la production de glucose (Soares & Leite-Moreira, 2008). Cependant, aucun récepteur pour la DAG n'a été identifié à ce jour. L'objectif était donc de tenter d'identifier ce récepteur.

La stratégie était d'utiliser une forme modifiée de la des-acyl-ghréline (DAG) qui serait radiomarquée et photoactivable pour former un lien covalent avec son récepteur par la méthode du photomarquage. Comme la DAG montre un effet adipogène sur les adipocytes (Thompson *et al.*, 2004), nous avons choisi les membranes des cellules 3T3-L1 différenciées pour tenter d'y trouver ce récepteur. Nos résultats ont révélé une protéine d'environ 54 kilodaltons (kDa), présente dans la préparation membranaire d'adipocytes 3T3-L1, qui pouvait être photomarquée par la DAG. Un excès de DAG ou de ghréline non-marquée pouvait compétitionner avec ce signal radioactif. Après une séparation par *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), nous avons fait analyser les protéines contenues dans un morceau de gel correspondant au poids moléculaire de notre protéine radiomarquée. Ces protéines ont été soumises à une protéolyse limitée par la chymotrypsine puis les fragments ont été séparés par *high performance liquid chromatography* (HPLC). L'appareil de chromatographie était couplé à un spectromètre de masse (MS/MS) pour permettre l'identification des fragments issus de la digestion. Comme le SDS-PAGE ne permet pas une purification spécifique, les résultats de spectrométrie de masse ont révélé la séquence de plusieurs protéines qui sont présentes dans une préparation membranaire d'adipocytes 3T3-L1 et qui ont un poids moléculaire autour de 54 kDa. Parmi ces protéines, la séquence M¹⁶⁴LGVVWLVAIIGSPMWHVQRLEIK¹⁸⁸ du GPR103b a été identifiée.

Étant donné les analogies entre les effets physiologiques de la DAG et du QRFP, nous avons supposé le GPR103 comme un récepteur potentiel de la DAG parmi toutes les protéines identifiées par spectrométrie de masse. L'étude de la liaison de DAG au GPR103 n'a toutefois pas confirmé notre hypothèse. Cependant, l'identification du GPR103b dans les adipocytes constituait une nouveauté intéressante.

1. 2. Objectifs généraux

Les objectifs des travaux de cette thèse étaient:

- 1- Investiguer le rôle du système GPR103/QRFP dans le tissu adipeux et les cellules qui composent ce tissu.
- 2- Établir des liens entre ce système et l'obésité.
- 3- Investiguer les mécanismes de régulation du système GPR103/QRFP.

2. Première étude

2. 1. Hypothèse et objectifs

Étant donné que le QRFP est reconnu pour augmenter la masse adipeuse indépendamment de l'augmentation de la consommation de nourriture (Moriya *et al.*, 2006) et que son récepteur est présent dans les adipocytes, nous avons posé l'hypothèse qu'il pourrait agir comme un activateur de l'adipogenèse.

Nos objectifs étaient de :

- 1- Démontrer le rôle du QRFP et du GPR103b sur l'adipogenèse *in vitro* et décrire les mécanismes impliqués.

2- Démontrer le rôle du QRFP et du GPR103b sur le métabolisme des adipocytes matures murins et humains.

3- Décrire la modulation du QRFP et du GPR103b dans les tissus adipeux lors de l'obésité.

2. 2. Contribution des auteurs

Mukandila Mulumba:

Contribution à l'expérimentation (qPCR, adipogenèse, cytométrie de flux, lipolyse, tissus adipeux de souris), participation à l'écriture de l'article, participation à la gestion du projet.

Christian Jossart :

Contribution à l'expérimentation (Découverte du GPR103b par spectrométrie de masse, qPCR, lipolyse, knockdown de GPR103b), écriture du manuscrit, participation à la gestion du projet.

Riccarda Granata :

Contribution à l'expérimentation (expériences sur adipocytes humains), commentaires sur le manuscrit.

Davide Gallo :

Contribution à l'expérimentation (expériences sur adipocytes humains).

Emanuel Escher :

Collaboration pour synthèse de peptides.

Ezio Ghigo :

Collaboration pour expériences sur adipocytes humains

Marc J. Servant :

Participation à la gestion du projet, commentaires sur le manuscrit, co-direction de Christian Jossart.

Sylvie Marleau :

Participation à l'écriture du manuscrit et la gestion du projet. Directrice de Mukandila Mulumba, co-directrice de Christian Jossart.

Huy Ong :

Participation à l'écriture du manuscrit et chercheur principal du projet. Directeur de Christian Jossart, co-directeur de Mukandila Mulumba.

2. 3. GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis

Mukandila Mulumba,* Christian Jossart,* Riccarda Granata, Davide Gallo, Emanuel Escher, Ezio Ghigo, Marc J. Servant, Sylvie Marleau, and Huy Ong

* M.M. and C.J. contributed equally to this work and should be considered as joint first authors.

Faculty of Pharmacy (M.M., C.J., M.J.S., S.M., H.O.), Université de Montréal. Case Postale 6128, Succursale Centre-Ville, Québec, Canada, H3C 3J7;

Laboratory of Molecular and Cellular Endocrinology (R.G., D.G., E.G.), Department of Internal Medicine, University of Turin, Corso Dogliotti 14, 10126 Turin, Italy;

and Department of Pharmacology (E.E.), Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Abbreviations: ACSL1, Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1; C₁₂-BODIPY 3823, 4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a-diaza-3-indacene-3-dodecanoic acid; C/EBP- α , CCAAT/enhancer binding protein- α ; DIO, diet-induced obesity; FA, fatty acid; FATP1, fatty acid transport protein-1; FBS, fetal bovine serum; GPR103, G protein-coupled receptor 103; HFD, high-fat diet; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; ISO, isoproterenol; LPL, lipoprotein lipase; NPY, neuropeptide Y; ORO, Oil Red O; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; qPCR, quantitative real-time PCR; shRNA, short hairpin RNA; WAT, white adipose tissue.

2. 3. 1. Abstract

The activation of G protein-coupled receptor 103 (GPR103) by its endogenous peptidic ligands, QRFPs, is involved in the central regulation of feeding by increasing food intake, body weight, and fat mass after intracerebroventricular injection in mice. However, the role of GPR103 in regulating peripheral metabolic pathways has not yet been explored. The present study aimed to investigate the role of GPR103 in adipogenesis and lipid metabolism using 3T3-L1 adipocyte cells. Our results show that differentiated 3T3-L1 cells expressed the GPR103b subtype mRNA and protein, as well as QRFP mRNA. QRFP-43 and -26 induced an increase in triglyceride accumulation of 50 and 41%, respectively, and elicited a dose-dependent increase in fatty acid uptake, by up to approximately 60% at the highest concentration, in 3T3-L1-differentiated cells. QRFP-43 and -26 inhibited isoproterenol (ISO)-induced lipolysis in a dose-dependent manner, with IC₅₀s of 2.3 ± 1.2 and 1.1 ± 1.0 nM, respectively. The expression of genes involved in lipid uptake (FATP1, CD36, LPL, ACSL1, PPAR- γ , and C/EBP- α), was increased by 2- to 3-fold after treatment with QRFP. The effects of QRFP on ISO-induced lipolysis and fatty acid uptake were abolished when GPR103b was silenced. In a mouse model of diet-induced obesity, the expression of GPR103b in epididymal fat pads was elevated by 16-fold whereas that of QRFP was reduced by 46% compared to lean mice. Furthermore, QRFP was bioactive in omental adipocytes from obese individuals, inhibiting ISO-induced lipolysis in these cells. Our results suggest that GPR103b and QRFP work in an autocrine/paracrine manner to regulate adipogenesis.

2. 3. 2. Introduction

The orphanized G protein-coupled receptor 103 (GPR103) (1, 2) is known to be activated by its endogenous peptide agonists QRFPs (3, 4), a 43-aa pyroglutamylated RFamide peptide and its constitutive C-terminal part QRFP-26 (also known as 26RFa). In rodents, the activation of GPR103 by intracerebroventricular administration of QRFP peptides results in orexigenic activity (3, 5, 6). In addition to an increase in fat mass and

body weight, long-term central administration of QRFP leads to reduced thermogenesis (6). Besides stimulating food intake, an effect which appears to be exacerbated when the animals are fed a high-fat diet (HFD) (6, 7), GPR103 receptors and QRFP have been shown to be involved in regulating behavioral arousal, blood pressure (5), bone formation (8), gonadotropic axis (9), aldosterone secretion (4), insulin secretion (10), and analgesia (11). However, whether GPR103 and QRFP may also exert metabolic effect at the periphery has not been investigated.

The orexigenic response of QRFP mediated through GPR103 signaling involves central neuropeptide Y (NPY) pathways (5, 12). The GPR103 receptor shares significant sequence identity with NPF2, NPY-Y2, and galanin-R1 receptors (1). Two subtypes of GPR103 have been identified in rodents, mGPR103a and mGPR103b, while only one receptor has been identified in human, hGPR103 (5). Rodent subtypes feature differential expression: whereas mGPR103a is mainly distributed to the central nervous system, retina, thymus, liver, kidney, and bladder, mGPR103b is expressed in multiple tissues, predominantly in nuclei of the hypothalamus regulating appetite (13). QRFP peptides are expressed in multiple tissues, predominantly in brain (14), but also in peripheral tissues including white adipose tissue (WAT) (13). Interestingly, other members of the RFamide peptides family, including the neuropeptides FF, AF, and SF, were found to modulate adipose tissue differentiation (15), adipocyte metabolism (16), and to regulate food intake (17, 18). In the present study, we investigated whether GPR103b plays a regulatory role in adipogenesis after its activation by QRFP peptides.

To this aim, the expression of GPR103b and QRFP in 3T3-L1 adipocytes has been assayed by quantitative real-time PCR (qPCR) along with flow cytometry for GPR103b detection by immunofluorescence in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Functional lipolysis assays and determination of triglyceride accumulation were performed, along with gene expression profiles of adipogenic transcription factors and fatty acid (FA) transporters. The involvement of GPR103b in these cellular responses has been confirmed by gene silencing using retrovirus infection. *In vivo* expression profiles of mGPR103b and QRFP were documented in mouse adipose tissues following a high-fat feeding regimen. In addition, the

physiological relevance of GPR103b in human adipose tissue metabolism has been investigated with isoproterenol (ISO)-induced lipolysis experiments in human omental adipocytes. Our findings support that GPR103b and QRFP might regulate adipogenesis through an autocrine/paracrine mechanism.

2. 3. 3. Material and methods

Animals

All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the United States National Institutes of Health (A5213-01). Wild-type C57BL/6 mice were weaned at 4 wk old and put on either normal chow (D12450B, 10% calories from fat) or a HFD (60% kcal from fat, D12492), from Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ) for 18 or 24 wk as a model of diet-induced obesity. At 22 or 28 wk old, mice were killed by CO₂ asphyxiation and adipose tissues from perirenal, inguinal, and epididymal depots were collected and kept at -80 C until RNA extraction.

Materials

QRFP peptides were obtained from a custom synthesis at the W.M. Keck Biotechnology Resource Center (New Haven, CT). Insulin, dexamethasone, adenosine, ISO, FA-free BSA (A7030), ORO, and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Cell culture media, fetal bovine serum (FBS), TRIzol, and PCR reagents were from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Rabbit IgG isotype control was from U.S. Biological (Swampscott, MS). R-phycoerythrin goat antirabbit IgG and 4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a-diaza-3-indacene-3-

dodecanoic acid (C₁₂-BODIPY 3823) were from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). Rosiglitazone was from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI).

Cell culture

Murine 3T3-L1 preadipocytes (CL-173) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). At confluence (designated as d 0), differentiation was induced by culturing cells with DMEM supplemented with 10% FBS, 167 nM (1 µg/ml) insulin, 1 µM dexamethasone, and 0.5 mM IBMX for 3 d (d 3). Differentiated cells were then cultured in DMEM with 10% FBS containing 167 nM insulin for 2 d (d 5). Cells were then maintained in DMEM with 10% FBS for an additional 2 d (d 7).

mRNA expression of GPR103b during 3T3-L1 differentiation

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

comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method. Data are presented relative to the expression found in hypothalamus. A detailed description of primer sequences is found in Supplemental Table 1.

Table 1: Primers used for real-time PCR

Name	Forward (3'-5')	Reverse (3'-5')	Annealing temperature (C)
PPAR-gamma2	CGCTGATGCACTGCCTATGA	AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC	60
CEBP-alpha	AGGTGCTGGAGTTGACCAGT	CAGCCTAGAGATCCAGCGAC	60
CD36	GGCCTTACTTGGGATTGG	CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA	60
LPL	ATCGGAGAACTGCTCATGATGA	GTCTTCAAAGAACTCGGATGCT	60
FATP1	TATGGGGTGGCTGTGCCAGGAG	CGCAGGAAGATGGGCCGAGCATAG	60
ACSL1	CGGTCTGAAGCCATTTGAACAG	TGCGACCTGAAATAGTTCCGTAGC	60
Beta-actin	ATTACTGCTCTGGCTCCTA	TCTGCTGGAAGGTGGACA	60

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

GPR103b was detected by a polyclonal rabbit antimouse GPR103b antibody generated in our laboratory by using the peptide GPR103b [Glu (400) to Cys (414)] coupled to keyhole limpet hemocyanin as immunogen. The specific anti-GPR103b Igs were purified by affinity on 6% cross-linked agarose coupled to the GPR103b [Glu (400) to Cys (414)] peptide. Trypsinized 3T3-L1 adipocytes were fixed with 2% formaldehyde in PBS and permeabilized with 0.5% Tween 20 in 0.02% BSA-PBS. Cells were first stained with rabbit antimouse GPR103b IgG (or preimmune purified IgG and rabbit IgG isotype used as controls; 20 μ g/ml in permeabilization buffer) and then with R-phycoerythrin goat

antirabbit IgG (4 $\mu\text{g/ml}$ in permeabilization buffer). Fluorescence intensity was measured by flow cytometry with a FACSCalibur Becton Dickinson flow cytometer (BD Biosciences; San Jose, CA), and the results were analyzed using CellQuest software (BD).

ORO staining

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

Fatty acid uptake (BODIPY 3823)

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

LPL enzyme activity assay

Two days after the induction of differentiation, 3T3-L1 cells were incubated in DMEM supplemented with 5% of heat inactivated (55 C for 30 min) FBS for 24 h. Cells

were then incubated, or not, with 167 nM insulin and QRFP-26 (10 and 1000 nM) for 2 d. Heparin (10 UI/ml) was added to the incubation media, which was collected after 30 min. The heparin-releasable LPL activity was measured with the LPL activity kit (Roar Biomedical Inc., New York, NY) using a nonfluorescent substrate emulsion that becomes intensely fluorescent upon interaction with LPL, according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as fold increase of relative enzyme activity normalized to DNA content.

Lipolysis experiments

3T3-L1 adipocytes were incubated at 37 C for 1 h with serum-free DMEM containing 200 nM adenosine as described by Viswanadha and Londos (47). The inhibitory effect of QRFP (preincubated for 30 min) on ISO-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes was assessed in DMEM supplemented with 2% FA-free BSA containing adenosine deaminase (1 U/ml). After 30 min stimulation with ISO, the incubation medium was collected for free glycerol measurement using the free glycerol reagent (Sigma F6428) and total protein by the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). The amount of glycerol released was calculated as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein and expressed as a percentage of ISO-induced lipolysis. The lipolysis index was calculated as follows: $(\text{sample free glycerol concentration} - \text{basal concentration}) / (\text{ISO-elicited free glycerol concentration} - \text{basal concentration})$.

Knockdown of GPR103b in 3T3-L1 adipocytes

Specific shRNA constructs against mouse GPR103b were custom made by Origene Technologies (Rockville, MD). HuSH 29-mer for GPR103b were provided in the pRS plasmid driven by U6-RNA promoter. Selection of a single shRNA sequence for the production of retrovirus was based on the ability of the sequence to silence the expression of GPR103b mRNA in HEK293T cells transiently cotransfected with pFLAG-CMV2-mGPR103b generated in-house. The targeted sequence selected for retrovirus production was 5'-CATTTGTCCAGTGCCTGCCATTGTGACA-3'. Retroviruses (Moloney murine leukemia virus) were produced by transfecting HEK293T Phoenix Amphi cells (Orbigen,

San Diego, CA) with the pRS-shRNA plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Medium containing infectious retroviruses was harvested 36 h after transfection, centrifuged to remove cell debris, and filtered on a 0.45- μ m filter. The infection of 3T3-L1 preadipocytes with shGPR103b retroviruses has been carried out by adding retrovirus to the culture cells in the presence of 8 μ g/ml Polybrene for 2 d. Control cells were infected with an empty vector retrovirus (pRS-Neo) and a nontargeting shRNA retrovirus (shcontrol). Infected cells were selected for their stable integration of the shRNA with 5 μ g/ml puromycin. Infected 3T3-L1 cells were then differentiated in adipocytes as described above.

Isolation of primary adipose cells from mouse fat pads

For primary adipocytes isolation, epididymal, perirenal, and inguinal fat pads were minced and digested in Krebs-Ringer-Bicarbonate-HEPES buffer [20 mM HEPES (pH 7.4), 120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM K_2HPO_4 , 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 24 mM $NaHCO_3$] saturated with CO_2 and containing 6 mM glucose, 1% BSA, and type 2 collagenase (2 mg/g tissue) (Sigma C6885). The cell suspension was filtered through a nylon mesh, and isolated adipocytes were washed three times with warm Krebs-Ringer-Bicarbonate-HEPES buffer containing 1% BSA. The adipocytes were kept at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until RNA extraction.

Human subjects

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

Expression of hGPR103 and lipolysis experiments in human omental adipocytes

Adipose tissue was minced into small pieces and digested at 37 C for 2 h in DMEM/Ham's F12 medium with 750 µg/ml type 1 collagenase (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The tissue was then diluted with PBS and filtered through a 100-µm nylon mesh. The stromal cells were separated from the floating mature adipocytes by centrifugation. Total RNA was extracted as described above, and GPR103 mRNA was detected by RT-PCR in human omental mature adipocytes using the following primers: sense 5'-TAG GAT CAC CCA TGT GGC ACG T-3' and antisense 5'-AAG AGA GCC ACC ACT GTC ACC ATC-3', as previously described (10). The PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Amplification of human β -actin mRNA served as internal control, sense 5'-GGT CAT CTT CTC GCG GTT GGC CTT GGG GT-3' and antisense 5'-CCC CAG GCA CCA GGG CGT GAT-3'. For lipolysis experiments, 40 µl of mature adipocytes were then collected and transferred into a 96-well plate containing 100 µl of Lipolysis Assay Kit Buffer (Zen-Bio, Research Triangle Park, NC) in the presence or absence of either QRFP-43 (1, 10, 100 nM) or insulin (100 nM). After 40 min, lipolysis was induced by addition of ISO (1 µM) for 80 min. Following the manufacturer's instructions, 50 µl of medium were then transferred into a new 96-well plate for glycerol measurement. Results are expressed as percentage of glycerol release in the basal condition used as control.

Statistical analysis

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

2. 3. 4. Results

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

The mRNA expression of GPR103 receptor subtypes was investigated in 3T3-L1 preadipocytes and differentiated adipocytes by RT-PCR. We found that the mRNA levels of GPR103b, and not those of GPR103a, are induced in a time-dependent manner after initiation of 3T3-L1 cell differentiation (Fig. 1, A and B). Increased mRNA levels correlated with increased GPR103b receptor expression as assessed by flow cytometry (Fig. 1C). Low levels of QRFP mRNA were detected in 3T3-L1 preadipocytes (Fig. 1A), which increased by 5-fold ($P < 0.05$) at d 4 after the induction of differentiation and appeared to plateau thereafter (Fig. 1D).

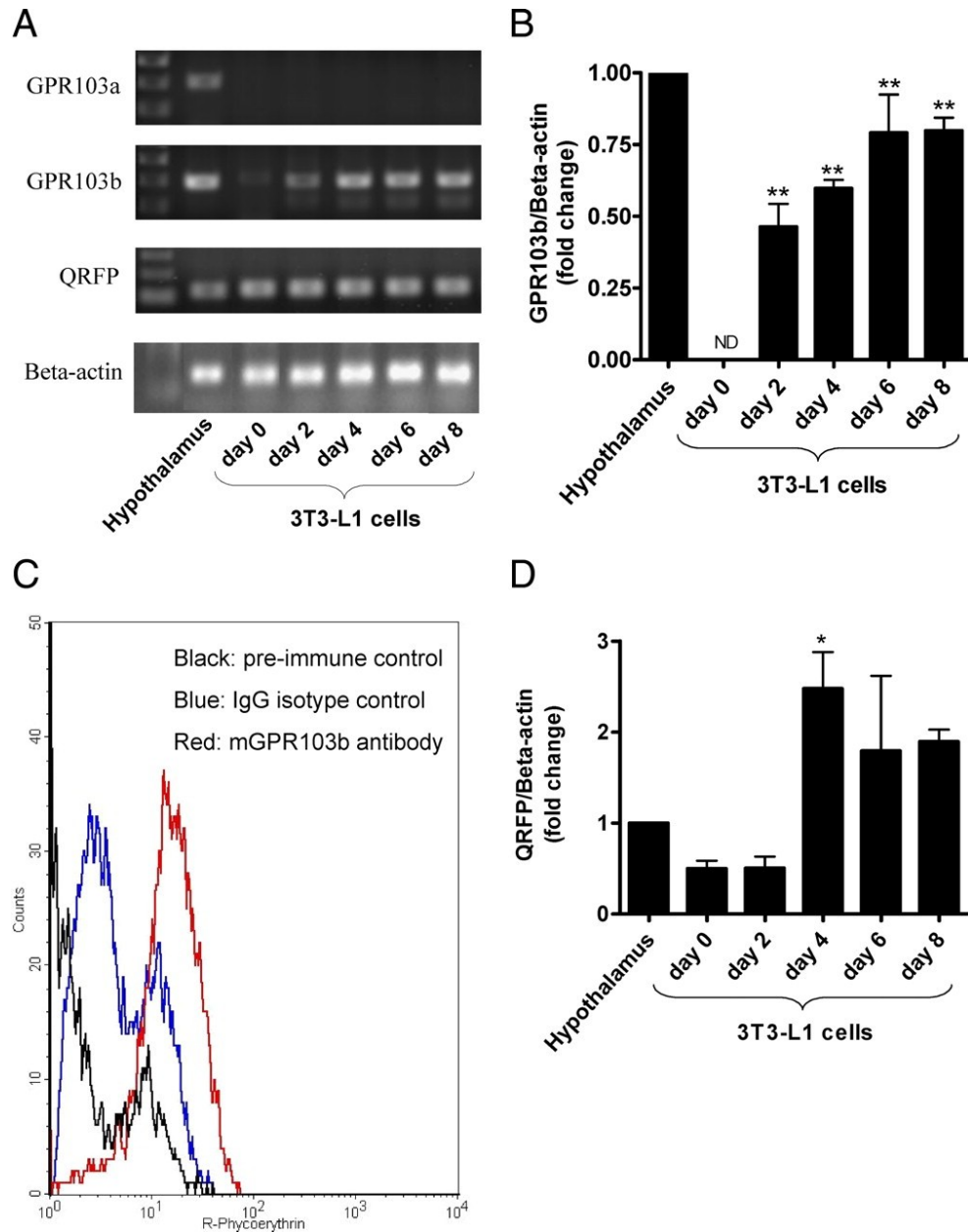


Fig. 1. Expression of GPR103b and QRFP during 3T3-L1 differentiation. A, Ethidium bromide-stained agarose gel for visualization of RT-PCR amplification products derived from 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were induced to differentiate at confluence (designated d 0) as described in *Material and Methods*. PCR amplification products of hypothalamus were used as positive controls. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels. B, qPCR of GPR103b during 3T3-L1 cell differentiation. Data are presented as fold change relative to hypothalamic expression set to 1 (n = 3). C, Detection of GPR103b in differentiated 3T3-

L1 cells by flow cytometry immunofluorescence. The histogram shows preimmune control fluorescence (*black*), IgG isotype control fluorescence (*blue*), and specific GPR103b fluorescence (*red*) ($n = 4$). D, qPCR of pre-QRFP during 3T3-L1 differentiation. Data are presented as fold change relative to hypothalamic expression set to 1 ($n = 3$). ND, Not detected; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ vs. d 0.

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

To assess the potential role of GRP103b on 3T3-L1 differentiation, cells were incubated in the presence of QRFP-43 or -26 (10 nM) during 4 d, from d 2 after the induction of differentiation. At the end of the incubation period, neutral lipids were stained with Oil Red O (ORO) and quantified by optical densitometry. Our results show that QRFP peptides increased intracellular triglyceride content, as shown by increased ORO staining (Fig. 2A) by 1.4-fold (QRFP-26) and 1.5-fold (QRFP-43) ($P < 0.01$), whereas 167 nM insulin induced a 1.2-fold ($P < 0.05$) elevation (Fig. 2B).

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

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

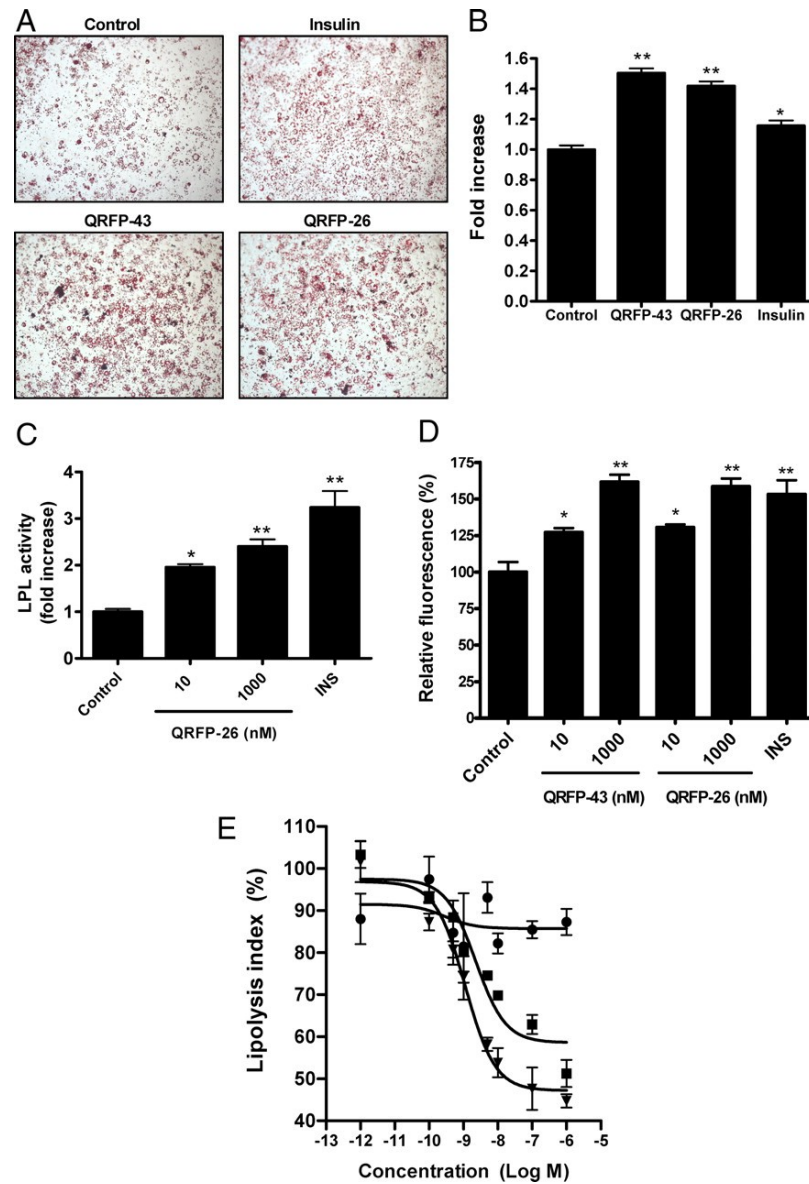


Fig. 2. Effects of QRFPs peptides on triglyceride accumulation, LPL activity, FA uptake, and lipolysis. A, Triglyceride accumulation by ORO staining of 3T3-L1 adipocytes. At d 2 of differentiation, 3T3-L1 cells were treated or not with insulin (167 nM) or QRFP-43 or -26 (10 nM) for 4 d. B, Quantitative analysis of ORO staining. Stained Oil Red O was eluted with isopropanol and quantified by measuring the optical density at 510

nm ($n = 3$). Oil Red O data are expressed as fold increase (mean \pm sem) over control (vehicle treated). C, Heparin-releasable activity in d 2 differentiated 3T3-L1 cells treated with insulin (INS, 167 nM) and QRFP-26 (10 and 1000 nM) for 2 more d ($n = 3$). D, Bar graphs in percent change (\pm sem) in mean fluorescence intensity over fluorescence in vehicle-treated cells set at 100%, as assessed by flow cytometry of C₁₂-BODIPY-labeled FA uptake in 3T3-L1 adipocytes starved 1 h and then treated 2 h with insulin (INS, 167 nM) or QRFP peptides (10 and 1000 nM) ($n = 4$). E, Dose-response curve of inhibition of ISO-induced lipolysis by QRFP. ISO + QRFP-43 (*square*), ISO + QRFP-26 (*triangle*), and ISO + QRFP-28n (*circle*) in differentiated 3T3-L1 cells. QRFP-43 and -26 inhibited the lipolytic effect of ISO in a dose-dependent manner. Data are expressed as lipolysis index (sample free glycerol concentration – basal concentration)/(ISO-elicited free glycerol concentration – basal concentration) ($n = 3$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. vehicle.

We next investigated the role of GPR103b on differentiated adipocyte functional response, using ISO-induced lipolysis. Neither QRFP-43 nor QRFP-26 had an effect on basal lipolysis (data not shown); however, both peptides inhibited ISO-elicited lipolysis in a dose-dependent manner, with IC₅₀s of 2.3 ± 1.2 and 1.1 ± 1.0 nM, respectively (Fig. 2E). In contrast, QRFP-28n, which displays weak affinity for GPR103 (4), had no effect on ISO-induced lipolysis (Fig. 2E).

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

To determine the involvement of GPR103b in mediating the effects of QRFP on adipocytes, we used retroviral-delivered short hairpin RNA (shRNA) to knockdown the expression of GPR103b in 3T3-L1 adipocytes. As shown in Fig. 3, A and B, an infection with a shRNA sequence specific for GPR103b (shGPR103b) decreased the expression of GPR103b by 67% ($P < 0.05$), at the mRNA level, and by 46% ($P < 0.05$) at the protein level, compared with an infection with the empty vector (pRS-Neo). Interestingly, an infection with a nontargeting shRNA (shcontrol) increased the mRNA of GPR103b without

affecting its protein expression. The knockdown of GPR103b did not affect 3T3-L1 differentiation compared with empty vector and nontargeting shRNA infections as shown by ORO staining of differentiated cells (Fig. 3C). The decrease in GPR103b immunofluorescence following specific shRNA infection is shown by a left shift in the fluorescence histogram compare to empty vector and nontargeting shRNA infections (Fig. 3D). Specific GPR103b knockdown abolished the increase in FA uptake as shown in Fig. 3E. Neither control infections, with empty vector or nontargeting shRNA sequence, modulated QRFP-43 and -26 abilities to increase FA uptake. The GPR103b knockdown did not affect insulin-mediated FA uptake, which was used as a positive control. These results suggest that triglyceride accumulation and FA uptake induced by QRFP-43 and -26 in differentiated adipocytes is mediated by the GPR103b receptor. Furthermore, specific GPR103b knockdown abolished the antilipolytic effects of QRFP-43 and -26 on ISO-induced lipolysis (Fig. 3F). In agreement, an infection with the empty vector or nontargeting shRNA did not affect the antilipolytic effect of QRFP peptides on ISO-induced lipolysis. In the latter case, both QRFP-43 and -26 inhibited ISO-induced lipolysis in a dose-dependent manner, supporting that the inhibitory effect of QRFP on β -adrenergic agonist-stimulated lipolysis is GPR103b-dependent.

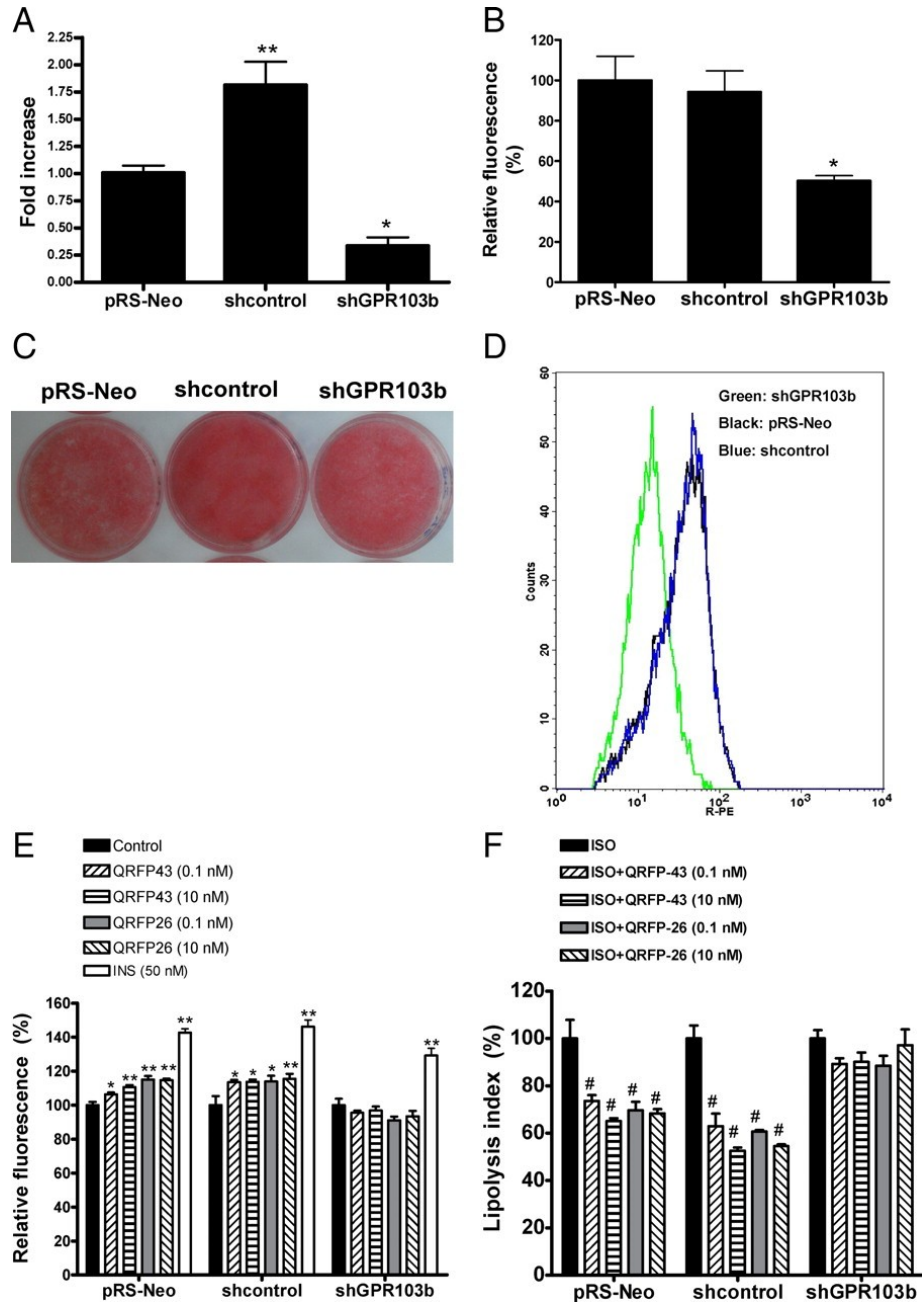


Fig. 3. Effects of GPR103b silencing on QRFP-dependent responses in differentiated 3T3-L1. A, qPCR of GPR103b in 3T3-L1 infected with shRNAs. Expression in nontargeting shRNA cells (shcontrol) and specific GPR103b shRNA cells (shGPR103b) are presented as fold change relative to empty vector (pRS-Neo) expression set to 1 (n = 4). B, Bar graphs of protein detection in percent change (\pm sem, n = 4) in mean fluorescence intensity over fluorescence in empty vector infected cells set at 100%, as assessed by flow

cytometry of GPR103b in empty vector, nontargeting shRNA or specific GPR103b shRNA-infected and differentiated 3T3-L1 cells. C, Triglyceride accumulation in empty vector, nontargeting shRNA, or specific GPR103b shRNA-infected 3T3-L1 cells. ORO staining has been performed on differentiated untreated cells. D, Detection of GPR103b in infected and differentiated 3T3-L1 cells by flow cytometry immunofluorescence. The left shift of shGPR103b cells in the fluorescence histogram shows a decrease in GPR103b expression compared with pRS-Neo and shcontrol cells ($n = 4$). E, C_{12} -BODIPY-labeled FA uptake in pRS-Neo, shcontrol, or shGPR103b in infected and differentiated 3T3-L1 cells following 1-h starvation and 2-h treatment with insulin (INS, 50 nM) or QRFP peptides (0.1 and 10 nM) ($n = 4$). F, Inhibition of ISO-induced lipolysis by QRFP-43 and -26. pRS-Neo, shcontrol, or shGPR103b infected 3T3-L1 cells were differentiated, and ISO-elicited lipolysis was inhibited with QRFP peptides at 0.1 and 10 nM ($n = 3$). Data are expressed as lipolysis index. #, $P < 0.05$ vs. ISO; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ vs. their respective control.

GPR103b activation increases adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes

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

expression of PPAR- γ , C/EBP- α , CD36, LPL, FATP1, and ACSL1. However, specific knockdown of GPR103b abolished the induction of these genes by QRFP (Fig. 4B). Rosiglitazone treatment (10 μ M) was used as a positive control for the induction of these genes (see Supplemental Fig. 1).

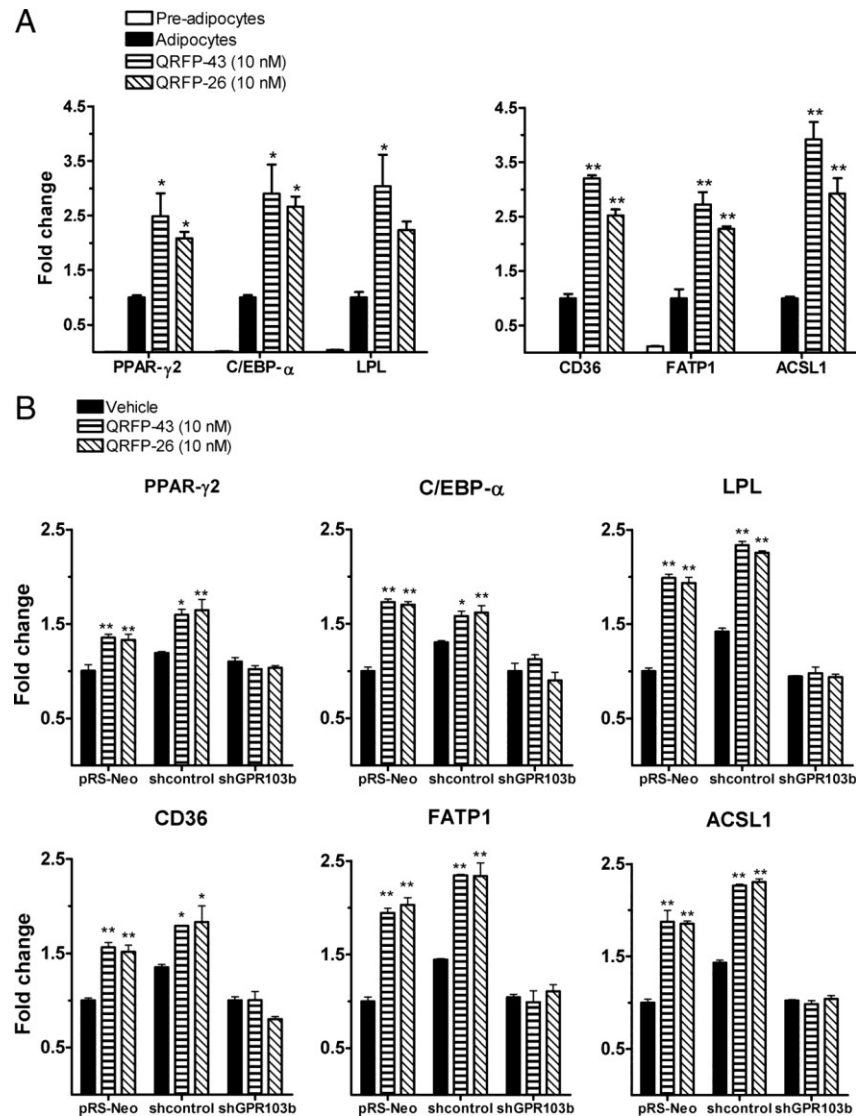
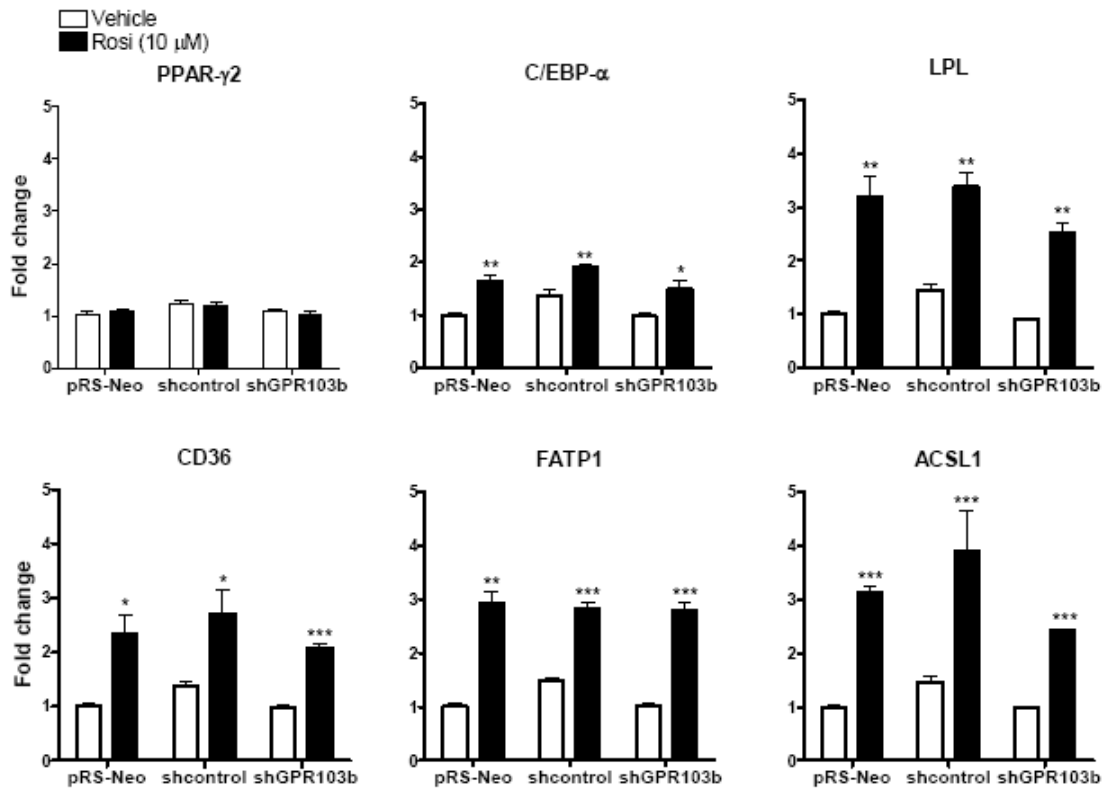


Fig. 4. Adipogenic gene expression in 3T3-L1-differentiated cells following QRFP treatment. A, Differentiated 3T3-L1 cells or, B, empty vector, nontargeting shRNA, and specific GPR103b shRNA-differentiated 3T3-L1 cells after retroviral infection were treated or not with QRFP-43, -26 (10 nM) or vehicle for 2 d, and the total number of RNAs were assayed by qPCR. Data are presented as fold increase over vehicle (10% FBS)-treated

adipocytes (n = 3). Gene expression levels were quantified by SYBR Green real-time PCR. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ vs. control (vehicle).



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

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

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

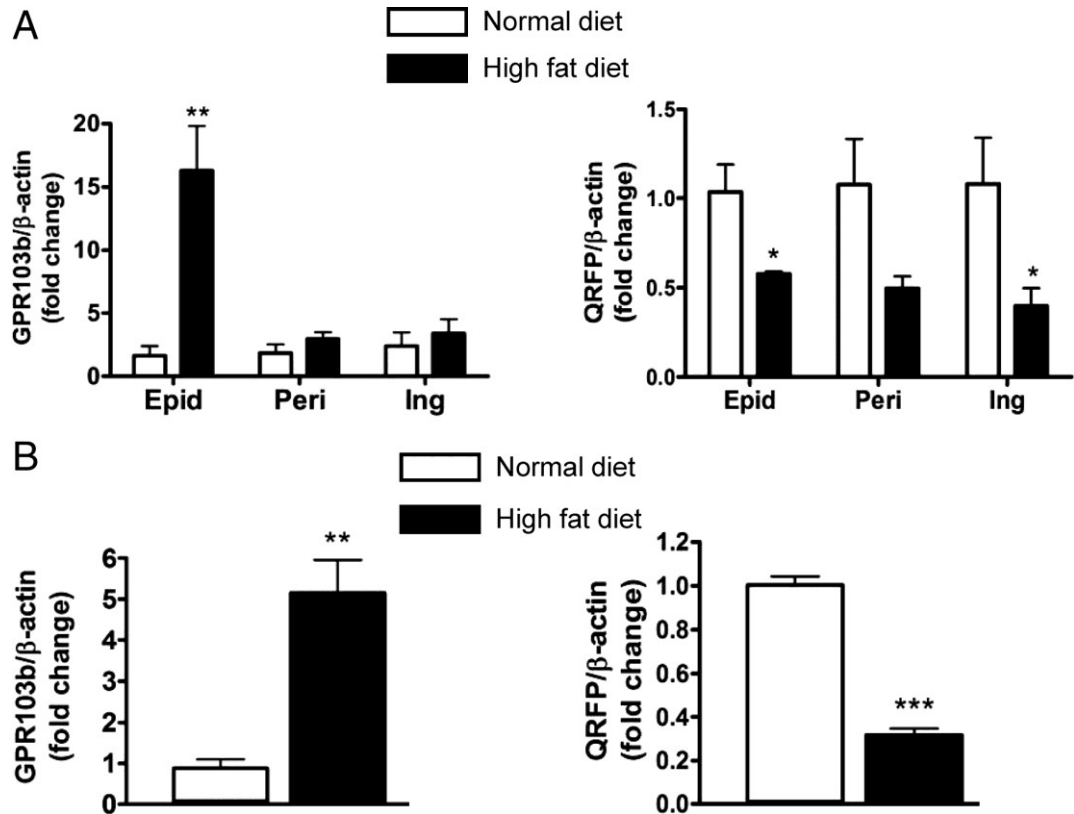


Fig. 5. Expression of GPR103b and pre-QRFP in adipose depot from mice fed a high-fat diet. A, qPCR of GPR103b and pre-QRFP in epididymal (Epid), perirenal (Peri), and inguinal (Ing) fat depots from mice fed a HFD (D12492; Research Diet Inc.) or normal diet (D12450B) for 24 wk. B, qPCR analysis of GPR103b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

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

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

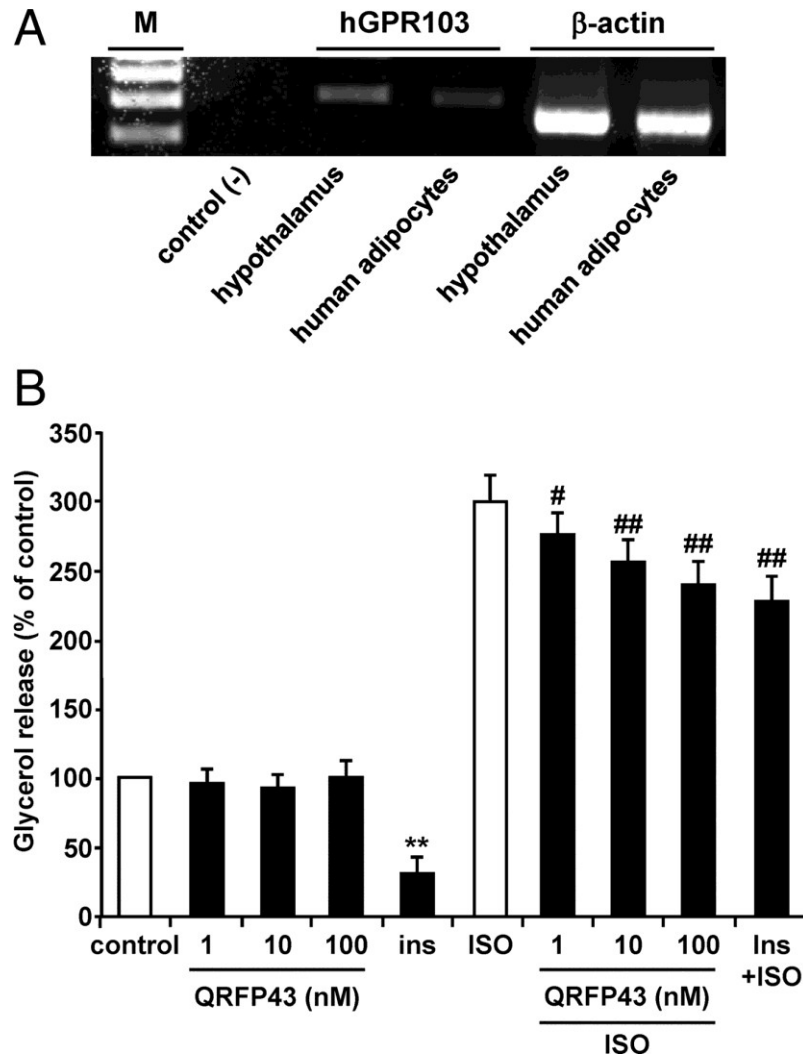


Fig. 6. Expression of hGPR103 and lipolysis in human omental adipocytes. A, GPR103 mRNA expression in human omental adipocytes. PCR amplification products of human hypothalamus were used for positive control. As expected, the amplified products corresponded to 318 bp for hGPR103 and 230 bp for β -actin. B, Lipolysis was measured in adipocytes preincubated with or without either QRFP-43 (1–100 nM) or insulin (100 nM) for 40 min and then incubated with ISO (1 μ M) for an additional 80 min. Results are expressed as percentage of control in basal (*left*) or stimulated (*right*) conditions (control glycerol release is of 33.75 μ M). The means \pm sem of five independent experiments are shown. **, $P < 0.01$ vs. control; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ vs. ISO.

2. 3. 5. Discussion

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

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

The activation of GPR103b by QRFP was found to increase intracellular triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells, which have been committed toward

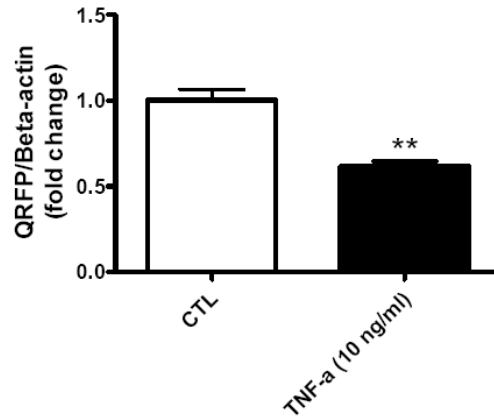
differentiation as shown by an approximate 1.5-fold increase in ORO-stained lipid droplets in QRFP-treated cells. In contrast, no effect of QRFP has been observed in nondifferentiated 3T3-L1 cells, in accordance with the absence of GPR103b in naive preadipocytes (data not shown). Both QRFP-26 and -43 regulated triglyceride metabolism in mature 3T3-L1 adipocytes, as shown by a potent antilipolytic action on ISO-induced lipolysis. The QRFP-28n fragment, which features weak binding affinity for GPR103 (4), was unable to inhibit ISO-induced lipolysis, thereby supporting a specific role for GPR103 in mediating the effect of QRFP. Using a retroviral-delivered shRNA to knockdown GPR103b, we demonstrated that both QRFP-43 and -26 could not inhibit ISO-induced lipolysis neither stimulate FA uptake in GPR103b knockdown cells. Overall, these results suggest that GPR103b promotes anabolism by increasing fat storage and by decreasing triglyceride hydrolysis in adipocytes. These observations suggest that QRFP may play a role in triglyceride metabolism similar to that of NPY and ghrelin. Indeed, both ghrelin (22, 24) and NPY (25) have been reported to inhibit ISO-induced lipolysis in isolated fat cells. In addition, both NPY and ghrelin have been reported to increase adipogenesis (21, 26) and food intake (27, 28, 29). In contrast, other RFamide peptides like NPPF, NPAF, and NPSF were shown to inhibit, rather than increase, adipocyte differentiation, by up-regulating the expression of Id3, a transcription factor that inhibits adipogenesis (15).

The role of LPL in catalyzing the hydrolysis of lipoproteins to generate free fatty acids that can be transported in adipocytes following an anabolic process is well established. LPL is regulated by hormones and nutrients in a tissue-specific manner (30, 31, 32). Among the hormones involved in the regulation of LPL activity, insulin was shown to regulate LPL activity in adipocytes by posttranscriptional and posttranslational mechanisms (19, 33, 34). Insulin decreases the intracellular pool of LPL and increases the cell surface-associated LPL released by heparin (33). Heparin-releasable LPL activity was increased significantly following treatment of 3T3-L1 adipocytes with QRFP-26. This increase of LPL activity promoted by QRFP was less than that mediated by insulin with a 3.4-fold increase in heparin-releasable LPL activity, in agreement with previous studies (19). In parallel to this observation, LPL activity within 3T3-L1 cells decreased after insulin and

QRFP-26 treatment (data not shown). However, LPL mRNA expression was up-regulated by QRFP, suggesting a regulatory effect of QRFP on LPL expression and release. The LPL activity correlated with FA uptake and storage in adipocytes. Using RNA interference, Gonzalez and Orlando (35) demonstrated that a 50% loss of LPL activity led to a reduction of 80% in intracellular lipids. The relevancy of increased LPL activity by QRFP is confirmed by an increase in the cellular uptake of fluorescent free FA (C₁₂-BODIPY) in 3T3-L1 adipocytes, as measured by flow cytometry (Fig. 2D). This increased cellular uptake of lipids was associated with an increase in FA transport proteins, CD36 and FATP1, mRNA levels that have been involved in the process of FA uptake in adipocytes (36). QRFP also induced the increase of ACSL1 expression, an enzyme which converts intracellular free long-chain FA into fatty acyl-CoA esters (37, 38, 39). This increase of ACSL1 correlated with the effect of QRFP on the increased expression of key transcription factors, such as PPAR- γ and C/EBP- α (Fig. 4), which control the expression of proteins involved in adipogenesis (40, 41, 42). In agreement, the up-regulation of adipogenic genes by QRFP was inhibited when GPR103b was knocked down. Taken together, these data suggest that genes involved in the storage of lipids within adipocytes are up-regulated in a GPR103b-dependent manner following a treatment with QRFP.

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

by proinflammatory cytokines like TNF- α , as shown in differentiated 3T3-L1 cells (Supplemental Fig. 2), in a similar manner to that of adiponectin in a state of obesity (45, 46).



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

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

The pathophysiological relevancy of GPR103b in obesity has not been determined so far. A mouse with a gene deletion for GPR103a has been generated (8), but their body weight was normal. This is in agreement with the fact that GPR103a is not expressed in murine adipocytes. It also suggests that the role of GPR103a in the hypothalamus could be less important than that of GPR103b in the regulation appetite. Along that line, a

GPR103b-deficient or a QRFP-deficient mouse would be helpful to assess the relative role of QRFP peptides in obesity. Insights regarding the intracellular pathways activated by GPR103, including cAMP production (3), pertussis toxin-sensitive Gi-protein (10), and Gq-protein (calcium mobilization) pathways (5) have been proposed in different cell types. Additional studies will be necessary to delineate the signaling pathways mediating the acute antilipolytic effect associated with GPR103b activation in adipocytes.

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

2. 3. 6. Acknowledgments and footnotes

We thank Petra Pohankova (Faculty of Pharmacy, Université de Montréal) for her skillful technical assistance.

This work was supported by an educational grant from Aeterna-Zentaris, Inc. M.M. is a recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM). C.J. is a recipient of a scholarship from the Rx&D Foundation and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). M.J.S. is a scholar from the FRSQ.

2. 3. 7. References

1. Lee DK, Nguyen T, Lynch KR, Cheng R, Vanti WB, Arkhitko O, Lewis T, Evans JF, George SR, O'Dowd BF 2001 Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* 275:83–91

2. **Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Laverty M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma Jr F, Zhang FL** 2003 Identification and characterization of a novel RFamide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 278:27652–27657
3. **Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Régo JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H** 2003 Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15247–15252
4. **Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M** 2003 A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 278:46387–46395
5. **Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasaki YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J** 2006 A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7438–7443
6. **Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H** 2006 RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* 147:2916–2922
7. **Primeaux SD, Blackmon C, Barnes MJ, Braymer HD, Bray GA** 2008 Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides* 29:1994–2000
8. **Baribault H, Danao J, Gupte J, Yang L, Sun B, Richards W, Tian H** 2006 The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol Cell Biol* 26:709–717

9. **Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Vigo E, Tovar S, Chartrel N, Le Marec O, Leprince J, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Vaudry H, Tena-Sempere M** 2006 Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol* 573:237–249
10. **Egido EM, Hernández R, Leprince J, Chartrel N, Vaudry H, Marco J, Silvestre RA** 2007 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides* 28:725–730
11. **Yamamoto T, Wada T, Miyazaki R** 2008 Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* 157:214–222
12. **Lectez B, Jeandel L, El-Yamani FZ, Arthaud S, Alexandre D, Mardargent A, Jégou S, Mounien L, Bizet P, Magoul R, Anouar Y, Chartrel N** 2009 The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 150:2342–2350
13. **Zhang Q, Qiu P, Arreaza MG, Simon JS, Golovko A, Lavery M, Vassileva G, Gustafson EL, Rojas-Triana A, Bober LA, Hedrick JA, Monsma Jr FJ, Greene JR, Bayne ML, Murgolo NJ** 2007 P518/Qrfrp sequence polymorphisms in SAMP6 osteopenic mouse. *Genomics* 90:629–635
14. **Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S** 2006 Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27:1073–1086
15. **Herrera-Herrera ML, Salazar-Olivo LA** 2008 RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 377:29–34

16. **Lefrere I, De CP, Camelin JC, Le Lay S, Mercier N, Elshourbagy N, Bril A, Berrebi-Bertrand I, Feve B, Krief S** 2002 Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on β -adrenergic responsiveness. *J Biol Chem* 277:39169–39178
17. **Dockray GJ** 2004 The expanding family of RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 89:229–235
18. **Bechtold DA, Luckman SM** 2007 The role of RFamide peptides in feeding. *J Endocrinol* 192:3–15
19. **Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO** 1979 Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem* 254:10021–10029
20. **Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X** 2008 Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J* 22:2452–2464
21. **Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z** 2007 Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13:803–811
22. **Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S** 2003 The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 144:754–759
23. **Ntambi JM, Young-Cheul K** 2000 Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S–3126S

24. **Muccioli G, Pons N, Ghè C, Catapano F, Granata R, Ghigo E** 2004 Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 498:27–35
25. **Valet P, Berlan M, Beauville M, Crampes F, Montastruc JL, Lafontan M** 1990 Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Clin Invest* 85:291–295
26. **Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T** 2004 Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145:234–242
27. **Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP** 1984 Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427–429
28. **Clark JT, Kalra PS, Kalra SP** 1985 Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology* 117:2435–2442
29. **Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913
30. **Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R** 2002 Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 13:471–481
31. **Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ** 2002 Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43:1997–2006
32. **Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, Ailhaud G** 1996 Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* 314(Pt 2):541–546

33. **Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L** 1989 Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264:9030–9038
34. **Knutson VP** 2000 The release of lipoprotein lipase from 3T3-L1 adipocytes is regulated by microvessel endothelial cells in an insulin-dependent manner. *Endocrinology* 141:693–701
35. **Gonzales AM, Orlando RA** 2007 Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr Metab (Lond)* 4:22
36. **Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A** 1999 Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta* 1441:4–13
37. **Shimomura I, Tokunaga K, Jiao S, Funahashi T, Keno Y, Kobatake T, Kotani K, Suzuki H, Yamamoto T, Tarui S** 1992 Marked enhancement of acyl-CoA synthetase activity and mRNA, paralleled to lipoprotein lipase mRNA, in adipose tissues of Zucker obese rats (fa/fa). *Biochim Biophys Acta* 1124:112–118
38. **Richards MR, Harp JD, Ory DS, Schaffer JE** 2006 Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J Lipid Res* 47:665–672
39. **Gargiulo CE, Stuhlsatz-Krouper SM, Schaffer JE** 1999 Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J Lipid Res* 40:881–892
40. **Cowherd RM, Lyle RE, McGehee Jr RE** 1999 Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10:3–10
41. **Kudo M, Sugawara A, Uruno A, Takeuchi K, Ito S** 2004 Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene expression by

tumor necrosis factor α via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology* 145:4948–4956

42. **Patel SR, Murphy KG, Thompson EL, Patterson M, Curtis AE, Ghattei MA, Bloom SR** 2008 Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 149:4747–4754
43. **Tschöp M, Heiman ML** 2001 Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:307–319
44. **Lafontan M, Berlan M** 2003 Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24:276–283
45. **Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B** 2003 Regulation of adiponectin by adipose tissue- derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527–E533
46. **Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R** 2002 Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1084–1089
47. **Viswanadha S, Londos C** 2006 Optimized conditions for measuring lipolysis in murine primary adipocytes. *J Lipid Res* 47:1859–1864

3. Transition vers la deuxième étude

Suite à la première publication, mon collègue Mukandila Mulumba s'est concentré sur l'étude des voies de signalisation du GPR103b impliquées dans la réponse anti-lipolytique. De mon côté, je me suis intéressé aux mécanismes de régulation de l'expression du QRFP. Nous avons tenté d'expliquer pourquoi l'expression du QRFP dans le tissu adipeux est diminuée par l'obésité chez la souris. Nous nous sommes intéressés aux adipocytes, mais aussi aux macrophages qui sont présents dans le tissu adipeux. Beaucoup de stimuli ont été utilisés pour tenter de moduler l'expression du QRFP, mais très peu d'entre eux ont eu un effet.

4. Deuxième étude

4. 1. Hypothèse et objectifs

Étant donné que l'expression du QRFP dans les tissus adipeux est diminuée chez les animaux obèses (Mulumba *et al.*, 2010) et que l'obésité est induite par une EM (Cani *et al.*, 2007), nous avons posé comme hypothèse que l'expression du QRFP dans les tissus adipeux pourrait être régulée par les endotoxines circulantes élevées.

Nos objectifs étaient de :

- 1- Documenter l'expression du QRFP dans les macrophages.
- 2- Identifier des signaux extracellulaires qui régulent l'expression du QRFP dans les adipocytes et les macrophages dans un contexte d'obésité.
- 3- Identifier les voies de signalisation impliquées dans cette régulation.

4. 2. Contribution des auteurs

Christian Jossart :

Partie expérimentale, écriture du manuscrit, participation à la gestion du projet.

Riccarda Granata :

Récolte de tissus adipeux humains, commentaires sur le manuscrit.

Davide Gallo :

Récolte de tissus adipeux humains, extraction d'ARN.

Ezio Ghigo :

Collaboration pour tissus adipeux humains.

Marc J. Servant :

Participation à la gestion du projet, commentaires sur le manuscrit, co-direction de Christian Jossart.

Sylvie Marleau :

Participation à l'écriture du manuscrit et la gestion du projet. Co-directrice de Christian Jossart.

Huy Ong :

Participation à l'écriture du manuscrit et chercheur principal du projet. Directeur de Christian Jossart.

4. 3. Pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP) gene is regulated by lipopolysaccharide and interferons in a cellular model of metabolic endotoxemia between macrophages and adipocytes

Christian Jossart, Riccarda Granata, Davide Gallo, Ezio Ghigo, Sylvie Marleau, Marc J. Servant and Huy Ong

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

Abbreviations: ActD, actinomycin D; AP-1, activator protein-1; BSA, bovine serum albumin; CCL2, CC-motif chemokine ligand; CHX, cycloheximide; DIO, diet-induced obesity; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FFA, free fatty acid; FBS, fetal bovine serum; GPR103, G protein-coupled receptor 103; HDAC, histone deacetylase; HFD, high-fat diet; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; IFN, interferon; IFNAR, IFN alpha/beta receptor; IFNGR, IFN gamma receptor; IKKiIV, IKK-2 inhibitor IV; IKK-2, inhibitor of kB kinase-2; IL-6, interleukine-6; IRF, interferon regulatory factor; JAK, Janus kinase; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ME, metabolic endotoxemia; MEK1, MAPK/ERK kinase 1; MyD88, myeloid differentiation primary response gene 88; NF-kB, nuclear factor-kappa B; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; qPCR, quantitative real-time PCR; QRFP, pyroglutamylated RF-amide peptide; RAW, RAW264.7; RIA, radioimmunoassay; shRNA, short hairpin RNA; STAT, signal transducer and activator of transcription; Th1, T-helper 1; TLR-4, toll-like receptor-4; TNF- α , tumor

necrosis factor- α ; TRIF, TIR domain-containing adapter-inducing IFN- β ; TSA, trichostatin A.

4. 3. 1. Abstract

Pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP) is involved in feeding regulation, thermogenesis, adipogenesis and lipolysis. The expression of QRFP in adipose tissue was found to be decreased in diet-induced obesity, a mouse model in which plasma concentration of endotoxins have been shown to be slightly elevated. The present study aimed to investigate the role of metabolic endotoxemia (ME) on QRFP gene regulation. Our results uncovered the expression of QRFP in mouse macrophages and cell lines. Low doses of LPS transiently downregulated QRFP by 59% in RAW macrophages but not in 3T3-L1 adipocytes. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on QRFP expression in macrophages could be reversed with IKK-2 inhibitor IV or the knockdown of TRIF but not by the knockdown of MyD88. Interferon- β (IFN- β) was induced by ME in macrophages. IFN- β reduced QRFP expression in both macrophages (64%) and adipocytes (49%) up to 48 h. IFN- γ downregulated QRFP (74%), but only in macrophages. TNF- α and fatty acids had no effect on QRFP mRNA. Both interferons inhibited QRFP secretion from macrophages. Macrophage-conditioned medium reduced QRFP expression in adipocytes, an effect blocked by IFN- β neutralizing antibody. The effect of IFN- β on QRFP expression was blocked by PI3K inhibitor (LY294002), p38 MAPK inhibitor (SB203580) and by HDACs inhibitor (trichostatin A). The effect of IFN- γ could be reversed by MEK1 inhibitor (PD98059) and trichostatin A. In conclusion, LPS induces IFN- β release from macrophages which reduces QRFP expression in both macrophages and adipocytes in an autocrine/paracrine dependent manner, suggesting QRFP as a potential biomarker in ME.

4. 3. 2. Introduction

Pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP) is known to activate the G protein-coupled receptor, GPR103 (1-3), which mediates orexigenic effects in rodents (1;4;5). The latter appears to be exacerbated when the animals are fed a high-fat diet (HFD) (6). Besides stimulating food intake, QRFP increases fat mass, body weight, adipogenesis and reduces thermogenesis (4;7). QRFP also regulates behavioral arousal (5), blood pressure (5), heart rate (8), bone formation (9), gonadotropic axis (10;11), aldosterone secretion (2), insulin secretion (12) and analgesia (13-15). However, very little is known about the regulation of QRFP gene expression.

Two forms of QRFPs, encoded by a single gene, were identified so far (16). The 43 amino acid form, QRFP-43, and its constitutive N-terminally truncated part, QRFP-26 (also known as 26RFa) are potent agonists of GPR103. Prepro-QRFP mRNA is expressed in multiple tissues, predominantly in hypothalamus (17), where it is upregulated in *ob/ob* and *db/db* obese mouse models and elevated by fasting in wild-type mice (5). Rats fed a HFD for 21 days showed elevated expression levels of QRFP in the ventromedial and arcuate nuclei of the hypothalamus but not in the lateral hypothalamus (6). In contrast, another study reported that rats fed a HFD for 8 weeks had undetectable levels of QRFP in the ventromedial nucleus (18). QRFP is also expressed in peripheral tissues including white adipose tissue (19). In 3T3-L1 cells, QRFP expression is induced during their differentiation into mature adipocytes (7). In a mouse model of diet-induced obesity (DIO), a 24-week HFD regimen decreased the expression of QRFP in epididymal, perirenal and inguinal fat depots (7). Adipocytes isolated from the epididymal fat of mice fed a 18-week HFD showed a similar decrease in QRFP mRNA levels (7).

In mice fed a HFD, circulating endotoxin levels have been shown to be chronically increased by 2-3-fold in comparison with mice fed a standard diet. This results in metabolic endotoxemia (ME), as a consequence of a change in gut microbiota, and it plays a role in the initiation of insulin resistance in obesity (20;21). Endotoxins and free fatty acids (FFA)

are both Toll-like receptor-4 (TLR-4) ligands known to be elevated in obesity (22). The activation of TLR-4 by these ligands activates both myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)-dependent and MyD88-independent, TIR domain-containing adapter-inducing IFN- β (TRIF)-dependent pathways (23;24). The MyD88-dependent pathway leads to the activation of nuclear factor-kappa B (NF-kB), activator protein-1 (AP-1) and the subsequent induction of pro-inflammatory cytokines by immune cells (24). On the other hand, the TRIF pathway leads to a delayed activation of NF-kB but also to the activation of interferon regulatory factors (IRFs) and to the induction of type I interferons (IFNs) (24). Macrophages and T-cells, which are known to infiltrate obese adipose tissue, play a crucial paracrine role in the development of adipose tissue inflammation (25). Indeed, lipopolysaccharide (LPS)-mediated activation of TLR-4 on macrophages elicits tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- β (IFN- β) secretion (26). Pro-inflammatory T-helper 1 (Th1) cells, which are elevated in obese adipose tissue (27), are interferon- γ (IFN- γ) secreting cells (28). All these cytokines have been reported to exert pro-lipolytic and anti-adipogenic actions (29-32), as for LPS itself (33;34). Since QRFP decreases lipolysis and increases adipogenesis in vitro (7), we investigated whether ME regulates QRFP expression in macrophages and adipocytes.

To this aim, the expression of QRFP in macrophages has been assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and the secretion of the peptide has been verified by radioimmunoassay (RIA). QRFP expression in RAW 264.7 (RAW) macrophages and 3T3-L1 adipocytes have been assessed following treatments with TNF- α , palmitate or low doses of LPS. The involvement of MyD88, TRIF and NF-kB signaling pathways in the LPS-dependent cellular response was tested by lentivirus-mediated gene silencing and pharmacological inhibition of the inhibitor of kappa B kinase 2 (IKK-2). The role of LPS-stimulated interferons on QRFP mRNA levels in adipocytes has been verified by RAW cells medium transfer and by antibody neutralization of IFN- β . The signaling pathways of IFN-mediated cellular responses have been investigated with pharmacological

inhibitors. Our findings support that ME modify macrophages and adipocytes secretome and suggest QRFP as a potential biomarker of ME.

4. 3. 3. Material and methods

Animals

All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. Wild type male C57BL/6 mice were weaned at 4 weeks old and put on normal chow (D12450B, 10% calories from fat) from Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ). At 8 months old, mice were sacrificed by CO₂ asphyxiation and peritoneal macrophages were collected in 5 mL heparinized PBS (10 U/mL). Harvested cells were put in culture in DMEM with 10% FBS for 3 hours. The medium containing non adhered cells was removed and cells were frozen at -80 °C until RNA extraction.

Materials

QRFP-43 peptide was obtained from a custom synthesis at the W.M. Keck Biotechnology Resource Center (New Haven, CT). Insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), LPS (055:B5), fludarabine, cycloheximide, actinomycin D, puromycin, sodium palmitate, endotoxin-free bovine serum albumin (BSA), mouse IFN- β and - γ were from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, Ontario, Canada). IKK-2 inhibitor IV (IKKiV), trichostatin A, LY293002, SB203580 and PD98059 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). SC-514 was from Cayman Chemical (New Orleans, LA). Cell culture media, low endotoxin fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin were from Wisent (St-Bruno, Québec, Canada). Rabbit anti-human QRFP antiserum has been produced by EZBiolab (Carmel, IN). TRIzol, RT-PCR reagents and rat TNF- α were from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Rabbit anti-mouse IFN- β antiserum was from

PBL interferon source (Piscataway, NJ). Rabbit IgG isotype control was from US Biological (Swampscott, MS). Goat anti-rabbit γ -globulins were from Medicorp (Montréal, Québec, Canada).

Cell Culture

Murine RAW 264.7 macrophages (#TIB-71), J774A.1 macrophages (#TIB-67) and 3T3-L1 preadipocytes (#CL-173) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). RAW and 3T3-L1 cells were routinely cultured in DMEM with 10% FBS and penicillin/streptomycin. For differentiation, 3T3-L1 cells were grown at confluence. Differentiation was induced by culturing cells with DMEM supplemented with 10% FBS, 167 nM insulin, 1 μ M dexamethasone and 0.5 mM isobutylmethylxanthine for 4 d. Differentiated cells were then cultured in DMEM with 10% FBS containing 167 nM insulin for 2 d. Cells were then were maintained in DMEM with 10% FBS for an additional 5 d.

mRNA expression of GPR103a, GPR103b and preproQRFP

Total RNA was extracted with TRIzol reagent and treated with DNase I Amplification Grade according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from DNase-treated total RNA with random primers and M-MLV reverse transcriptase. Primers for mGPR103a, sense: 5'-TCT TTG GCA ACT CTC TGG TCA TC-3', antisense: 5'-CTT CGG GTA GTG TAC TGC CAC T-3'; mGPR103b, sense: 5'-CGA TAT CAA GTG GTG TGA ACA GCC-3', antisense: 5'-GGG TCT CTT GTA GCC CAG GT-3'; mpreproQRFP, sense: 5'-TCT GCC GTC CTT ACC ATC TCA-3', antisense: 5'-TCT CAG GAC TGT CCC AAA GGA G-3' and mouse β -actin, sense 5'-ATTACTGCTCTGGCTCCTA-3', antisense 5'-TCTGCTGGAAGGTGGACA-3' were used to assess mRNA expression levels by qPCR. It was performed using Ssofast Evagreen Supermix from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Gene expression levels were quantified by Evagreen real-time PCR using Rotor-Gene 3000 from Corbett Research (Mortlake, New South Wales, Australia). All mRNA levels were normalized to β -actin mRNA and relative gene expression was calculated using the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method. The sequences of all other primers used are found in Supplementary Table 1.

Table 1: Primers used for real-time PCR

Gene	Forward (3'-5')	Reverse (3'-5')	Annealing temperature (C)
IFN- β	CCTCCACGCTGCGTTCCTGC	AAGTCCGCCCTGTAGGTGAGGT	60
MyD88	GTCCGACCGTGACGTCCTGC	CCACCATGCGGCGACACCTT	60
TRIF	GCTCTGGGCCAGGACACGGA	TGGTACAGGCGAGCCACCGT	60
IL-6	CTTCCATCCAGTTGCCTTCTTG	AATTAAGCCTCCGACTTGTGAAG	60
TNF- α	TCGGGGTGATCGGTCCCCAA	CATGCCGTTGGCCAGGAGGG	60
CCL2	CCAGCACCAGCACCAGCCAA	GTGGATGCTCCAGCCGGCAA	60

Stimulation of RAW with LPS and IFNs

RAW macrophages were plated at 1×10^6 cells in 2 mL of medium per well in 6-well plates 24 h before stimulations. LPS was added in the medium to a final concentration of 1 ng/mL (or as indicated) and incubated for the indicated time before media were removed and cell were frozen at -80°C . According to the manufacturer, 1 ng/mL corresponds to ≥ 0.5 EU/mL, within the concentrations range found in ME (21). Stimulations with IFNs were carried out using the same number of cells. IFN- β and IFN- γ were added to a final concentration of 100 U/mL and 10 ng/mL (or as indicated), respectively. Stimulation on differentiated and confluent 3T3-L1 adipocytes were made in 2 mL of medium per well in 6-well plates. 1 ng/mL LPS or 300 U/mL IFN- β were used or as indicated.

Macrophage-conditioned medium experiments

3×10^6 RAW cells in 2 mL of medium were plated in 6-well plates. After 2 h, 1 ng/mL LPS was added to the cells. The medium was harvested 5 h later, filtered and antibodies (30 and 300 U/mL of anti-mouse IFN- β or equimolar concentration of IgG isotype) were added to the medium before incubation with differentiated 3T3-L1

adipocytes for 24 h. Medium was removed and adipocytes were frozen at -80 °C before RNA extraction.

Palmitate treatments

Treatments with palmitate were done according to Shi et al. (35) with modifications. Manipulations were done with non-pyrogenic material. Sodium palmitate was dissolved in 25 mM KOH at 80°C and gradually added to low endotoxin, fatty acid-free BSA (10%) at a 4:1 ratio to yield a 30 mM stock solution. The palmitate:BSA complex was added to RAW cells for 8 h and to 3T3-L1 adipocytes for 24 h. Vehicle contained BSA and KOH only.

Knockdown of MyD88 and TRIF in RAW cells

Specific short hairpin RNA (shRNA) constructs against mouse MyD88 (#TRCN77234) and TRIF (#TRCN362763) were purchased from Sigma. shRNAs were provided in the pLKO-puro plasmid driven by U6-RNA promoter. Lentiviruses were produced by transfecting HEK293T cells with the pLKO-shRNA plasmids and helper plasmids (VSV-G, PLP1 and PLP2) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Medium containing infectious lentiviruses was harvested 36 h after transfection, centrifuged to remove cell debris and filtered on a 0.45 µm filter. The conditions of infection of RAW cells has been optimized with lentiviruses containing green fluorescent protein (GFP) gene and has been carried out by adding virus to the cells in the presence of 10 µg/mL Polybrene for 2 d. Control cells were infected with a non-targeting shRNA lentivirus (non-target). Infected cells were selected for their stable integration of the shRNA with 4 µg/mL puromycin.

Overexpression of preproQRFP and generation of RAW-mQRFP cells

The pCMV6-Kan/Neo plasmid containing the mouse preproQRFP sequence has been purchased from Origene (Rockville, MD). RAW cells were electroporated with a 10 µL tip and a 20 ms pulse of 1680 V using the Neon transfection system (Invitrogen). Cells were then selected for their stable expression of mouse QRFP with 200 µg/mL Geneticin (Invitrogen).

Detection of QRFP by RIA

3×10^6 RAW-mQRFP cells/well in 2 mL of medium were plated in 6-well plates. After adhesion, treatments were added for 48 h. Media were harvested and centrifuged to remove non adherent cells. QRFP was detected in the media by RIA using a modified version of the method described by Bruzzone and al. (36). Briefly, QRFP-43 was iodinated with Na^{125}I (Perkin-Elmer) using the lactoperoxidase method described elsewhere (37). Dilutions of tracer (100 μL , 10 000 cpm/tube) and antiserum (100 μL , 1:3000 final dilution) were done in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0,1% Triton X-100, 0,1% BSA buffer. Standards (100 μL) were diluted in complete medium. Incubation was performed for 48 h at 4 °C and separation of the antibody-bound fractions was done by adding 500 μL of 0.2% goat anti-rabbit γ -globulins in 12 % PEG 8000 and 200 μL of buffer.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using nonlinear regression analysis software PRISM (GraphPad, La Jolla, CA). Significance was tested using a one-way ANOVA, with Dunnett's (single control comparison) or Newman-Keuls' post-test, or an unpaired *t* Student test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Figures shown are representative of at least 3 independent experiments.

4. 3. 4. Results

Whether macrophages express QRFP and/or GPR103 and play a role in the paracrine effects of QRFP in adipose tissue is not known yet. qPCR analysis has been performed on peritoneal macrophages, RAW and J774 macrophage cell lines. The two receptor subtypes of QRFP, GPR103a (Fig. 1A) and GPR103b (Fig. 1B), are not significantly expressed or not detected in murine peritoneal macrophages and cell lines in contrast to hypothalamus (positive control). QRFP mRNA was detected in RAW and J774 cell lines, however to low levels compared to the hypothalamus expression (Fig. 1C). The expression of QRFP was higher in mouse peritoneal macrophages compared to macrophage cell lines (Fig. 1C). These results suggest a possible paracrine role for QRFP coming from macrophages.

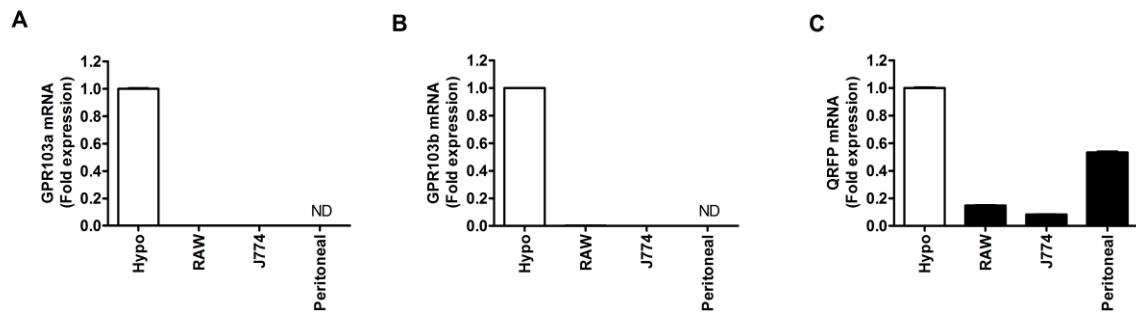


FIG. 1. Expression of GPR103a, GPR103b and QRFP in macrophages. qPCR analysis of mouse GPR103a (A), GPR103b (B) and QRFP (C) in unstimulated RAW, J774 and mouse isolated peritoneal macrophages (*peritoneal*). Data are shown as fold change relative to hypothalamic expression (*Hypo*) set to 1. All data are normalized to β -actin mRNA. *ND*, Not detected. (n = 3).

In order to delineate the role of ME in regulating QRFP expression in macrophages, RAW cells were treated with increasing concentrations of LPS for 4 h. LPS decreased the expression of QRFP by 53% ($P < 0.01$) at 1 ng/mL (Fig. 2A) and the inhibitory effect of LPS was maintained up to to 1 μ g/mL. LPS, at 1 ng/mL, elicited a time-dependent

downregulation of QRFP gene expression, with a peak at 8 h (Fig. 2B). LPS-induced QRFP downregulation was transient, as shown by a return of mRNA levels to those observed in vehicle-treated macrophages at 24 h, followed by an upregulation at 48 h ($P < 0.01$) (Fig. 2B). The mRNA of QRFP is not stable and decreases rapidly after the addition of the inhibitor of transcription actinomycin D (ActD), showing a half-life of approximately 90 min (Fig. 2C). LPS did not enhance the inhibitory effect of ActD on QRFP mRNA (Fig. 2C), suggesting an action at the transcriptional level. The expression of IFN- β was induced by 29-fold ($P < 0.001$) after a 4 h treatment with 1 ng/mL LPS (Fig. 2D). To assess whether LPS has a direct effect on QRFP expression, the inhibitor of protein biosynthesis cycloheximide (CHX) was used. CHX did not reverse the effect of LPS but rather increased its effect ($P < 0.001$) suggesting that LPS exerts a direct action on RAW cells (Fig. 2E). 3T3-L1 adipocytes also express QRFP mRNA (7) and the effect of LPS on these cells has been investigated. Treatments with 10 ng/mL to 1 μ g/mL LPS did not change QRFP expression after 4 (Fig. 2F, left) and 24 h (Fig. 2F, right) of incubation, but strongly upregulated TNF- α expression (data not shown).

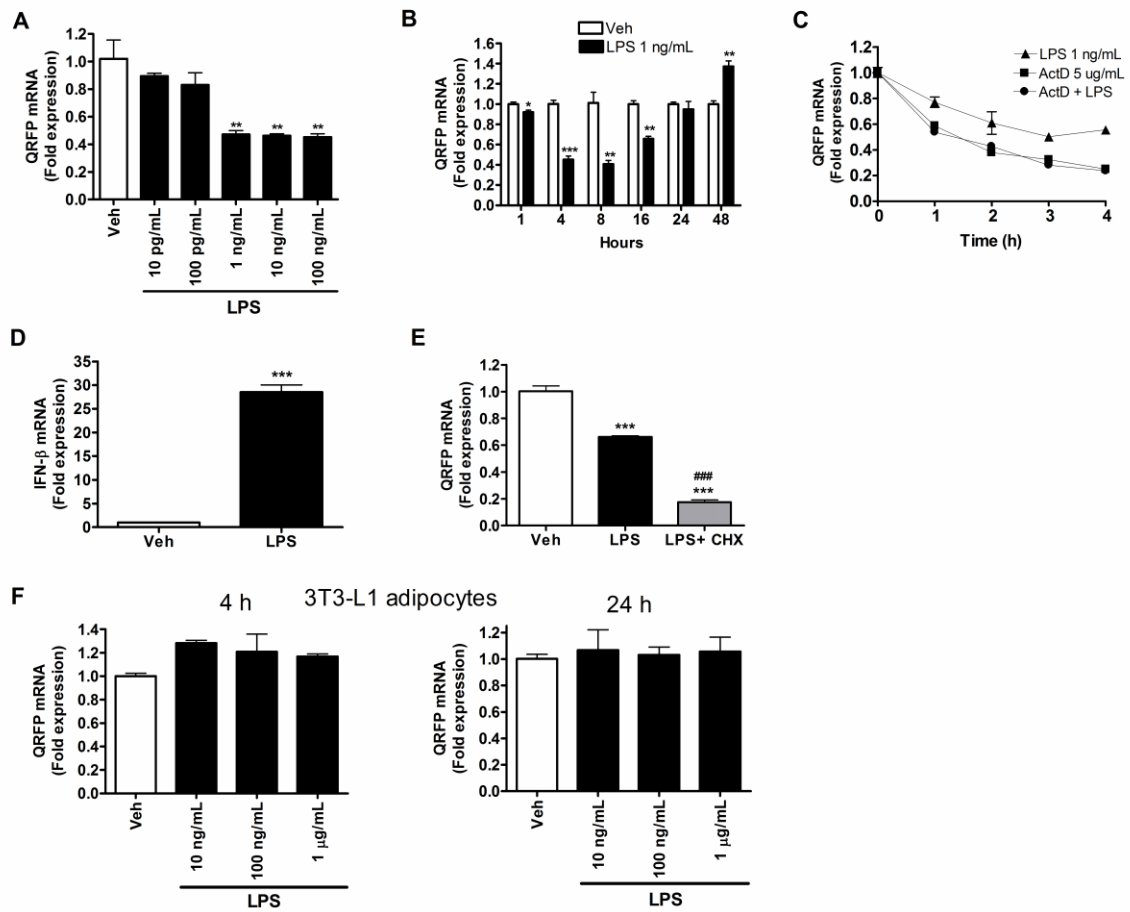
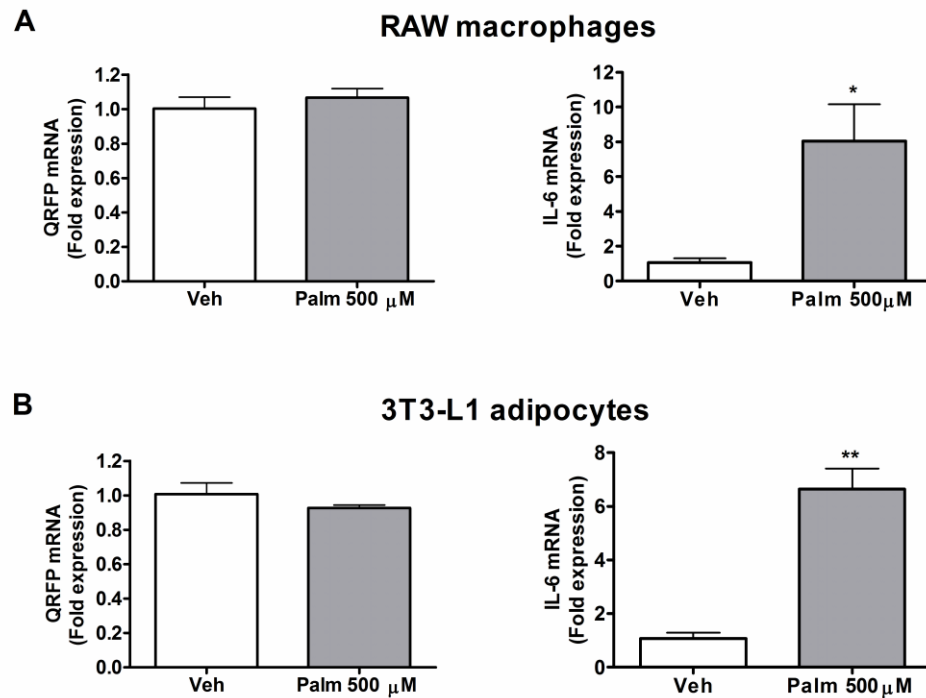
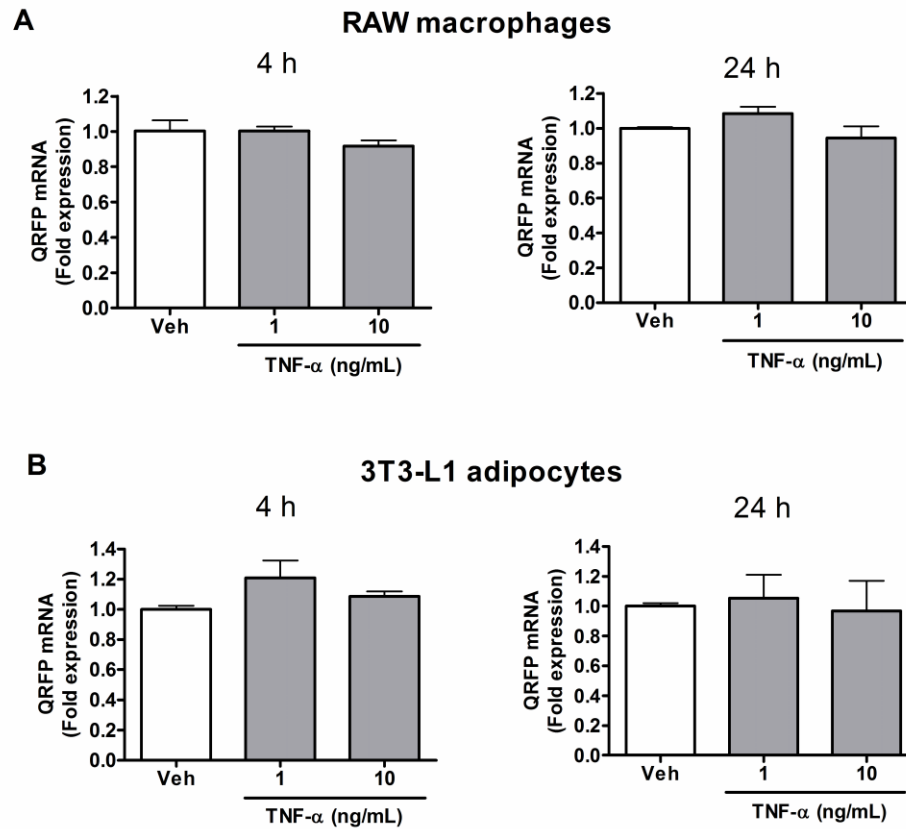


FIG. 2. LPS downregulates QRFP expression in RAW macrophages but not in 3T3-L1 adipocytes. **A**, Dose-response of LPS on QRFP mRNA in RAW treated for 4 h. **B**, Kinetics of QRFP mRNA in RAW during 1 ng/mL LPS treatment. Each time point is shown as fold change relative to its own vehicle. **C**, Effect of 5 μ g/mL ActD on QRFP mRNA in RAW macrophages with or without 1 ng/ml LPS. Each time point is shown as fold change relative to time = 0. **D**, IFN- β mRNA induction in RAW cells by 1 ng/mL LPS after 4 h. **E**, Effect of a 5 μ g/mL CHX pretreatment (1 h) on QRFP mRNA before a 4 h treatment with 1 ng/mL LPS. **F**, Dose-response of LPS on QRFP mRNA in 3T3-L1 adipocytes treated for 4 (*left*) or 24 h (*right*). All data are normalized to β -actin mRNA. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ versus vehicle (*Veh*). ####, $P < 0.001$ versus LPS alone ($n = 3$).



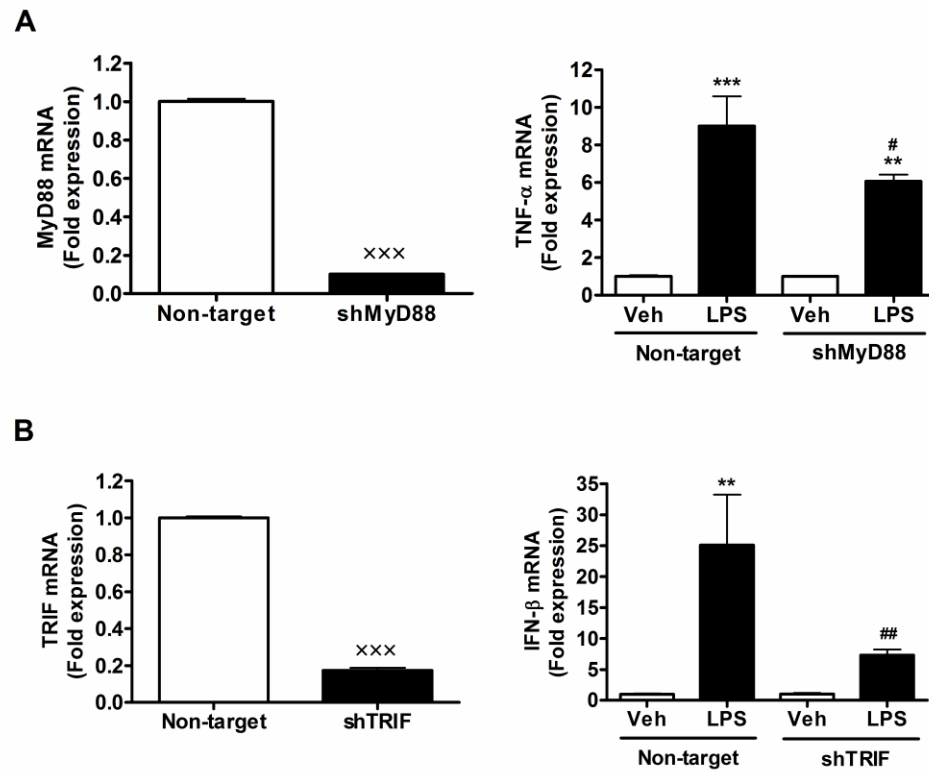
SUPP. FIG. 1. QRFP mRNA in RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes is not affected by palmitate. Palmitate was conjugated with fatty acid-free, endotoxin-free BSA as described in *material and methods*. **A**, Effect of palmitate in RAW macrophages. Cells were treated with 500 μ M palmitate for 8 h. QRFP mRNA (*left*) and IL-6 mRNA (*right*) were quantified by qPCR. **B**, Effect of palmitate on 3T3-L1 adipocytes. Differentiated cells were treated with 500 μ M palmitate during 24 h. QRFP mRNA (*left*) and IL-6 mRNA (*right*) were quantified. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus vehicle (*Veh*) ($n = 3$).

RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes were treated with 500 μ M palmitate for 8 and 24 h, respectively, accounting for elevation of saturated FFAs as a consequence of cytokine-induced fat lipolysis (38). However, palmitate did not change QRFP expression in these cells (Supp. Fig. 1A, left and Supp. Fig. 1B, left) but upregulated interleukine-6 (IL-6) expression (Supp. Fig. 1A, right and Supp. Fig. 1B, right). Similar observations were made with stearate (data not shown).



SUPP. FIG. 2. QRFP mRNA in RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes is not affected by TNF- α . TNF- α dilutions were made in complete medium containing 10% FBS. **A**, Effect of TNF- α on QRFP mRNA in RAW macrophages. Cells were treated with TNF- α (1 and 10 ng/mL) for 4 (*right*) or 24 h (*left*). **B**, Effect of TNF- α on QRFP mRNA in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated cells were treated with TNF- α (1 and 10 ng/mL) during 4 (*right*) or 24 h (*left*) (n = 3).

The effect of TNF- α , which is upregulated in adipose tissue of obese animals (39), has been tested on RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes. TNF- α , incubated at 1 and 10 ng/mL concentrations for 4 and 24 h, did not change QRFP mRNA levels in either RAW macrophages (Supp. Fig. 2A) or 3T3-L1 adipocytes (Supp. Fig. 2B). Yet, TNF- α upregulated IL-6 expression in these cells (data not shown).



SUPP. FIG. 3. MyD88 and TRIF expressions are knocked down in RAW macrophages. Cells were infected with lentiviruses containing shRNAs targeting mouse MyD88 (*shMyD88*), TRIF (*shTRIF*) or non-targeting shRNA (*non-target*) as described in *material and methods* and were selected with puromycin for their stable expression of shRNAs. **A**, MyD88 knockdown. MyD88 mRNA in non-target and shMyD88 cells (*left*). TNF- α mRNA in non-target and shMyD88 cells treated or not with 1 ng/mL LPS for 4 h (*right*). **B**, TRIF knockdown. TRIF mRNA in non-target and shTRIF cells (*left*). IFN- β mRNA in non-target and shTRIF cells treated or not with 1 ng/mL LPS for 4 h (*right*). xxx, $P < 0.001$ versus empty vector; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ versus vehicle (*Veh*); #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus LPS in non-target cells. (n = 3).

The activation of TLR-4 by LPS activates the MyD88 pathway and the TRIF pathway (23;24). To elucidate the signaling pathway involved in QRFP downregulation, RNA silencing against these adaptor proteins mRNAs has been performed in RAW

macrophages with lentivirus-delivered shRNAs. MyD88 mRNA was knocked down by $90 \pm 0.2\%$ ($P < 0.001$) and LPS-induced TNF- α mRNA, a read-out for NF- κ B activation, was blocked by $33 \pm 6.8\%$ ($P < 0.05$) in these cells compared to control cells infected with non-targeting shRNA (Supp. Fig. 3A). TRIF mRNA was knocked down by $83 \pm 1.5\%$ ($P < 0.001$) and LPS-induced IFN- β mRNA, a read-out for IRF-3 activation, was reversed ($P < 0.01$) in these cells versus non-targeting shRNA-infected cells (Supp. Fig. 3B). These results suggest that the knockdown of MyD88 and TRIF in RAW cells were effective.

The comparison of basal expressions of QRFP in RAW macrophages showed that TRIF-depleted cells express $51 \pm 8.7\%$ ($P < 0.05$) more QRFP than shMyD88-infected and non-targeting shRNA-infected cells (Fig. 3A). Moreover, the inhibition of QRFP expression by LPS could be partially reversed by $38 \pm 12\%$ ($P < 0.01$) in shTRIF-infected cells compared to non-targeting shRNA-infected cells (Fig. 3B). Knocking down MyD88 did not have any effect on LPS-mediated response. Since both MyD88- and TRIF-dependent pathways activates NF- κ B (23;24), we investigated the role of NF- κ B in the downregulation of QRFP. LPS-induced inhibition of QRFP could be reversed by a pretreatment with IKK-2 inhibitor IV ($P < 0.001$) but not with SC-514 (Fig. 3C, left). Both are selective inhibitors of IKK-2, an upstream activator of NF- κ B, and blunted ($P < 0.001$) the LPS-induced CC-motif chemokine ligand 2 (CCL2) mRNA (Fig. 3C, center). However, they show differential effects on LPS-induced IFN- β mRNA (Fig. 3C, right). The latter may explain their differential effects on QRFP expression. Taken together, these results suggest that the TRIF pathway leading to the activation of IRF-3 and the transcription of IFNs seems to be involved in LPS regulation of QRFP expression. Histone deacetylases (HDACs) are known to modulate gene expression upon activation by LPS (40;41). The involvement of HDACs in LPS regulation of QRFP expression has been verified by a pretreatment with a HDACs inhibitor, trichostatin A (TSA). TSA treatment reversed ($P < 0.001$) the action of LPS on QRFP mRNA (Fig. 3D) suggesting a role for HDACs in the repressor activity of LPS in RAW cells.

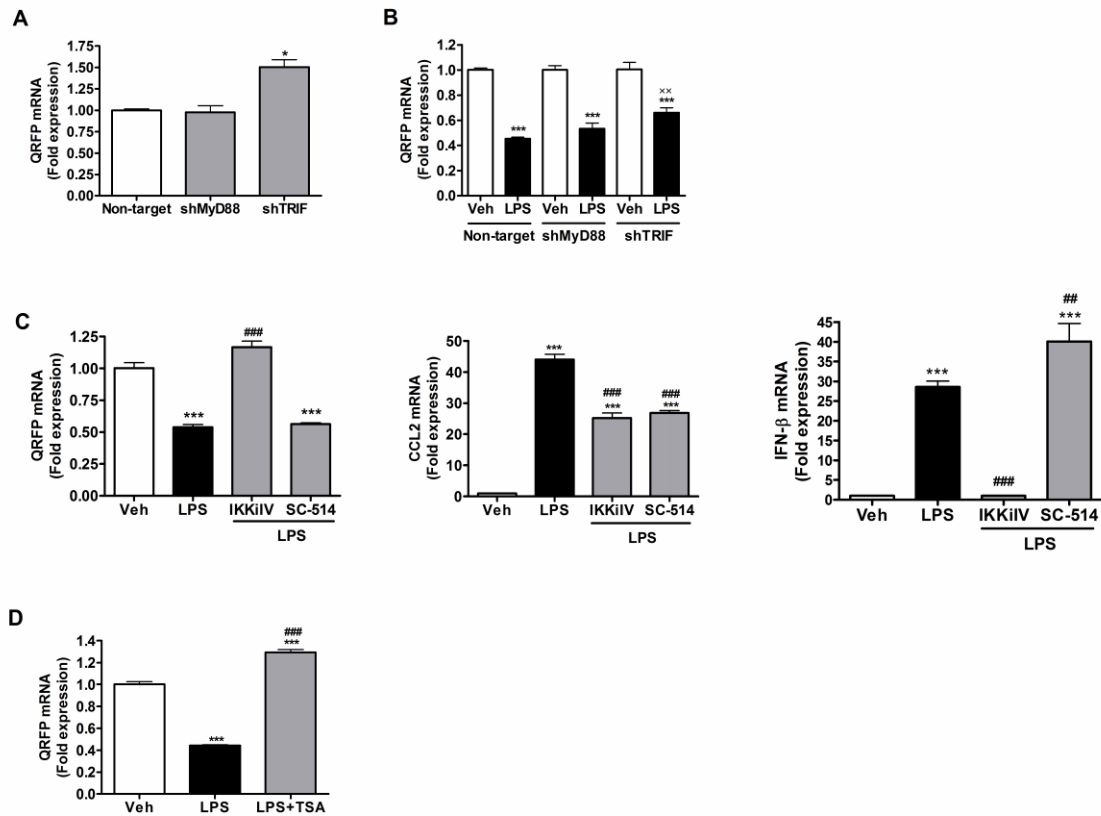


FIG. 3. Signaling of LPS in RAW macrophages. Control cells were infected with non-targeting shRNA plasmid (*non-target*). Knocked cells were infected with shRNA plasmid targeting mouse MyD88 (*shMyD88*) or TRIF (*shTRIF*). **A**, Basal QRFP mRNA in RAW shRNA cells. Data are shown as fold change relative to *non-target* set to 1. **B**, QRFP mRNA levels in RAW-shRNA cells treated for 4 h with 1 ng/mL LPS. Data are shown as fold change relative to their own vehicle set to 1. **C**, Effects of IKK-2 inhibitors on QRFP (*left*), CCL2 (*center*) and IFN-β (*right*) mRNA in RAW treated for 4 h with 1 ng/mL LPS. IKKiIV (10 μM) and SC-514 (25 μM) were preincubated for 1 h before LPS. **D**, Effect of TSA on QRFP mRNA in RAW cells treated for 4 h with 1 ng/mL LPS. TSA (500 nM) was preincubated for 6 h before LPS. *, $P < 0.05$ versus *non-target*. ***, $P < 0.001$ versus vehicle (*Veh*). **, $P < 0.01$ versus LPS in *non-target* cells. ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ versus LPS alone (n = 3).

Since IFN- β expression is induced by LPS at concentrations found in ME and that Th1 cells secrete IFN- γ , IFNs might play an autocrine/paracrine role on QRFP expression in macrophages. The effects of IFN- β and IFN- γ have been tested on RAW cells. After 24 h incubation with IFN- β at 10, 100 and 1000 U/mL, QRFP expression was decreased in a dose-dependent manner by up to $64 \pm 2\%$ ($P < 0.01$) in RAW macrophages (Fig. 4A). IFN- γ , at concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL, dose-dependently downregulated QRFP by up to $74\% \pm 2\%$ ($P < 0.01$) in RAW cells after 24 h incubation (Fig. 4B). IFN- β and IFN- γ sustainably repressed QRFP mRNA from 4 to 48 h ($P < 0.01$) (Fig. 4C). The cellular mechanisms involved in this repression have been investigated. Cycloheximide pretreatment did not reverse IFN- β -mediated QRFP downregulation and even increased it ($P < 0.001$), suggesting that the action of IFN- β is not dependent of new protein synthesis (Fig. 4D). The signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) inhibitor fludarabine did not reverse IFN- β effect, whereas the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 ($P < 0.001$) and the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB203580 ($P < 0.001$) could do so (Fig. 4D). These results suggest that the PI3K- and the p38-dependent intracellular pathways are involved in the inhibition of QRFP expression. In additional experiments, HDACs appeared to be involved in the repressive activity of IFN- β since TSA pretreatment reverses its action ($P < 0.001$) (Fig. 4E). Neither cycloheximide, LY294002 or fludarabine reversed the downregulating effect of IFN- γ on QRFP expression (Fig. 4F). The MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase, MEK1, is an upstream activator of ERK1/2 MAPK (42) and its inhibition with PD98059 could reverse the downregulation of QRFP by IFN- γ ($P < 0.001$) (Fig. 4F). Additional support for a role of HDACs in the repression of QRFP expression was shown by the reversal of IFN- γ action by TSA in RAW macrophages ($P < 0.001$) (Fig. 4G).

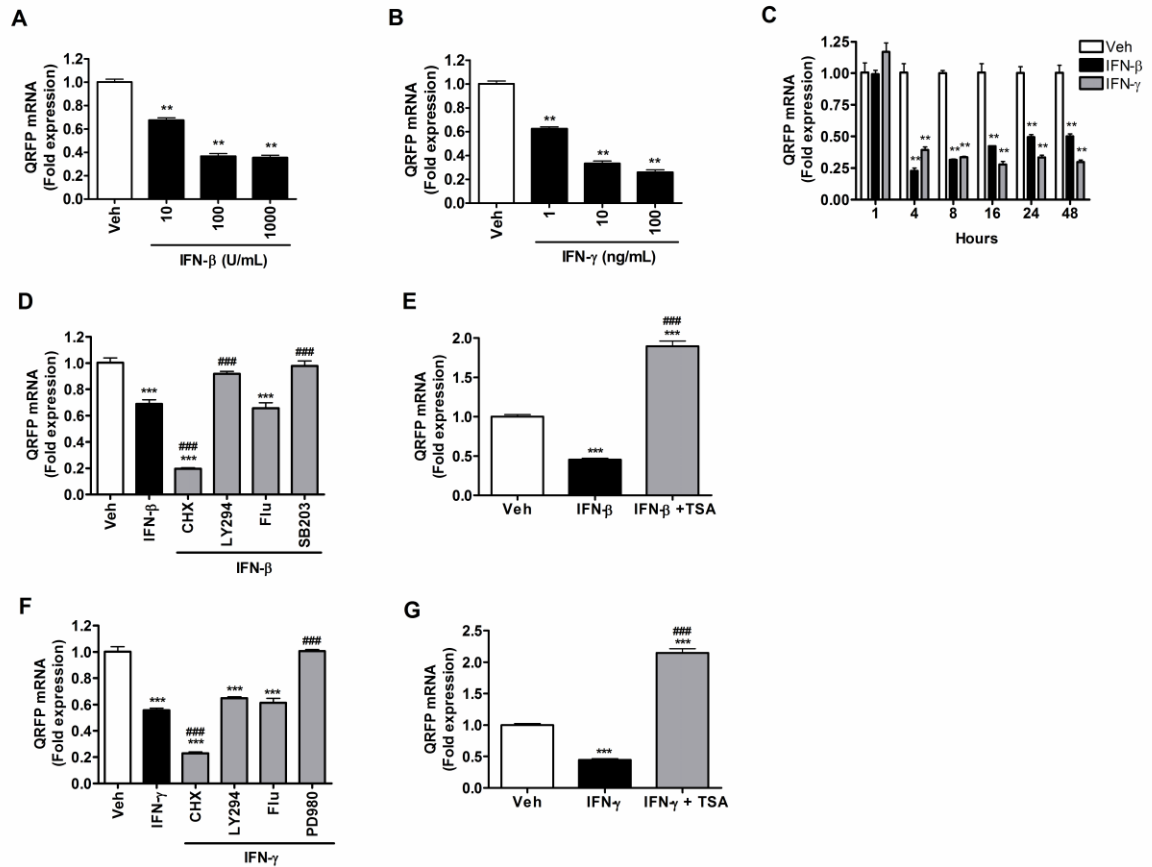


FIG. 4. IFNs downregulate QRFP expression in RAW macrophages. **A**, Dose-response of IFN- β on QRFP mRNA in RAW macrophages treated for 24 h. **B**, Dose-response of IFN- γ on QRFP mRNA in RAW cells treated for 24 h. **C**, Kinetics of QRFP mRNA in RAW macrophages during IFN- β (100 U/mL) or IFN- γ (10 ng/mL) treatment. Each time point is shown as fold change relative to its own vehicle. **D**, Signaling of IFN- β (100 U/mL) in RAW cells treated for 6 h. CHX (5 μ g/mL), LY294002 (*LY294*, 30 μ M) and SB203580 (*SB203*, 10 μ M) were incubated for 1 h and fludarabine (*Flu*) was incubated for 16 h before IFN- β . **E**, Effect of TSA on QRFP mRNA in RAW cells treated for 4 h with IFN- β (100 U/mL). TSA (500 nM) was incubated for 6 h before IFN- β . **F**, Signaling of IFN- γ (10 ng/mL) in RAW macrophages incubated for 6 h. CHX (5 μ g/mL), LY294002 (*LY294*, 30 μ M) and PD98059 (*PD980*, 10 μ M) were incubated for 1 h and fludarabine (*Flu*) was added 16 h before IFN- γ . **G**, Effect of TSA on QRFP mRNA in RAW cells treated 4 h with IFN- γ (10 ng/mL). TSA (500 nM) was added 6 h before IFN- γ . All data

were normalized to β -actin mRNA. **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ versus vehicle (*Veh*). ###, $P < 0.001$ versus IFNs alone ($n = 3$).

The potential paracrine role of IFNs on adipocytes has been investigated on 3T3-L1 adipocytes. A 24 h treatment with IFN- β , at 100 and 1000 U/mL, decreased QRFP expression by up to $49 \pm 5\%$ ($P < 0.01$) in 3T3-L1 adipocytes (Fig. 5A). In contrast, IFN- γ treatment, ranging from 1 to 100 ng/mL, for 6 (data not shown) or 24 h (Fig. 5B), did not change the expression of QRFP. The sustained effect of IFN- β on QRFP expression in 3T3-L1 adipocytes was observed from 4 ($P < 0.05$) to 48 h ($P < 0.01$) (Fig. 5C). The signaling events under this downregulation have been investigated. Whereas cycloheximide and fludarabine did not reverse the effect of IFN- β on QRFP expression, LY294002 and SB203580 were able to inhibit its repressive effect (Fig. 5D). These observations suggest that IFN- β -dependent signaling mechanisms involved in QRFP downregulation in RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes are similar and depends of PI3K and p38 pathways. In order to validate a paracrine role for IFN- β on 3T3-L1 adipocytes in ME, adipocytes have been stimulated with LPS-treated macrophage-conditioned medium. Media from RAW cells, treated with 1 ng/mL LPS for 5 h, were put on 3T3-L1 cells for 24 h. Media from vehicle-treated macrophages do not change QRFP expression compared to untreated medium (Fig. 5E). Media harvested from 3×10^6 cells treated with LPS downregulated QRFP in 3T3-L1 adipocytes ($P < 0.01$) while media harvested from 0.5×10^6 cells did not, suggesting a dose-dependent effect (Fig. 5E). Pretreatment of LPS-treated macrophage-conditioned media with 30 U/mL IFN- β neutralizing antibody did not change QRFP expression versus RAW medium. In contrast, pretreatment of media with 300 U/mL IFN- β neutralizing antibody reversed ($P < 0.05$) the effect of LPS-treated macrophage conditioned media, compared to the level of an equimolar concentration of rabbit IgG (Fig. 5F). Taken together, these results suggest that IFN- β produced from macrophages can downregulate QRFP expression in adipocytes.

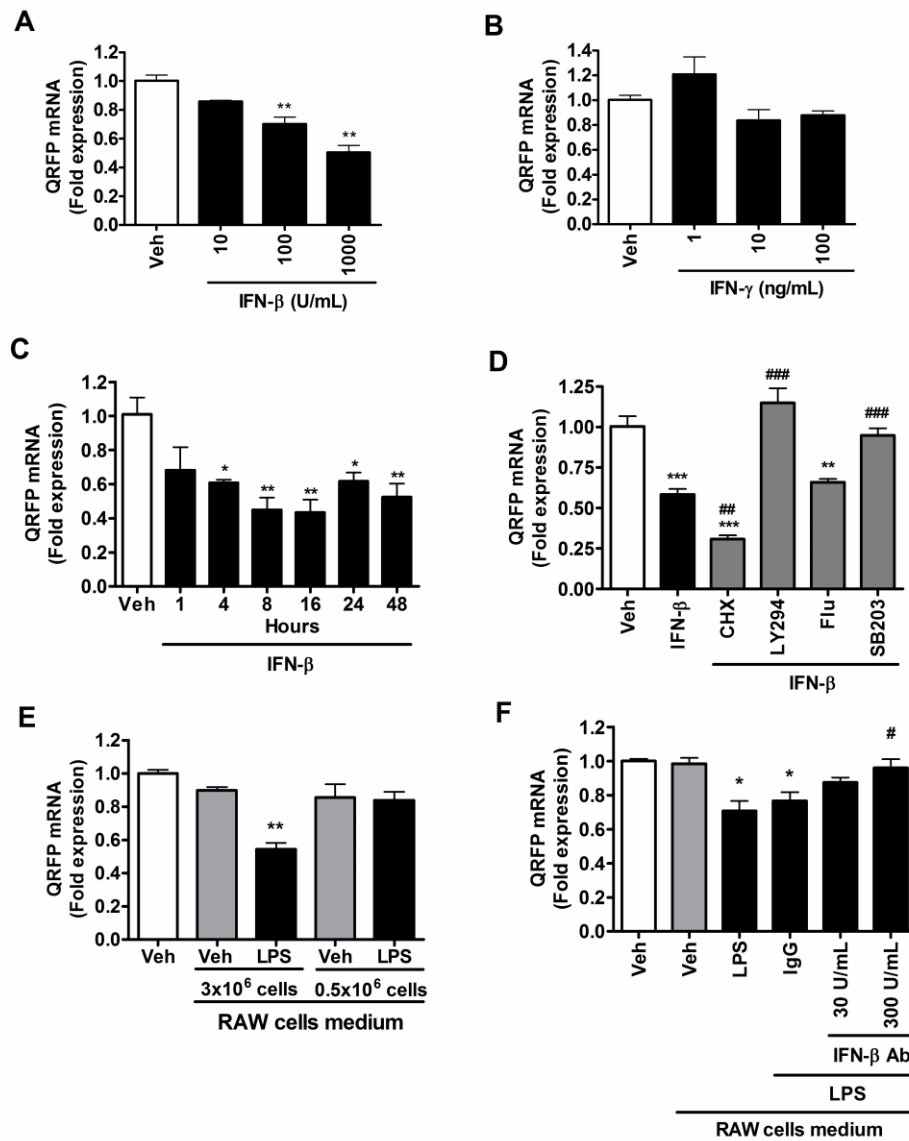


FIG. 5. IFN- β downregulates QRFP expression in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 cells were differentiated in adipocytes as described in *material and methods*. **A**, Dose-response of IFN- β on QRFP mRNA in 3T3-L1 adipocytes treated for 24 h. **B**, Dose-response of IFN- γ on QRFP mRNA in 3T3-L1 adipocytes treated for 24 h. **C**, Kinetics of QRFP mRNA in 3T3-L1 adipocytes during IFN- β (300 U/mL) treatment. **D**, Signaling of IFN- β (300 U/mL) in 3T3-L1 adipocytes incubated for 6 h. CHX (5 μ g/mL), LY294002 (*LY294*, 30 μ M) and SB203580 (*SB203*, 10 μ M) were added 1 h and fludarabine (*Flu*) 16 h before IFN- β . **E**, Effect of LPS-treated RAW conditioned media on 3T3-L1 adipocytes QRFP mRNA. RAW

(0.5×10^6 or 3×10^6 cells) were stimulated for 5 h with 1 ng/mL LPS or vehicle. The media were harvested, filtered and put on 3T3-L1 adipocytes for 24 h. Data are shown as fold change relative to untreated medium (complete DMEM) set to 1. **F**, Effect of IFN- β neutralizing antibody on LPS-treated RAW macrophages conditioned media on 3T3-L1 adipocytes QRFP mRNA. RAW (3×10^6 cells) were stimulated for 5 h with 1 ng/mL LPS or vehicle. The media were harvested, filtered and antibodies were added. 30 or 300 U/mL of IFN- β neutralizing antibody (*IFN- β Ab*) or 1.827 μ g/mL rabbit IgG (*IgG*) were used. Media were put on 3T3-L1 adipocytes for 24 h (n = 6 for this experience). Data are shown as fold change relative to untreated medium (complete DMEM) set to 1. All data were normalized to β -actin mRNA. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ versus vehicle (*Veh*). #, $P < 0.05$ versus *IgG*; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ versus *IFN- β* alone (n = 3).

In order to investigate the relevancy of IFNs on the secretion of QRFP peptide from macrophages, a mild overexpression of mouse QRFP mRNA has been induced by electroporation of these cells (RAW-mQRFP). QRFP mRNA was increased by $53 \pm 11\%$ ($P < 0.01$) in RAW-mQRFP (Fig. 6A). Following QRFP overexpression, QRFP peptide could be detected in the medium by RIA after 48 h. Treatments of RAW-mQRFP with 100 U/mL IFN- β or 10 ng/mL IFN- γ for 48 h inhibited QRFP secretion by $47 \pm 9\%$ ($P < 0.01$) and $40 \pm 3\%$ ($P < 0.05$), respectively (Fig. 6B). These results suggest that the actions of IFNs on QRFP mRNA in macrophages are paralleled by reduced QRFP secretion.

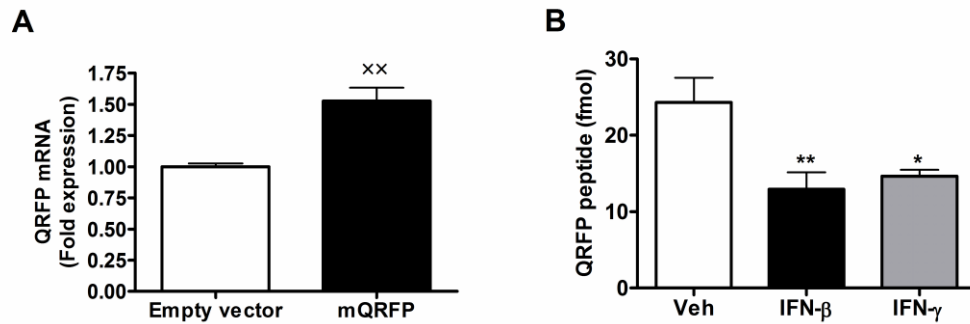


FIG. 6. IFNs inhibit QRFP secretion by RAW macrophages. **A**, Overexpression of QRFP mRNA in RAW cells. Cells were electroporated with 0.5 μ g of pCMV6-Kan/Neo-mQRFP or empty vector and selected with Geneticin for their stable expression. (n = 3) **B**, IFNs inhibit QRFP secretion by RAW-mQRFP cells. RAW-mQRFP (3×10^6 cells) were plated in 2 mL of medium. After adhesion, treatments were added for 48 h. Media was harvested and QRFP was assayed by RIA (n = 4). **, $P < 0.01$ versus empty vector; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus vehicle (*Veh*).

4. 3. 5. Discussion

In this study, we show that the adipogenic peptide QRFP is not only expressed by adipocytes but also expressed by macrophages (Fig. 1). Furthermore, as shown by RIA, macrophages can secrete QRFP in cell culture medium (Fig. 6). QRFP secreted from macrophages appears to have a paracrine function since macrophages do not express GPR103. Adipocytes, in contrast, express GPR103b (7). We found that QRFP expression in macrophages and adipocytes can be downregulated by cytokine levels as found in ME which accompanies a state of obesity. To our knowledge, this is the first report examining the molecular mechanisms involved in the regulation of peripheral QRFP expression.

Low doses of LPS exerted a transient decrease in QRFP mRNA in RAW macrophages by a direct effect as shown by protein synthesis inhibition with cycloheximide (Fig. 2). In contrast, palmitate and TNF- α , which are reported to be elevated in obesity, had

no effect on QRFP mRNA. QRFP mRNA is not stable and depletes rapidly after transcription blockade with ActD. ActD also showed that LPS-induced downregulation of QRFP works at the transcriptional level. The activation of TLR-4 by LPS is well known to induce the transcription of pro-inflammatory cytokines (26). In contrast to QRFP, cytokines like TNF- α and IFN- β have anti-adipogenic and pro-lipolytic activities on adipocytes (29-32). In that context, downregulation of QRFP by LPS is in agreement with the role of LPS in adipose tissue.

The knockdown of two key proteins involved in TLR-4 signaling, MyD88 and TRIF, allowed to elucidate the pathway responsible for QRFP downregulation by LPS in macrophages (Fig. 3). Macrophages that are deficient in TRIF expressed higher QRFP levels and were less sensitive to the effects of LPS. Deficiency in MyD88 did not modulate QRFP expression. Stimulations with TNF- α or treatment with the IKK-2 inhibitor SC-514 in the presence of LPS support that activation of NF- κ B is not sufficient for the repression of QRFP gene. In contrast, increased IFN- β expression, known to be mediated by TRIF-dependent IRFs activation, seems to be linked with QRFP downregulation as shown by IKKiIV blockade or TRIF knockdown. The latter is in agreement with a role for IRFs in adipogenesis, as demonstrated by Eguchi et al. (43;44). TSA pretreatment supports a role for HDACs in the repression of the QRFP gene by LPS, a mechanism that has been shown for other genes such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) downregulated by LPS-induced HDACs in macrophages (40;41).

IFN- β is induced in macrophages by LPS concentrations that are within the concentration range found in ME. Th1 cells, known for their secretion of IFN- γ and their role in inflamed adipose tissue, infiltrate obese visceral fat depots in mice (45). Both IFN- β and IFN- γ , as cytokines found in obese adipose tissue, were tested for their potential regulatory effect on QRFP mRNA levels in both macrophages and adipocytes. Both IFNs elicited a sustained downregulation of QRFP in macrophages (Fig. 4) but only IFN- β showed an effect on adipocytes (Fig. 5). Type I interferons, like IFN- β , are known to activate the IFN- α/β receptor (IFNAR) formed by the IFNAR1 and IFNAR2 subunits

(46;47). This receptor activates the Janus kinase (JAK)/STAT pathway leading to the activation of the STAT-1/STAT-2/IRF9 transcription factor complex (46;47). Alternatively, IFNAR is also known to activate the PI3K pathway (48;49) and p38 pathways (50) in mediating the biological effects of type I IFNs. Our results show that IFN- β has a direct effect on macrophages and adipocytes since CHX did not change cell response. In both cell types, the action of IFN- β on QRFP mRNA downregulation could be reversed by inhibitors of PI3K or p38 MAPK. IFN- γ , a type II interferon, activates the IFN- γ receptor (IFNGR) formed by the IFNGR1 and IFNGR2 subunits (46;51). This receptor is known to activate the JAK-STAT-1 pathway but also the PI3K and ERK1/2 pathways (50;52). Our results show that IFN- γ directly decreases QRFP mRNA in macrophages by a ERK1/2-dependent pathway. As for LPS stimulation, the repressive activity of IFNs on QRFP expression was dependent of HDACs activity, as shown by TSA-dependent HDACs inhibition.

Low doses of LPS, as used in the present study, induced IFN- β expression in macrophages. We also showed that IFN- β downregulated QRFP mRNA in RAW macrophages and adipocytes. The paracrine effect of LPS-induced IFN- β from macrophages to adipocytes stimulation has been confirmed by medium transfer experiments (Fig. 5). Indeed, after neutralization of IFN- β , the medium could not modulate QRFP expression.

IFNs have a sustained downregulating effect on QRFP mRNA in macrophages. The relevance of reduced QRFP gene expression on protein levels was confirmed by RIA dosage of QRFP in the medium of RAW cells mildly overexpressing QRFP (Fig. 6). The 1.5-fold induction of QRFP mRNA in RAW cells resulted in QRFP expression still under what is found in mouse isolated peritoneal macrophages. Using RAW-mQRFP cells, we showed that IFN- β and IFN- γ inhibited QRFP secretion to a similar magnitude than the reduction of mRNA levels. The model of autocrine/paracrine actions of LPS-induced IFNs is summarized in Fig. 7. In macrophages, LPS activates TLR-4 and its TRIF-dependent pathway leading to the activation of IRF-3 and the production of IFN- β . The activation of this pathway downregulates QRFP mRNA. Autocrine stimulation of macrophages by IFN-

β or stimulation by Th1 cytokine IFN- γ downregulate QRFP protein and mRNA. IFN- β secreted from macrophages also downregulate QRFP mRNA in adipocytes.

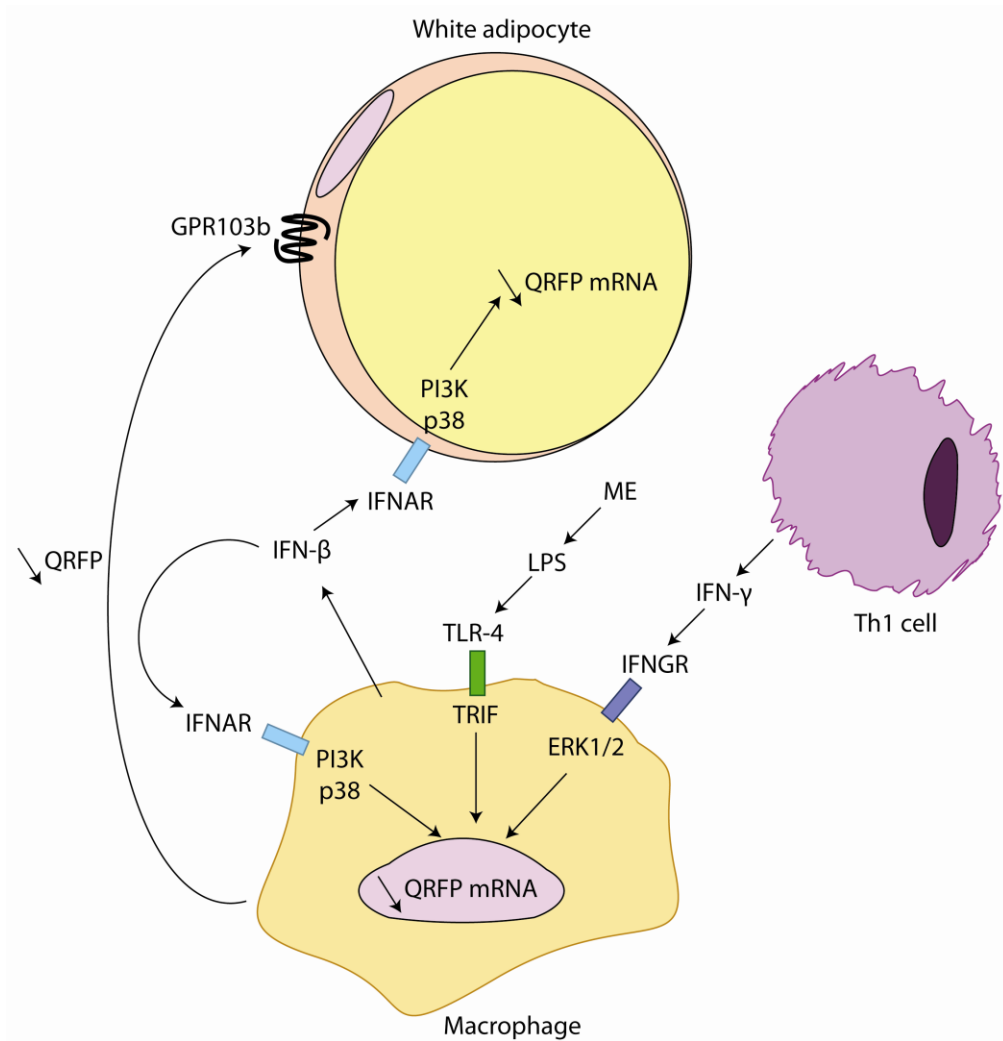


FIG. 7. Autocrine/paracrine role of IFNs on QRFP expression in a state of obesity. In ME, LPS activates TLR-4 and its TRIF-dependent pathway leading to the production of IFN- β by macrophages. The activation of this pathway downregulates QRFP mRNA. Autocrine stimulation of macrophages by IFN- β by PI3K- and p38-dependent pathways downregulates QRFP protein and mRNA. Stimulation of macrophages by Th1 cytokine IFN- γ downregulates QRFP protein and mRNA by an ERK1/2-dependent pathway. In adipocytes, LPS-induced IFN- β secreted from macrophages also downregulates QRFP mRNA in a PI3K- and p38-dependent manner.

Very little is known about the QRFP gene promoter and the transcription factors regulating its expression. Previous studies showed that nutritional status and obesity seems to regulate QRFP expression in hypothalamus (5;6;18). DIO was also showed to be a factor influencing QRFP expression in adipose tissue (7). The present work explored the pro-inflammatory stimuli susceptible to be met in a state of obesity in the periphery. As recently uncovered, immune cells infiltration and interaction with adipocytes in adipose tissue give rise to a secretome controlling adipose tissue inflammation and type 2 diabetes (53). The nature of secreted factors in adipose tissue, whether pro-inflammatory and anti-adipogenic or anti-inflammatory and pro-adipogenic, will control the inflammation state. In the same way, the adipogenic QRFP is thought to work in an autocrine/paracrine manner in adipose tissue. We showed that its expression is regulated by IFNs levels found in ME conditions, which may contribute to switching the tissue from a pro-adipogenic to a pro-inflammatory state. However, QRFP expression was not changed by other common pro-inflammatory adipose tissue adipokines like TNF- α or by FFA. Hence, our results suggest that QRFP may be considered as a biomarker for ME in adipose tissue.

4. 3. 6. Acknowledgments and footnotes

The authors would like to thank Petra Pohankova for her skillful technical assistance and Geneviève Boucher for bioinformatic assistance.

This work was supported by an educational grant from Aeterna-Zentaris Inc. C. J. is a recipient of a scholarship from the Rx&D Foundation and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). M. J. S. is a scholar from the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).

Disclosure Summary: H.O. received grant support from Aeterna-Zentaris inc. C.J., R.G., M.J.S. and S.M. have nothing to declare.

Short title: QRFP is downregulated by metabolic endotoxemia

Address all correspondence and requests for reprints to: Huy Ong, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Key words: QRFP, macrophages, adipocytes, metabolic endotoxemia, interferons

4. 3. 7. References

1. **Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Rego JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H** 2003 Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15247-15252
2. **Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M** 2003 A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 278:46387-46395
3. **Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Laverty M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F, Jr., Zhang FL** 2003 Identification and characterization of a novel RFamide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 278:27652-27657

4. **Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H** 2006 RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* 147:2916-2922
5. **Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasaki YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J** 2006 A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7438-7443
6. **Primeaux SD, Blackmon C, Barnes MJ, Braymer HD, Bray GA** 2008 Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides* 29:1994-2000
7. **Mulumba M, Jossart C, Granata R, Gallo D, Escher E, Ghigo E, Servant MJ, Marleau S, Ong H** 2010 GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol Endocrinol* 24:1615-1625
8. **Fang Q, Liu Q, Li N, Jiang TN, Li YL, Yan X, Wang R** 2009 Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *Eur J Pharmacol* 621:61-66
9. **Baribault H, Danao J, Gupte J, Yang L, Sun B, Richards W, Tian H** 2006 The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol Cell Biol* 26:709-717
10. **Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Vigo E, Tovar S, Chartrel N, Le MO, Leprince J, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Vaudry H, Tena-Sempere M** 2006 Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol* 573:237-249

11. **Patel SR, Murphy KG, Thompson EL, Patterson M, Curtis AE, Ghatei MA, Bloom SR** 2008 Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 149:4747-4754
12. **Egido EM, Hernandez R, Leprince J, Chartrel N, Vaudry H, Marco J, Silvestre RA** 2007 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides* 28:725-730
13. **Yamamoto T, Wada T, Miyazaki R** 2008 Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* 157:214-222
14. **Yamamoto T, Miyazaki R, Yamada T** 2009 Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides* 30:1683-1688
15. **Yamamoto T, Miyazaki R, Yamada T, Shinozaki T** 2011 Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides* 32:1262-1269
16. **Chartrel N, Alonzeau J, Alexandre D, Jeandel L, Alvear-Perez R, Leprince J, Boutin J, Vaudry H, Anouar Y, Llorens-Cortes C** 2011 The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 32:387-397
17. **Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S** 2006 Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27:1073-1086
18. **Beck B, Richey S** 2009 Suppression of QRFP 43 in the hypothalamic ventromedial nucleus of Long-Evans rats fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 383:78-82

19. **Zhang Q, Qiu P, Arreaza MG, Simon JS, Golovko A, Lavery M, Vassileva G, Gustafson EL, Rojas-Triana A, Bober LA, Hedrick JA, Monsma FJ, Jr., Greene JR, Bayne ML, Murgolo NJ** 2007 P518/Qrpf sequence polymorphisms in SAMP6 osteopenic mouse. *Genomics* 90:629-635
20. **Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R** 2008 Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57:1470-1481
21. **Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R** 2007 Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772
22. **Schaffler A, Scholmerich J** 2010 Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol* 31:228-235
23. **Kawai T, Akira S** 2006 TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825
24. **Kawai T, Akira S** 2010 The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384
25. **Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH** 2010 Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol* 21:172-177
26. **Takeda K, Akira S** 2004 TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16:3-9
27. **Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM** 2009 Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921-929

28. **Moss RB, Moll T, El-Kalay M, Kohne C, Soo HW, Encinas J, Carlo DJ** 2004 Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther* 4:1887-1896
29. **McGillicuddy FC, Chiquoine EH, Hinkle CC, Kim RJ, Shah R, Roche HM, Smyth EM, Reilly MP** 2009 Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J Biol Chem* 284:31936-31944
30. **Feingold KR, Doerrler W, Dinarello CA, Fiers W, Grunfeld C** 1992 Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology* 130:10-16
31. **Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA, Grunfeld C** 1986 Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8313-8317
32. **Taylor JL, Samuel CE, Grossberg SE** 1988 Antiviral and antidifferentiative activities of interferon beta and gamma in relation to their induction of double-stranded RNA-dependent protein kinase activity in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 263:1336-1341
33. **Zu L, He J, Jiang H, Xu C, Pu S, Xu G** 2009 Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 284:5915-5926
34. **Franchini M, Monnais E, Seboek D, Radimerski T, Zini E, Kaufmann K, Lutz T, Reusch C, Ackermann M, Muller B, Linscheid P** 2010 Insulin resistance and increased lipolysis in bone marrow derived adipocytes stimulated with agonists of Toll-like receptors. *Horm Metab Res* 42:703-709

35. **Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS** 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025
36. **Bruzzo F, Lectez B, Tollemier H, Leprince J, Dujardin C, Rachidi W, Chatenet D, Baroncini M, Beauvillain JC, Vallarino M, Vaudry H, Chartrel N** 2006 Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *J Neurochem* 99:616-627
37. **Labrecque J, McNicoll N, Marquis M, De Lean A** 1999 A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem* 274:9752-9759
38. **Suganami T, Ogawa Y** 2010 Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 88:33-39
39. **Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E** 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:355-365
40. **Aung HT, Schroder K, Himes SR, Brion K, van ZW, Trieu A, Suzuki H, Hayashizaki Y, Hume DA, Sweet MJ, Ravasi T** 2006 LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB J* 20:1315-1327
41. **Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, Schroder K, Matthias G, Cao C, Lovelace E, Reid RC, Le GT, Hume DA, Irvine KM, Matthias P, Fairlie DP, Sweet MJ** 2010 Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol* 87:1103-1114
42. **Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA** 2003 Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17:1263-1293

43. **Eguchi J, Yan QW, Schones DE, Kamal M, Hsu CH, Zhang MQ, Crawford GE, Rosen ED** 2008 Interferon regulatory factors are transcriptional regulators of adipogenesis. *Cell Metab* 7:86-94
44. **Eguchi J, Wang X, Yu S, Kershaw EE, Chiu PC, Dushay J, Estall JL, Klein U, Maratos-Flier E, Rosen ED** 2011 Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab* 13:249-259
45. **Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, Libby P** 2008 Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res* 103:467-476
46. **Platanias LC** 2005 Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375-386
47. **Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH** 2005 Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307-336
48. **Joshi S, Kaur S, Kroczyńska B, Platanias LC** 2010 Mechanisms of mRNA translation of interferon stimulated genes. *Cytokine* 52:123-127
49. **Kaur S, Uddin S, Platanias LC** 2005 The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J Interferon Cytokine Res* 25:780-787
50. **Katsoulidis E, Li Y, Mears H, Platanias LC** 2005 The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J Interferon Cytokine Res* 25:749-756
51. **Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD** 1998 How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264
52. **Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ** 2008 IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev* 19:383-394

53. **Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM** 2011 Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 70:408-417

Chapitre III : Discussion

1. Discussion du premier article

Dans cette étude, le GPR103b et le QRFP ont été identifiés comme des régulateurs de l'adipogenèse *in vitro*. Nous avons démontré l'expression du GPR103b et du QRFP de même que l'absence du GPR103a dans les adipocytes 3T3-L1. L'absence du GPR103a dans les adipocytes murins n'est pas surprenante dans la mesure où les souris déficientes en GPR103a ne montrent pas de phénotype particulier au niveau du métabolisme (Baribault *et al.*, 2006). Nous avons aussi montré l'induction de l'ARNm du GPR103b et du QRFP au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes matures. Cette induction laissait supposer un rôle potentiel dans l'adipogenèse ou dans le métabolisme des adipocytes matures.

Les modèles d'adipocytes utilisés dans notre étude sont des modèles *in vitro*, dans le cas des adipocytes 3T3-L1, et *ex vivo*, dans le cas des adipocytes omentaux humains. Les adipocytes 3T3-L1 représentent le modèle d'adipocytes *in vitro* le plus utilisé et le plus caractérisé (Ntambi & Young-Cheul, 2000). Les adipocytes omentaux humains isolés, quant à eux, ont comme avantage d'être un modèle d'adipocytes plus près de la réalité humaine. Les deux modèles ont montré un effet anti-lipolytique lors d'un traitement aigu avec les QRFPs en présence d'un stimulus lipolytique. Nous n'avons toutefois pas de résultats pour appuyer un effet aigu sur la lipolyse *in vivo*. Il a toutefois été montré qu'un traitement par voie ICV chronique avec le QRFP-43 augmente la concentration des AGLs circulants chez les souris soumises à une diète modérément enrichie en gras, et ceci de façon indépendante de l'augmentation de la consommation de nourriture (Moriya *et al.*, 2006). Ceci suggère un effet pro-lipolytique central *in vivo* pour le QRFP-43, mais on ignore quel effet le QRFP pourrait avoir directement sur le tissu adipeux.

Les QRFPs -26 et -43 ont montré un effet adipogène sur les cellules 3T3-L1 dont la différenciation a été préalablement déclenchée avec le cocktail adipogène. L'augmentation

de l'accumulation des TGs dans les adipocytes a été accompagnée d'une augmentation de l'activité de la LPL ainsi que d'une augmentation du captage des AGLCs. Cette augmentation du captage des AGLCs par les QRFPs n'a plus été observée suite au *knockdown* (KD) du GPR103b. Un traitement avec le QRFP sur des préadipocytes 3T3-L1, dont la différenciation n'a pas été préalablement induite, n'a pas montré d'effet sur la différenciation. Ceci suggère que le QRFP seul ne peut induire tous les facteurs de transcription nécessaires à la différenciation terminale, mais qu'il peut accélérer l'adipogenèse des 3T3-L1. Un traitement avec les QRFPs sur des adipocytes matures a aussi pu augmenter l'expression des gènes comme PPAR- γ , C/EBP- α , LPL, CD36, FATP1 et ACSL1 qui sont tous impliqués, à différents niveaux, dans l'adipogenèse. Le KD du GPR103b a aussi pu bloquer cet effet sur l'expression des gènes. Le traitement des adipocytes 3T3-L1 matures avec les QRFPs a révélé un effet inhibiteur dose-dépendant sur la lipolyse induite par l'isoprotérénol, un agoniste β -adrénergique. Cet effet est aussi dépendant de l'expression du GPR103b. L'activité anti-lipolytique du QRFP a aussi pu être observée sur les adipocytes humains isolés du tissu adipeux omental lorsque ceux-ci ont été stimulés avec l'isoprotérénol. Dans les adipocytes 3T3-L1 comme dans les adipocytes omentaux humains, le QRFP ne démontre pas d'effet sur la lipolyse basale.

L'implication d'un autre récepteur, le NPFF-R2, médiant certains effets du QRFP-26 a été rapportée (Bruzzone *et al.*, 2007; Gouarderes *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que le NPFF-R2, de même que le NPFF-R1, sont exprimés dans le tissu adipeux humain (Elshourbagy *et al.*, 2000) et dans les adipocytes 3T3-L1 (Lefrere *et al.*, 2002). Notre étude a tenu compte de la possibilité que le NPFF-R2 soit impliqué dans l'action adipogène du QRFP-26. Nous avons donc ciblé spécifiquement l'expression du GPR103b par KD afin de démontrer que le GPR103b semblait être nécessaire pour les réponses cellulaires du QRFP dans les adipocytes. Des effets du NPFF et du NPAF, deux agonistes du NPFF-R1 et -R2, sur les adipocytes 3T3-L1 ont été rapportés (Lefrere *et al.*, 2002). Il a été montré que le NPAF, un agoniste des NPFF-R1 et -R2, augmente l'expression des récepteurs β -adrénergiques dans les adipocytes 3T3-L1. En conséquence, le NPAF augmente aussi la production intracellulaire d'AMPc (Lefrere *et al.*, 2002). Cette réponse

cellulaire est fortement susceptible d'activer l'activité lipolytique des adipocytes 3T3-L1. Sur les cellules 3T3-F442A et les préadipocytes humains, il a été montré que le NPF et le NPAF, tout comme le RFRP-1 qui ne lie que le NPF-R1 avec haute affinité (Liu *et al.*, 2001), inhibent la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Herrera-Herrera & Salazar-Olivo, 2008). Cet effet anti-adipogène serait causé par l'expression maintenue du facteur de transcription *inhibitor of differentiation 3* (Id3). Au contraire, une autre étude rapporte que l'activation du NPF-R2 chez l'humain inhibe la lipolyse *in vitro* et *in vivo* (Dahlman *et al.*, 2007). Chez l'humain, un polymorphisme dans la séquence du NPF-R2 serait associé à une protection contre l'obésité et à une lipolyse élevée (Dahlman *et al.*, 2007). Au niveau central, l'activation du NPF-R1 par le RFRP-1 résulterait en une diminution de la consommation de nourriture chez le rat (Kovacs *et al.*, 2012).

Les modèles de souris déficientes, sans être des modèles parfaits, sont de bons outils pour établir le rôle physiologique d'une protéine. Les souris déficientes pour le GPR103a n'ont pas montré d'effet métabolique après la délétion de ce récepteur (Baribault *et al.*, 2006). Ceci suggère que le GPR103a n'est pas impliqué dans les actions orexigènes et adipogènes du QRFP. On ne peut toutefois pas exclure de possibles mécanismes de compensation, médiés par le GPR103b ou d'autres signaux orexigènes ou adipogènes, qui pourraient masquer le rôle du GPR103a. Ces phénomènes de compensation ont été évoqués pour expliquer l'absence de phénotype métabolique chez les souris déficientes pour certains facteurs hypothalamiques orexigènes, comme le NPY ou le AGRP (Erickson *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 2002). L'étude d'une éventuelle souris déficiente en GPR103b pourrait toutefois nous en apprendre davantage sur le rôle physiologique spécifique au GPR103b.

Comme notre étude n'a pas abordé les voies de signalisation activées par le QRFP dans les adipocytes, elles demeurent peu connues. Nous savons toutefois que le QRFP peut activer des voies de signalisation différentes selon les types cellulaires. Dans les cellules hypophysaires de rat le QRFP active la production d'AMPc (Chartrel *et al.*, 2003). Au contraire, un traitement avec la toxine pertussique bloque l'action inhibitrice du QRFP sur la sécrétion d'insuline par le pancréas de rat (Egido *et al.*, 2007). Ceci suggère une action dépendante de l'activation de la protéine G α i qui inhibe l'activité de l'adenylyl cyclase.

Dans les cellules HEK293 ou les cellules de *chinese hamster ovary* (CHO), le QRFP active la mobilisation de calcium par la protéine Gαq (Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003), un effet insensible au traitement avec la toxine pertussique (Jiang *et al.*, 2003). Les comparaisons entre le GPR103a et le GPR103b n'ont pas montré de réponses significativement différentes dans la mobilisation de calcium des HEK293 (Takayasu *et al.*, 2006) ou dans la production d'inositol trisphosphate des cellules COS-7 (Kampe *et al.*, 2006).

Il existe différents modèles d'obésité chez les rongeurs. Les plus utilisés sont des modèles génétiquement obèses, comme les souris *ob/ob*, les souris *db/db*, les rats *fa/fa*, et l'obésité induite par la diète. Les souris *db/db* et les rats *fa/fa* sont déficients pour le LepR, alors que les souris *ob/ob* sont déficientes pour la leptine. Nous avons choisi d'utiliser le modèle d'obésité induite par la diète pour notre étude. Ce modèle est celui qui représente le mieux le type d'obésité le plus prévalent chez l'humain (Tschop & Heiman, 2001), comparativement aux autres modèles qui démontrent une obésité génétique. Pour induire l'obésité, nos souris ont été nourries à long terme avec une diète riche en gras. Sur le total de l'apport calorique, cette diète est composée à 60% de gras, 20% de glucides et 20% de protéines. En comparaison, une diète normale est composée de 10% de gras, 70% de glucides et 20% de protéines. La diète à 60% de gras est la plus couramment utilisée pour les modèles de souris obèses par la diète. Chez l'humain, il a été montré dans les études épidémiologiques qu'il existe une corrélation positive entre la proportion de lipides dans la diète et l'obésité ou le gain de poids. Cette corrélation est aussi vraie chez les rongeurs (Hariri & Thibault, 2010). C'est la raison pour laquelle les animaux sont rendus obèses 18 semaines après le début de la diète riche en gras.

L'expression du GPR103b et du QRFP a été confirmée dans les différents tissus adipeux épидидymal, perirénal et inguinal de souris. Une obésité induite par une diète riche en gras diminue l'expression du QRFP dans les tissus adipeux de souris. Au contraire, l'expression du GPR103b est augmentée chez ces souris obèses, mais seulement au niveau du tissu adipeux épидидymal. La modulation de l'expression du GPR103b et de son ligand dans le tissu adipeux obèse peut supposer une implication pour ces molécules dans l'obésité

et ses effets pathophysiologiques. D'ailleurs, la modulation spécifique de l'expression du récepteur dans le tissu adipeux épидидymal, un tissu intra-abdominal, plutôt que inguinal, un tissu sous-cutané, appuie cette supposition. De plus, l'expression du hGPR103 dans les adipocytes isolés du tissu adipeux omental, un tissu viscéral, a été validée chez l'humain.

Comme l'expression du QRFP diminue dans les tissus adipeux des souris obèses, nous avons tenté de voir si un stimulus inflammatoire régule le QRFP à la baisse. Nous avons testé l'effet du TNF- α sur les adipocytes 3T3-L1 pendant 48 heures pour percevoir une diminution significative de l'ARNm du prepro-QRFP dans ces conditions.

Le rôle physiologique des QRFPs s'apparente à celui de la ghréline et du NPY. Ces peptides sont exprimés dans l'hypothalamus et médient un effet orexigène central (Arora & Anubhuti, 2006). Ils sont exprimés en périphérie (Kojima *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008) et semblent avoir un effet direct sur l'adipogenèse (Kuo *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2004). De plus, la ghréline et le NPY ont une activité anti-lipolytique (Choi *et al.*, 2003; Valet *et al.*, 1990). Par leurs actions centrales et périphériques, le QRFP, la ghréline et le NPY agissent pour emmagasiner l'énergie en augmentant son absorption et son stockage dans les adipocytes. Ces peptides semblent donc jouer un rôle anabolique qui favorise le développement de l'obésité. La leptine joue un rôle complètement à l'inverse. Elle diminue la consommation de nourriture et favorise les processus cataboliques dans plusieurs tissus. Étant donné leurs rôles antagonistes sur le métabolisme et leur régulation inverse dans les cas d'obésité, on pourrait émettre l'hypothèse que le QRFP aurait un effet inhibiteur sur l'expression de la leptine et vice-versa. Toutefois, nos résultats (observations non publiées) n'ont pas montré d'effet modulateur entre ces deux peptides dans les adipocytes 3T3-L1.

2. Discussion du deuxième article

Dans notre étude, nous avons rapporté l'expression du QRFP dans les macrophages péritonéaux de souris ainsi que dans les lignées cellulaires de macrophages RAW 264.7

(RAW) et J774A.1 (J774). Nous avons aussi montré l'absence d'expression de l'un ou l'autre des récepteurs GPR103 dans ces macrophages. Étant donné l'expression du GRP103b dans les adipocytes (Mulumba *et al.*, 2010), un rôle paracrine pour le QRFP provenant des macrophages pourrait être envisagé. La sécrétion du QRFP par les macrophages a d'ailleurs été démontrée par nos résultats.

Nous avons démontré dans notre précédente étude que l'expression du QRFP dans le tissu adipeux et les adipocytes de souris obèses est diminuée comparativement aux souris normales. Nous avons utilisé des stimuli susceptibles d'être présents dans le tissu adipeux obèse pour en connaître davantage sur les mécanismes de régulation du QRFP. Beaucoup de molécules ont été testées dans notre laboratoire, mais bien peu ont pu avoir un effet sur l'expression du QRFP dans les macrophages ou les adipocytes. Cependant, nous avons découvert que de faibles doses de LPS, comme celles présentes dans l'EM, diminuent l'expression du QRFP dans les macrophages RAW de façon directe, mais transitoire. Par l'inhibition de la transcription avec l'actinomycine D (ActD), nous avons pu mettre en évidence le court temps de vie de l'ARNm du QRFP. L'ActD nous a aussi permis de démontrer que le LPS agirait au niveau de la transcription du QRFP et non par des mécanismes post-transcriptionnels de déstabilisation de l'ARNm. Par contre, dans les adipocytes 3T3-L1, le LPS n'a d'effet sur l'expression du QRFP. Comme le TLR-4 est exprimé dans les adipocytes 3T3-L1 (Schaffler *et al.*, 2007), ceci suggère que l'activation seule de ce récepteur n'est pas suffisante pour moduler l'expression du QRFP.

Par ailleurs, le TNF- α ou des acides gras saturés comme le palmitate et le stéarate n'ont pas eu d'effet sur l'expression du QRFP dans les macrophages et dans les adipocytes. Ceci renforce l'idée que l'activation du TLR-4 n'est pas suffisante pour réguler l'expression du QRFP. Ceci suggère aussi qu'un stimulus inflammatoire, que l'on pourrait décrire par l'activation de NF- κ B et AP-1, ne suffit pas pour diminuer l'expression du QRFP. Les présents résultats avec le TNF- α ne sont pas en accord avec ce que nous avons démontré dans l'étude précédente. Ceci peut être expliqué par les temps de stimulation qui diffèrent. Le fait que le TNF- α n'ait pu montrer d'effet après 24 heures semble suggérer qu'il n'est pas un régulateur direct de l'expression du QRFP.

Le LPS active deux principales voies de signalisation dans les macrophages. C'est pourquoi les deux protéines adaptatrices MyD88 et TRIF ont été ciblées par KD dans le but d'inhiber leurs voies de signalisation respectives. Après avoir confirmé l'efficacité du KD de l'ARNm de ces molécules, nous avons pu démontrer que l'inhibition de la voie de TRIF augmente l'expression basale du QRFP en plus de bloquer partiellement l'effet du LPS sur l'ARNm du QRFP. L'inhibition de la voie de MyD88 n'a pas eu d'effet sur l'expression du QRFP. L'utilisation d'inhibiteurs de IKK-2 a permis de montrer que l'effet du LPS peut être renversé seulement si cet inhibiteur a un effet sur l'induction de l'IFN- β . Ceci suppose que l'activation de IRF-3 par la voie de TRIF est nécessaire au LPS pour médier ses effets. Il semble aussi que l'inhibition partielle de l'activation de NF- κ B n'a pas de conséquence sur la capacité du LPS à médier son effet. D'autre part, ces résultats suggèrent une explication pour l'absence de réponse au LPS dans les adipocytes 3T3-L1. Puisqu'il a été démontré que le LPS n'activait pas la phosphorylation de IRF-3 dans les adipocytes 3T3-L1 (Kopp *et al.*, 2010), le LPS serait incapable de médier un effet sur l'expression de QRFP dans ces cellules.

Nos résultats sont en accord avec une étude démontrant le rôle des IRFs dans la régulation de l'adipogenèse (Eguchi *et al.*, 2008). Le IRF-3 et le IRF-4 y ont été décrits comme des inhibiteurs de l'adipogenèse (Eguchi *et al.*, 2008). De plus, l'induction d'IRF-4 amènerait l'expression de gènes lipolytiques ce qui augmenterait la lipolyse (Eguchi *et al.*, 2011). Comme le QRFP a un effet adipogène et anti-lipolytique, il est logique de voir l'activation de la voie des IRFs réprimer l'expression du QRFP.

Le LPS, utilisé à une concentration retrouvée dans l'EM, induit l'expression de l'IFN- β dans les macrophages RAW. Il a aussi été montré que les lymphocytes Th1, des cellules qui sécrètent l'IFN- γ (Moss *et al.*, 2004), infiltrèrent le tissu adipeux lors de l'obésité (Winer *et al.*, 2009). Les lymphocytes T n'expriment pas le TLR-4 (Beutler, 2002), cependant le LPS peut indirectement augmenter la sécrétion d'IFN- γ par ces cellules par l'entremise de l'IL-12, de l'IL-18 et du TNF- α produit par les macrophages (Doherty *et al.*, 1992; Langhans, 2007). Dans ce contexte, nous avons donc décrit les effets potentiels des IFNs sur l'ARNm du QRFP dans les macrophages RAW et les adipocytes 3T3-L1. L'IFN-

β et l'IFN- γ régulent à la baisse et de façon soutenue l'expression du QRFP dans les macrophages RAW. Dans les adipocytes 3T3-L1, seul l'IFN- β s'est avéré capable de diminuer l'expression du QRFP. Nous avons montré que ces effets sont directs puisque qu'un inhibiteur de la synthèse protéique n'a pas d'effet sur la réponse aux IFNs.

Afin de valider l'effet paracrine de l'IFN- β provenant des macrophages sur les adipocytes, nous avons utilisé la méthode de transfert de milieu. Le milieu des macrophages RAW stimulés avec une concentration de LPS comparable à celle retrouvée dans la circulation des souris obèses a été mis en contact avec les adipocytes 3T3-L1. Ce milieu a induit une baisse de l'ARNm du QRFP. De plus, l'addition d'un anticorps neutralisant l'IFN- β dans ce milieu a pu renverser cet effet. Ces résultats tendent à confirmer que l'IFN- β sécrété par les macrophages en réponse au LPS peut diminuer l'expression du QRFP dans les adipocytes.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de signalisation responsables de la diminution de l'expression du QRFP par les IFNs. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques pour STAT-1, PI3K, MEK1 et p38 a permis d'identifier les voies nécessaires à la modulation du QRFP. L'action de l'IFN- β dans les macrophages RAW et dans les adipocytes 3T3-L1 a pu être bloquée par les inhibiteurs de PI3K et p38, suggérant un rôle pour ces voies dans la régulation du QRFP. D'autre part, l'action de l'IFN- γ dans les macrophages RAW a pu être bloquée par l'inhibiteur de MEK1, suggérant un rôle pour ERK1/2 dans l'expression du QRFP.

Comme les IFNs médient un effet soutenu sur l'ARNm du QRFP dans les macrophages, nous avons voulu confirmer leurs effets au niveau de la sécrétion du peptide. Un modèle de macrophages RAW surexprimant modérément l'ARNm du QRFP a été utilisé. En comparaison avec la quantité d'ARNm de QRFP détectée dans les macrophages péritonéaux de souris, notre modèle de macrophages RAW transfectés exprime toujours moins de QRFP que ces cellules. Cette légère augmentation permet une meilleure détection par radioimmunoessai du QRFP sécrété dans le milieu de culture. Nous avons donc pu

démontrer que l'IFN- β et l'IFN- γ diminuent la sécrétion du QRFP par les macrophages dans une proportion similaire à la diminution observée sur l'ARNm.

Nos résultats sur la répression du QRFP par le LPS et les IFNs sont en accord avec les effets de ces molécules qui ont été rapportés sur les adipocytes. Il a été montré que le LPS est un inducteur de la lipolyse (Zu *et al.*, 2009). Il est aussi un répresseur de PPAR- γ et un inhibiteur de l'adipogenèse (Poulain-Godefroy & Froguel, 2007). Dans le même sens, les IFNs inhibent l'adipogenèse (McGillicuddy *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 1988) et activent la lipolyse (Feingold *et al.*, 1992). Un effet inhibiteur sur l'expression du QRFP par ces molécules est donc en accord le rôle adipogène et anti-lipolytique du QRFP qui est contraire à celui des cytokines et du LPS.

La transcription génique est contrôlée en partie par la condensation de la chromatine. L'acétylation des histones joue un rôle dans cette condensation. C'est dans ce processus d'acétylation et de déacétylation que les histone acétyltransférases (HATs) et les HDACs ont été tout d'abord identifiées. Cependant, ces enzymes contrôlent l'acétylation de plusieurs autres protéines que les histones, complexifiant leurs actions cellulaires. Ainsi, on ne peut strictement qualifier les HDACs d'inhibiteurs et les HATs d'activateurs de la transcription (Peserico & Simone, 2011). L'implication des HDACs induites par le LPS a été démontrée dans l'effet répresseur sur quelques gènes comme COX-2 et PAI-1 dans les macrophages (Aung *et al.*, 2006; Halili *et al.*, 2010). Les HDACs sont aussi impliquées dans la régulation transcriptionnelle des ISGs par les IFNs de type I et de type II (Nusinzon & Horvath, 2003). Cette observation a aussi été faite dans les macrophages (Wang *et al.*, 2005). Nous avons donc évalué le rôle des HDACs dans l'inhibition de l'expression du QRFP par le LPS et les IFNs. Le prétraitement avec la trichostatine A (TSA) a pu renverser les effets inhibiteurs du LPS et des IFNs sur l'ARNm du QRFP suggérant un rôle pour les HDACs dans cet effet.

3. Discussion intégrative et perspectives

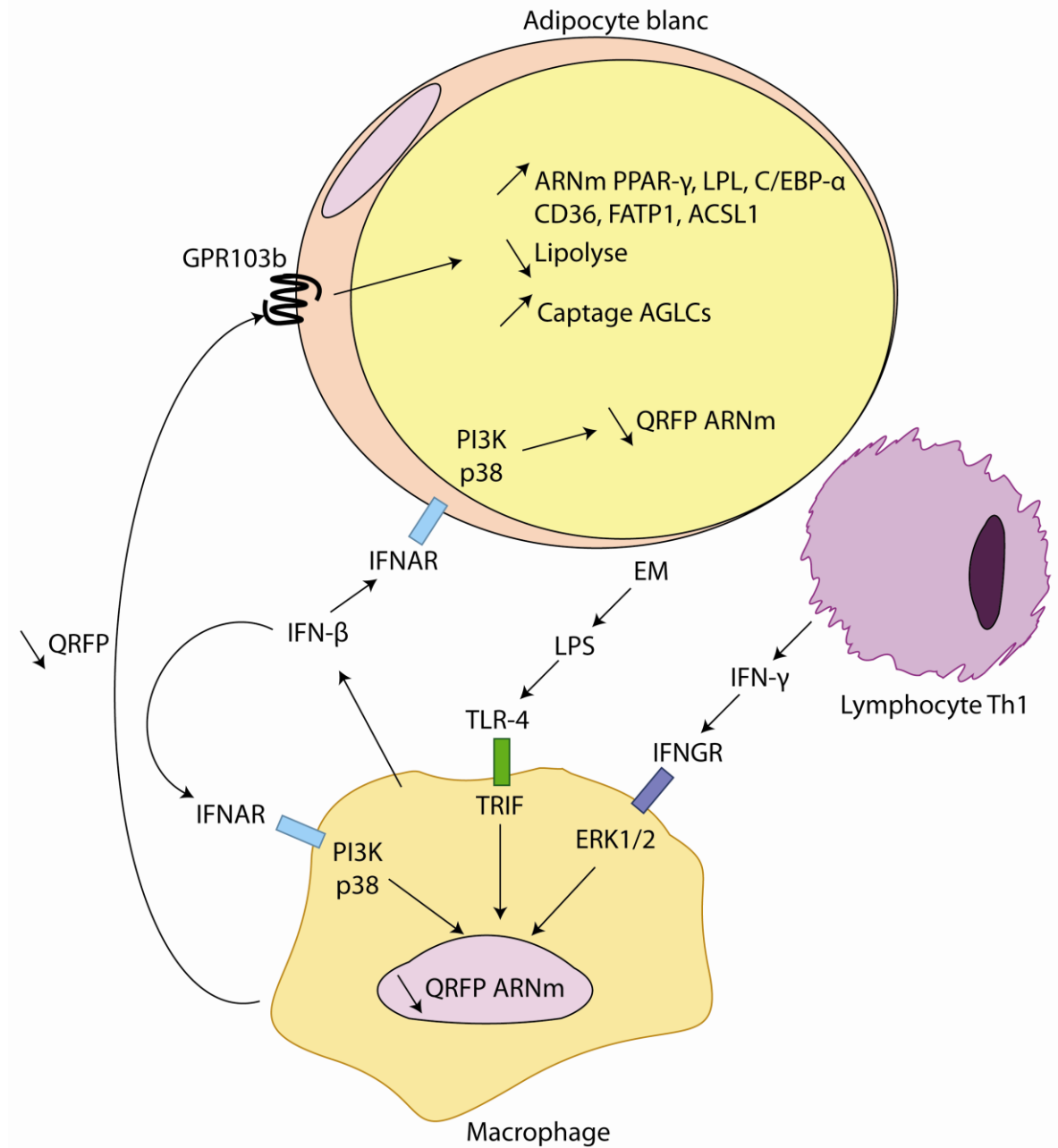


Figure 28 : Schéma récapitulatif. Dans un contexte d'EM, le LPS active le TLR-4 et sa voie TRIF-dépendante menant à la production de l'IFN- β par les macrophages. L'activation de cette voie diminue l'ARNm du QRFP. La stimulation autocrine des macrophages par l'IFN- β et ses voies PI3K- et p38-dépendante diminue l'ARNm et la protéine du QRFP. La stimulation des macrophages par une cytokine Th1, l'IFN- γ , diminue l'ARNm et la

protéine du QRFP par une voie ERK1/2-dépendante. Sur les adipocytes, la sécrétion de l'IFN- β induite par le LPS sur les macrophages diminue aussi l'ARNm du QRFP d'une façon PI3K- et p38-dépendante. Ces diminutions du QRFP localement sécrété diminuent son effet adipogène sur les adipocytes. Le QRFP augmente l'expression de PPAR- γ , la LPL, C/EBP- α , CD36, FATP1 et ACSL1. Le QRFP augmente le captage des AGLCs et inhibe la lipolyse. ACSL1, *long chain fatty acyl-CoA synthetase 1*; AGLCs, acides gras à longue chaîne; ARNm, ARN messenger; CD36, *cluster of differentiation 36*; C/EBP- α , *CCAAT/enhancer-binding protein*; EM, endotoxémie métabolique; ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinases 1/2*; FATP1, *fatty acid transport protein 1*; GPR103b, *G protein-coupled receptor 103b*; IFNAR, *interferon alpha/beta receptor*; IFN- β , interféron- β ; IFN- γ , interféron- γ ; IFNGR, *interferon gamma receptor*; LPL, *lipoprotein lipase*; LPS, lipopolysaccharide; p38, protéine kinase de 38 kDa; PI3K, phosphoinositide 3 kinase, PPAR- γ , *peroxysome proliferator-activated receptor- γ* ; QRFP, *pyroglutamylated RF-amide peptide*; Th1, *T-helper 1 cell*; TLR-4, toll-like receptor-4; TRIF, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* .

Lors de la dernière décennie, les recherches sur l'obésité ont permis de mieux comprendre l'importance de l'inflammation du tissu adipeux dans la pathogenèse des problèmes liés à l'obésité. L'identification de nouvelles adipokines, ainsi que de leur rôle, a permis d'en apprendre davantage sur les fonctions autocrine/paracrine des adipocytes et des autres cellules présentes dans le tissu adipeux. Avec nos études sur le QRFP, nous avons identifié un nouveau joueur dans ces mécanismes. Le QRFP semble être un facteur adipogène exprimé par les adipocytes et les macrophages et qui serait induit durant la différenciation terminale des adipocytes dans un tissu adipeux normal. Dans un environnement de tissu adipeux obèse dysfonctionnel, l'expression et la sécrétion du QRFP semble réprimée pour laisser place aux processus inflammatoires. Voir schéma récapitulatif (Figure 28).

L'adipogenèse et l'inflammation sont des phénomènes qui s'inhibent mutuellement. Par exemple, les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et l'IL-6, montrent une activité pro-lipolytique et anti-adipogène (Gnacinska *et al.*, 2009). À l'inverse, les agonistes de PPAR- γ ont des activités anti-inflammatoires (Tontonoz & Spiegelman, 2008). On parle de transrépression pour décrire l'inhibition entre PPAR- γ et le NF-kB sans liaison directe à un promoteur. L'activation de PPAR- γ amène la formation de complexes protéiques formés de co-répresseurs qui inhibent l'activité de NF-kB (Glass & Ogawa, 2006). À l'inverse, une stimulation avec le TNF- α mène à la diminution de l'expression de PPAR- γ et C/EBP- α et de leur activité (Cawthorn & Sethi, 2008). Notre étude a décrit un autre exemple d'inhibition d'un signal adipogène par une stimulation inflammatoire.

Nous avons identifié quelques mécanismes de régulation du QRFP par le LPS et les IFNs dans un contexte d'obésité. Nous n'avons toutefois pas caractérisé la régulation du QRFP dans son ensemble. Très peu de choses ont été publiées sur le promoteur du QRFP. Dans le but d'obtenir des pistes de mécanismes de régulation et de valider nos résultats, nous avons fait une analyse *in silico* du promoteur du preproQRFP. Nous avons utilisé le logiciel AliBaba 2.1 pour prédire les sites de liaison potentiels de facteurs de transcription sur le promoteur. Un résumé des sites de liaison prédits par AliBaba est décrit dans le Tableau 2. La nature des sites de liaison identifiés sur le promoteur du QRFP permet de spéculer sur la régulation de ce gène.

Tableau 2 : Sites de liaison potentiels sur le promoteur du gène du QRFP.

Facteur de transcription	Nombre de sites potentiels	Rôle
C/EBP- α , β	9, 1	Adipogène
C/EBP- γ	1	Anti-adipogène (Darlington <i>et al.</i> , 1998)
NF-kB	3	Pro-inflammatoire
Krox-20	3	Adipogène (Chen <i>et al.</i> , 2005)
MyoD	3	Différenciation en myoblaste (Berkes & Tapscott, 2005)
AP-2 α	4	Anti-adipogène (Jiang <i>et al.</i> , 1998)
AP-1	3	Pro-inflammatoire
GR	2	Adipogène
ISGF3	1	Pro-inflammatoire

L'analyse du promoteur suggère que le QRFP est régulé par la balance entre l'adipogenèse et l'inflammation. Nous pourrions spéculer que la transcription du QRFP pourrait être activée par C/EBP- α qui est présent dans les macrophages et qui est induit lors de la différenciation terminale des adipocytes. Aussi, le QRFP pourrait potentiellement être induit par Krox-20 et le GR, dont les activations sont impliquées dans l'adipogenèse (Chen *et al.*, 2005; Farmer, 2006). En contrepartie, le QRFP pourrait être régulé à la baisse par

l'action de NF- κ B, AP-1, AP-2 α , ISGF3 ou encore de C/EBP- γ qui est anti-adipogène (Darlington *et al.*, 1998). Mentionnons que l'activité de C/EBP- β est induite par le LPS (Hu *et al.*, 1998) et les IFNs (Honda *et al.*, 1998). Il est donc possible que ce facteur de transcription ait un rôle à jouer dans la régulation du QRFP par ces molécules. Le facteur de transcription *myogenic differentiation* (MyoD), qui est le régulateur principal dans la différenciation en myoblaste (Berkes & Tapscott, 2005), semble avoir plusieurs sites de liaison. Ceci peut supposer un effet répresseur de MyoD sur un gène exprimé dans les adipocytes, suite à la différenciation en myoblaste.

Notre analyse du promoteur du QRFP tend à renforcer la validité du contexte du tissu adipeux dans lequel nous avons identifié le QRFP et la validité des mécanismes de régulation que nous avons décrit. Pour vérifier toutes ces hypothèses, des études sur la liaison de ces facteurs de transcription seraient toutefois nécessaires. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine permettrait de documenter la liaison des facteurs de transcription sur le promoteur du QRFP après un stimulus donné.

En plus de son rôle sur le tissu adipeux, d'autres rôles pour le QRFP ont été rapportés. Nous avons élucidé certains mécanismes de régulation du QRFP dans les macrophages et les adipocytes dans un contexte d'EM. Étant donné la concentration un peu plus élevée de LPS dans la circulation des animaux et humains obèses (Cani *et al.*, 2007; Creely *et al.*, 2007), il n'est pas exclu que le QRFP puisse être régulé de la même façon dans les autres tissus.

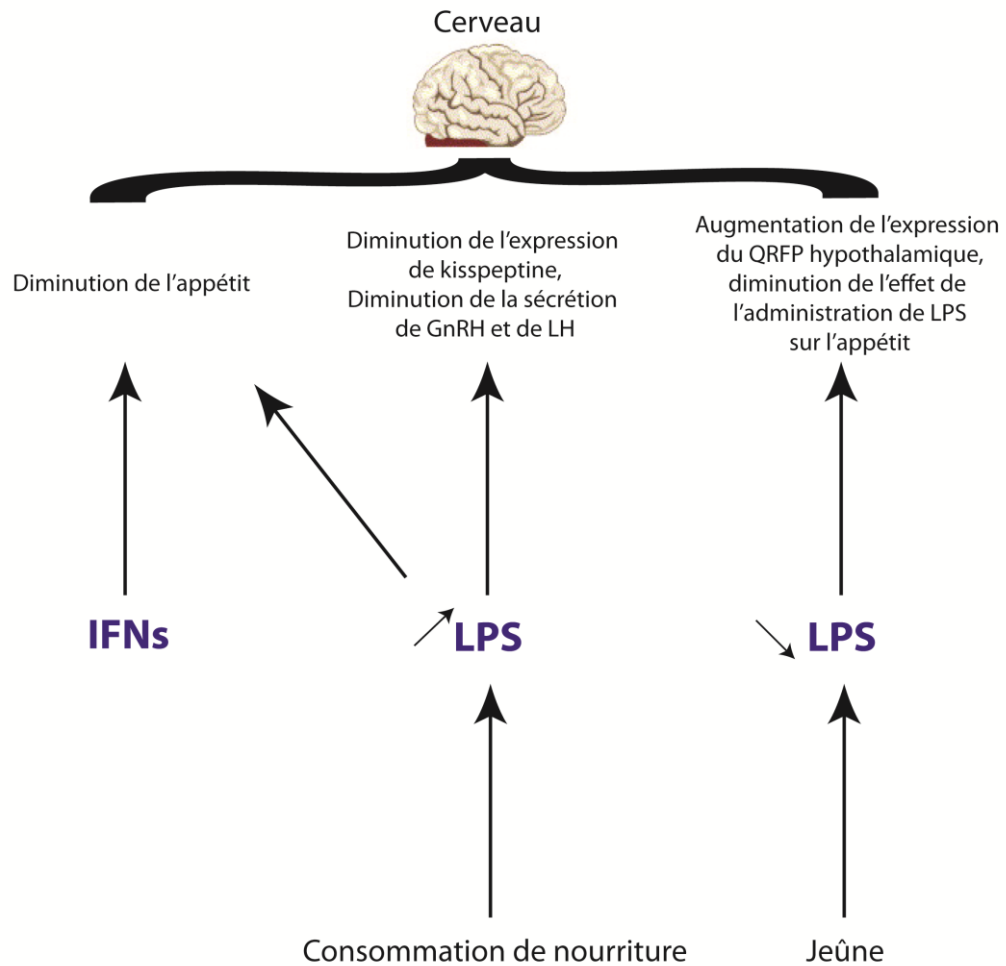


Figure 29 : Les interactions entre l'endotoxémie et les effets du QRFP au niveau central. L'endotoxémie fluctue en fonction de la consommation de nourriture. Le LPS et les IFNs ont des effets inhibiteurs sur l'appétit. Le LPS a aussi un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH et de LH ainsi que sur l'expression de kisspeptine, un RF-amide activateur de la sécrétion de LH. L'expression de QRFP, qui stimule l'appétit et l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique, est augmentée dans l'hypothalamus durant le jeûne. L'effet du LPS sur l'inhibition de l'appétit est aussi diminué durant le jeûne. GnRH, *gonadotrophin-releasing hormone*; IFNs, interférons; LH, hormone lutéinisante, LPS, lipopolysaccharide; QRFP, *pyroglutamylated RF-amide peptide*.

Au niveau du contrôle de l'appétit (Figure 29), il a été rapporté que le LPS montre un effet anorexigène par la modulation de cytokines, adipokines, hormones et facteurs hypothalamiques (Langhans, 2007). Les IFNs partagent cet effet inhibiteur sur l'appétit (Wong & Pinkney, 2004). Nous savons aussi que l'endotoxémie fluctue en fonction de la consommation de nourriture (Cani *et al.*, 2007). Comme il a été rapporté que l'expression du QRFP est augmentée durant le jeûne chez les souris (Takayasu *et al.*, 2006) et que l'effet anorectique du LPS est diminué durant le jeûne (Gautron *et al.*, 2005), il serait intéressant d'étudier le rôle de la concentration sanguine de LPS sur l'expression hypothalamique de QRFP. Sur la base de nos résultats dans le tissu adipeux, il serait possible de penser que les effets anorexigènes du LPS et des IFNs puissent être médiés via la régulation hypothalamique du QRFP. L'étude de l'effet du LPS sur l'expression hypothalamique d'un autre peptide de la famille des RF-amide, la kisspeptine, a démontré une diminution de l'expression de ce peptide dans le ARC (Castellano *et al.*, 2010). Comme les études sur les effets à long terme d'une diète riche en gras sur l'expression hypothalamique du QRFP sont contradictoires (Beck & Richy, 2009;Primeaux *et al.*, 2008), il est difficile de spéculer sur les liens entre l'EM et l'expression du QRFP dans cette situation.

La régulation du QRFP peut être comparée avec la régulation de peptides qui ont des fonctions similaires, le NPY et la ghréline. L'expression hypothalamique du QRFP et du NPY est augmentée lors d'un jeûne (Takayasu *et al.*, 2006), alors que celle de la ghréline est diminuée (Sato *et al.*, 2005). La sécrétion de ghréline par son lieu principal d'expression, l'estomac, est toutefois augmentée lors du jeûne (Tschop *et al.*, 2001a). En comparaison avec le NPY, l'augmentation de l'expression du QRFP dans l'hypothalamus est beaucoup moindre (Takayasu *et al.*, 2006). L'effet du LPS sur l'expression hypothalamique de la ghréline n'a pas été rapporté, toutefois une diminution des quantités circulantes de ghréline a été montrée suite à ce traitement (Wang *et al.*, 2006). Une administration de LPS n'a pas d'effet sur l'expression hypothalamique du NPY dans des conditions normales (Borges *et al.*, 2007). Cependant, lorsque que l'expression

hypothalamique du NPY est augmentée par une restriction calorique, le LPS diminue cette expression (MacDonald *et al.*, 2011).

Au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, il a été montré que le LPS avait un effet inhibiteur sur ce système en causant une baisse de GnRH et de LH (Tomaszewska-Zaremba & Herman, 2009). Comme le QRFP est un activateur de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Navarro *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008), nous pouvons soumettre l'hypothèse que le QRFP pourrait être régulé à la baisse par le LPS dans l'hypothalamus et l'hypophyse. Il serait alors intéressant d'investiguer si le QRFP joue un rôle dans l'effet du LPS sur ce système. Dans le cas de la kisspeptine, un peptide activateur de la sécrétion de LH, il a été montré que le LPS avait un effet inhibiteur sur son expression et qu'il en résultait une diminution des gonadotropines (Iwasa *et al.*, 2008).

Étant donné le nombre restreint de publications disponibles sur le GPR103b, il est difficile de décrire le rôle spécifique de ce sous-type de récepteur dans les actions du QRFP chez les rongeurs. Il semble pourtant que le GPR103a n'ait pas de rôle métabolique apparent chez les souris (Baribault *et al.*, 2006). Le GPR103b pourrait donc être candidat comme médiateur des effets métaboliques du QRFP. Un plus grand nombre d'études sur ce récepteur serait toutefois nécessaire pour mieux définir son rôle. Il serait intéressant de développer un antagoniste pour le GPR103b dans le but d'étudier ses effets. Quant au QRFP et ses rôles physiologiques, les études publiées sur ce sujet ne sont pas très nombreuses, encore une fois. Avec la possibilité que le QRFP puisse activer le NPY-R2 (Chartrel *et al.*, 2011), il est plus que probable que nous ne connaissions pas tous les effets cellulaires et physiologiques de ce peptide présentement. Il est aussi difficile de juger de l'importance du QRFP dans une réponse physiologique *in vivo* à partir d'études faites sur des modèles cellulaires seulement. Nos études ont démontré un effet adipogène pour le QRFP *in vitro*, cependant il est difficile de décrire l'ampleur du rôle physiologique joué par le QRFP parmi la multitude de signaux qui contrôlent l'adipogenèse. Malgré tout, le fait que le QRFP ait un effet adipogène supérieur à l'insuline dans nos essais *in vitro* laisse

penser que le QRFP pourrait avoir un impact non-négligeable dans une étude plus physiologique.

Le QRFP partage plusieurs similitudes biologiques avec la ghréline et le NPY. Au niveau de la régulation de l'appétit, l'administration ICV de ces trois peptides stimule la consommation de nourriture à court terme (Clark *et al.*, 1984;Tschop *et al.*, 2000;Chartrel *et al.*, 2003). Le NPY et la ghréline ont une puissance similaire sur l'appétit (Kirchner *et al.*, 2012), alors que le QRFP est un peu moins puissant que le NPY (Takayasu *et al.*, 2006). L'administration ICV chronique de ghréline (Tschop *et al.*, 2000) et de NPY (Stanley *et al.*, 1986) augmente la consommation cumulative de nourriture à plus long terme. L'administration ICV chronique de QRFP augmente la consommation cumulative de nourriture lorsque les animaux sont sous une diète modérément enrichie en gras, alors que ce n'est pas le cas lorsque les animaux sont sous une diète normale (Moriya *et al.*, 2006). Au niveau de la prise de poids, un traitement ICV chronique de ghréline (Tschop *et al.*, 2000) ou de NPY (Stanley *et al.*, 1986) augmente le poids corporel de façon beaucoup plus importante que le QRFP qui a un effet très modeste sans une diète riche en gras (Moriya *et al.*, 2006). L'augmentation du poids est accompagnée d'une augmentation de la masse adipeuse dans les trois cas. Toutefois, cette augmentation de masse adipeuse par la ghréline (Theander-Carrillo *et al.*, 2006) et le QRFP (Moriya *et al.*, 2006) est indépendante de l'augmentation de l'appétit, ce qui n'est pas le cas avec le NPY (Chambers & Woods, 2012).

L'augmentation significative de la masse adipeuse par la ghréline et le QRFP est indépendante de l'hyperphagie (Theander-Carrillo *et al.*, 2006), mais l'hyperphagie compte tout de même pour une partie de l'augmentation totale observée. La comparaison des animaux, traités et non-traités, qui consomment la même quantité de nourriture permet de déterminer l'importance de l'effet hyperphagique sur l'augmentation de la masse adipeuse. Dans le cas de la ghréline, l'hyperphagie compte pour environ 60% de l'augmentation de la masse adipeuse (Theander-Carrillo *et al.*, 2006). Pour le QRFP, l'hyperphagie compte pour seulement 25% de l'augmentation de masse adipeuse sous une diète modérément enrichie

en gras (Moriya *et al.*, 2006). L'augmentation de masse adipeuse induite par la ghréline est toutefois beaucoup plus importante que dans le cas du QRFP. Ceci suggère que l'effet périphérique du QRFP est relativement plus important que son effet sur l'appétit.

D'autres peptides de la famille des RF-amide ont un effet sur l'appétit. C'est le cas du NPF, du PrRP et du RFRP (Bechtold & Luckman, 2007; Takayanagi & Onaka, 2010). Contrairement au QRFP, ces peptides montrent un effet inhibiteur sur la consommation de nourriture.

La régulation de l'adipogenèse peut se faire de différentes façons. La première est une action périphérique et directe au niveau du tissu adipeux. Une autre façon implique une stimulation centrale qui génère des signaux adipogènes par l'entremise de l'innervation du tissu adipeux. La ghréline peut médier ses effets adipogènes des deux façons (Theander-Carrillo *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2004). Nous avons démontré une activité adipogène directe du QRFP sur les adipocytes (Mulumba *et al.*, 2010), alors que l'infusion ICV de QRFP démontre une action sur l'adipogenèse par le SNC (Moriya *et al.*, 2006). Pour vérifier l'importance physiologique de nos observations, il serait important de vérifier l'effet d'une administration périphérique chronique de QRFP sur le gain de masse adipeuse.

Nous avons montré les effets du QRFP sur les adipocytes blancs. Toutefois, les effets du QRFP sur les adipocytes bruns ont été peu investigués à ce jour. Il a été rapporté que le QRFP semble diminuer la thermogenèse et l'expression de UCP-1 dans le BAT (Moriya *et al.*, 2006). Il serait intéressant d'analyser l'expression du GPR103 et du QRFP dans les adipocytes bruns. Il serait ensuite possible de regarder les effets du QRFP sur l'expression des gènes propres aux adipocytes bruns et des facteurs de transcription impliqués. Il serait intéressant de documenter l'effet du QRFP sur la thermogenèse induite par les catécholamines, puisque ce phénomène nécessite la lipolyse et que nous avons montré l'effet anti-lipolytique du QRFP sur les adipocytes blancs. Ce mécanisme pourrait donc expliquer la réponse cellulaire dans les deux types d'adipocytes.

Pour toutes ces raisons, un modèle de souris déficientes en QRFP ou encore des souris avec des délétions spécifiques du QRFP dans certains tissus pourraient nous en apprendre davantage sur le rôle de ce peptide *in vivo*. Il serait intéressant de vérifier l'effet de la déficience de QRFP sur l'appétit, l'augmentation de la masse adipeuse, les paramètres métaboliques sanguins, la sécrétion des gonadotropines, l'activité locomotrice, la thermogénèse, la sécrétion d'aldostérone, la pression artérielle, le rythme cardiaque, la formation osseuse et la douleur. Ceci permettrait d'évaluer l'importance du rôle physiologique du QRFP dans ces réponses reconnues pour être modulées par ce peptide. Des souris déficientes en QRFP pourraient possiblement révéler d'autres rôles insoupçonnés pour le QRFP.

Nos études ont tenté de déterminer les rôles du QRFP dans le tissu adipeux pour en apprendre davantage sur son potentiel thérapeutique contre l'obésité. La stratégie la plus instinctive pour tenter d'enrayer l'obésité par la pharmacologie serait d'inhiber la formation des cellules adipeuses. Dans cette optique, une molécule qui inhiberait l'adipogénèse et activerait la lipolyse pourrait prévenir l'obésité. Dans le contexte de notre étude, cette molécule pourrait être un antagoniste du GPR103b. Cette approche comporte cependant des problèmes conceptuels. Devant le problème de l'obésité, il faudrait tenir compte du fait que rien ne se perd et rien ne se crée. La théorie de l'expansibilité du tissu adipeux (Sorensen *et al.*, 2010; Virtue & Vidal-Puig, 2010) situe l'obésité dans un contexte physiologique plus large, en relation avec le SMet. Suivant cette théorie, l'adipogénèse serait considérée comme un phénomène protecteur. Dans cette optique, l'utilisation d'un antagoniste du GPR103b pour prévenir l'obésité ne serait pas souhaitable.

Repousser les limites d'expansion du tissu adipeux pourrait donc, en théorie, améliorer l'état de santé des obèses. Cette affirmation semble vraie et constitue un des mécanismes des TZDs pour améliorer la sensibilité à l'insuline (Cariou *et al.*, 2012). Un agoniste du GPR103b qui serait dépourvu d'effets centraux pourrait possiblement avoir le même effet. Cependant, cette stratégie est limitée et n'est pas souhaitable à long terme. Augmenter la masse adipeuse entraîne des problèmes esthétiques et mécaniques pour la

personne avec une surcharge pondérale. De plus, si le rôle physiologique du QRFP dans l'inhibition de la thermogenèse s'avérerait confirmé, un agoniste du GPR103b pourrait avoir un effet négatif sur la consommation d'énergie.

D'autres stratégies de gestion des lipides ont été avancées pour traiter l'obésité. Une consisterait à éliminer les lipides en circulation en augmentant leur oxydation. L'augmentation de la β -oxydation par le découplage de la mitochondrie dans le BAT serait donc une avenue intéressante pour augmenter le catabolisme des lipides. Au contraire de l'effet du QRFP sur le BAT (Moriya *et al.*, 2006), il serait donc souhaitable d'augmenter la masse et l'activité métabolique du BAT pour augmenter la dépense énergétique. Dans ce sens, il a été montré récemment que le froid pouvait activer le métabolisme du BAT chez l'humain et que cette augmentation augmentait la dépense énergétique (Ouellet *et al.*, 2012). L'efficacité d'une telle approche dans un contexte d'obésité reste toutefois à être démontrée.

Dans le même sens, plusieurs molécules importantes dans la différenciation du BAT ont été identifiées et représenteraient des cibles intéressantes pour augmenter l'activité métabolique de ce tissu. Par exemple les *bone morphogenetic proteins* (BMPs) sont des protéines sécrétées faisant partie de la superfamille de TGF- β . BMP-7 est une molécule qui promouvoit la différenciation des CSMs en adipocytes bruns plutôt qu'en adipocytes blancs. La surexpression *in vivo* de BMP-7 augmente la masse de BAT, la dépense énergétique et freine la prise de poids (Tseng *et al.*, 2008). La délétion d'un autre membre de la famille de TGF- β , le *growth differentiation factor 3* (GDF3), augmente le métabolisme basal des adipocytes blancs par l'expression de PGC-1 α et de UCP-1. Ce changement vers un phénotype d'adipocytes bruns augmente la dépense énergétique et protège contre l'obésité (Shen *et al.*, 2009). La surexpression du *fibroblast growth factor-21* (FGF-21) semble augmenter la masse de BAT et protéger les souris *ob/ob*, *db/db* de l'obésité (Kharitonov *et al.*, 2005). Des molécules activant les facteurs de transcription PRDM16 et PGC-1 α , qui sont essentiels à la différenciation des adipocytes bruns, pourraient aussi être des médicaments prometteurs (Cypess & Kahn, 2010).

Une autre stratégie pour augmenter la β -oxydation des lipides et le catabolisme serait d'augmenter l'activité de l'AMPK. La metformine est reconnue comme un activateur de l'AMPK. L'effet de la metformine sur le DT2 serait principalement de diminuer la gluconéogenèse hépatique (Kirpichnikov *et al.*, 2002). Pour activer l'AMPK, la metformine doit être transportée à l'intérieur de la cellule par le *organic cation transporter 1* (OCT1) qui serait exprimé dans le foie et les reins. En effet, les souris déficientes en OCT1 seraient insensibles aux effets de la metformine sur le glucose (Shu *et al.*, 2007). Ceci suggère que la metformine, comme activatrice de l'AMPK, médie des effets limités et qu'une molécule qui pourrait activer l'AMPK dans le muscle, le BAT, en plus du foie, pourrait avoir de meilleurs effets sur le métabolisme.

Grâce aux récentes études sur le concept de l'EM, de nouvelles stratégies pour inhiber l'obésité ont émergé. Il semble que la composition du microbiote intestinal soit importante pour l'apparition de l'obésité et de ses problèmes associés. L'utilisation d'antibiotiques semble protéger de l'obésité induite par la diète chez les rongeurs. Il en est de même lorsque l'on fait la délétion du CD14, un corécepteur du LPS (Cani *et al.*, 2008). Bien que cette étude fournisse des pistes de solution intéressantes, l'utilisation d'antibiotiques à long terme peut favoriser la sélection de bactéries résistantes alors que la neutralisation de la signalisation du LPS pourrait inhiber la défense immunitaire bactérienne. D'autre part, l'ingestion de certains probiotiques ou de prébiotiques, comme des glucides non-digestibles mais fermentables, semble avoir des effets positifs sur la prévention de l'obésité chez les rongeurs (Cani & Delzenne, 2011). Les changements apportés par ces prébiotiques incluent bien sûr, le microbiote, mais aussi la modulation de la sécrétion de GLP-1, de PYY et de ghréline (Cani & Delzenne, 2011). De plus, l'ajout de fibres alimentaires dans un régime riche en gras semble avoir des effets bénéfiques sur le bilan métabolique (Serino *et al.*, 2012). Globalement, ces résultats laissent supposer que des études plus approfondies chez l'humain pourraient mener à des solutions thérapeutiques intéressantes et relativement simples pour contrer l'obésité.

Contrairement à plusieurs autres maladies mortelles, l'obésité a l'avantage d'être réversible. De plus, les moyens pour le faire sont connus. La modification des habitudes de

vie est certes la solution qui demande le plus d'effort de la part du patient, mais qui a l'avantage de traiter le problème à la source.

4. Conclusion

Nos études ont permis d'identifier un nouveau joueur dans le processus de l'adipogenèse. Le ligand peptidique QRFP et son récepteur, GPR103, semblent agir comme des activateurs du stockage de lipides dans les adipocytes. L'expression et la sécrétion de ce ligand semble être diminué par l'EM, une condition retrouvée chez les obèses. Bien que l'adipogenèse soit importante dans le développement de l'obésité, son rôle physiologique essentiel en fait une mauvaise cible pour le traitement pharmacologique de l'obésité. C'est pourquoi nous ne pouvons pas conclure à partir de nos résultats que le GPR103 ou le QRFP pourraient être des cibles pharmacologiques périphériques intéressantes pour le traitement de l'obésité. Quant à son rôle central sur la régulation de l'appétit, l'utilité d'un bloqueur du GPR103 qui pourrait traverser la barrière hématoencéphalique reste à être démontrée.

Bibliographie

1. Abbott, CR, Rossi, M, Wren, AM, Murphy, KG, Kennedy, AR, Stanley, SA, Zollner, AN, Morgan, DG, Morgan, I, Ghatei, MA, Small, CJ & Bloom, SR. (2001). Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology*, **142**, 3457-3463.
2. Abe, M, Matsuda, M, Kobayashi, H, Miyata, Y, Nakayama, Y, Komuro, R, Fukuhara, A & Shimomura, I. (2008). Effects of statins on adipose tissue inflammation: their inhibitory effect on MyD88-independent IRF3/IFN-beta pathway in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 871-877.
3. Adrian, TE, Ferri, GL, Bacarese-Hamilton, AJ, Fuessl, HS, Polak, JM & Bloom, SR. (1985a). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, **89**, 1070-1077.
4. Adrian, TE, Savage, AP, Sagor, GR, Allen, JM, Bacarese-Hamilton, AJ, Tatemoto, K, Polak, JM & Bloom, SR. (1985b). Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology*, **89**, 494-499.
5. Ahima, RS, Saper, CB, Flier, JS & Elmquist, JK. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, **21**, 263-307.
6. Ahmadian, M, Wang, Y & Sul, HS. (2010). Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 555-559.
7. Air, EL, Strowski, MZ, Benoit, SC, Conarello, SL, Salituro, GM, Guan, XM, Liu, K, Woods, SC & Zhang, BB. (2002). Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med*, **8**, 179-183.

8. Alessi, MC, Poggi, M & Juhan-Vague, I. (2007). Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 240-245.
9. Amar, J, Burcelin, R, Ruidavets, JB, Cani, PD, Fauvel, J, Alessi, MC, Chamontin, B & Ferrieres, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*, **87**, 1219-1223.
10. Arimura, N, Horiba, T, Imagawa, M, Shimizu, M & Sato, R. (2004). The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 10070-10076.
11. Ariyasu, H, Takaya, K, Tagami, T, Ogawa, Y, Hosoda, K, Akamizu, T, Suda, M, Koh, T, Natsui, K, Toyooka, S, Shirakami, G, Usui, T, Shimatsu, A, Doi, K, Hosoda, H, Kojima, M, Kangawa, K & Nakao, K. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 4753-4758.
12. Arora, S & Anubhuti. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*, **40**, 375-401.
13. Asakawa, A, Inui, A, Yuzuriha, H, Ueno, N, Katsuura, G, Fujimiya, M, Fujino, MA, Nijjima, A, Meguid, MM & Kasuga, M. (2003). Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*, **124**, 1325-1336.
14. Asakawa, A, Uemoto, M, Ueno, N, Katagi, M, Fujimiya, M, Fujino, K, Kodama, N, Nanba, H, Sakamaki, R, Shinfuku, N, Meguid, MM & Inui, A. (2006). Peptide YY3-36 and pancreatic polypeptide suppress food intake. *J Gastroenterol Hepatol*, **21**, 1501-1502.
15. Aschenbach, WG, Sakamoto, K & Goodyear, LJ. (2004). 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise. *Sports Med*, **34**, 91-103.

16. Aung, HT, Schroder, K, Himes, SR, Brion, K, van, ZW, Trieu, A, Suzuki, H, Hayashizaki, Y, Hume, DA, Sweet, MJ & Ravasi, T. (2006). LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB J*, **20**, 1315-1327.
17. Azzu, V & Brand, MD. (2010). The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci*, **35**, 298-307.
18. Backhed, F, Manchester, JK, Semenkovich, CF & Gordon, JI. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 979-984.
19. Bagdade, JD, Bierman, EL & Porte, D, Jr. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*, **46**, 1549-1557.
20. Baggio, LL, Huang, Q, Brown, TJ & Drucker, DJ. (2004). Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology*, **127**, 546-558.
21. Bakker, AH, Van Dielen, FM, Greve, JW, Adam, JA & Buurman, WA. (2004). Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obes Res*, **12**, 488-498.
22. Balasubramanyam, M, Sampathkumar, R & Mohan, V. (2005). Is insulin signaling molecules misguided in diabetes for ubiquitin-proteasome mediated degradation? *Mol Cell Biochem*, **275**, 117-125.
23. Banks, WA, Kastin, AJ, Huang, W, Jaspan, JB & Maness, LM. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, **17**, 305-311.

24. Bannon, AW, Seda, J, Carmouche, M, Francis, JM, Norman, MH, Karbon, B & McCaleb, ML. (2000). Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain Res*, **868**, 79-87.
25. Barbatelli, G, Murano, I, Madsen, L, Hao, Q, Jimenez, M, Kristiansen, K, Giacobino, JP, De, MR & Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **298**, E1244-E1253.
26. Baribault, H, Danao, J, Gupte, J, Yang, L, Sun, B, Richards, W & Tian, H. (2006). The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol Cell Biol*, **26**, 709-717.
27. Batterham, RL, Cohen, MA, Ellis, SM, Le Roux, CW, Withers, DJ, Frost, GS, Ghatei, MA & Bloom, SR. (2003). Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*, **349**, 941-948.
28. Batterham, RL, Cowley, MA, Small, CJ, Herzog, H, Cohen, MA, Dakin, CL, Wren, AM, Brynes, AE, Low, MJ, Ghatei, MA, Cone, RD & Bloom, SR. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, **418**, 650-654.
29. Baura, GD, Foster, DM, Porte, D, Jr., Kahn, SE, Bergman, RN, Cobelli, C & Schwartz, MW. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest*, **92**, 1824-1830.
30. Bechtold, DA & Luckman, SM. (2007). The role of RFamide peptides in feeding. *J Endocrinol*, **192**, 3-15.
31. Beck, B & Richy, S. (2009). Suppression of QRFP 43 in the hypothalamic ventromedial nucleus of Long-Evans rats fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*, **383**, 78-82.

32. Benoit, SC, Air, EL, Coolen, LM, Strauss, R, Jackman, A, Clegg, DJ, Seeley, RJ & Woods, SC. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*, **22**, 9048-9052.
33. Berg, AH, Combs, TP, Du, X, Brownlee, M & Scherer, PE. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, **7**, 947-953.
34. Berkes, CA & Tapscott, SJ. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 585-595.
35. Beutler, B. (2002). TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol*, **270**, 109-120.
36. Bhavsar, S, Watkins, J & Young, A. (1998). Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiol Behav*, **64**, 557-561.
37. Bicknell, AB. (2008). The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol*, **20**, 692-699.
38. Biddinger, SB & Kahn, CR. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol*, **68**, 123-158.
39. Birsoy, K, Chen, Z & Friedman, J. (2008). Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab*, **7**, 339-347.
40. Boden, G. (2011). Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **18**, 139-143.
41. Boord, JB, Fazio, S & Linton, MF. (2002). Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **13**, 141-147.
42. Borges, BC, Antunes-Rodrigues, J, Castro, M, Bittencourt, JC, Elias, CF & Elias, LL. (2007). Expression of hypothalamic neuropeptides and the desensitization of

pituitary-adrenal axis and hypophagia in the endotoxin tolerance. *Horm Behav*, **52**, 508-519.

43. Broberger, C, Landry, M, Wong, H, Walsh, JN & Hokfelt, T. (1997). Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, **66**, 393-408.
44. Bruning, JC, Gautam, D, Burks, DJ, Gillette, J, Schubert, M, Orban, PC, Klein, R, Krone, W, Muller-Wieland, D & Kahn, CR. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, **289**, 2122-2125.
45. Bruzzone, F, Lectez, B, Alexandre, D, Jegou, S, Mounien, L, Tollemer, H, Chatenet, D, Leprince, J, Vallarino, M, Vaudry, H & Chartrel, N. (2007). Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, **503**, 573-591.
46. Bruzzone, F, Lectez, B, Tollemer, H, Leprince, J, Dujardin, C, Rachidi, W, Chatenet, D, Baroncini, M, Beauvillain, JC, Vallarino, M, Vaudry, H & Chartrel, N. (2006). Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *J Neurochem*, **99**, 616-627.
47. Canello, R, Henegar, C, Viguier, N, Taleb, S, Poitou, C, Rouault, C, Coupaye, M, Pelloux, V, Hugol, D, Bouillot, JL, Bouloumie, A, Barbatelli, G, Cinti, S, Svensson, PA, Barsh, GS, Zucker, JD, Basdevant, A, Langin, D & Clement, K. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, **54**, 2277-2286.
48. Cani, PD, Amar, J, Iglesias, MA, Poggi, M, Knauf, C, Bastelica, D, Neyrinck, AM, Fava, F, Tuohy, KM, Chabo, C, Waget, A, Delmee, E, Cousin, B, Sulpice, T,

Chamontin, B, Ferrieres, J, Tanti, JF, Gibson, GR, Casteilla, L, Delzenne, NM, Alessi, MC & Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **56**, 1761-1772.

49. Cani, PD, Bibiloni, R, Knauf, C, Waget, A, Neyrinck, AM, Delzenne, NM & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, **57**, 1470-1481.
50. Cani, PD & Delzenne, NM. (2011). The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*, **130**, 202-212.
51. Cariou, B, Charbonnel, B & Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab*.
52. Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*, **29**, 18-24.
53. Carling, D, Sanders, MJ & Woods, A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)*, **32 Suppl 4**, S55-S59.
54. Castellano, JM, Bentsen, AH, Romero, M, Pineda, R, Ruiz-Pino, F, Garcia-Galiano, D, Sanchez-Garrido, MA, Pinilla, L, Mikkelsen, JD & Tena-Sempere, M. (2010). Acute inflammation reduces kisspeptin immunoreactivity at the arcuate nucleus and decreases responsiveness to kisspeptin independently of its anorectic effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **299**, E54-E61.
55. Cawthorn, WP & Sethi, JK. (2008). TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*, **582**, 117-131.
56. Chabowski, A, Momken, I, Coort, SL, Calles-Escandon, J, Tandon, NN, Glatz, JF, Luiken, JJ & Bonen, A. (2006). Prolonged AMPK activation increases the

expression of fatty acid transporters in cardiac myocytes and perfused hearts. *Mol Cell Biochem*, **288**, 201-212.

57. Chakrabarti, P & Kandrór, KV. (2009). FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, **284**, 13296-13300.
58. Chambers, AP & Woods, SC. (2012). The role of neuropeptide Y in energy homeostasis. *Handb Exp Pharmacol*, 23-45.
59. Chartrel, N, Alonzeau, J, Alexandre, D, Jeandel, L, Alvear-Perez, R, Leprince, J, Boutin, J, Vaudry, H, Anouar, Y & Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol*, **32**, 387-397.
60. Chartrel, N, Bruzzone, F, Leprince, J, Tollemmer, H, Anouar, Y, Do-Rego, JC, Segalas-Milazzo, I, Guilhaudis, L, Cosette, P, Jouenne, T, Simonnet, G, Vallarino, M, Beauvillain, JC, Costentin, J & Vaudry, H. (2006). Structure and functions of the novel hypothalamic RFamide neuropeptides R-RFa and 26RFa in vertebrates. *Peptides*, **27**, 1110-1120.
61. Chartrel, N, Dujardin, C, Anouar, Y, Leprince, J, Decker, A, Clerens, S, Do-Rego, JC, Vandesande, F, Llorens-Cortes, C, Costentin, J, Beauvillain, JC & Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15247-15252.
62. Chaves, VE, Frasson, D & Kawashita, NH. (2011). Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie*, **93**, 1631-1640.
63. Chawla, A, Nguyen, KD & Goh, YP. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, **11**, 738-749.

64. Chawla, A, Schwarz, EJ, Dimaculangan, DD & Lazar, MA. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, **135**, 798-800.
65. Chen, AS, Marsh, DJ, Trumbauer, ME, Frazier, EG, Guan, XM, Yu, H, Rosenblum, CI, Vongs, A, Feng, Y, Cao, L, Metzger, JM, Strack, AM, Camacho, RE, Mellin, TN, Nunes, CN, Min, W, Fisher, J, Gopal-Truter, S, MacIntyre, DE, Chen, HY & Van der Ploeg, LH. (2000a). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*, **26**, 97-102.
66. Chen, AS, Metzger, JM, Trumbauer, ME, Guan, XM, Yu, H, Frazier, EG, Marsh, DJ, Forrest, MJ, Gopal-Truter, S, Fisher, J, Camacho, RE, Strack, AM, Mellin, TN, MacIntyre, DE, Chen, HY & Van der Ploeg, LH. (2000b). Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res*, **9**, 145-154.
67. Chen, HY, Trumbauer, ME, Chen, AS, Weingarth, DT, Adams, JR, Frazier, EG, Shen, Z, Marsh, DJ, Feighner, SD, Guan, XM, Ye, Z, Nargund, RP, Smith, RG, Van der Ploeg, LH, Howard, AD, MacNeil, DJ & Qian, S. (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, **145**, 2607-2612.
68. Chen, Z, Torrens, JI, Anand, A, Spiegelman, BM & Friedman, JM. (2005). Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab*, **1**, 93-106.
69. Choi, K, Roh, SG, Hong, YH, Shrestha, YB, Hishikawa, D, Chen, C, Kojima, M, Kangawa, K & Sasaki, S. (2003). The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, **144**, 754-759.
70. Chung, WK & Leibel, RL. (2008). Considerations regarding the genetics of obesity. *Obesity (Silver Spring)*, **16 Suppl 3**, S33-S39.

71. Clark, JT, Kalra, PS, Crowley, WR & Kalra, SP. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*, **115**, 427-429.
72. Coleman, DL. (2010). A historical perspective on leptin. *Nat Med*, **16**, 1097-1099.
73. Combs, TP, Berg, AH, Obici, S, Scherer, PE & Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*, **108**, 1875-1881.
74. Crawley, JN & Corwin, RL. (1994). Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, **15**, 731-755.
75. Creely, SJ, McTernan, PG, Kusminski, CM, Fisher, M, Da Silva, NF, Khanolkar, M, Evans, M, Harte, AL & Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E740-E747.
76. Cristancho, AG & Lazar, MA. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 722-734.
77. Cypess, AM & Kahn, CR. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **17**, 143-149.
78. Dahlman, I, Dicker, A, Jiao, H, Kere, J, Blomqvist, L, van, H, V, Hoffstedt, J, Borch-Johnsen, K, Jorgensen, T, Hansen, T, Pedersen, O, Laakso, M & Arner, P. (2007). A common haplotype in the G-protein-coupled receptor gene GPR74 is associated with leanness and increased lipolysis. *Am J Hum Genet*, **80**, 1115-1124.
79. Darlington, GJ, Ross, SE & MacDougald, OA. (1998). The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **273**, 30057-30060.

80. David, M, Petricoin, E, III, Benjamin, C, Pine, R, Weber, MJ & Larner, AC. (1995). Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science*, **269**, 1721-1723.
81. Derosa, G & Maffioli, P. (2012). Anti-obesity drugs: a review about their effects and their safety. *Expert Opin Drug Saf*, **11**, 459-471.
82. DiGirolamo, M, Newby, FD & Lovejoy, J. (1992). Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *FASEB J*, **6**, 2405-2412.
83. do Rego, JC, Leprince, J, Chartrel, N, Vaudry, H & Costentin, J. (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides*, **27**, 2715-2721.
84. Doherty, GM, Lange, JR, Langstein, HN, Alexander, HR, Buresh, CM & Norton, JA. (1992). Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, **149**, 1666-1670.
85. Du, Z, Wei, L, Murti, A, Pfeffer, SR, Fan, M, Yang, CH & Pfeffer, LM. (2007). Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem*, **102**, 1087-1094.
86. Dzamko, NL & Steinberg, GR. (2009). AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiol (Oxf)*, **196**, 115-127.
87. Eberlein, GA, Eysselein, VE, Schaeffer, M, Layer, P, Grandt, D, Goebell, H, Niebel, W, Davis, M, Lee, TD, Shively, JE & . (1989). A new molecular form of PYY: structural characterization of human PYY(3-36) and PYY(1-36). *Peptides*, **10**, 797-803.
88. Eder, K, Baffy, N, Falus, A & Fulop, AK. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res*, **58**, 727-736.

89. Edwards, CM, Abusnana, S, Sunter, D, Murphy, KG, Ghatei, MA & Bloom, SR. (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol*, **160**, R7-12.
90. Egido, EM, Hernandez, R, Leprince, J, Chartrel, N, Vaudry, H, Marco, J & Silvestre, RA. (2007). 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides*, **28**, 725-730.
91. Eguchi, J, Wang, X, Yu, S, Kershaw, EE, Chiu, PC, Dushay, J, Estall, JL, Klein, U, Maratos-Flier, E & Rosen, ED. (2011). Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab*, **13**, 249-259.
92. Eguchi, J, Yan, QW, Schones, DE, Kamal, M, Hsu, CH, Zhang, MQ, Crawford, GE & Rosen, ED. (2008). Interferon regulatory factors are transcriptional regulators of adipogenesis. *Cell Metab*, **7**, 86-94.
93. Ekblad, E & Sundler, F. (2002). Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides*, **23**, 251-261.
94. Elshourbagy, NA, Ames, RS, Fitzgerald, LR, Foley, JJ, Chambers, JK, Szekeres, PG, Evans, NA, Schmidt, DB, Buckley, PT, Dytko, GM, Murdock, PR, Milligan, G, Groarke, DA, Tan, KB, Shabon, U, Nuthulaganti, P, Wang, DY, Wilson, S, Bergsma, DJ & Sarau, HM. (2000). Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **275**, 25965-25971.
95. Erickson, JC, Clegg, KE & Palmiter, RD. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, **381**, 415-421.
96. Esau, C, Kang, X, Peralta, E, Hanson, E, Marcusson, EG, Ravichandran, LV, Sun, Y, Koo, S, Perera, RJ, Jain, R, Dean, NM, Freier, SM, Bennett, CF, Lollo, B & Griffey, R. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 52361-52365.

97. Fain, JN. (2010). Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm*, **2010**, 513948.
98. Fang, Q, Liu, Q, Li, N, Jiang, TN, Li, YL, Yan, X & Wang, R. (2009). Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *Eur J Pharmacol*, **621**, 61-66.
99. Farag, YM & Gaballa, MR. (2011). Diabesity: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant*, **26**, 28-35.
100. Farmer, SR. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, **4**, 263-273.
101. Farooqi, IS, Yeo, GS, Keogh, JM, Aminian, S, Jebb, SA, Butler, G, Cheetham, T & O'Rahilly, S. (2000). Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest*, **106**, 271-279.
102. Faust, IM, Johnson, PR, Stern, JS & Hirsch, J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol*, **235**, E279-E286.
103. Febbraio, M, Abumrad, NA, Hajjar, DP, Sharma, K, Cheng, W, Pearce, SF & Silverstein, RL. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, **274**, 19055-19062.
104. Feingold, KR, Doerrler, W, Dinarello, CA, Fiers, W & Grunfeld, C. (1992). Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology*, **130**, 10-16.

105. Ferri, C, Desideri, G, Valenti, M, Bellini, C, Pasin, M, Santucci, A & De, MG. (1999). Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension*, **34**, 568-573.
106. Festuccia, WT, Blanchard, PG, Turcotte, V, Laplante, M, Sariahmetoglu, M, Brindley, DN & Deshaies, Y. (2009). Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J Lipid Res*, **50**, 1185-1194.
107. Field, BC, Chaudhri, OB & Bloom, SR. (2009). Obesity treatment: novel peripheral targets. *Br J Clin Pharmacol*, **68**, 830-843.
108. Floyd, ZE & Stephens, JM. (2002). Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem*, **277**, 4062-4068.
109. Fresno, M, Alvarez, R & Cuesta, N. (2011). Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem*, **117**, 151-164.
110. Friedman, JM & Halaas, JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**, 763-770.
111. Fruebis, J, Tsao, TS, Javorschi, S, Ebbets-Reed, D, Erickson, MR, Yen, FT, Bihain, BE & Lodish, HF. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2005-2010.
112. Fruhbeck, G & Salvador, J. (2000). Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia*, **43**, 3-12.
113. Fryer, LG, Parbu-Patel, A & Carling, D. (2002). The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, **277**, 25226-25232.

114. Fukusumi, S, Yoshida, H, Fujii, R, Maruyama, M, Komatsu, H, Habata, Y, Shintani, Y, Hinuma, S & Fujino, M. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem*, **278**, 46387-46395.
115. Gautron, L, Mingam, R, Moranis, A, Combe, C & Laye, S. (2005). Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. *Neuroscience*, **134**, 933-946.
116. Ghatei, MA, Uttenthal, LO, Christofides, ND, Bryant, MG & Bloom, SR. (1983). Molecular forms of human enteroglucagon in tissue and plasma: plasma responses to nutrient stimuli in health and in disorders of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab*, **57**, 488-495.
117. Gimeno, RE. (2007). Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 271-276.
118. Girard, J, Perdereau, D, Foufelle, F, Prip-Buus, C & Ferre, P. (1994). Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J*, **8**, 36-42.
119. Glass, CK & Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, **6**, 44-55.
120. Gnacinska, M, Malgorzewicz, S, Stojek, M, Lysiak-Szydłowska, W & Sworczak, K. (2009). Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci*, **54**, 150-157.
121. Goodge, KA & Hutton, JC. (2000). Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 235-242.
122. Gordon, S. (2007). Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest*, **117**, 89-93.
123. Gouarderes, C, Mazarguil, H, Mollereau, C, Chartrel, N, Leprince, J, Vaudry, H & Zajac, JM. (2007). Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor

- coupling: high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [35S]GTPgammaS binding. *Neuropharmacology*, **52**, 376-386.
124. Gough, DJ, Levy, DE, Johnstone, RW & Clarke, CJ. (2008). IFNgamma signaling- does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev*, **19**, 383-394.
 125. Green, H & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, **5**, 19-27.
 126. Guillod-Maximin, E, Roy, AF, Vacher, CM, Aubourg, A, Bailleux, V, Lorsignol, A, Penicaud, L, Parquet, M & Taouis, M. (2009). Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol*, **200**, 93-105.
 127. Gupta, RK, Arany, Z, Seale, P, Mepani, RJ, Ye, L, Conroe, HM, Roby, YA, Kulaga, H, Reed, RR & Spiegelman, BM. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*, **464**, 619-623.
 128. Hagan, MM. (2002). Peptide YY: a key mediator of orexigenic behavior. *Peptides*, **23**, 377-382.
 129. Halili, MA, Andrews, MR, Labzin, LI, Schroder, K, Matthias, G, Cao, C, Lovelace, E, Reid, RC, Le, GT, Hume, DA, Irvine, KM, Matthias, P, Fairlie, DP & Sweet, MJ. (2010). Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol*, **87**, 1103-1114.
 130. Hardie, DG. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, **144**, 5179-5183.
 131. Hardie, DG. (2004a). AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*, **5**, 119-125.

132. Hardie, DG. (2004b). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, **117**, 5479-5487.
133. Hardie, DG & Hawley, SA. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, **23**, 1112-1119.
134. Hariri, N & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*, **23**, 270-299.
135. Harp, JB. (2004). New insights into inhibitors of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol*, **15**, 303-307.
136. Herrera-Herrera, ML & Salazar-Olivo, LA. (2008). RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **377**, 29-34.
137. Heshka, S & Allison, DB. (2001). Is obesity a disease? *Int J Obes Relat Metab Disord*, **25**, 1401-1404.
138. Honda, Y, Rogers, L, Nakata, K, Zhao, BY, Pine, R, Nakai, Y, Kurosu, K, Rom, WN & Weiden, M. (1998). Type I interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)beta, repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med*, **188**, 1255-1265.
139. Hotamisligil, GS. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, **444**, 860-867.
140. Howard, JK & Flier, JS. (2006). Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab*, **17**, 365-371.
141. Hu, HM, Baer, M, Williams, SC, Johnson, PF & Schwartz, RC. (1998). Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-

- induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol*, **160**, 2334-2342.
142. Huszar, D, Lynch, CA, Fairchild-Huntress, V, Dunmore, JH, Fang, Q, Berkemeier, LR, Gu, W, Kesterson, RA, Boston, BA, Cone, RD, Smith, FJ, Campfield, LA, Burn, P & Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, **88**, 131-141.
 143. Ibrahim, MM. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, **11**, 11-18.
 144. Imai, T, Takakuwa, R, Marchand, S, Dentz, E, Bornert, JM, Messaddeq, N, Wendling, O, Mark, M, Desvergne, B, Wahli, W, Chambon, P & Metzger, D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4543-4547.
 145. Ioannides-Demos, LL, Piccenna, L & McNeil, JJ. (2011). Pharmacotherapies for obesity: past, current, and future therapies. *J Obes*, **2011**, 179674.
 146. Iwasa, T, Matsuzaki, T, Murakami, M, Shimizu, F, Kuwahara, A, Yasui, T & Irahara, M. (2008). Decreased expression of kisspeptin mediates acute immune/inflammatory stress-induced suppression of gonadotropin secretion in female rat. *J Endocrinol Invest*, **31**, 656-659.
 147. Jackson, RS, Creemers, JW, Ohagi, S, Raffin-Sanson, ML, Sanders, L, Montague, CT, Hutton, JC & O'Rahilly, S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*, **16**, 303-306.
 148. Jakobsen, SN, Hardie, DG, Morrice, N & Tornqvist, HE. (2001). 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in

- response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem*, **276**, 46912-46916.
149. Jequier, E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*, **967**, 379-388.
150. Jiang, MS, Tang, QQ, McLenithan, J, Geiman, D, Shillinglaw, W, Henzel, WJ & Lane, MD. (1998). Derepression of the C/EBPalpha gene during adipogenesis: identification of AP-2alpha as a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3467-3471.
151. Jiang, Y, Luo, L, Gustafson, EL, Yadav, D, Lavery, M, Murgolo, N, Vassileva, G, Zeng, M, Laz, TM, Behan, J, Qiu, P, Wang, L, Wang, S, Bayne, M, Greene, J, Monsma, F, Jr. & Zhang, FL. (2003). Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem*, **278**, 27652-27657.
152. Jump, DB. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **41**, 41-78.
153. Kahn, BB, Alquier, T, Carling, D & Hardie, DG. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, **1**, 15-25.
154. Kajimura, S, Seale, P, Kubota, K, Lunsford, E, Frangioni, JV, Gygi, SP & Spiegelman, BM. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature*, **460**, 1154-1158.
155. Kajimura, S, Seale, P, Tomaru, T, Erdjument-Bromage, H, Cooper, MP, Ruas, JL, Chin, S, Tempst, P, Lazar, MA & Spiegelman, BM. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*, **22**, 1397-1409.

156. Kalra, SP, Dube, MG, Sahu, A, Phelps, CP & Kalra, PS. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10931-10935.
157. Kaminski, DA & Randall, TD. (2010). Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*, **31**, 384-390.
158. Kampe, J, Wiedmer, P, Pfluger, PT, Castaneda, TR, Burget, L, Mondala, H, Kerr, J, Liaw, C, Oldfield, BJ, Tschop, MH & Bagnol, D. (2006). Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Res*, **1119**, 133-149.
159. Katsuki, A, Sumida, Y, Murashima, S, Murata, K, Takarada, Y, Ito, K, Fujii, M, Tsuchihashi, K, Goto, H, Nakatani, K & Yano, Y. (1998). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 859-862.
160. Kawai, T & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, **13**, 816-825.
161. Kawai, T & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, **11**, 373-384.
162. Kelly, M, Keller, C, Avilucea, PR, Keller, P, Luo, Z, Xiang, X, Giralt, M, Hidalgo, J, Saha, AK, Pedersen, BK & Ruderman, NB. (2004). AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 449-454.
163. Kharitononkov, A, Shiyanova, TL, Koester, A, Ford, AM, Micanovic, R, Galbreath, EJ, Sandusky, GE, Hammond, LJ, Moyers, JS, Owens, RA, Gromada, J, Brozinick, JT, Hawkins, ED, Wroblewski, VJ, Li, DS, Mehrbod, F, Jaskunas, SR & Shanafelt, AB. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*, **115**, 1627-1635.

164. Kim, JB, Sarraf, P, Wright, M, Yao, KM, Mueller, E, Solanes, G, Lowell, BB & Spiegelman, BM. (1998a). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*, **101**, 1-9.
165. Kim, JB & Spiegelman, BM. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*, **10**, 1096-1107.
166. Kim, JB, Wright, HM, Wright, M & Spiegelman, BM. (1998b). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4333-4337.
167. Kim, JY, van de Wall, E, Laplante, M, Azzara, A, Trujillo, ME, Hofmann, SM, Schraw, T, Durand, JL, Li, H, Li, G, Jelicks, LA, Mehler, MF, Hui, DY, Deshaies, Y, Shulman, GI, Schwartz, GJ & Scherer, PE. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*, **117**, 2621-2637.
168. Kim, MS, Rossi, M, Abusnana, S, Sunter, D, Morgan, DG, Small, CJ, Edwards, CM, Heath, MM, Stanley, SA, Seal, LJ, Bhatti, JR, Smith, DM, Ghatei, MA & Bloom, SR. (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*, **49**, 177-182.
169. Kinzig, KP, D'Alessio, DA & Seeley, RJ. (2002). The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J Neurosci*, **22**, 10470-10476.
170. Kirchner, H, Heppner, KM & Tschop, MH. (2012). The role of ghrelin in the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol*, 161-184.
171. Kirpichnikov, D, McFarlane, SI & Sowers, JR. (2002). Metformin: an update. *Ann Intern Med*, **137**, 25-33.

172. Kishi, T, Aschkenasi, CJ, Lee, CE, Mountjoy, KG, Saper, CB & Elmquist, JK. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, **457**, 213-235.
173. Kojima, M, Hosoda, H, Date, Y, Nakazato, M, Matsuo, H & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656-660.
174. Kola, B, Hubina, E, Tucci, SA, Kirkham, TC, Garcia, EA, Mitchell, SE, Williams, LM, Hawley, SA, Hardie, DG, Grossman, AB & Korbonsits, M. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **280**, 25196-25201.
175. Kopp, A, Buechler, C, Bala, M, Neumeier, M, Scholmerich, J & Schaffler, A. (2010). Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. *Endocrinology*, **151**, 1097-1108.
176. Kovacs, A, Laszlo, K, Galosi, R, Toth, K, Ollmann, T, Peczely, L & Lenard, L. (2012). Microinjection of RFRP-1 in the central nucleus of amygdala decreases food intake in the rat. *Brain Res Bull*, **88**, 589-595.
177. Koylu, EO, Couceyro, PR, Lambert, PD, Ling, NC, DeSouza, EB & Kuhar, MJ. (1997). Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol*, **9**, 823-833.
178. Kozak, LP. (2010). Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell Metab*, **11**, 263-267.
179. Krude, H, Biebermann, H, Luck, W, Horn, R, Brabant, G & Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*, **19**, 155-157.

180. Kubota, N, Yano, W, Kubota, T, Yamauchi, T, Itoh, S, Kumagai, H, Kozono, H, Takamoto, I, Okamoto, S, Shiuchi, T, Suzuki, R, Satoh, H, Tsuchida, A, Moroi, M, Sugi, K, Noda, T, Ebinuma, H, Ueta, Y, Kondo, T, Araki, E, Ezaki, O, Nagai, R, Tobe, K, Terauchi, Y, Ueki, K, Minokoshi, Y & Kadowaki, T. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*, **6**, 55-68.
181. Kuk, JL, Katzmarzyk, PT, Nichaman, MZ, Church, TS, Blair, SN & Ross, R. (2006). Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity (Silver Spring)*, **14**, 336-341.
182. Kuo, LE, Kitlinska, JB, Tilan, JU, Li, L, Baker, SB, Johnson, MD, Lee, EW, Burnett, MS, Fricke, ST, Kvetnansky, R, Herzog, H & Zukowska, Z. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med*, **13**, 803-811.
183. La Cava, A & Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*, **4**, 371-379.
184. Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*, **32 Suppl 7**, S39-S51.
185. Lambert, PD, Couceyro, PR, McGirr, KM, Dall Vechia, SE, Smith, Y & Kuhar, MJ. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*, **29**, 293-298.
186. Langhans, W. (2007). Signals generating anorexia during acute illness. *Proc Nutr Soc*, **66**, 321-330.
187. Le Marec, O, Neveu, C, Lefranc, B, Dubessy, C, Boutin, JA, Do-Rego, JC, Costentin, J, Tonon, MC, Tena-Sempere, M, Vaudry, H & Leprince, J. (2011). Structure-activity relationships of a series of analogues of the RFamide-related peptide 26RFa. *J Med Chem*, **54**, 4806-4814.

188. Le Roux, CW & Bloom, SR. (2005). Peptide YY, appetite and food intake. *Proc Nutr Soc*, **64**, 213-216.
189. Lectez, B, Jeandel, L, El-Yamani, FZ, Arthaud, S, Alexandre, D, Mardargent, A, Jegou, S, Mounien, L, Bizet, P, Magoul, R, Anouar, Y & Chartrel, N. (2009). The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology*, **150**, 2342-2350.
190. Lee, DK, Nguyen, T, Lynch, KR, Cheng, R, Vanti, WB, Arkhitko, O, Lewis, T, Evans, JF, George, SR & O'Dowd, BF. (2001a). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, **275**, 83-91.
191. Lee, JY, Sohn, KH, Rhee, SH & Hwang, D. (2001b). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, **276**, 16683-16689.
192. Lefrere, I, De, CP, Camelin, JC, Le, LS, Mercier, N, Elshourbagy, N, Bril, A, Berrebi-Bertrand, I, Feve, B & Krief, S. (2002). Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on beta-adrenergic responsiveness. *J Biol Chem*, **277**, 39169-39178.
193. Lefterova, MI, Zhang, Y, Steger, DJ, Schupp, M, Schug, J, Cristancho, A, Feng, D, Zhuo, D, Stoeckert, CJ, Jr., Liu, XS & Lazar, MA. (2008). PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*, **22**, 2941-2952.
194. Lepper, C & Fan, CM. (2010). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*, **48**, 424-436.
195. Leroith, D. (2012). Pathophysiology of the metabolic syndrome: implications for the cardiometabolic risks associated with type 2 diabetes. *Am J Med Sci*, **343**, 13-16.

196. Liddle, RA, Goldfine, ID, Rosen, MS, Taplitz, RA & Williams, JA. (1985). Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest*, **75**, 1144-1152.
197. Lin, HC & Chey, WY. (2003). Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul Pept*, **114**, 131-135.
198. Lin, S, Shi, YC, Yulyaningsih, E, Aljanova, A, Zhang, L, Macia, L, Nguyen, AD, Lin, EJ, During, MJ, Herzog, H & Sainsbury, A. (2009). Critical role of arcuate Y4 receptors and the melanocortin system in pancreatic polypeptide-induced reduction in food intake in mice. *PLoS One*, **4**, e8488.
199. Liu, Q, Guan, XM, Martin, WJ, McDonald, TP, Clements, MK, Jiang, Q, Zeng, Z, Jacobson, M, Williams, DL, Jr., Yu, H, Bomford, D, Figueroa, D, Mallee, J, Wang, R, Evans, J, Gould, R & Austin, CP. (2001). Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem*, **276**, 36961-36969.
200. Liu, Y, Zhang, Y, Li, S, Huang, W, Liu, X, Lu, D, Meng, Z & Lin, H. (2009a). Molecular cloning and functional characterization of the first non-mammalian 26RFa/QRFP orthologue in Goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol*, **303**, 82-90.
201. Liu, Y, Zhang, Y, Li, S, Huang, W, Liu, X, Lu, D, Meng, Z & Lin, H. (2009b). Molecular cloning and functional characterization of the first non-mammalian 26RFa/QRFP orthologue in Goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol*, **303**, 82-90.
202. Locke, RM, Rial, E, Scott, ID & Nicholls, DG. (1982). Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria. *Eur J Biochem*, **129**, 373-380.

203. Longo, KA, Wright, WS, Kang, S, Gerin, I, Chiang, SH, Lucas, PC, Opp, MR & MacDougald, OA. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem*, **279**, 35503-35509.
204. Luiken, JJ, Coort, SL, Willems, J, Coumans, WA, Bonen, A, van der Vusse, GJ & Glatz, JF. (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, **52**, 1627-1634.
205. Lumeng, CN, Bodzin, JL & Saltiel, AR. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, **117**, 175-184.
206. Lutz, TA. (2005). Pancreatic amylin as a centrally acting satiating hormone. *Curr Drug Targets*, **6**, 181-189.
207. MacDonald, L, Radler, M, Paolini, AG & Kent, S. (2011). Calorie restriction attenuates LPS-induced sickness behavior and shifts hypothalamic signaling pathways to an anti-inflammatory bias. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **301**, R172-R184.
208. MacLean, DB. (1985). Abrogation of peripheral cholecystokinin-satiety in the capsaicin treated rat. *Regul Pept*, **11**, 321-333.
209. Maffei, M, Halaas, J, Ravussin, E, Pratley, RE, Lee, GH, Zhang, Y, Fei, H, Kim, S, Lallone, R, Ranganathan, S & . (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, **1**, 1155-1161.
210. Marin, P, Andersson, B, Ottosson, M, Olbe, L, Chowdhury, B, Kvist, H, Holm, G, Sjostrom, L & Bjorntorp, P. (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism*, **41**, 1242-1248.

211. Marks, JL, Porte, D, Jr., Stahl, WL & Baskin, DG. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*, **127**, 3234-3236.
212. Massiera, F, Bloch-Faure, M, Ceiler, D, Murakami, K, Fukamizu, A, Gasc, JM, Quignard-Boulangé, A, Negrel, R, Ailhaud, G, Seydoux, J, Meneton, P & Teboul, M. (2001a). Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*, **15**, 2727-2729.
213. Massiera, F, Seydoux, J, Geloën, A, Quignard-Boulangé, A, Turban, S, Saint-Marc, P, Fukamizu, A, Negrel, R, Ailhaud, G & Teboul, M. (2001b). Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*, **142**, 5220-5225.
214. Maury, E & Brichard, SM. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, **314**, 1-16.
215. McGillicuddy, FC, Chiquoine, EH, Hinkle, CC, Kim, RJ, Shah, R, Roche, HM, Smyth, EM & Reilly, MP. (2009). Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J Biol Chem*, **284**, 31936-31944.
216. Medina-Gomez, G, Gray, SL, Yetukuri, L, Shimomura, K, Virtue, S, Campbell, M, Curtis, RK, Jimenez-Linan, M, Blount, M, Yeo, GS, Lopez, M, Seppanen-Laakso, T, Ashcroft, FM, Oresic, M & Vidal-Puig, A. (2007). PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet*, **3**, e64.
217. Memon, RA, Feingold, KR, Moser, AH, Doerrler, W & Grunfeld, C. (1992). In vivo effects of interferon-alpha and interferon-gamma on lipolysis and ketogenesis. *Endocrinology*, **131**, 1695-1702.

218. Minokoshi, Y, Alquier, T, Furukawa, N, Kim, YB, Lee, A, Xue, B, Mu, J, Fofelle, F, Ferre, P, Birnbaum, MJ, Stuck, BJ & Kahn, BB. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, **428**, 569-574.
219. Minokoshi, Y, Kim, YB, Peroni, OD, Fryer, LG, Muller, C, Carling, D & Kahn, BB. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, **415**, 339-343.
220. Mondal, MS, Date, Y, Yamaguchi, H, Toshinai, K, Tsuruta, T, Kangawa, K & Nakazato, M. (2005). Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept*, **126**, 55-59.
221. Montague, CT, Farooqi, IS, Whitehead, JP, Soos, MA, Rau, H, Wareham, NJ, Sewter, CP, Digby, JE, Mohammed, SN, Hurst, JA, Cheetham, CH, Earley, AR, Barnett, AH, Prins, JB & O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, **387**, 903-908.
222. Moriya, R, Sano, H, Umeda, T, Ito, M, Takahashi, Y, Matsuda, M, Ishihara, A, Kanatani, A & Iwaasa, H. (2006). RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology*, **147**, 2916-2922.
223. Moss, RB, Moll, T, El-Kalay, M, Kohne, C, Soo, HW, Encinas, J & Carlo, DJ. (2004). Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther*, **4**, 1887-1896.
224. Motojima, K, Passilly, P, Peters, JM, Gonzalez, FJ & Latruffe, N. (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*, **273**, 16710-16714.

225. Mulumba, M, Jossart, C, Granata, R, Gallo, D, Escher, E, Ghigo, E, Servant, MJ, Marleau, S & Ong, H. (2010). GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol Endocrinol*, **24**, 1615-1625.
226. Navarro, VM, Fernandez-Fernandez, R, Nogueiras, R, Vigo, E, Tovar, S, Chartrel, N, Le, MO, Leprince, J, Aguilar, E, Pinilla, L, Dieguez, C, Vaudry, H & Tena-Sempere, M. (2006). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol*, **573**, 237-249.
227. Nedergaard, J, Bengtsson, T & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293**, E444-E452.
228. Nedergaard, J, Petrovic, N, Lindgren, EM, Jacobsson, A & Cannon, B. (2005). PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*, **1740**, 293-304.
229. Neveu, C, Lefranc, B, Tasseau, O, Do-Rego, JC, Bourmaud, A, Chan, P, Bauchat, P, Le, MO, Chuquet, J, Guilhaudis, L, Boutin, JA, Segalas-Milazzo, I, Costentin, J, Vaudry, H, Baudy-Floc'h, M, Vaudry, D & Leprince, J. (2012). Rational design of a low molecular weight, stable, potent, and long-lasting GPR103 aza-beta3-pseudopeptide agonist. *J Med Chem*, **55**, 7516-7524.
230. Nieto-Vazquez, I, Fernandez-Veledo, S, Kramer, DK, Vila-Bedmar, R, Garcia-Guerra, L & Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem*, **114**, 183-194.
231. Nijenhuis, WA, Oosterom, J & Adan, RA. (2001). AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol*, **15**, 164-171.
232. Nishimura, S, Manabe, I, Nagasaki, M, Eto, K, Yamashita, H, Ohsugi, M, Otsu, M, Hara, K, Ueki, K, Sugiura, S, Yoshimura, K, Kadowaki, T & Nagai, R. (2009).

- CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*, **15**, 914-920.
233. Ntambi, JM & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, **130**, 3122S-3126S.
234. Nusinzon, I & Horvath, CM. (2003). Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14742-14747.
235. Olivecrona, T, Hultin, M, Bergh, M & Olivecrona, G. (1997). Lipoprotein lipase: regulation and role in lipoprotein metabolism. *Proc Nutr Soc*, **56**, 723-729.
236. Ollmann, MM, Wilson, BD, Yang, YK, Kerns, JA, Chen, Y, Gantz, I & Barsh, GS. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, **278**, 135-138.
237. Ouellet, V, Labbe, SM, Blondin, DP, Phoenix, S, Guerin, B, Haman, F, Turcotte, EE, Richard, D & Carpentier, AC. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*, **122**, 545-552.
238. Parhar, I, Ogawa, S & Kitahashi, T. (2012). RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Prog Neurobiol*, **98**, 176-196.
239. Parker, JA & Bloom, SR. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*.
240. Patel, SR, Murphy, KG, Thompson, EL, Patterson, M, Curtis, AE, Ghatei, MA & Bloom, SR. (2008). Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology*, **149**, 4747-4754.

241. Pendyala, S, Walker, JM & Holt, PR. (2012). A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology*.
242. Peserico, A & Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 371832.
243. Polonsky, KS, Given, BD & Van, CE. (1988). Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest*, **81**, 442-448.
244. Porte, D, Jr., Baskin, DG & Schwartz, MW. (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev*, **60**, S20-S29.
245. Poulain-Godefroy, O & Froguel, P. (2007). Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. *Biochem Biophys Res Commun*, **356**, 662-667.
246. Primeaux, SD. (2011). QRFP in female rats: effects on high fat food intake and hypothalamic gene expression across the estrous cycle. *Peptides*, **32**, 1270-1275.
247. Primeaux, SD, Blackmon, C, Barnes, MJ, Braymer, HD & Bray, GA. (2008). Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides*, **29**, 1994-2000.
248. Puigserver, P, Wu, Z, Park, CW, Graves, R, Wright, M & Spiegelman, BM. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**, 829-839.
249. Qaiser, F, Wahab, F, Wiqar, MA, Hashim, R, Leprince, J, Vaudry, H, Tena-Sempere, M & Shahab, M. (2012). Study of the role of novel RF-amide neuropeptides in affecting growth hormone secretion in a representative non-human primate (*Macaca mulatta*). *Endocrine*, **42**, 658-663.

250. Qian, S, Chen, H, Weingarh, D, Trumbauer, ME, Novi, DE, Guan, X, Yu, H, Shen, Z, Feng, Y, Frazier, E, Chen, A, Camacho, RE, Shearman, LP, Gopal-Truter, S, MacNeil, DJ, Van der Ploeg, LH & Marsh, DJ. (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol*, **22**, 5027-5035.
251. Rabe, K, Lehrke, M, Parhofer, KG & Broedl, UC. (2008). Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*, **14**, 741-751.
252. Rani, MR & Ransohoff, RM. (2005). Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, **25**, 788-798.
253. Ravussin, E & Galgani, JE. (2011). The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr*, **31**, 33-47.
254. Richard, D, Carpentier, AC, Dore, G, Ouellet, V & Picard, F. (2010). Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)*, **34 Suppl 2**, S59-S66.
255. Rocha, VZ, Folco, EJ, Sukhova, G, Shimizu, K, Gotsman, I, Vernon, AH & Libby, P. (2008). Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res*, **103**, 467-476.
256. Rondinone, CM. (2006). Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*, **29**, 81-90.
257. Ronti, T, Lupattelli, G & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **64**, 355-365.
258. Roseberry, AG, Liu, H, Jackson, AC, Cai, X & Friedman, JM. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron*, **41**, 711-722.

259. Roselli-Reh fuss, L, Mountjoy, KG, Robbins, LS, Mortrud, MT, Low, MJ, Tatro, JB, Entwistle, ML, Simerly, RB & Cone, RD. (1993). Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8856-8860.
260. Rosen, ED, Sarraf, P, Troy, AE, Bradwin, G, Moore, K, Milstone, DS, Spiegelman, BM & Mortensen, RM. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, **4**, 611-617.
261. Rossi, M, Kim, MS, Morgan, DG, Small, CJ, Edwards, CM, Sunter, D, Abusnana, S, Goldstone, AP, Russell, SH, Stanley, SA, Smith, DM, Yagaloff, K, Ghatei, MA & Bloom, SR. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, **139**, 4428-4431.
262. Rothwell, NJ & Stock, MJ. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, **281**, 31-35.
263. Rupnick, MA, Panigrahy, D, Zhang, CY, Dallabrida, SM, Lowell, BB, Langer, R & Folkman, MJ. (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10730-10735.
264. Sato, T, Fukue, Y, Teranishi, H, Yoshida, Y & Kojima, M. (2005). Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*, **146**, 2510-2516.
265. Scarpulla, RC. (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, **286**, 81-89.
266. Schaeffler, A, Gross, P, Buettner, R, Bollheimer, C, Buechler, C, Neumeier, M, Kopp, A, Schoelmerich, J & Falk, W. (2009). Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*, **126**, 233-245.

267. Schaffler, A & Scholmerich, J. (2010). Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*, **31**, 228-235.
268. Schaffler, A, Scholmerich, J & Salzberger, B. (2007). Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol*, **28**, 393-399.
269. Schmidt, PT, Naslund, E, Gryback, P, Jacobsson, H, Hartmann, B, Holst, JJ & Hellstrom, PM. (2003). Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regul Pept*, **116**, 21-25.
270. Schoonjans, K, Watanabe, M, Suzuki, H, Mahfoudi, A, Krey, G, Wahli, W, Grimaldi, P, Staels, B, Yamamoto, T & Auwerx, J. (1995). Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, **270**, 19269-19276.
271. Schulze, MB, Shai, I, Rimm, EB, Li, T, Rifai, N & Hu, FB. (2005). Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes*, **54**, 534-539.
272. Seale, P, Bjork, B, Yang, W, Kajimura, S, Chin, S, Kuang, S, Scime, A, Devarakonda, S, Conroe, HM, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Rudnicki, MA, Beier, DR & Spiegelman, BM. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, **454**, 961-967.
273. Sell, H & Eckel, J. (2007). Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 258-262.
274. Sengenès, C, Bouloumie, A, Hauner, H, Berlan, M, Busse, R, Lafontan, M & Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem*, **278**, 48617-48626.

275. Sengenès, C, Miranville, A, Lolmede, K, Curat, CA & Bouloumie, A. (2007). The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med*, **262**, 415-421.
276. Serino, M, Luche, E, Gres, S, Baylac, A, Berge, M, Cenac, C, Waget, A, Klopp, P, Iacovoni, J, Klopp, C, Mariette, J, Bouchez, O, Lluch, J, Ouarne, F, Monsan, P, Valet, P, Roques, C, Amar, J, Bouloumie, A, Theodorou, V & Burcelin, R. (2012). Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*, **61**, 543-553.
277. Shen, JJ, Huang, L, Li, L, Jorgez, C, Matzuk, MM & Brown, CW. (2009). Deficiency of growth differentiation factor 3 protects against diet-induced obesity by selectively acting on white adipose. *Mol Endocrinol*, **23**, 113-123.
278. Shi, H, Kokoeva, MV, Inouye, K, Tzameli, I, Yin, H & Flier, JS. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, **116**, 3015-3025.
279. Shu, Y, Sheardown, SA, Brown, C, Owen, RP, Zhang, S, Castro, RA, Ianculescu, AG, Yue, L, Lo, JC, Burchard, EG, Brett, CM & Giacomini, KM. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*, **117**, 1422-1431.
280. Siersbaek, R, Nielsen, R, John, S, Sung, MH, Baek, S, Loft, A, Hager, GL & Mandrup, S. (2011a). Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J*, **30**, 1459-1472.
281. Siersbaek, R, Nielsen, R, John, S, Sung, MH, Baek, S, Loft, A, Hager, GL & Mandrup, S. (2011b). Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J*, **30**, 1459-1472.
282. Simpson, F & Whitehead, JP. (2010). Adiponectin--it's all about the modifications. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 785-788.

283. Small, CJ & Bloom, SR. (2004). Gut hormones and the control of appetite. *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 259-263.
284. Small, CJ, Kim, MS, Stanley, SA, Mitchell, JR, Murphy, K, Morgan, DG, Ghatei, MA & Bloom, SR. (2001). Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes*, **50**, 248-254.
285. Soares, JB & Leite-Moreira, AF. (2008). Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides*, **29**, 1255-1270.
286. Song, MJ, Kim, KH, Yoon, JM & Kim, JB. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **346**, 739-745.
287. Sorensen, TI, Virtue, S & Vidal-Puig, A. (2010). Obesity as a clinical and public health problem: is there a need for a new definition based on lipotoxicity effects? *Biochim Biophys Acta*, **1801**, 400-404.
288. Spalding, KL, Arner, E, Westermark, PO, Bernard, S, Buchholz, BA, Bergmann, O, Blomqvist, L, Hoffstedt, J, Naslund, E, Britton, T, Concha, H, Hassan, M, Ryden, M, Frisen, J & Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, **453**, 783-787.
289. Stanley, BG, Kyrkouli, SE, Lampert, S & Leibowitz, SF. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, **7**, 1189-1192.
290. Stark, GR, Kerr, IM, Williams, BR, Silverman, RH & Schreiber, RD. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
291. Steger, DJ, Grant, GR, Schupp, M, Tomaru, T, Lefterova, MI, Schug, J, Manduchi, E, Stoeckert, CJ, Jr. & Lazar, MA. (2010). Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev*, **24**, 1035-1044.

292. Stephens, M, Ludgate, M & Rees, DA. (2011). Brown fat and obesity: the next big thing? *Clin Endocrinol (Oxf)*, **74**, 661-670.
293. Strable, MS & Ntambi, JM. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **45**, 199-214.
294. Stryjecki, C & Mutch, DM. (2011). Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. *Eur J Clin Nutr*, **65**, 285-297.
295. Suganami, T & Ogawa, Y. (2010). Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*, **88**, 33-39.
296. Sun, K, Kusminski, CM & Scherer, PE. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, **121**, 2094-2101.
297. Takayanagi, Y & Onaka, T. (2010). Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *FEBS J*, **277**, 4998-5005.
298. Takayasu, S, Sakurai, T, Iwasaki, S, Teranishi, H, Yamanaka, A, Williams, SC, Iguchi, H, Kawasawa, YI, Ikeda, Y, Sakakibara, I, Ohno, K, Ioka, RX, Murakami, S, Dohmae, N, Xie, J, Suda, T, Motoike, T, Ohuchi, T, Yanagisawa, M & Sakai, J. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7438-7443.
299. Takeuchi, K & Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**, E1195-E1209.
300. Tanaka, T, Yoshida, N, Kishimoto, T & Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J*, **16**, 7432-7443.

301. Tang, QQ, Gronborg, M, Huang, H, Kim, JW, Otto, TC, Pandey, A & Lane, MD. (2005). Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9766-9771.
302. Tang, QQ, Zhang, JW & Daniel, LM. (2004). Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 235-239.
303. Tang, W, Zeve, D, Suh, JM, Bosnakovski, D, Kyba, M, Hammer, RE, Tallquist, MD & Graff, JM. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, **322**, 583-586.
304. Tang-Christensen, M, Vrang, N & Larsen, PJ. (2001). Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **25 Suppl 5**, S42-S47.
305. Tanti, JF & Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*, **9**, 753-762.
306. Taylor, JL, Samuel, CE & Grossberg, SE. (1988). Antiviral and antidifferentiative activities of interferon beta and gamma in relation to their induction of double-stranded RNA-dependent protein kinase activity in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, **263**, 1336-1341.
307. Tchoukalova, YD, Votruba, SB, Tchkonina, T, Giorgadze, N, Kirkland, JL & Jensen, MD. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18226-18231.
308. Theander-Carrillo, C, Wiedmer, P, Cettour-Rose, P, Nogueiras, R, Perez-Tilve, D, Pfluger, P, Castaneda, TR, Muzzin, P, Schurmann, A, Szanto, I, Tschop, MH &

- Rohner-Jeanrenaud, F. (2006). Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest*, **116**, 1983-1993.
309. Theofilopoulos, AN, Baccala, R, Beutler, B & Kono, DH. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, **23**, 307-336.
310. Thompson, NM, Gill, DA, Davies, R, Loveridge, N, Houston, PA, Robinson, IC & Wells, T. (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, **145**, 234-242.
311. Tobar, Y, Iijima, N, Tsunekawa, K, Osugi, T, Haraguchi, S, Ubuka, T, Ukena, K, Okanoya, K, Tsutsui, K & Ozawa, H. (2011). Identification, localisation and functional implication of 26RFa orthologue peptide in the brain of zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol*, **23**, 791-803.
312. Tomaszewska-Zaremba, D & Herman, A. (2009). The role of immunological system in the regulation of gonadoliberin and gonadotropin secretion. *Reprod Biol*, **9**, 11-23.
313. Tong, Q, Dalgin, G, Xu, H, Ting, CN, Leiden, JM & Hotamisligil, GS. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*, **290**, 134-138.
314. Tontonoz, P, Graves, RA, Budavari, AI, Erdjument-Bromage, H, Lui, M, Hu, E, Tempst, P & Spiegelman, BM. (1994a). Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5628-5634.
315. Tontonoz, P, Hu, E, Graves, RA, Budavari, AI & Spiegelman, BM. (1994b). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, **8**, 1224-1234.

316. Tontonoz, P & Spiegelman, BM. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem*, **77**, 289-312.
317. Track, NS, McLeod, RS & Mee, AV. (1980). Human pancreatic polypeptide: studies of fasting and postprandial plasma concentrations. *Can J Physiol Pharmacol*, **58**, 1484-1489.
318. Trayhurn, P, Hoggard, N, Mercer, JG & Rayner, DV. (1999). Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **23 Suppl 1**, 22-28.
319. Trayhurn, P & Wood, IS. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, **92**, 347-355.
320. Trigatti, BL, Anderson, RG & Gerber, GE. (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **255**, 34-39.
321. Trinchieri, G & Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, **7**, 179-190.
322. Tschop, M & Heiman, ML. (2001). Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **109**, 307-319.
323. Tschop, M, Smiley, DL & Heiman, ML. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**, 908-913.
324. Tschop, M, Wawarta, R, Riepl, RL, Friedrich, S, Bidlingmaier, M, Landgraf, R & Folwaczny, C. (2001a). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, **24**, RC19-RC21.
325. Tschop, M, Weyer, C, Tataranni, PA, Devanarayan, V, Ravussin, E & Heiman, ML. (2001b). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, **50**, 707-709.

326. Tseng, YH, Kokkotou, E, Schulz, TJ, Huang, TL, Winnay, JN, Taniguchi, CM, Tran, TT, Suzuki, R, Espinoza, DO, Yamamoto, Y, Ahrens, MJ, Dudley, AT, Norris, AW, Kulkarni, RN & Kahn, CR. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, **454**, 1000-1004.
327. Tsukumo, DM, Carvalho-Filho, MA, Carvalheira, JB, Prada, PO, Hirabara, SM, Schenka, AA, Araujo, EP, Vassallo, J, Curi, R, Velloso, LA & Saad, MJ. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **56**, 1986-1998.
328. Turnbaugh, PJ, Ley, RE, Mahowald, MA, Magrini, V, Mardis, ER & Gordon, JI. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027-1031.
329. Tzamelis, I, Fang, H, Ollero, M, Shi, H, Hamm, JK, Kievit, P, Hollenberg, AN & Flier, JS. (2004). Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 36093-36102.
330. Ukena, K, Tachibana, T, Iwakoshi-Ukena, E, Saito, Y, Minakata, H, Kawaguchi, R, Osugi, T, Tobar, Y, Leprince, J, Vaudry, H & Tsutsui, K. (2010). Identification, localization, and function of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RFa, and its cognate receptor, G protein-coupled receptor-103. *Endocrinology*, **151**, 2255-2264.
331. Ukena, K, Vaudry, H, Leprince, J & Tsutsui, K. (2011). Molecular evolution and functional characterization of the orexigenic peptide 26RFa and its receptor in vertebrates. *Cell Tissue Res*, **343**, 475-481.
332. Uldry, M, Yang, W, St-Pierre, J, Lin, J, Seale, P & Spiegelman, BM. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*, **3**, 333-341.

333. Valet, P, Berlan, M, Beauville, M, Crampes, F, Montastruc, JL & Lafontan, M. (1990). Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Clin Invest*, **85**, 291-295.
334. Vila-Bedmar, R & Fernandez-Veledo, S. (2011). A new era for brown adipose tissue: New insights into brown adipocyte function and differentiation. *Arch Physiol Biochem*, **117**, 195-208.
335. Villanueva, CJ, Waki, H, Godio, C, Nielsen, R, Chou, WL, Vargas, L, Wroblewski, K, Schmedt, C, Chao, LC, Boyadjian, R, Mandrup, S, Hevener, A, Saez, E & Tontonoz, P. (2011). TLE3 is a dual-function transcriptional coregulator of adipogenesis. *Cell Metab*, **13**, 413-427.
336. Villena, JA, Roy, S, Sarkadi-Nagy, E, Kim, KH & Sul, HS. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, **279**, 47066-47075.
337. Virtue, S & Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*, **1801**, 338-349.
338. Vohl, MC, Sladek, R, Robitaille, J, Gurd, S, Marceau, P, Richard, D, Hudson, TJ & Tchernof, A. (2004). A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res*, **12**, 1217-1222.
339. Vrang, N, Larsen, PJ, Clausen, JT & Kristensen, P. (1999). Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci*, **19**, RC5.
340. Wada, T, Hoshino, M, Kimura, Y, Ojima, M, Nakano, T, Koya, D, Tsuneki, H & Sasaoka, T. (2011). Both type I and II IFN induce insulin resistance by inducing

- different isoforms of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **300**, E1112-E1123.
341. Wahab, F, Salahuddin, H, Anees, M, Leprince, J, Vaudry, H, Tena-Sempere, M & Shahab, M. (2012). Study of the effect of 26RF- and 43RF-amides on testosterone and prolactin secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Peptides*, **36**, 23-28.
342. Waite, KJ, Floyd, ZE, Arbour-Reily, P & Stephens, JM. (2001). Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes. *J Biol Chem*, **276**, 7062-7068.
343. Wajchenberg, BL. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, **21**, 697-738.
344. Wang, H & Eckel, RH. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **297**, E271-E288.
345. Wang, L, Basa, NR, Shaikh, A, Luckey, A, Heber, D, St-Pierre, DH & Tache, Y. (2006). LPS inhibits fasted plasma ghrelin levels in rats: role of IL-1 and PGs and functional implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **291**, G611-G620.
346. Wang, Y, Curry, HM, Zwilling, BS & Lafuse, WP. (2005). Mycobacteria inhibition of IFN-gamma induced HLA-DR gene expression by up-regulating histone deacetylation at the promoter region in human THP-1 monocytic cells. *J Immunol*, **174**, 5687-5694.
347. Watkins, PA. (1997). Fatty acid activation. *Prog Lipid Res*, **36**, 55-83.
348. Weisberg, SP, McCann, D, Desai, M, Rosenbaum, M, Leibel, RL & Ferrante, AW, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **112**, 1796-1808.

349. Wierup, N, Richards, WG, Bannon, AW, Kuhar, MJ, Ahren, B & Sundler, F. (2005). CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul Pept*, **129**, 203-211.
350. Wilding, JP, Gilbey, SG, Bailey, CJ, Batt, RA, Williams, G, Ghatei, MA & Bloom, SR. (1993). Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, **132**, 1939-1944.
351. Williams, G, Gill, JS, Lee, YC, Cardoso, HM, Okpere, BE & Bloom, SR. (1989). Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, **38**, 321-327.
352. Winer, S, Chan, Y, Paltser, G, Truong, D, Tsui, H, Bahrami, J, Dorfman, R, Wang, Y, Zielenski, J, Mastronardi, F, Maezawa, Y, Drucker, DJ, Engleman, E, Winer, D & Dosch, HM. (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*, **15**, 921-929.
353. Wiper-Bergeron, N, Wu, D, Pope, L, Schild-Poulter, C & Hache, RJ. (2003). Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J*, **22**, 2135-2145.
354. Wong, S & Pinkney, J. (2004). Role of cytokines in regulating feeding behaviour. *Curr Drug Targets*, **5**, 251-263.
355. Wortley, KE, Garcia, K, Okamoto, H, Thabet, K, Anderson, KD, Shen, V, Herman, JP, Valenzuela, D, Yancopoulos, GD, Tschop, MH, Murphy, A & Sleeman, MW. (2007). Peptide YY regulates bone turnover in rodents. *Gastroenterology*, **133**, 1534-1543.
356. Wu, Z & Boss, O. (2007). Targeting PGC-1 alpha to control energy homeostasis. *Expert Opin Ther Targets*, **11**, 1329-1338.

357. Wu, Z, Rosen, ED, Brun, R, Hauser, S, Adelmant, G, Troy, AE, McKeon, C, Darlington, GJ & Spiegelman, BM. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, **3**, 151-158.
358. Yamamoto, T, Miyazaki, R & Yamada, T. (2009). Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides*, **30**, 1683-1688.
359. Yamamoto, T, Miyazaki, R, Yamada, T & Shinozaki, T. (2011). Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides*, **32**, 1262-1269.
360. Yamamoto, T, Wada, T & Miyazaki, R. (2008). Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience*, **157**, 214-222.
361. Yamauchi, T, Kamon, J, Minokoshi, Y, Ito, Y, Waki, H, Uchida, S, Yamashita, S, Noda, M, Kita, S, Ueki, K, Eto, K, Akanuma, Y, Froguel, P, Foufelle, F, Ferre, P, Carling, D, Kimura, S, Nagai, R, Kahn, BB & Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**, 1288-1295.
362. Yang, K, Guan, H, Arany, E, Hill, DJ & Cao, X. (2008). Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J*, **22**, 2452-2464.
363. Yeh, WC, Cao, Z, Classon, M & McKnight, SL. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*, **9**, 168-181.

364. Zhang, JW, Klemm, DJ, Vinson, C & Lane, MD. (2004). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 4471-4478.
365. Zhang, K, Guo, W, Yang, Y & Wu, J. (2011). JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBPbeta transcription. *J Cell Biochem*, **112**, 488-497.
366. Zhang, Q, Qiu, P, Arreaza, MG, Simon, JS, Golovko, A, Lavery, M, Vassileva, G, Gustafson, EL, Rojas-Triana, A, Bober, LA, Hedrick, JA, Monsma, FJ, Jr., Greene, JR, Bayne, ML & Murgolo, NJ. (2007). P518/Qrpf sequence polymorphisms in SAMP6 osteopenic mouse. *Genomics*, **90**, 629-635.
367. Zhang, Y, Proenca, R, Maffei, M, Barone, M, Leopold, L & Friedman, JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425-432.
368. Zhou, SL, Stump, D, Sorrentino, D, Potter, BJ & Berk, PD. (1992). Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Biol Chem*, **267**, 14456-14461.
369. Zu, L, He, J, Jiang, H, Xu, C, Pu, S & Xu, G. (2009). Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*, **284**, 5915-5926.

Annexe : Liste des publications

1. Articles scientifiques

1. **Jossart C**, Coupal M., McNicoll N, Fournier A, Wilkes BC, and De Léan, A (2005) Photolabeling Study of the Ligand Binding Domain of Natriuretic Peptide Receptor-A : Development of a Model. *Biochemistry*. 44, 2397- 2408.
2. Joubert S, **Jossart C**, McNicoll N. and De Léan A. (2005) Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP-binding site on the natriuretic peptide receptor-A. *FEBS J*. 272, 5572-5583.
3. Bujold K, Rhainds D, **Jossart C**, Febbraio M, Marleau S, Ong H (2009) CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res*. 83, 457-64.
4. Mulumba M*, **Jossart C***, Granata R, Gallo D, Escher E, Ghigo E, Servant MJ, Marleau S, Ong H (2010) GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol Endocrinol*. 24, 1615-25.***Co-premiers auteurs**.
5. Bessi VL, Labbé SM, Huynh DN, Ménard L, **Jossart C**, Febbraio M, Guérin B, Bentourkia M, Lecomte R, Carpentier AC, Ong H, Marleau S. EP 80317, a selective CD36 ligand, show cardioprotective effects against postischaemic myocardial damage in mice. (2012) *Cardiovasc Res*. Epub.

2. Brevet

Jossart C, Mulumba M, Ong H, Lachance Y, Perrissoud D. (2009) Triazole derivatives as ligands of G-protein coupled receptors. United States Patent 20090042905. Déposé par Aeterna Zentaris GmbH.