



HAL
open science

Inflammation du tissu adipeux et vulnérabilité du système nerveux central

Rana Awada

► **To cite this version:**

Rana Awada. Inflammation du tissu adipeux et vulnérabilité du système nerveux central. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2011. Français. NNT : 2011LARE0023 . tel-00783611

HAL Id: tel-00783611

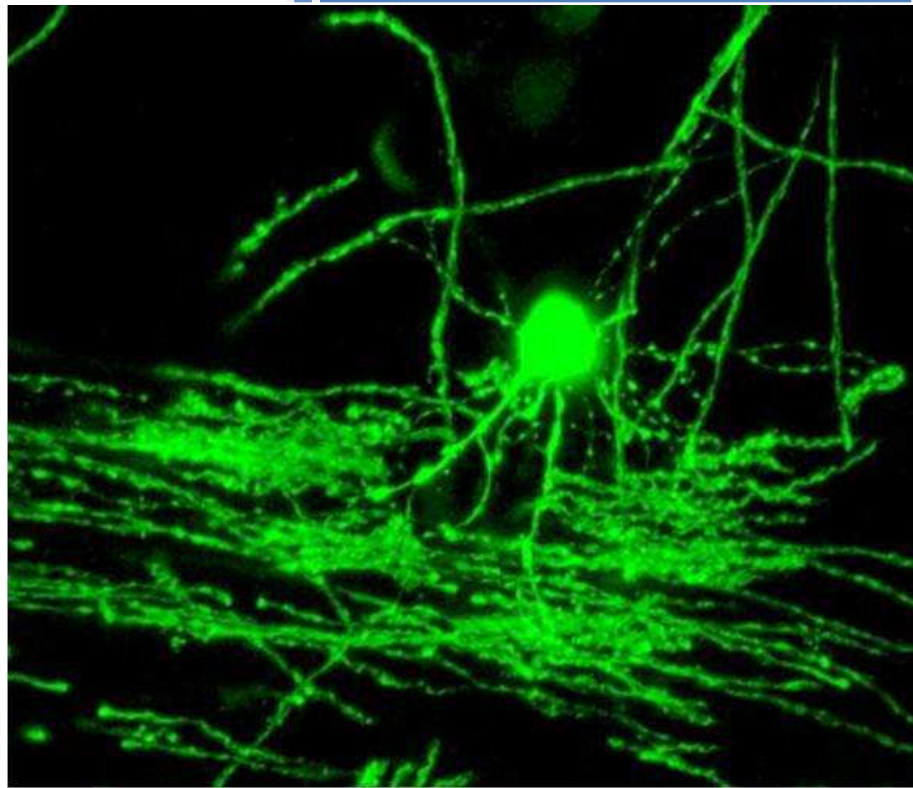
<https://theses.hal.science/tel-00783611>

Submitted on 1 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Inflammation du tissu adipeux et vulnérabilité du système nerveux central



Rana AWADA

Christian LEVBRE D'HELLENCOURT



Université de La Réunion



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de La Réunion

Spécialité : Biologie Cellulaire, Moléculaire et Biochimie

Par

Rana AWADA

**Inflammation du tissu adipeux et
vulnérabilité du système nerveux central**

Soutenue le vendredi 7 Octobre 2011

JURY :

Mme. Anne LORSIGNOL , Pr. Uté Paul Sabatier-Toulouse	Rapporteur
M. Thierry OSTER , MC-HDR Uté Paul Verlaine de Metz-Nancy	Rapporteur
M. Sylvain FISSON , Pr. Uté Evry Val d'Essonne	Examineur
M. Philippe GASQUE , Pr. Uté La Réunion	Examineur
M. Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT , Pr. Uté La Réunion	Directeur

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du Groupe d'Étude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) EA 4516 de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de la Réunion, dirigé par le Pr. Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT.

Ce travail a été financé par la Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Il a bénéficié d'une collaboration avec le Dr. Jean Sébastien SAULNIER-BLACHE, directeur de recherche INSERM à U1048/I2MC de l'Université Paul Sabatier de Toulouse et avec le Dr. Jean HARRY, directeur du programme national de toxicologie du NIEHS, NIH aux Etats-Unis.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent :

A **Christian LEVEBRE D'HELLENCOURT**, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et qui m'a suivie durant ces trois années de thèse.

Merci Christian pour ta disponibilité, ta générosité de répondre à mes questions avec une grande compréhension et ta grande patience dont tu as su faire preuve malgré tes charges professionnelles. Merci pour tous tes efforts, rien n'aurait été fait sans toi.

A **Emmanuel BOURDON**, MC-HDR au GEICO, d'avoir gentiment collaborer au projet stress oxydant. Merci Manu infiniment pour ton encouragement, ton aide et ta contribution majeure à la relecture et à la correction de ce travail.

A **Marie-Paule GONTHIER**, MC-HDR au GEICO, d'avoir eu la gentillesse de lire et corriger mon manuscrit. Merci Marie-Paule pour tes précieux conseils qui ont permis un bon déroulement de ma thèse.

A l'ensemble des membres du GEICO, un grand merci pour leur soutien, leur aide précieuse et leur bonne humeur. L'ambiance, la solidarité et la confiance entre vous m'ont permis d'avancer sereinement. J'ai tout particulièrement apprécié travailler dans une équipe agréable et sympathique.

Aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie vivement de me faire l'honneur de consacrer une partie de vos temps précieux pour juger ce travail. Que vous trouviez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce travail. Merci sincèrement à tous et à toutes.

Enfin, je ne pouvais finir ces remerciements sans mentionner mes parents pour leur confiance inconditionnelle et leur patience. Merci de m'avoir encouragée au bout de ces longues études malgré la distance et de continuer de croire à que je fais. Vous avez été un soutien inestimable.

« إِنَّ الْحَيَاةَ ظِلَامٌ إِلَّا إِذَا صَاحَبَهَا الْحَافِزُ ،
وَكُلُّ حَافِزٍ ضَرِيرٌ إِلَّا إِذَا اقْتَرَنَ بِالْمَعْرِفَةِ ،
وَكُلُّ مَعْرِفَةٍ هَيَاءٌ إِلَّا إِذَا رَاقَهَا الْعَمَلُ
وَكُلُّ عَمَلٍ خَوَاءٌ إِلَّا إِذَا امْتَرَجَ بِالْحُبِّ ،
إِذَا امْتَرَجَ عَمَلُكَ بِالْحُبِّ فَقَدْ وَصَلْتَ نَفْسَكَ بِنَفْسِكَ ، وَبِالنَّاسِ وَبِاللَّهِ »

*« La vie est ténèbre si elle n'est pas animée par un élan,
Et tout élan est aveugle s'il n'est pas guidé par le savoir,
Et tout savoir est vain s'il n'est pas accompagné de labeur,
Et tout labeur est futile s'il n'est pas accompli avec amour ;*

Et quand vous travaillez avec amour vous resserez vos liens avec vous-même, avec autrui, et avec Dieu ».

– Gibran Khalil Gibran –

A mon petit paysle Liban

Table des matières

Liste des abréviations	<i>i</i>
Liste des figures	<i>v</i>
Liste des tableaux	<i>viii</i>
Introduction	1
Objectif de la thèse	93
Résultats et Discussion	97
Conclusions et Perspectives	227
Références bibliographiques	233

Liste des abréviations

- A**
- A β : Amyloid β
 - ACC: Acétyl-Coenzyme A Carboxylase
 - Acr30: Adipocyte Complement-Related protein of 30 KD
 - ADP: Adipose
 - AGRP: Agouti Related Protein
 - α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone
 - AMPK: Activated Protein Kinase
 - AMP1: Adipose Most Abundant gene transcript 1
 - ATX: Autotaxine
 - AVC: Accident Vasculaire Cérébral
- B**
- BAT: Brown Adipose Tissue
 - BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor
 - BHE: Barrière Hémato Encéphalique
- C**
- CART: Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
 - CDC: Centers for Disease Control and Prevention
 - C/EBP: CCAAT-Enhancer Binding Proteins
 - CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
 - COX: Cyclooxygenase
 - cPA: Acide phosphatidique cyclique
 - CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes
 - CR: Récepteurs au Complément
 - CSF: Colony Stimulating Factors
 - CXCL: CXC-Chemokine Ligand
- D**
- DT2: Diabète de Type 2
- E**
- Edg: Endothelial Differentiation Genes
 - E-NPP: Ecto-Nucleotide Pyrophosphatases/ Phosphodiesterases
 - ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
- F**
- FIZZ: Found in Inflammatory Zone
 - FSV: Fraction Stroma Vasculaire
 - FTO: Fat mass and Obesity associated
- G**
- GBP28: Gelatin-Binding Protein of 28 KD
 - GFP: Green Fluorescent Protein
 - GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
 - GPAT: Glycérol-3P Acyl Transferase
 - GPR: G Protein-coupled Receptors
 - GPx: Glutathion Peroxydase
- H**
- HMW: High Molecular Weight
 - HO \cdot Radical Hydroxyle
 - H₂O₂: Peroxyde d'Hydrogène

HPO: Hypothalamo-Hypophysaire-Ovarien
HTA: Hypertension artérielle
HyperTG: Hypertriglycéridémie

I ICAM-1: Inter-Cellular Adhesion Molecule-1

IFN γ : Interferon-gamma
IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1
IL-: Interleukine
IL-1RA: IL-1 Récepteur Antagoniste
IMC: Indice de Masse Corporelle
INSEE: Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
IRM: Imagerie à Résonance Magnétique

J Jak/Stat: Janus Kinas/ Signal Transducer and Activator of Transcription

L LCR: Liquide Céphalo-Rachidien

LDL: Low-Density Lipoprotein
LMW: Low Molecular Weight
LPA: Acide Lysophosphatidique
LPC: Lysophosphatidylcholine
LPP: Lipides Phosphate Phosphohydrolases
LPS: Lipopolysaccharide
LRP: Low density lipoprotein Receptor-related Protein
Lyso-PLD: Lysophospholipase D

M MAC1: Macrophage Antigen Complex-1

MAGK: mono-acyl glycérol kinase
MAPK: Mitogen-Activating Protein Kinase
MARCO: Macrophage Receptor Containing a Collagenous Domain
MC4R: Récepteur de la Mélanocortine 4
MCP1: Chimiokine Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor
MEC: Matrice Extracellulaire
MMW: Middle Molecular Weight
MND: Maladies Neurodégénératives

N NADPH oxydase: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B
NK: Natural Killer
NO: Nitric Oxide
NOS: NO Synthétases
NPY: Neuropeptide Y
NUC: Nuclease-like C-terminal

O O₂⁻ Anion Superoxyde

OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ONOO⁻ Radical Peroxynitrite

P PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PC-1: Prohormone Convertase-1

PDE: Phosphodiester Domain
PET: Positron Emission Tomography
PGE₂: Prostaglandin E₂
PLA: Phospholipase A
POMC: Pro-Opioid Melanocortin
PPAR γ : Peroxisome Proliferation Activated Receptor γ
PPi: Pyrophosphate inorganic
P2y: Purinergic Receptor

R RAGE: Receptor for Advanced Glycation End products

REDIA: Réunion-Diabète
RNS: Reactive Nitrogen Species
ROS: Reactive Oxygen Species
RTH: Rapport de la tour de la Taille/Hanche

S S1P: Sphingosine-1-Phosphate
SMB: Somatomedine B
SNC: Système Nerveux Central
SNP: Système Nerveux Périphérique
SOD: Superoxydes Dismutases
SPC: Sphingosylphosphorylcholine
SR: Scavenger Receptors
SREBP1C: Sterol-Regulatory-Element-Binding Protein1C
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T TA: tissu(s) adipeux
TG: Triglycérides
TH: Lymphocytes T helper
TLR: Toll-like receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TGF: Transforming growth factors

U UCP: Uncoupling Proteins

V VCAM1: Vascular Cell-Adhesion Molecule-1

W WAT: White Adipose Tissue

Liste des figures

Figure I.1 : Prévalence de l'obésité dans le monde.....	3
Figure I.2 : Prévalence de l'obésité en fonction de l'âge et du sexe.....	4
Figure I.3 : Prévalence de l'obésité en fonction des revenus nets mensuels du foyer.....	6
Figure I.4 : Fréquence de complications et pathologies associées à l'obésité.....	7
Figure I.5 : Obésité et risque diabétique.....	8
Figure I.6 : Obésité et risque cardiovasculaire.....	8
Figure I.7 : Obésité et atrophie cérébrale.....	12
Figure I.8 : Obésité et dysfonctionnement cérébral.....	13
Figure II.1 : Tissu adipeux brun de la peau de souris.....	14
Figure II.2 : Différents types cellulaires de tissu adipeux épидидymaire de souris.....	16
Figure II.3 : Imagerie IRM du tissu adipeux abdominal superficiel et profond.....	17
Figure II.4 : Différentes étapes de l'adipogenèse et de la différenciation adipocytaire.....	18
Figure II.5 : Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation chronique.....	20
Figure II.6 : Structure de l'adiponectine et ses effets sur les cellules.....	23
Figure II.7 : Effet de l'adiponectine sur le monocyte/macrophage.....	24
Figure II.8 : Régulation de la prise alimentaire par la leptine.....	26
Figure II.9 : Effet de la leptine sur le monocyte/macrophage.....	27
Figure II.10 : Effet de la résistine sur le monocyte/macrophage.....	29
Figure III.1 : Structure de l'autotaxine.....	35
Figure III.2 : Voie de sécrétion de l'ATX.....	37
Figure III.3 : Voie de synthèse de LPA par l'ATX.....	39
Figure III.4 : Expression du récepteur LPA ₁₋₅ dans le cerveau murin et humain.....	41
Figure III.5 : Voie de signalisation du récepteur LPA ₁₋₅	42
Figure IV.1 : Structure du SNC.....	45
Figure IV.2 : Microglies et neurones du cortex cérébral de souris.....	47
Figure IV.3 : Origine de la microglie et des autres cellules du SNC.....	50
Figure IV.4 : Hétérogénéité morphologique de la microglie.....	54
Figure IV.5 : Activation de la microglie par les récepteurs de l'immunité innée.....	55
Figure IV.6 : Voie de signalisation de TLRs dans la microglie lors des MND.....	57
Figure IV.7 : Effet de la leptine sur la microglie.....	61

Figure IV.8 : Formation de ROS.....	63
Figure IV.9 : Formation de RNS.....	64
Figure IV.10 : Les principales sources de radicaux libres	65
Figure IV.11 : Activation du complexe NADPH oxydase dans les microglies.....	66
Figure IV.12 : Voie oxydative dans les microglies.....	67
Figure M.1 : Méthodologie.....	145
Figure R.I.1 : Western blot de l'expression de l'ATX dans les BV ₂ traitées.....	147
Figure R.I.2 : Western blot de l'expression de l'ATX dans les BV ₂ transfectées.....	148
Figure R.I.3 : Activité enzymatique du PGPH-like.....	149
Figure R.I.4 : Test d'hémolyse.....	150
Figure M.2 : Méthodologie.....	191
Figure R.II.1 : Effet de LPA et Ki ₁₆₄₂₅ sur l'expression de TNF α	194
Figure R.II.2 : Effet de l'ATX sur l'activation NF-kB.....	195
Figure M.3 : Clonage d'un plasmide.....	216
Figure M.4: Principe du clonage Gateway TM	218
Figure R.IV.1 : Expression de l'ARN d'IL-1 β et de TGF β	220
Figure R.IV.2 : Expression de l'ARN de l'adiponectine et de ses récepteurs	221
Figure R.IV.3 : Photos du gel d'agarose du clonage	222
Figure R.IV.4 : Photos du gel d'agarose des produits PCR2	223
Figure R.IV.5 : Photos du gel d'agarose du pDONR 221 recombiné.....	224
Figure R.IV.6 : Effet du TMT sur l'adiponectine chez la souris.....	225
Figure V : Effet de l'ATX sur les microglies.....	230

Liste des tableaux


Tableau I : Classification de l'IMC chez l'adulte	2
Tableau II : Effets inflammatoires des adipokines et les maladies associées	33
Tableau III : Récepteurs au LPA.....	41
Tableau IV: Liste des amorces utilisées.....	215
Tableau V: Caractéristiques des plasmides utilisés	215
Tableau VI : Liste des amorces utilisées pour les PCR1 et PCR2	219
Tableau VII : Les valeurs des Ct.....	221
Tableau VIII: Taille pcDNA3.1 (Zeo+) attendue et estimée	223
Tableau IX : Taille du pDONR 221 recombiné attendue et estimée	214

Introduction > Revue Bibliographique

I. L'obésité : Fléau du XXIe siècle	
I .1. Définition et index de mesure	1
I .2. Des prévalences alarmantes	3
I .3. Etiopathogénie multifactorielle.....	5
I .4. Des conséquences graves.....	7
I .5. Obésité et maladies neurodégénératives	9
II. Le tissu adipeux : Acteur majeur du syndrome inflammatoire chronique	
II .1. Description du tissu adipeux	14
II .2. Du tissu adipeux aux adipocytes et aux adipocytokines	17
II.3. Des adipocytokines dans l'inflammation	20
II.3.1. L'adiponectine	20
II.3.2. La leptine	25
II.3.3. La résistine.....	28
II.3.4. Les cytokines	30
III. L'autotaxine : Nouvelle adipocytokine d'intérêt	
III .1. Caractérisation biochimique.....	34
III .2. Couple ATX-LPA	38
III .3. Récepteurs au LPA.....	39
III .4. Effets biologiques.....	42
IV. Les microglies : Principales cellules immunocompétentes résidentes du SNC	
IV .1. Description du système nerveux central	45
IV .2. Du SNC aux microglies	47
IV.3. Caractéristiques des microglies	51
IV.3.1. Hétérogénéité morphologique et fonctionnelle	51
IV.3.2. Activation rapide.....	54
IV .4. Microglie face à l'inflammation	59
IV .5. Microglie face au stress oxydant	62

Résultats > *Approche expérimentale*

I.	Article 1: « Autotaxin protects microglial cells against oxidative stress »	99
I.1.	Méthodologie	145
I.2.	Principaux résultats	146
I.3.	Discussion	146
I.4.	Conclusion	151
II.	Article 2: « Anti inflammatory effects of autotaxin on microglial cells »	153
II.1.	Méthodologie	191
II.2.	Principaux résultats	192
II.3.	Discussion	192
II.4.	Conclusion	196
III.	Article 3: « Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue »	197
III.1.	Méthodologie	207
III.2.	Principaux résultats	207
III.3.	Discussion	208
III.4.	Conclusion	210
IV.	Chapitre 4: « Effet des adipokines sur la réponse inflammatoire de cellules microgliales »	211
IV.1.	Méthodologie	214
IV.2.	Résultats et discussion	220
IV.3.	Conclusion	225



*Revue
bibliographique*

I. L'obésité : Fléau du XXI^e siècle

I.1. Définition et index de mesure :

De même que nous avons besoin d'oxygène pour respirer, nous avons absolument besoin d'énergie pour que toutes les cellules de notre organisme fonctionnent. Grâce aux constituants alimentaires, l'énergie est apportée à notre organisme par les glucides, les protéines et les lipides, parmi eux, les constituants caractéristiques des corps gras (huiles, margarines, beurre, graisses animales etc.), sont très énergétiques. En effet, quand la quantité d'énergie apportée par notre alimentation est supérieure à la quantité d'énergie que nous dépensons, notre organisme stocke des réserves sous forme de triglycérides dans notre tissu graisseux (tissu adipeux). Ainsi un excès d'apports et/ou une diminution des dépenses énergétiques favorise l'obésité [1]. L'obésité est donc un résultat direct d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique.

« L'obésité peut être simplement définie comme la maladie au cours de laquelle un excédent de masse grasse s'est accumulé jusqu'à avoir des effets indésirables sur la santé. Toutefois, la quantité de graisse en excès, sa répartition dans l'organisme et la morbidité qui lui est associée montrent des variations considérables d'un sujet obèse à l'autre ». Cette définition a été élaborée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui a officiellement déclaré la gravité de la pandémie d'obésité suite à une mesure globale du taux d'obésité en 1997.

Cette pandémie fait des ravages dans le monde entier : « 1 mort de l'obésité toutes les minutes en Europe / USA ». (Source *L'obésité : de l'individu à la société 2004*) Le constat alarmant de ce chiffre démontre bien que nous, citoyens du monde, sommes confrontés désormais à un véritable problème de santé.

La masse de graisse se répartit différemment chez l'homme et la femme. Elle représente 15% du poids corporel de l'homme qui s'accumule plutôt sur l'abdomen et le thorax et 25% du poids de la femme qui s'accumule sur les hanches et les cuisses. Lorsque le taux de graisse dépasse 35% chez la femme et 25% chez l'homme, l'individu est considéré comme obèse.

Il existe plusieurs méthodes pour estimer le pourcentage de graisse d'un individu (mesure de l'épaisseur des plis cutanés, analyse d'impédance bioélectrique ou pesée hydrostatique), l'obésité est le plus souvent définie par l'IMC (Indice de Masse Corporelle).

L'IMC est un paramètre standard international de mesure de l'obésité, qui permet d'évaluer le risque pour la santé associé à un excès ou à une insuffisance de poids. Il correspond au rapport du poids de l'individu (en kilogrammes) sur le carré de sa taille (en mètres) :

$$\text{IMC} = \frac{\text{P (Kg)}}{\text{T (m}^2\text{)}}$$

En appliquant cette formule, l'OMS définit le surpoids chez l'adulte par un $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ et l'obésité par un $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Un IMC supérieur à 40 kg/m^2 signe une obésité morbide qui engendre des problèmes de santé graves, souvent mortels [2]. D'ailleurs, Galien a été le premier à établir une méthode scientifique pour décrire et traiter l'obésité morbide [3]. Le tableau I montre la classification de l'IMC chez l'adulte en fonction du risque de morbidité.

Classification	Catégorie de l'IMC (kg/m ²)	Risque de morbidité
Insuffisance pondérale	< 18,50	Accru
Poids normal	18,5 □ 24,9	Moyen
Surpoids	25,0 □ 29,9	Accru
Obésité, classe I	30,0 □ 34,9	Modérée
classe II	35,0 □ 39,9	Sévère
classe III	≥ 40	Massive

Tableau I : Classification de l'IMC chez l'adulte. *Source : OMS (1998)*

Cependant l'interprétation de l'IMC peut avoir quelques limites. En effet, l'IMC ne donne aucune indication quant à la répartition de la masse grasseuse dans l'organisme dont dépend le risque de complications associées à l'augmentation de la masse grasse. Pour cela, d'autres mesures sont fréquemment utilisées, telles que le rapport du tour de taille sur celui des hanches (RTH). Pour ne pas être considéré en surpoids ou obésité, le RTH doit être inférieur à 1 chez l'homme et à 0,85 chez la femme [4]. Les progrès de l'imagerie médicale ont ensuite permis de connaître de manière détaillée la répartition et la quantification de la graisse au sein de l'organisme par tomographie à densité électronique (CT-scan) ou par imagerie à résonance magnétique (IRM) [5].

I.2. Des Prévalences alarmantes :

L'obésité est une maladie longtemps silencieuse, devenue une épidémie qui sévit dans une large zone géographique et qui touche une forte proportion de la population mondiale de tous âges et de tous sexes.

Une vaste étude internationale parue en 2010 montre que 10% des adultes dans le monde sont obèses. Ce sont en fait 500 millions de personnes adultes qui sont obèses, représentant 9,8% d'hommes et 13,8% de femmes parmi la population mondiale (*Source Creapharma.ch/Statistiques obésité*). L'OMS prévoit en outre que d'ici 2015, environ 2,3 milliards d'adultes auront un surpoids et plus de 700 millions seront obèses.

L'augmentation de la prévalence de l'obésité a été relevée aux Etats-Unis, puis s'est étendue à d'autres pays industrialisés et elle est même désormais bien connue dans les pays en développement [6] (Fig. I.1).

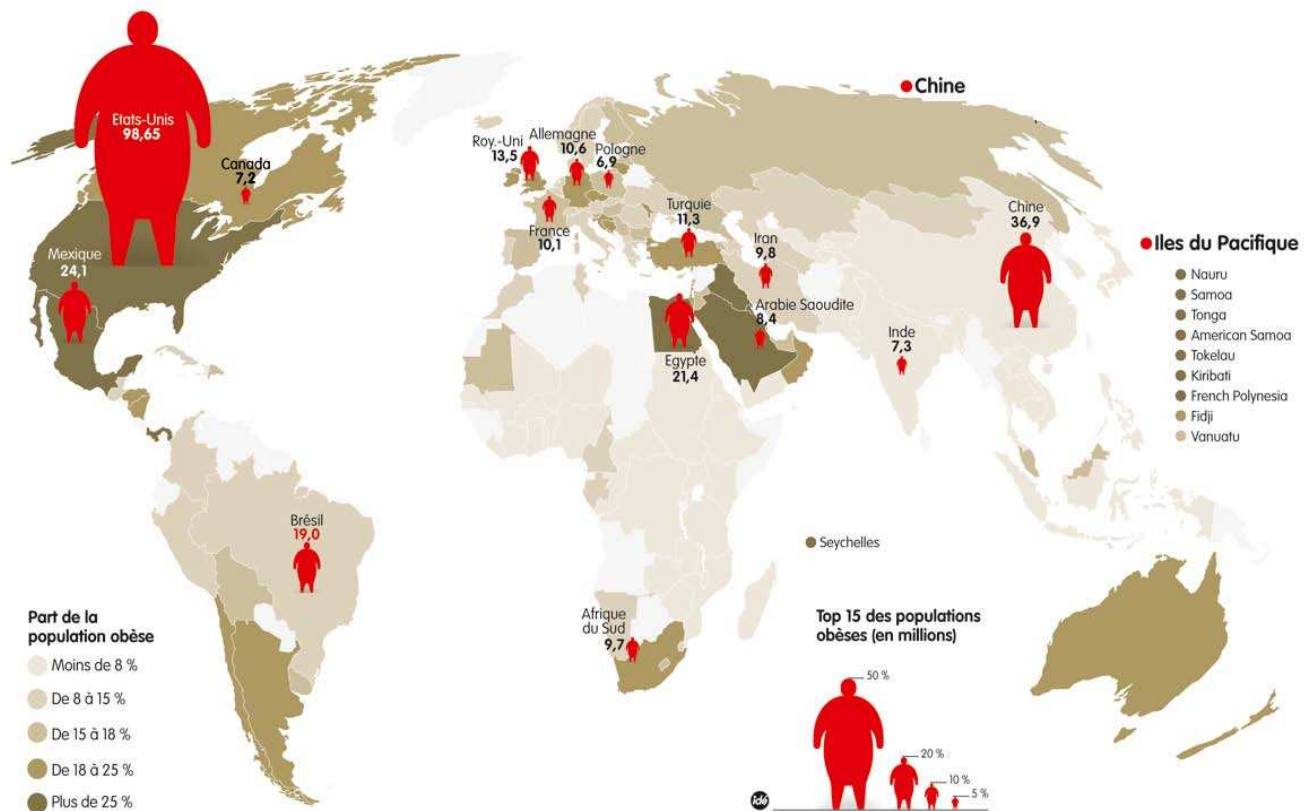


Figure I.1 : Prévalence de l'obésité dans le monde. *Source: OMS (2011)*

Aux Etats-Unis, la prévalence de l'obésité est passée de 34,9% en 2002 à 39% en 2005, soit 72 millions d'adultes obèses dont 33,3% d'hommes et 35,2% de femmes en 2005-2006, selon des statistiques des CDC (Centers for Disease Control and Prevention). L'OMS estime que le taux d'obésité sera de 53% en 2015 [7]. L'obésité coûte chaque année au moins 215 milliards

de dollars aux États-Unis, qu'il s'agisse de coûts directs comme ceux des dépenses médicales, ou indirects comme ceux liés à la perte de productivité (Source Brookings institution).

Le Mexique est le deuxième pays au monde quant à la part d'obèses dans sa population, juste derrière les États-Unis qui est également le numéro 1 mondial de l'obésité infantile. Certains enfants dépassent 6 kg à la naissance (Source cyberpresse.ca/le-mexique-champion-de-lobesite-infantile.php).

La France compterait presque 17% d'individus obèses. La prévalence de l'obésité en France est passée de 8,6% en 1997 à 13,1% en 2006 [8]. L'étude *ObEpi-Roche* en 2009 témoigne d'une augmentation de la prévalence du surpoids de 31,9% et de l'obésité de 14,5%. Ainsi, cette étude montre que la prévalence augmente régulièrement avec l'âge et est plus importante chez la femme que chez l'homme (Fig. I.2). L'OMS estime que d'ici 2015, 20% des français seront considérés comme obèses.

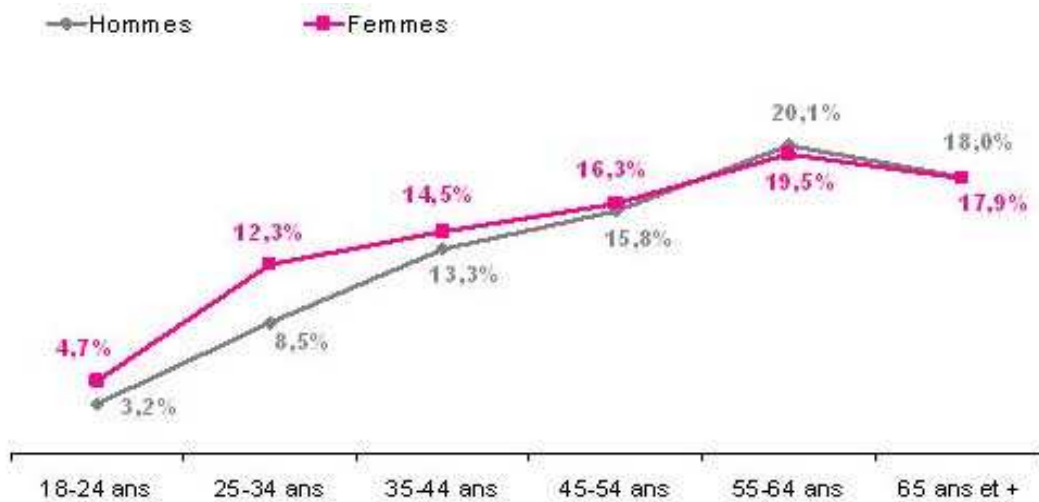


Figure I.2 : Prévalence de l'obésité en fonction de l'âge et du sexe.

Source: *ObEpi-Roche (2009) : évolution de l'obésité et du surpoids en France*

L'île de La Réunion n'est pas épargnée avec une prévalence 3 à 4 fois supérieure à celle observée en métropole [9]. En 2001, l'étude REDIA (Réunion-Diabète) opérée par l'Observatoire Régional de la Santé, a mis en évidence que 13% des réunionnais sont obèses, 1 adulte sur 2 est en surpoids, et que plus de 26% des enfants sont en surpoids ou obèses.

Enfin, la prévalence de l'obésité augmente partout dans le monde à un rythme alarmant. Le monde compte dorénavant plus de personnes obèses que de personnes souffrant de malnutrition. Plus d'un milliard d'habitants sont victimes d'un excès pondéral, tandis que 800

millions de personnes ne mangent pas à leur faim. Aujourd'hui, la menace n'est plus que la sous-alimentation, mais aussi la sur- alimentation.

I.3. Etiopathogénie multifactorielle :

L'explosion récente du nombre d'obèses est attribuée à plusieurs facteurs qu'ils soient d'origine génétique, héréditaire ou non, d'ordres environnementaux, métaboliques, psychologiques, culturels ou économiques, sociaux et politiques [10].

La génétique explique entre 25 à 40 % de la variance de l'IMC [11]. C'est un des facteurs qui explique le fait que deux personnes ayant le même régime et la même hygiène de vie puissent avoir une corpulence très différente. Il n'y a sûrement pas un gène de l'obésité. Cependant, sur nos trente milles gènes, un petit nombre aurait un impact important sur la corpulence et le pourcentage ou la distribution régionale de la masse grasse. Il existe par exemple le gène baptisé ADP (Adipose) qui régule l'accumulation des graisses dans l'organisme [12] de même que le gène FTO (fat mass and obesity associated) impliqué dans l'évolution du poids [13]. Il y a aussi le gène qui contrôle la production de l'UCP1 et de l'UCP2. Les UCP (uncoupling proteins) sont des protéines qui favorisent la production énergétique de chaleur dans la mitochondrie.

Outre les protéines UCP, on connaît d'autres protéines susceptibles d'être impliquées dans la génétique de l'obésité : la leptine qui est le produit du gène ob (souris obèses). Elle se comporte comme une « hormone de satiété » agissant principalement sur le contrôle de la prise alimentaire. Des études ont montré, chez les souris comme chez les humains, qu'une mutation dans le gène de la leptine (ob/ob) provoque l'apparition d'une obésité [14]. Les mêmes conséquences sont observées si le gène de son récepteur (db) n'est pas fonctionnel [15]. Dans une revue du génome humain, cinq grandes classes de traits génétiques associés à l'obésité ont été identifiées [16] :

- un métabolisme énergétique de base faible
- une absence de prédisposition à l'activité physique
- un défaut d'oxydation des lipides
- une grande capacité de stockage des lipides
- une régulation altérée de la satiété

Par conséquent, il semble y avoir une grande variété dans les types d'anomalies génétiques pouvant causer l'obésité.

L'hérédité jouerait un rôle indéniable dans la prise de poids. Il a également été constaté que si

les deux parents ont un poids normal, le risque pour que leur enfant devienne obèse à l'âge adulte est inférieur à 10%. Si l'un des deux parents est obèse, ce risque atteint 40% et grimpe à 80% si les deux le sont. Il est donc courant de rencontrer des familles ayant la même corpulence. Bien que des facteurs héréditaires puissent être responsables de l'apparition de l'obésité, ce sont surtout les facteurs environnementaux qui sont en cause dans la progression fulgurante de l'obésité.

Les facteurs environnementaux sont complexes et multiples : déséquilibres des rythmes alimentaires (aliments industriels hyperénergétiques, alimentation riche en lipides, les grignotages), troubles psychologiques (stress, manque de sommeil), dérèglement hormonal ou glandulaire (grossesse, ménopause), l'écologie microbienne de l'intestin [17], le vieillissement (diminution des dépenses énergétiques totales alors que les apports restent souvent constants), prise de médicaments (neuroleptiques, corticoïdes, pilule, tricycliques), arrêt du tabac.

Par ailleurs, une grande responsabilité est attribuée à un de ces facteurs environnementaux : le mode de vie sédentaire. Il s'explique par une diminution de l'activité physique et une alimentation à densité énergétique élevée (plus riche en graisses et en sucres mais pauvres en micronutriments non énergétiques d'intérêt comme les vitamines, polyphénols et minéraux) [18, 19]. Il existe d'autres facteurs qui sont liés au statut socio-économique. En effet, les études épidémiologiques nationales et internationales ont montré que la prévalence de l'obésité augmente selon les revenus et les catégories socio-professionnelles; il existe environ 3 fois plus de personnes en surpoids chez les agriculteurs que chez les cadres et professions intellectuelles supérieures. La prévalence de l'obésité est donc inversement corrélée au niveau d'instruction et aux revenus du foyer (Fig. I.3).

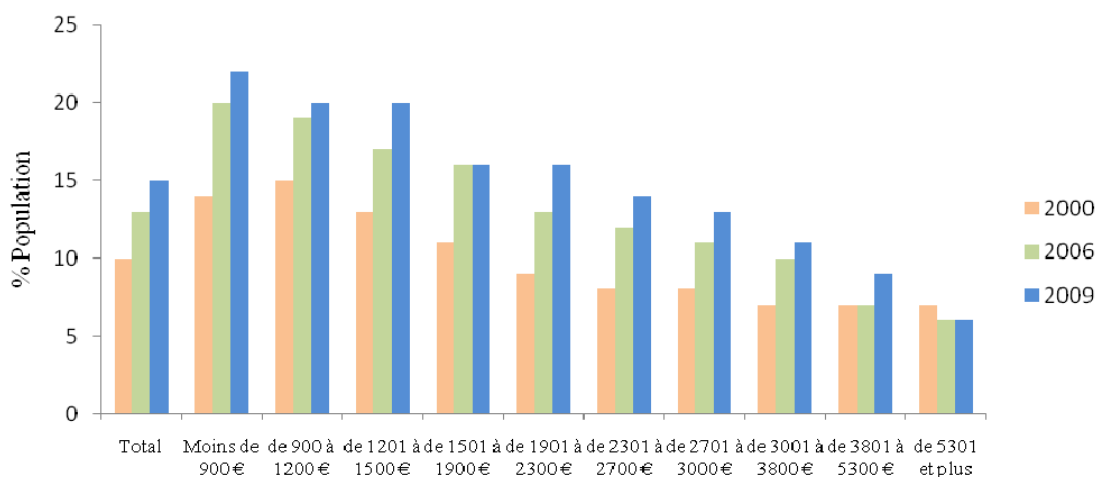


Figure I.3 : Prévalence de l'obésité en fonction des revenus nets mensuels du foyer.

Source: ObEpi-Roche (2009) : évolution de l'obésité et du surpoids en France

Enfin, L'obésité est multifactorielle. Elle résulte de l'expression d'une susceptibilité génétique sous l'influence de facteurs environnementaux. De plus, les modifications de notre mode de vie sont probablement en grande partie responsables de ce « nouveau mal du siècle » qu'est l'obésité et ont une forte influence sur les facteurs génétiques.

I.4. Des conséquences graves :

L'obésité ne constitue pas une pathologie en elle-même. L'obésité est délétère pour l'organisme, car elle est à l'origine du développement d'autres pathologies ayant un impact significatif sur la morbidité et la mortalité telles que les **maladies métaboliques** comme le diabète de type 2 (DT2), l'hypertriglycémie (HyperTG), l'insulino-résistance, la diminution du taux de cholestérol-HDL, la dyslipidémie, les **maladies cardio-vasculaires** comme l'hypertension artérielle (HTA), l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque et les accidents vasculaires cérébraux et périphériques ainsi que de nombreux types de **cancers**. L'obésité est aussi un facteur de risques pour un certain nombre de **maladies neurodégénératives** [20]. Elle peut aussi provoquer d'autres complications liées aux contraintes mécaniques imposées par le développement de la masse grasse comme les désordres respiratoires (asthme, apnée du sommeil) ou les problèmes articulaires (arthrite).

Selon la répartition de la masse grasse dans l'organisme, il y a une grande différence de risque de complications et de maladies associées à l'obésité. On distingue les obésités viscérales ou androïde (abdomino-mésentérique) et gynoïde (fessio-crurale). Les complications hépatiques, métaboliques et cardio-vasculaires sont 3 à 4 fois plus fréquentes en cas d'obésité androïde qu'en cas d'obésité gynoïde (Fig. I.4) et sont 4 à 8 fois plus fréquentes que dans la population des sujets non obèses. A l'inverse, les problèmes articulaires ou les insuffisances veineuses sont plus fréquentes en cas d'obésité gynoïde.

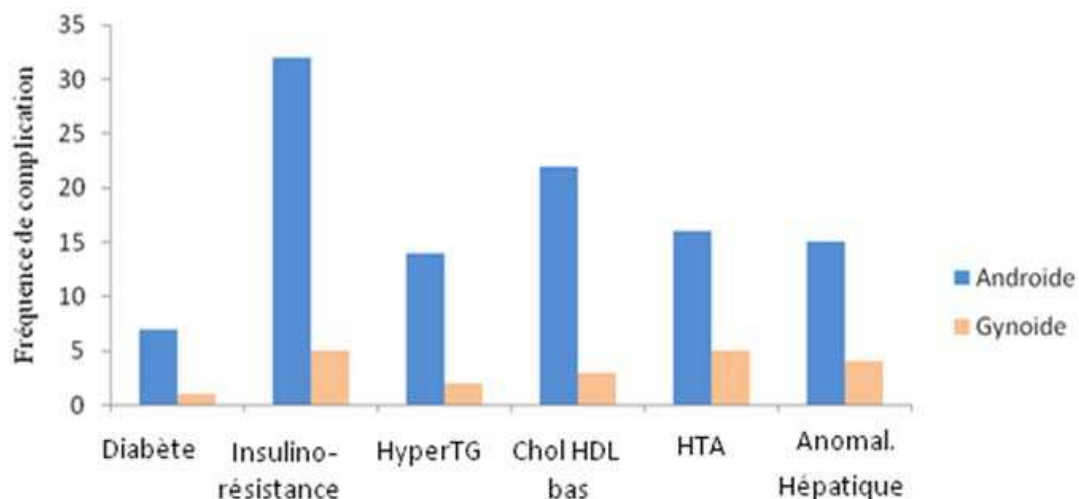


Figure I.4 : Fréquence de complications et pathologies associées à l'obésité.

Source : *anorexie-et-boulimie.fr*

De nombreuses études ont montré le rôle de l'obésité dans l'étiologie du diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Aussi, le risque de développer ces maladies augmente parallèlement à l'indice de masse corporelle et au tour de taille, chez l'homme comme chez la femme [21] (Fig. I.5 et Fig I.6).

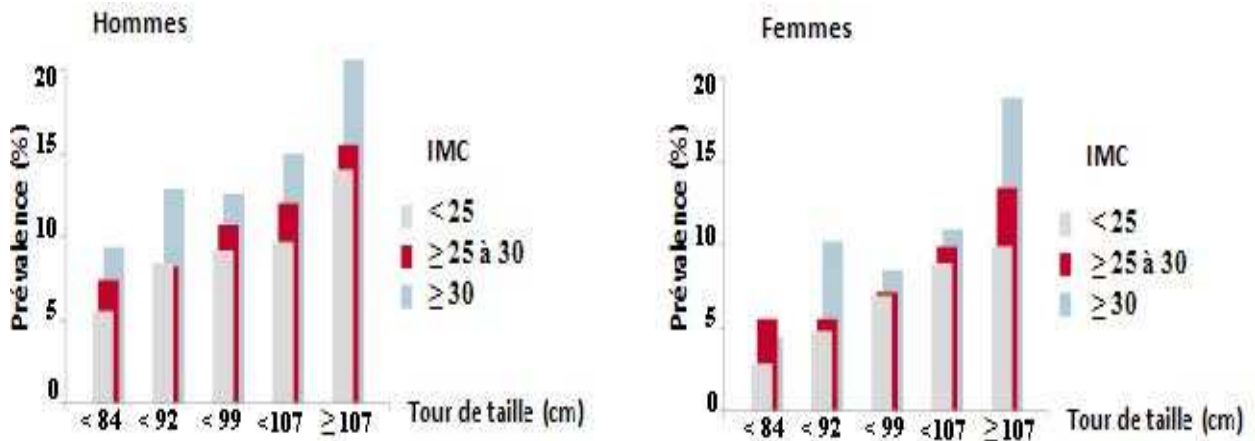


Figure I.5 : Obésité et risque diabétique : Prévalence du diabète de type 2 en fonction de l'IMC et du tour de taille chez l'homme et la femme

Source : *Balkau et al. (2007) [21]*

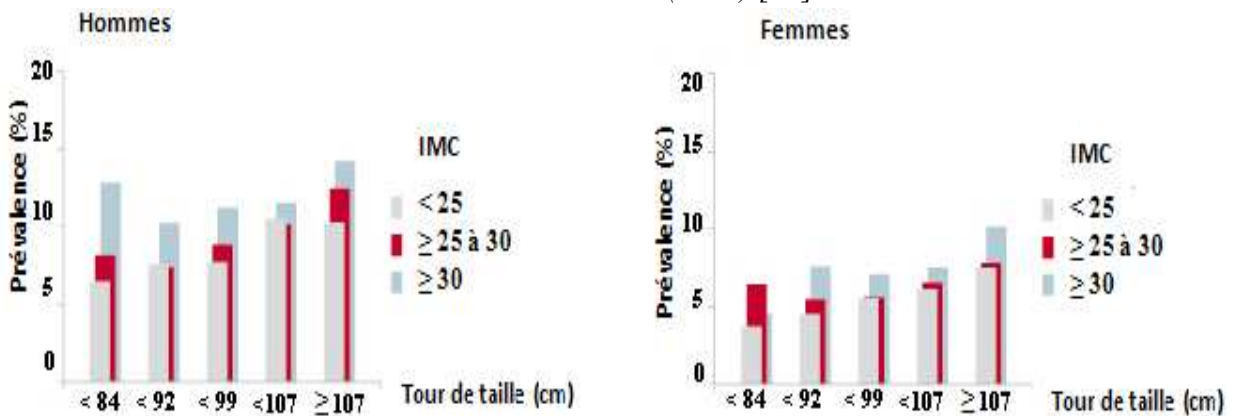


Figure I.6 : Obésité et risque cardiovasculaire : Prévalence de maladies cardiovasculaires en fonction de l'IMC et du tour de taille chez l'homme et la femme.

Source : *Balkau et al. (2007) [21]*

Ainsi, la survenue de certains cancers est corrélée avec l'indice de masse corporelle [22]. Il s'agit en particulier des cancers de la vessie, ceux du pancréas, et de l'estomac [23]. Chez la femme obèse, le risque est plus grand de contracter un cancer du sein, de l'endomètre, des ovaires et des cervicales. L'obésité serait responsable de près de 5 % des cancers de la femme

ménopausée [24]. Chez l'homme, on suspecte l'influence de l'obésité dans le cancer de la prostate et le cancer du rectum et du côlon.

Outre les conséquences physiques, l'obésité entraîne également des **maladies psychiques** dues aux conséquences psychologiques, esthétiques et mentales de l'excès de poids, comme la discrimination, la dépression, les problèmes de confiance en soi.

Enfin, toutes ces conséquences graves sont les principales causes de mortalité dans le monde. L'OMS estime que, dans le monde, 60% des décès annuels sont causés par des maladies chroniques liées à l'obésité. L'obésité est donc devenue la première maladie non infectieuse de l'histoire de l'humanité qui entraîne une espérance de vie de 9 ans inférieure à la moyenne [25].

I. 5. Obésité et maladies neurodégénératives :

Parmi l'ensemble des pathologies associées à l'obésité, nous nous sommes intéressés aux maladies neurodégénératives (MND). La relation entre ces deux pathologies n'a pas été largement étudiée.

Les MND constituent un groupe de pathologies progressives liées à un dysfonctionnement métabolique au sein du tissu nerveux, conduisant à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux. Le cerveau et la moelle épinière peuvent être touchés par des lésions diffuses ou limitées à certaines zones spécifiques (*Source Encyclopaedia Universalis*).

En 2008, d'après l'INSEE (Institut national de la statistique et des études économiques), les maladies neurodégénératives telles que Parkinson, Alzheimer, Huntington ou d'autres (syndrome de Down / trisomie 21, Ataxie de Friedrich, syndrome de Prader-Willi) ont été la 5ème cause de mortalité en France.

Le plus grand facteur de risque pour les MND est le vieillissement. Comme tous les organes, le cerveau subit le processus du vieillissement mais contrairement aux autres organes, très peu de cellules composant le cerveau se renouvellent. Quand un nombre important de neurones se met à dégénérer, les conséquences sont donc très importantes en termes d'invalidité. Le cerveau subit ensuite des modifications anatomiques structurelles et fonctionnelles complexes s'accompagnant parfois de troubles cognitifs, y compris la démence, qui deviennent plus fréquents avec l'âge.

Par exemple, la maladie d'Alzheimer est la plus répandue d'un groupe important de MND appelées « démences ». Il s'agit des affections cérébrales à évolution lente dont la probabilité

d'apparition augmente avec l'avancée en âge. Ce type d'affection se traduit par une dégénérescence progressive de certaines zones du cerveau due à la mort des neurones. Cela entraîne une détérioration des facultés cognitives et de la mémoire provoquant une démence sénile. La maladie d'Alzheimer touche :

- 5% de la population âgée de plus de 65 ans et double à peu près tous les quatre ans pour atteindre environ 30 % chez celles âgées de 80 ans.
- 25 millions de personnes dans le monde.
- Plus de 4 millions de malades aux Etats Unis.
- Près d'un million de français âgés de plus de 65 ans.
- Trois fois plus chez la femme que chez l'homme.
- 50 % des malades ont des troubles du comportement alimentaire
- 30 à 40% des malades perdent du poids avant l'apparition des premières manifestations.
- 50% des malades de plus de 50 ans présentent la démence.

Avec de telles évolutions, il ne fait pas de doute que la maladie d'Alzheimer va devenir un réel problème de société d'ici quelques années.

Plusieurs facteurs de risque modifiables de la démence ont déjà été identifiés, notamment l'obésité. Des études cliniques ont montré que les patients obèses ont un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer [26]. D'ailleurs, le Pr D. Gustafson a été la première à démontrer la relation entre le surpoids et les risques de développer cette maladie dans une étude sur un échantillon de population suédoise [27].

De plus, des études épidémiologiques et des expériences sur l'animal ont montré que la composition de l'alimentation peut avoir un impact sur la démence. En effet, l'alimentation riche en graisses saturées, cholestérol, acide linoléique et en sucres raffinés augmente le risque de démence et diminue la plasticité neuronale et l'apprentissage [28, 29]. Cela pourrait être dû à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation dans le cortex cérébral et à une diminution d'un facteur neurotrophique, le BDNF (Brain derived neurotrophic factor) [29, 30]. Il a été démontré que le surpoids et l'obésité contribuent au stress oxydatif et à l'inflammation chronique, qui pourraient affecter le **fonctionnement du cerveau** et développer la maladie d'Alzheimer. Plusieurs études indiquent que cette inflammation est présente dans le cerveau, suggérant qu'une inflammation en périphérie peut provoquer une neuroinflammation chronique et une neurodégénérescence progressive [31].

L'effet de surpoids ou d'une obésité ne se limite pas à cette maladie, il a également été démontré une relation entre l'indice de masse corporelle, l'atrophie cérébrale et les lésions de la substance blanche chez la femme [32, 33].

En effet, chez les personnes obèses, des anomalies dans la **structure du cerveau** ont été observées. Des études ont montré que l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) est associée à la réduction du volume cérébral [34]. D'autres études ont confirmé ces changements structurels dans le cerveau, en particulier dans le lobe frontal en montrant une diminution du volume de la substance blanche dans ce lobe [35]. Parce que le lobe frontal est plus sensible aux effets du vieillissement que les autres lobes, ces données pourraient suggérer que l'obésité pourrait accélérer le vieillissement.

En IRM, il a également été montré que le volume de la substance blanche dans plusieurs régions du cerveau est plus réduit chez les personnes obèses par rapport aux personnes maigres [36]. Très récemment, deux études ont montré que l'obésité est associée à une atrophie cérébrale et à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

La **première étude** a montré que l'**obésité abdominale** est associée à une diminution du volume du cerveau et à un risque de démence accru plus tard dans la vie chez des personnes d'âge moyen en bonne santé [37]. Cette étude a été menée chez 733 personnes d'un âge médian de 60 ans. Les chercheurs ont examiné l'association de différents indicateurs de l'obésité y compris l'IMC, le RTH, la circonférence de la taille et la graisse abdominale avec le volume total du cerveau, la densité de la substance blanche cérébrale et la présence de plaques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Ils ont trouvé que tous ces indicateurs de l'obésité étaient inversement corrélés avec le volume total du cerveau. Cette corrélation inverse était plus forte pour l'obésité abdominale avec un risque accru de démence et de maladie d'Alzheimer.

La **seconde étude** a montré qu'une variation spécifique du **gène FTO lié à l'obésité** est aussi liée à une atrophie cérébrale, augmentant ainsi le risque de maladie d'Alzheimer [38].

En effet, ils ont comparé les images cérébrales de 200 personnes âgées entre 55 et 90 ans. Celles qui portaient cette variation avaient en moyenne 8% moins de tissus cérébraux dans les lobes frontaux (souvent qualifiés de centres des commandes) et 12% de moins dans les lobes occipitaux (centres de la vision et d'autres perceptions) (Fig.I.7).

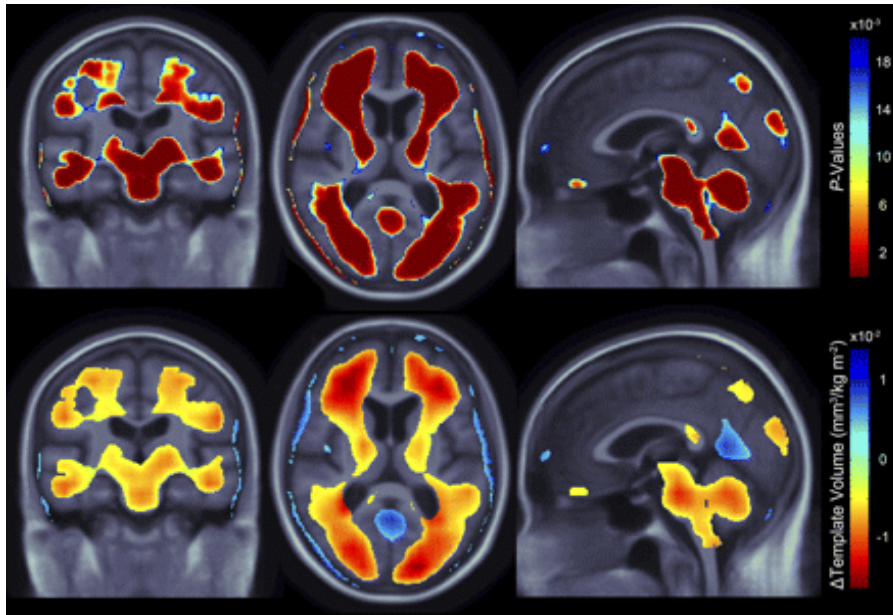


Figure I.7 : Obésité et atrophie cérébrale: Image radiologique des différentes régions cérébrales associées à l'IMC pour l'individu âgé sain (en haut) et l'individu porteur de l'allèle FTO lié à l'obésité (en bas). *Source : Ho et al. (2010) [38]*

C'est la conclusion d'une nouvelle recherche qui a établi que les individus âgés obèses ou en surpoids avaient sensiblement moins de tissu cérébral que les individus de poids normal. L'essentiel de la disparition du tissu cérébral a lieu dans les régions des lobes frontal, temporal et occipital du cerveau. Ainsi, une diminution du volume cérébral augmente le risque de maladie d'Alzheimer en réduisant la réserve dont dispose une personne pour compenser les effets des plaques cérébrales caractéristiques de la maladie. Les accidents vasculaires cérébraux peuvent aussi réduire la quantité de tissus et ainsi diminuer les réserves cérébrales. Des études ont démontré que l'obésité, comme le vieillissement, est un facteur de risque majeur de l'accident vasculaire cérébral ischémique (AVC ischémique) [39-41]. Par ailleurs, des données épidémiologiques suggèrent que les patients obèses souffrent plus de complications et de mortalité que les patients non obèses après un traumatisme crânien [42].

Une autre étude montre que la dopamine peut être un acteur clé dans l'obésité. Elle peut jouer aussi un rôle central sur les structures du cerveau et intervient sur le fonctionnement de toutes les activités de l'être humain. En se liant sur son récepteur, la dopamine peut être impliquée dans plusieurs processus neurologiques du SNC comme la cognition, la mémoire, l'apprentissage. En effet, dans une étude d'imagerie cérébrale faite avec un PET scan (Positron Emission Tomography), il a été démontré que les personnes obèses posséderaient

moins de récepteurs de dopamine dans leur cerveau par rapport à des personnes de poids normal (Fig. I.8) [43].

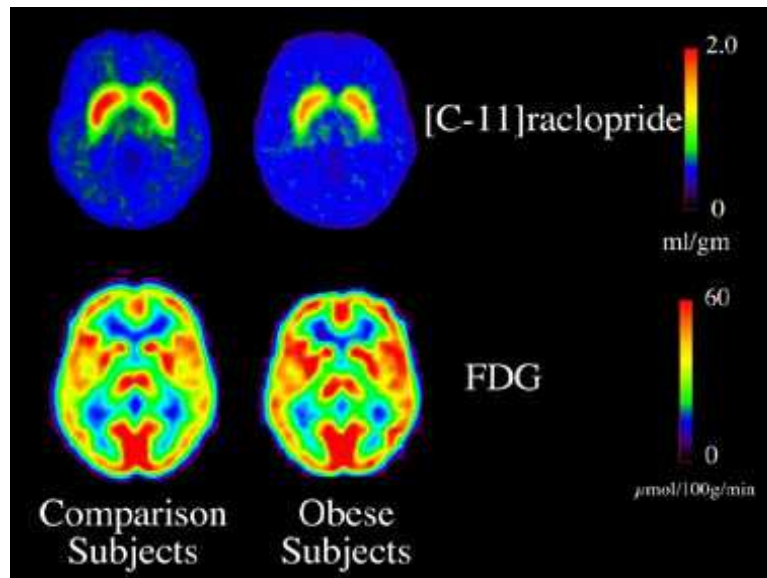


Figure I.8 : Obésité et dysfonctionnement cérébral :
Imagerie cérébrale PET au [C-11] raclopride, un antagoniste récepteurs D2 dopaminergiques
et au FDG, Fluorodesoxyglucose exprimant l'activité métabolique pour l'individu de poids
normal et l'individu obèse. *Source : Wang et.al. (2001) [43]*

Enfin, toutes ces études suggèrent que le surpoids et l'obésité peuvent accélérer le processus de vieillissement et peuvent augmenter le risque de développer des maladies neurodégénératives ainsi que la susceptibilité à des neurodégénérescences aiguës induites par des facteurs exogènes (un traumatisme, une exposition à des agents chimiques) ou des facteurs endogènes (une ischémie, un accident vasculaire cérébral).

II. Le tissu adipeux : Acteur majeur du syndrome inflammatoire chronique

II.1. Description du tissu adipeux :

Depuis près d'une décennie, le statut du tissu adipeux a évolué, passant de celui de simple tissu conjonctif aréolaire jouant un rôle dans le stockage de graisses sous forme de triglycérides (TG) à celui de véritable organe endocrine et sécrétoire hautement actif jouant un rôle essentiel dans de nombreuses réponses physiologiques de l'organisme. Il cible les signaux modulant l'appétit, la balance énergétique, la reproduction, l'inflammation et l'immunité [44].

Chez les mammifères, le tissu adipeux comprend la graisse blanche et la graisse brune. Cela permet ainsi de distinguer deux types tissulaires différents par leur métabolisme et/ou leur localisation tels que le **tissu adipeux blanc** (white adipose tissue, WAT) et le **tissu adipeux brun** (Brown Adipose Tissue, BAT) [45].

Le BAT est communément appelé « Graisse de bébé » car il est présent chez les nouveau-nés, mais converti en WAT à l'âge adulte [46]. Cette conversion est effectuée par la protéine découplante mitochondriale 1 (UCP1) dans les mitochondries. La présence de BAT le long de la colonne vertébrale et sous les clavicules chez l'adulte vient d'être démontrée [46, 47]. Il est fortement vascularisé et directement innervé par des fibres sympathiques. Les adipocytes de ce tissu sont multiloculaires, comportent de nombreuses gouttelettes lipidiques et un très grand nombre de mitochondries (Fig. II.1).

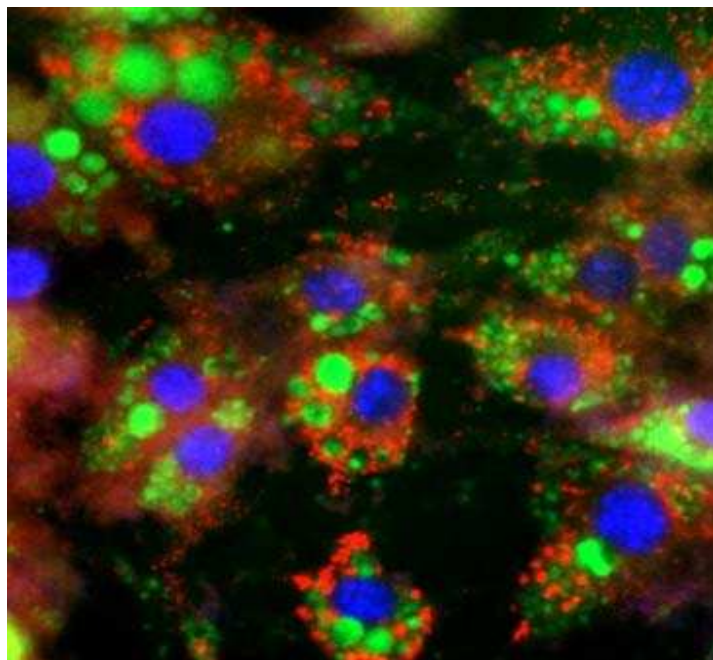


Figure II.1 : Tissu adipeux brun de la peau de souris :

En verts, marquage des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des adipocytes bruns.

En bleu, marquage des noyaux des adipocytes. *Source: Technologyreview.com*

Le BAT joue un rôle dans la thermogénèse, alors que le WAT a un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique. Il constitue un réservoir d'énergie mobilisable de l'organisme et un isolant thermique et mécanique en jouant le rôle de coussins au niveau des nombreux organes qu'il entoure (reins, ganglions lymphatiques, graisse péri-orbitaire des yeux, etc.). Le WAT est un tissu hétérogène, le plus majoritaire dans l'organisme, et présente une grande diversité cellulaire. On distingue deux populations : les **adipocytes matures** et la **fraction stroma-vasculaire (FSV)**. L'adipocyte, le type cellulaire majoritaire, comporte une vacuole lipidique unique pouvant représenter 95% du volume cytoplasmique. Son cytoplasme contient très peu de mitochondries et un noyau refoulé à la périphérie de la cellule. Il est spécialisé dans l'élaboration, le stockage et la libération des triglycérides et dans la sécrétion de molécules signales.

Une augmentation excessive de la masse du WAT peut se traduire d'une part par une augmentation des réserves de triglycérides accumulés dans les adipocytes (hypertrophie) et d'autre part par une augmentation du nombre d'adipocytes (hyperplasie). Cette augmentation du nombre d'adipocytes est due fréquemment au recrutement de nouveaux adipocytes issus d'un processus de différenciation (adipogénèse) de précurseurs adipocytaires dormants (pré-adipocytes) présents dans la FSV.

Autres que les pré-adipocytes, la FSV est composée de cellules endothéliales, de fibroblastes, de cellules nerveuses, et également de cellules du système immunitaire inné (les macrophages) et adaptatif (les lymphocytes) (Fig. II.2) [48]. Les pré-adipocytes et les cellules endothéliales favorisent la vascularisation et le développement du TA [49, 50]. Les cellules nerveuses modulent la prolifération et la différenciation des pré-adipocytes et donc l'évolution de la masse grasse [51, 52].

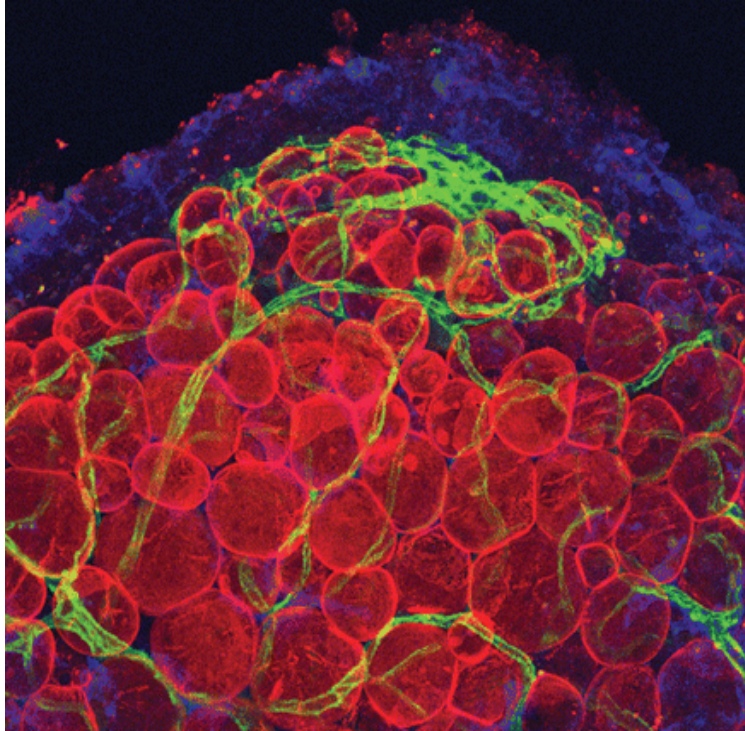


Figure II .2 : Différents types cellulaires de tissu adipeux épидидymaire de souris. En rouge, marquage immuno-fluorescents des périlipines (adipocytes). En vert, marquage de PECAM-1 (endothéliums). En bleu, marquage LYVE-1 (macrophages).

Source: Cho et al. (2007) [50]

Chez l'humain, la localisation du tissu adipeux blanc diffère selon le sexe, l'âge, l'alimentation et l'environnement [53]. Le TA est localisé dans plusieurs zones de l'organisme. On distingue deux catégories : le **TA sous-cutané** (graisse superficielle) et le **TA viscéral** (graisse profonde). Chez la femme, le TA est surtout localisé dans les parties inférieures de l'organisme et autour des glandes mammaires. Chez l'homme, la majeure partie du TA se trouve dans la cavité abdominale soit au niveau sous-cutané soit au niveau intra-viscéral [5] (Fig. II.3). Il y en a également autour des intestins, dans le péritoine, le foie, le muscle, la moelle osseuse et même dans le thorax, en particulier autour du cœur, surtout chez les personnes présentant un excès de poids.

Les adipocytes ne sont pas les mêmes partout. Ceux qui sont autour des organes abdominaux sont plus petits, plus nombreux et métaboliquement plus actifs que ceux qui sont en position sous-cutanée, car ils ont une forte activité lipolytique et libèrent de grandes quantités d'acides gras libres. Ainsi, ils présentent un profil sécrétoire différent avec une expression de cytokines pro inflammatoires plus forte dans le TA profond que le TA sous-cutané [54].

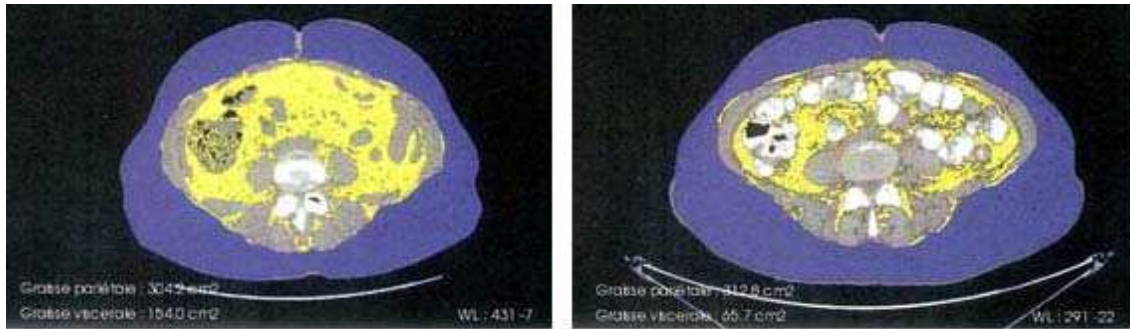


Figure II.3 : Imagerie IRM du tissu adipeux abdominal superficiel (à gauche) et profond (à droite) en coupe transversale. *Source : drdidierpanizza.com*

Enfin, le TA est un acteur majeur de l'homéostasie de l'organisme. Il est indispensable à l'homéostasie glucidique et lipidique. Cependant, l'absence de tissu adipeux sous-cutané ainsi que la redistribution et le stockage du TA dans le tissu profond sont à l'origine des perturbations métaboliques et cardiovasculaires [55].

II .2. Du tissu adipeux aux adipocytes et aux adipokines :

Le tissu adipeux conserve tout au long de la vie sa capacité de différenciation et prolifération des cellules souches mésenchymateuses multipotentes de morphologie fibroblastique en cellules hautement spécialisées et pouvant accumuler des triglycérides, les adipocytes [56].

L'adipogenèse est divisée en plusieurs phases. La première phase, appelée phase de détermination, conduit à la conversion des cellules souches en adipoblastes cellulaires, qui ne peuvent pas être distingués morphologiquement de sa cellule précurseur, ni différenciés en d'autres types cellulaires [57]. Il s'en suit une phase de prolifération amenant les adipoblastes à subir des divisions cellulaires. Devenus pré-adipocytes, une phase d'expansion clonale intervient ensuite, où les cellules prolifèrent de nouveau puis s'arrêtent et entrent dans la phase de différenciation terminale [58] (Fig. II.4). Cette phase se traduit par la conversion des pré-adipocytes en adipocytes matures en prenant les caractéristiques de l'adipocyte mature (le transport des lipides et de synthèse, la sensibilité à l'insuline et la sécrétion de la protéine adipocytaire spécifique). Les bases moléculaires de cette phase ont été principalement étudiées sur les lignées cellulaires de pré-adipocyte *in vitro* (lignées 3T3-L1 ou 3T3F442A).

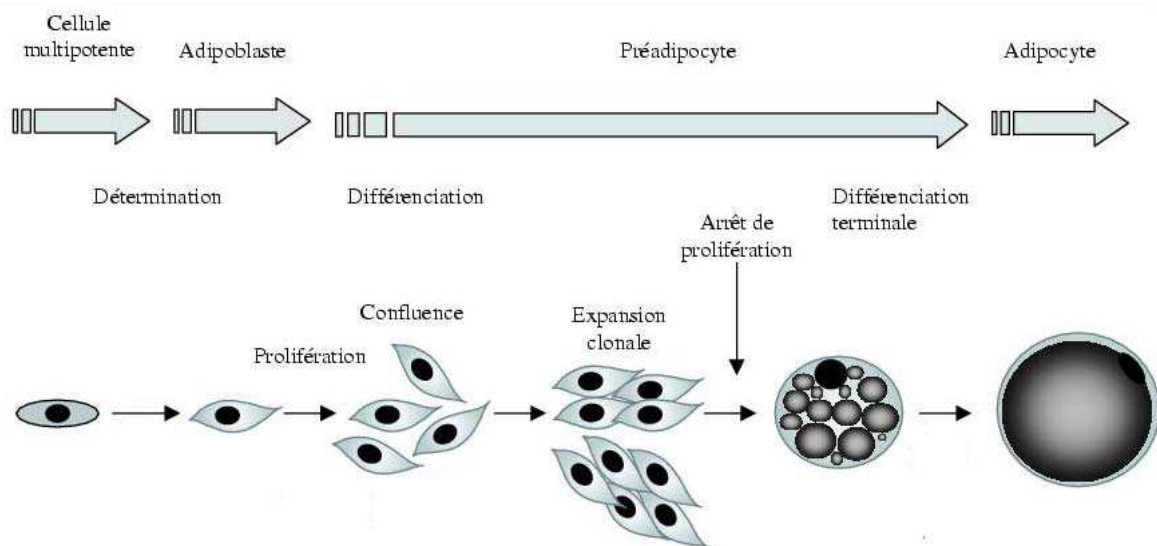


Figure II.4 : Différentes étapes de l'adipogénèse et de la différenciation adipocytaire.
Source : Casteilla et al. (2005) [58]

La différenciation des pré-adipocytes est contrôlée par une expression génique finement régulée dans le temps [59]. Deux familles de facteurs de transcription adipogéniques interviennent dans ce processus de différenciation, le PPAR γ (peroxisome proliferation activated receptor γ) et le C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins). L'expression du C/EBP par le pré-adipocyte va activer l'expression des PPARs en induisant une cascade d'expression de gènes des protéines sécrétées appelées adipokines ou adipocytokines [60, 61].

Les adipokines sont des molécules sécrétées par les adipocytes de nature protéique, peptidique et lipidique à activité autocrine, paracrine et endocrine [62]. Ces facteurs, dont la liste ne cesse de croître, sont capables d'influencer les comportements, la régulation énergétique, l'oxydation des lipides, la fonction immune, les fonctions vasculaires, la situation hormonale, etc. La découverte de la première sécrétion adipocytaire remonte à 1964 avec la découverte de la lipoprotéine lipase [63]. Puis en 1985, il a été montré que le TA était la source principale d'adipsine [64]. Mais les découvertes les plus excitantes concernant les adipokines eurent lieu en 1994 avec la découverte de la leptine [14] et en 1995 avec la découverte de l'adiponectine ; ouvrant un nouveau champ de recherche dans le domaine de l'inflammation au cours de l'obésité.

La leptine, l'interleukine 6 (IL-6) et l'adiponectine sont par excellence les facteurs «modèles» témoignant de l'activité endocrine complexe du tissu adipeux et de ses relations avec les

autres organes comme le système nerveux central. Ces facteurs modulent la sensibilité à l'insuline, l'immunité, l'inflammation, la reproduction, l'appétit.

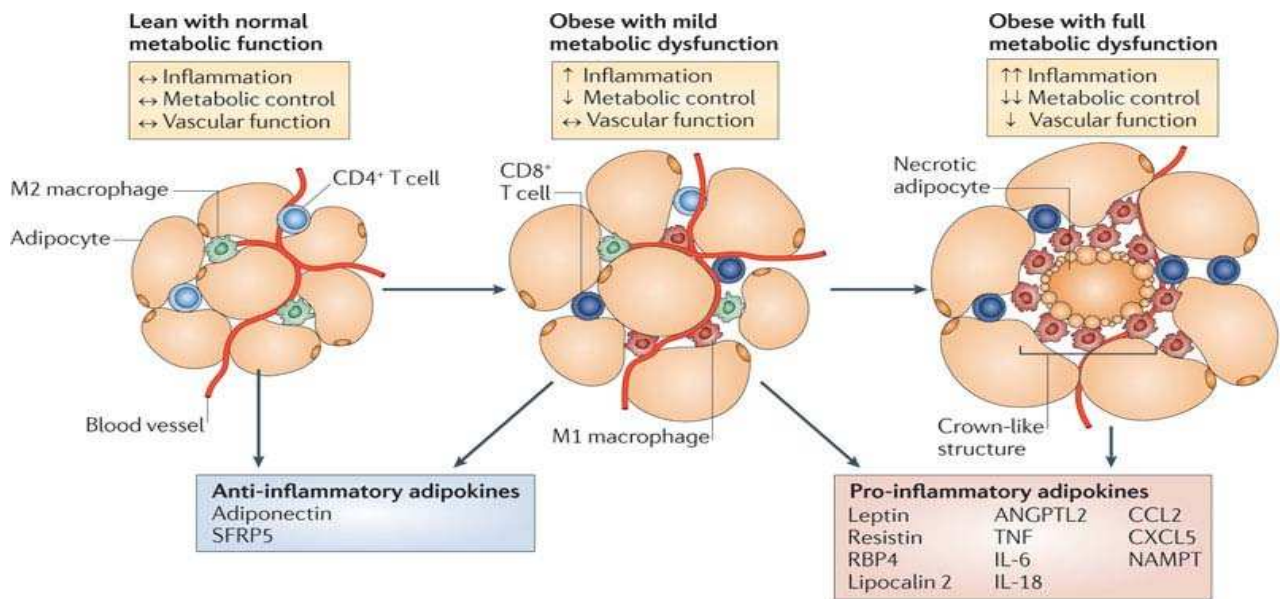
Quant aux autres facteurs, ils agissent localement, de façon autocrine ou paracrine, comme le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), le Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), ou encore l'acide lysophosphatidique produit par l'autotaxine [47]. Ces facteurs ont un rôle sur la prolifération des précurseurs adipocytaires, leur différenciation en adipocytes matures, leur sensibilité à l'insuline et sur la vascularisation locale du tissu.

Bien que l'adipocyte synthétise un grand nombre de médiateurs, les autres cellules du tissu adipeux comme les macrophages représentant 10% des cellules du TA ont également des fonctions sécrétoires.

Les macrophages sont des cellules dont le phénotype change en fonction du microenvironnement tissulaire. On distingue deux principales familles M1 et M2 de macrophages. M1 présente un phénotype « pro-inflammatoire » alors que M2 présente un phénotype « anti-inflammatoire ». La proportion et le phénotype de macrophages varient lors de la mise en place de l'obésité [65, 66]. Chez le sujet massivement obèse, le nombre des macrophages augmente de 5-10 jusqu'à 15-30 macrophages pour 100 adipocytes et les macrophages sécrétant des molécules pro-inflammatoires sont plus nombreux que chez les témoins et plus abondants dans le tissu profond [67, 68]. En plus, les M1 pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline associée à l'obésité *via* la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires [69, 70]. A l'inverse, les M2 permettraient de maintenir la sensibilité à l'insuline du TA, *via* PPAR γ [71, 72]. Les M2 vont produire de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-1) mais de grandes quantités d'anti-inflammatoires comme IL-10. Ils vont être impliqués dans les mécanismes d'allergie, d'immunorégulation et de remodelage de la matrice extracellulaire et des tissus en fin de réaction immunitaire [73]. Parmi les facteurs pro-inflammatoires produits en excès par l'adipocyte dans le tissu adipeux obèse, la leptine et la chimiokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) semblent jouer un rôle particulièrement crucial dans le recrutement des macrophages [74].

Par ailleurs, des études chez la souris ont révélé l'importance des lymphocytes dans le recrutement des macrophages. Les lymphocytes présents dans le TA sont de la famille des NK, NKT, T $\gamma\delta$ [75]. Les lymphocytes T interagissent avec les macrophages en contrôlant leur état d'activation *via* la production de cytokines. Dans des conditions physiologiques normales, les lymphocytes sont représentés par des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ en quantité équivalente

[76-78]. Par contre, la proportion de lymphocytes cytotoxiques (CD8+) augmente plus que les lymphocytes CD4+ avec l'obésité chez l'homme, particulièrement dans le tissu viscéral [79] (Fig. II.5).



Nature Reviews | Immunology

Figure II.5 : Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation chronique :

Dans l'obésité, l'hypertrophie adipocytaire s'accompagne souvent de l'accumulation des macrophages M1 qui pourrait perpétuer l'inflammation dans le tissu adipeux et déréguler la sécrétion des adipokines et des facteurs pro-inflammatoires. *Source: Ouchi et al. (2011) [78]*

Enfin, il a déjà été démontré que l'accumulation des macrophages rencontrés dans le tissu adipeux hypertrophié induit un état inflammatoire pré-adipocytaire chez l'humain, caractérisé par une sécrétion accrue de cytokines et de chimiokines. Cette sécrétion contribue à l'inflammation systémique bas-grade caractérisant l'obésité.

II.3. Des adipocytokines dans l'inflammation :

Nous avons choisi de représenter trois des adipokines les plus étudiées, qui interviennent dans l'inflammation : l'adiponectine, la leptine et la résistine.

II.3.1. L'adiponectine : Elle a été identifiée par quatre groupes indépendants [80-83], qui lui ont donné différentes appellations: AdipoQ, Acr30 (adipocyte complement-related protein of 30 KD), AMP1 (adipose most abundant gene transcript 1) et GBP28 (gelatin-binding protein of 28 KD). Cette protéine de 244 acides aminés présente une structure primaire, très proche de celle du facteur du complément C1q et aux collagènes VIII et X, avec une extrémité C-

terminale possédant un domaine globulaire « C1q-like » et une extrémité N-terminal possédant un domaine collagène « collagène-like » [83, 84].

L'adiponectine est synthétisée principalement par le tissu adipeux mais elle peut être exprimée à partir des cellules du muscle squelettique, des cellules myocardiques, des cellules endothéliales [85] et aussi par les ostéoblastes [86]. Elle circule sous forme de fragment protéolytique ne comportant que la partie globulaire (adiponectine globulaire) ou sous forme de trimères à faible poids moléculaire (LMW, low molecular weight) permettant l'hétérotrimérisation. Elle se dimérise par un pont disulfure en hexamère à poids moléculaire moyen de 190 kDa (MMW, middle molecular weight) puis s'oligomérisse en polymères, de 12 à 18 sous-unités, à poids moléculaire élevé > 300 kDa (HMW, high molecular weight) (Fig II.6). Il a été proposé que l'élastase leucocytaire, sécrétée par les monocytes activés et/ou les neutrophiles, permet la génération du domaine globulaire de l'adiponectine à partir de sa forme pleine longueur [87]. Ce domaine peut alors se trimériser après clivage mais ne peut pas s'oligomériser davantage.

La concentration plasmatique d'adiponectine, qui est mille fois plus élevée que celle des autres adipokines circulantes, est fortement réduite chez les individus obèses, insulino-résistants, DT2 ou dyslipidémiques. Le taux d'adiponectine dans le sérum humain est de 5 à 10 mg/mL comparé à la leptine qui circule à une concentration de quelques ng/mL. [45, 88-90]. Sa synthèse est régulée par plusieurs mécanismes faisant intervenir d'autres molécules : le TNF- α et l'IL6 dans les adipocytes inhibent la transcription de l'adiponectine alors que l'insuline et l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) l'augmentent. Cela pourrait expliquer le faible niveau de cette protéine circulant dans le sérum chez les individus obèses [91, 92].

Bien que la cascade de signalisation ne soit pas encore totalement élucidée, deux récepteurs distincts de l'adiponectine ont été identifiés :

ADIPOR1 et ADIPOR2 sont les deux récepteurs de l'adiponectine à sept domaines transmembranaires, mais ne paraissent pas couplés aux protéines G. Leur extrémité N-terminale est intracellulaire et leur extrémité C-terminale extracellulaire (à l'opposé des récepteurs couplés aux protéines G). Ils sont exprimés dans de nombreux tissus périphériques ainsi que dans le cerveau. Chez la souris, ADIPOR1 est localisé dans le muscle alors qu'ADIPOR2 est surtout exprimée dans le foie [93]. Chez l'homme, ADIPOR1 et ADIPOR2 sont tous les deux exprimés dans le muscle [94]. L'adiponectine globulaire semble activée de préférence le récepteur ADIPOR1 contrairement au récepteur ADIPOR2, qui lui est activé par la forme à fort poids moléculaire [93]. Ensuite, ces deux récepteurs activent d'une part l'AMP

kinase (activated protein kinase), une enzyme clé dans la régulation du métabolisme des glucides et des lipides et, d'autre part, le PPAR γ , un facteur clé dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation [95] (Fig II.6). Ceci explique le rôle important de l'adiponectine dans la régulation métabolique et dans le processus inflammatoire.

Des études montrent que l'adiponectine exerce un rôle **anti-diabétique** en augmentant la sensibilité à l'insuline. Dans le muscle squelettique, elle permet d'augmenter la captation de glucose et l'oxydation des acides gras, phénomènes contribuant également à améliorer la sensibilité à l'insuline. Au niveau hépatique, elle contribue à diminuer la production de glucose et à réduire le contenu en triglycérides pour ainsi favoriser une augmentation de la sensibilité à l'insuline.

En effet, *via* l'activation de l'AMPK, l'adiponectine inhibe le SREBP1C (sterol-regulatory-element-binding protein1C) qui est le principal facteur régulant l'expression des gènes codant pour la synthèse des médiateurs lipidiques [96]. De plus, l'adiponectine augmente l'oxydation des acides gras par inhibition de l'activité l'ACC (Acétyl-Coenzyme A Carboxylase) qui diminue les concentrations du malonyl-CoA. L'adiponectine augmente aussi la translocation des transporteurs GLUT4 du cytoplasme vers la membrane plasmique et facilite ainsi la captation de glucose par les tissus (Fig II.6).

L'importance fonctionnelle de la forme HMW d'adiponectine a bien été définie dans le syndrome métabolique. En effet, chez les souris invalidées pour l'adiponectine, l'injection d'adiponectine HMW exogène induit une diminution dose dépendante de l'hyperglycémie. De même, chez les DT2 traitées par des thiazolidinediones (TZD), agonistes du PPAR γ , l'amélioration de la sensibilité à l'insuline est positivement corrélée à la concentration totale d'adiponectine HMW [97]. Il a été démontré qu'une mutation du domaine collagène de l'adiponectine peut conduire à une augmentation de 3 fois des concentrations circulantes ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline [98]. Pour toutes ces raisons, l'adiponectine est décrite comme un puissant agent insulino-sensibilisant. Des études suggèrent que la forme HMW serait un meilleur index dans la détermination de la sensibilité à l'insuline que la concentration totale d'adiponectine circulante.

En parallèle, l'adiponectine exerce un rôle **anti-inflammatoire** en modulant les cascades inflammatoires directement ou indirectement *via* l'activation de PPAR γ dans les cellules endothéliales et les macrophages. En effet l'adiponectine globulaire, à travers le récepteur ADIPOR1, est capable de supprimer l'activité transcriptionnelle des gènes qui dépendent de

NF- κ B (Nuclear Factor- κ B). Ce qui aura comme conséquence ensuite de diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , et l'interféron-gamma (IFN γ) et d'augmenter la production de cytokines anti-inflammatoire comme l'IL-10 et l'IL1 récepteur antagoniste (IL-1RA) [45] (Fig II.6). L'adiponectine réduit ainsi l'induction des ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) et des VCAM-1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule-1) par le TNF- α [99].

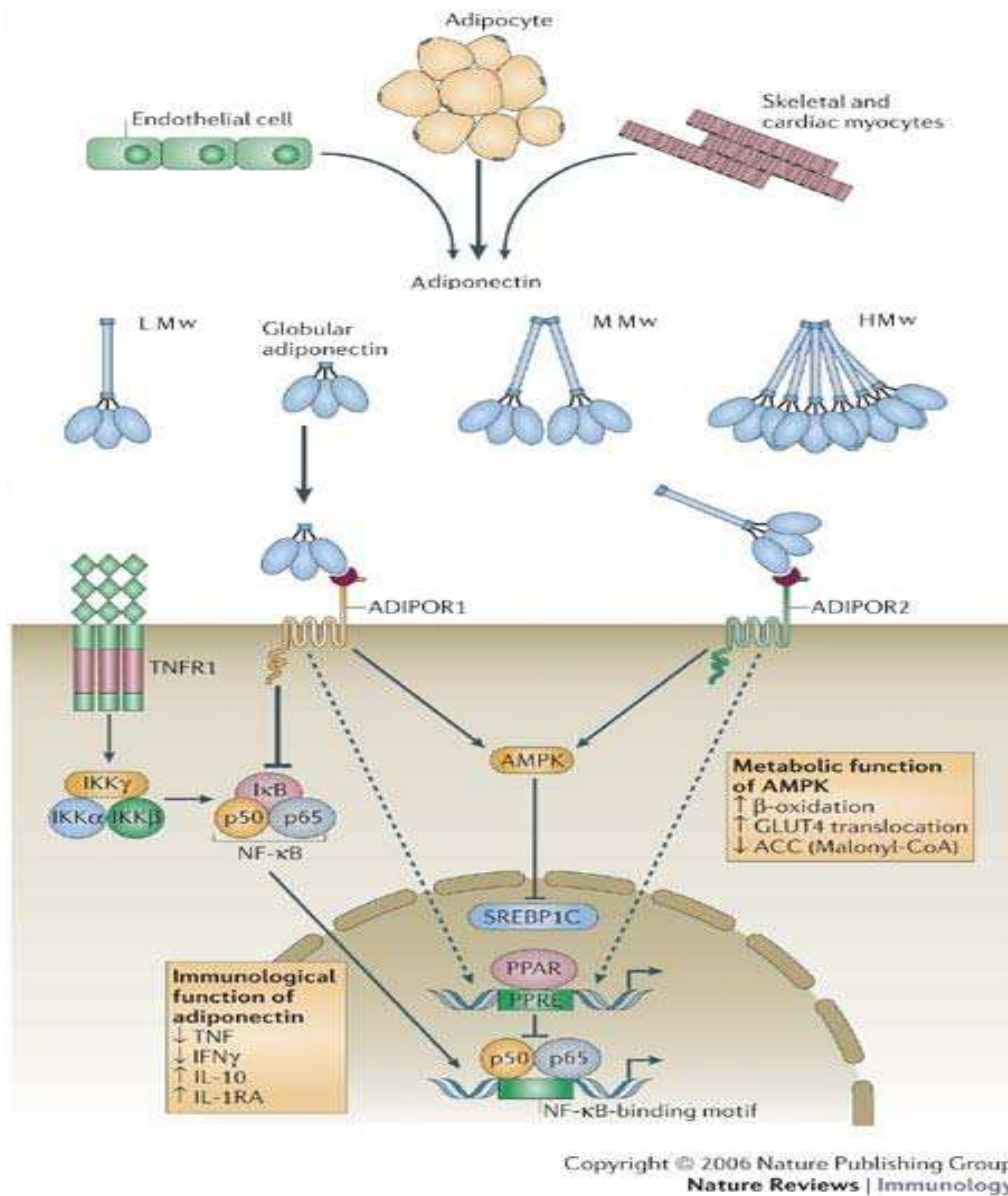


Figure II.6 : Structure de l'adiponectine et ses effets anti-diabétique et anti-inflammatoire sur les cellules squelettiques, endothéliales et adipocytes. Source : Fantuzzi et al. (2005) [45]

Dans les cellules monocytaires et macrophagiques, des études montrent que l'adiponectine induit l'apoptose des monocytes et inhibe l'activité phagocytaire des macrophages ; ce qui inhibe ensuite la production de TNF et de l'IFN- γ .

En réponse à la stimulation des macrophages avec du lipopolysaccharide (LPS, composant de la paroi bactérienne des bactéries à Gram-négatif), l'adiponectine globulaire, à travers le récepteur ADIPOR1, supprime l'activation de NF- κ B induite par le TLR (Toll-like receptor) indiquant que cette adipokine permet de réguler négativement les réponses des macrophages aux ligands TLR. Par ailleurs, elle permet une production d'IL-10 et d'IL-1RA via l'activation de PPAR γ [100] (figure II.7).

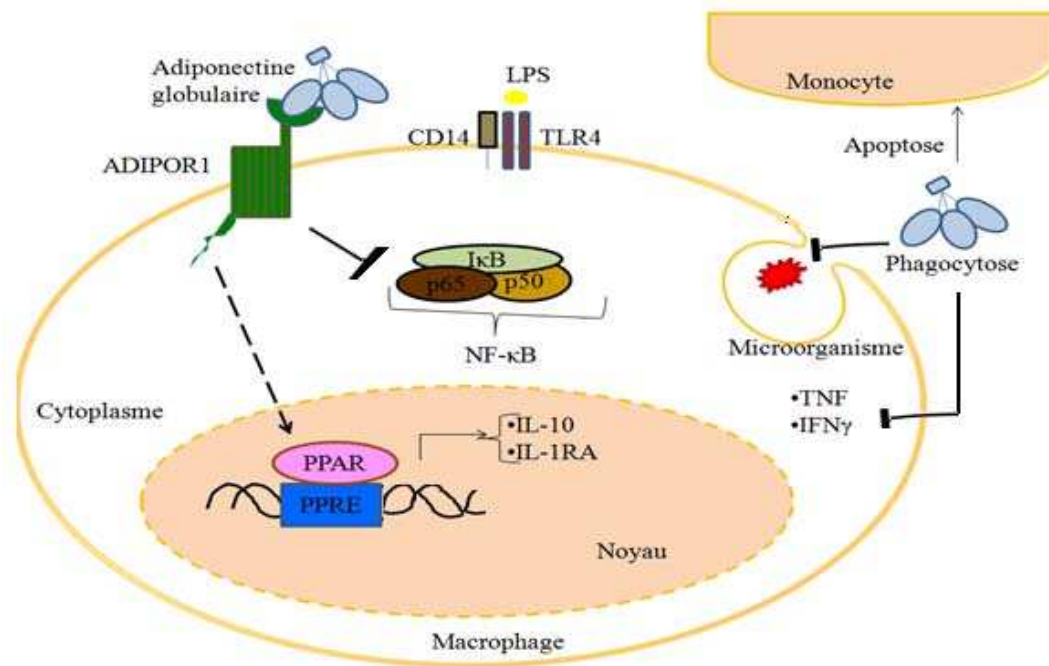


Figure II.7 : Effet de l'adiponectine sur le monocyte/macrophage.

Source : Tilg et al. (2006) [100]

D'autres études montrent que l'adiponectine peut avoir dans certaines situations des effets **pro-inflammatoires** [101]. En effet, dans le cas d'une stimulation des macrophages/monocytes humains par du LPS, la forme HMW de l'adiponectine permet une augmentation de la production d'IL-8 et d'IL-6. Ainsi, il a été montré que c'est seulement la forme LMW qui a un effet anti-inflammatoire par la diminution de la production d'IL6 en réponse à la stimulation de LPS et par une induction de la synthèse d'IL-10 [102].

Indépendamment de ses effets sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et l'action anti- et pro-inflammatoire, l'adiponectine exerce également des effets cardioprotecteurs. Elle inhibe l'apparition des plaques d'athérome et de l'athérosclérose par inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion et des récepteurs du LDL (Low-density lipoprotein). Chez les souris déficientes en apolipoprotéine-E, la surexpression en adiponectine supprime l'athérosclérose [103].

Enfin, l'action centrale de l'adiponectine a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, ADIPOR1 et ADIPOR2 sont exprimés dans le cerveau dans l'area postrema et dans l'hypothalamus [104, 105]. Une injection intracérébrale d'adiponectine, provoque une perte de poids en augmentant la dépense énergétique. Cet effet est plus marqué qu'une administration périphérique d'adiponectine [106].

II.3.2. La leptine : Elle vient du grec *leptos* pour maigre. Il s'agit d'une protéine de 16 kDa codée par le gène *ob* [14, 107, 108] sécrétée majoritairement par l'adipocyte mais également par d'autres tissus tels que le placenta, la moelle osseuse, le muscle, la muqueuse gastrique et même le cerveau.

Chez les souris et chez les humains, les niveaux circulants de leptine sont directement corrélés avec la masse du TA [109]. La quantité de leptine varie d'une dizaine de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ chez les sujets à IMC normal à une trentaine de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ chez les obèses et peut atteindre de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ chez les sujets à très fort IMC. Par ailleurs, chez la femme, le taux circulant de leptine est deux à trois fois supérieure que chez l'homme (la testostérone contrairement aux œstrogènes diminue le taux circulant de leptine). La leptine contrôle aussi la fonction de reproduction. En effet, la présence de récepteurs de la leptine au niveau de l'ovaire, l'oviducte, l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure, suggère que la leptine intervient dans la régulation aux différents niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien (HPO) [110].

Le rôle de la leptine dans la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux au cours de la dernière décennie. En revanche le rôle de cette hormone dans la régulation de la sensibilité à l'insuline et la fonction cardiovasculaire est encore débattu.

La leptine se comporte comme une hormone de la satiété, qui agit en régulant l'appétit en fonction de la masse de tissu adipeux, par un rétrocontrôle hypothalamique dans le système nerveux central (SNC). Elle est capable de modifier l'expression des gènes CART (cocaine and amphetamine regulated transcript), NPY (neuropeptide Y), AGRP (agouti related protein) et α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) *via* son action opposée sur deux populations neuronales localisées dans le noyau arqué hypothalamique. En effet, la leptine traverse la barrière hémato encéphalique (BHE) et se lie à des récepteurs hypothalamiques. Elle active la voie anorexigène et de dépenses énergétiques par les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) et inhibe la voie orexigène et de stockage d'énergie par les neurones producteurs de neuropeptide Y (NPY) [111] ; ce qui induit une augmentation de la synthèse et de la sécrétion

d α -MSH. L α -MSH est un peptide dérivé de POMC grâce à un clivage protéolytique par une Prohormone Convertase 1 (PC-1). L α -MSH se lie au récepteur de type 4 à la mélanocortine (MC4R) dans le noyau paraventriculaire et permet ensuite l'inhibition des effecteurs de la prise alimentaire [112] (Fig. II.8).

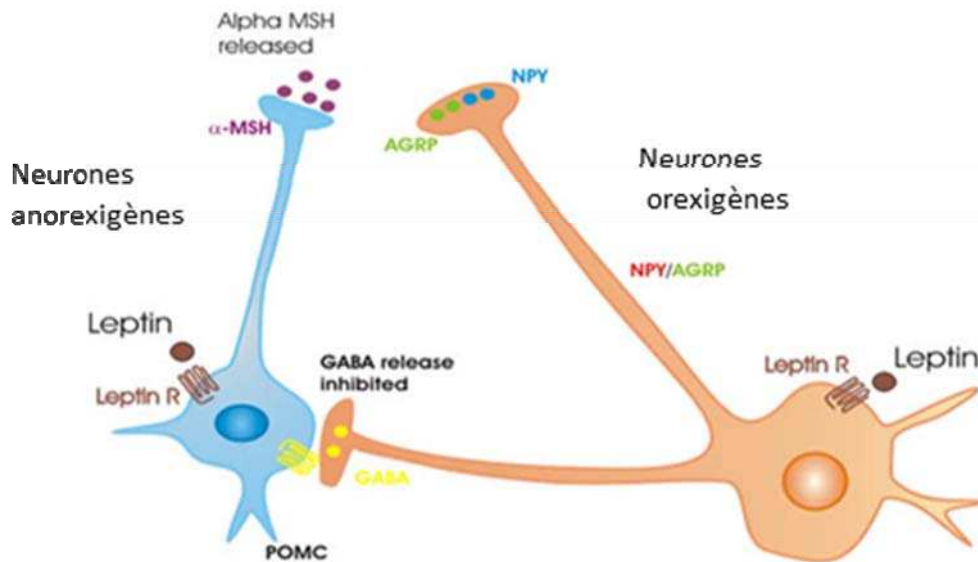


Figure II.8 : Régulation de la prise alimentaire par la leptine.
 Source : Zigman et al. (2003) [112]

Sur le plan métabolique, il a été démontré qu'une sécrétion importante de cette hormone induit une lipolyse, inhibe la lipogenèse et augmente la sensibilité à l'insuline. Elle pourrait directement moduler la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, améliorer le transport de glucose et l'oxydation musculaire des acides gras. La leptine a également été identifiée comme étant un puissant inhibiteur de la formation osseuse ainsi que dans de nombreuses fonctions stomacales [113].

Sur le plan inflammatoire, la leptine est un médiateur important dans les maladies immunitaires et dans les processus inflammatoires. Son expression est augmentée dans des conditions où il y a une libération de cytokines pro-inflammatoires comme par exemple durant les conditions d'inflammations aiguës telle que la septicémie [114].

Considérée comme étant une cytokine pro-inflammatoire, la leptine possède une similarité structurale proche d'autres cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-12.

Son effet cellulaire s'exerce via l'activation du récepteur de la leptine OBR codé par le gène du diabète db. Six isoformes différentes du récepteur de la leptine ont été identifiées, appelées OB Ra-f, ayant chacune un domaine cytoplasmique d'une longueur différente. OBR_b est le

type le plus étudié chez l'homme qui met en jeu la voie de signalisation Jak/Stat (Janus kinas/signal transducer and activator of transcription) ou la voie de signalisation des MAPs kinases. La leptine, à travers son récepteur OBR_b, active MAPK p38 (mitogen-activating protein kinase), ERK (extracellular-signal-regulated kinase) et STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) dans les macrophages en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , IL-6 et IL-12 [115]. De plus, la leptine induit la production de NOS₂ (nitric-oxide synthase) et d'espèces réactives oxygénées améliorant la phagocytose du macrophage et induit l'activation, la prolifération et la migration des monocytes [116]. (Fig. II.9)

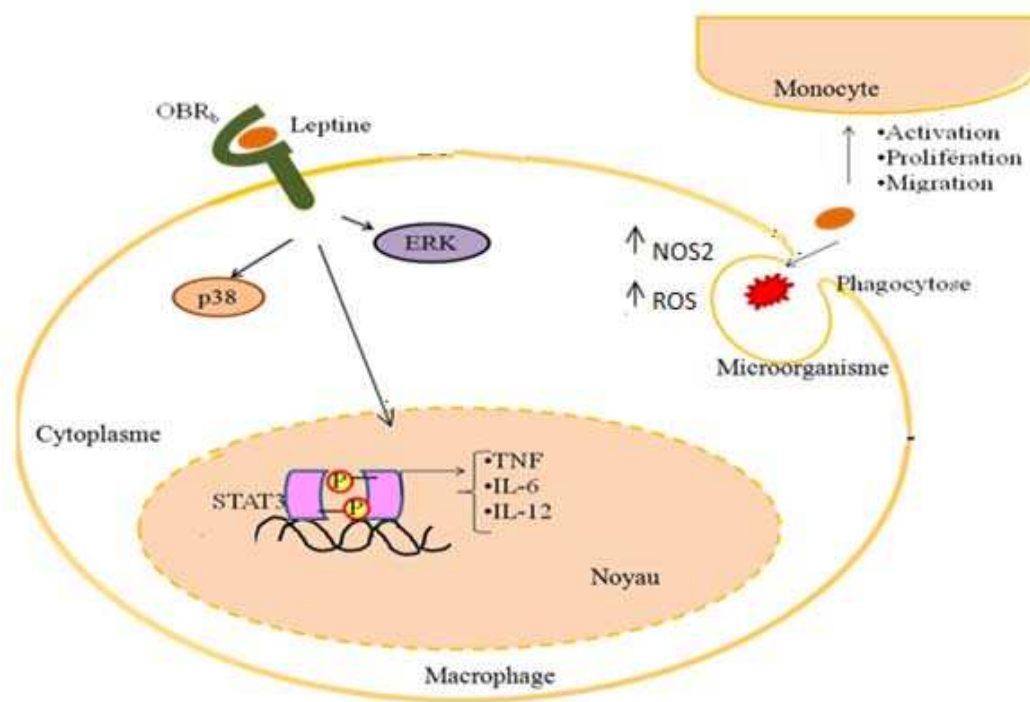


Figure II.9 : Effet de la leptine sur le monocyte/macrophage.

Source : Tilg et al. (2006) [100]

Au niveau de l'immunité adaptative, la leptine induit la prolifération des cellules T naïves mais elle inhibe la prolifération des cellules T mémoires [117]. Par ailleurs, la leptine augmente la production de T helper 1 (TH1), d'IL-2 et d'IFN γ et supprime la production de TH2 et d'IL-4. Elle protège aussi les lymphocytes T de l'apoptose en régulant la prolifération et l'activation de ces cellules. En effet, il a été montré que l'IL-2 produite à partir des lymphocytes T, n'existe pas chez les enfants leptine-déficients et l'absence de cette cytokine est restaurée par l'administration de leptine [118].

Dans les cellules endothéliales, la leptine provoque un stress oxydant et une régulation positive des molécules d'adhésion.

Dans les modèles animaux expérimentaux, les stimuli inflammatoires induisent la leptine et augmentent le niveau de leptine circulant [119].

Dans la plupart des études *in vivo* des effets de la leptine sur la modulation immunitaire ont été générés en utilisant des souris leptine-déficientes ob/ob. La déficience en leptine est associée à une réduction de l'inflammation dans les modèles de maladies auto-immunes mais avec une augmentation de la susceptibilité aux infections virales et bactériennes [120]. C'est la conséquence des effets de la leptine sur l'activation de l'immunité.

Enfin, la leptine agit sur le développement du cerveau et a une action potentielle sur la santé de celui-ci et sur son vieillissement [121]. Elle affecte la fonction hypothalamique et les processus d'apprentissage et de lecture contrôlés par l'hippocampe.

II.3.3. La résistine : Elle a reçu ce nom du fait qu'elle induit une résistance à l'insuline chez les souris [34]. C'est un polypeptide de 114 acides aminés appartenant à la famille des protéines riches en cystéine.

La résistine se trouve sous deux formes circulantes dans le sérum. Ainsi, il y a une forme prépondérante à haut poids moléculaire hexamérique et une forme plus réactive mais moins prépondérante à faible poids moléculaire [122].

La résistine peut être trouvée dans différents types de tissus tels que le tissu adipeux, l'hypothalamus, la glande adrénérergique, la rate, les muscles squelettiques, le pancréas et le tractus gastro-intestinal [123]. Chez les souris, elle est principalement produite par les adipocytes, alors que chez les humains, les macrophages apparaissent comme la source la plus importante de résistine. A ce jour, le récepteur de la résistine est inconnu [124].

Chez les souris, la résistine a été impliquée dans l'obésité en association avec l'insulinorésistance et le diabète de type II [125] alors que le rôle de celle-ci chez les humains reste encore incertain.

La résistine est localisée dans les processus de régulation de l'inflammation d'où le nom FIZZ-3 (found in inflammatory zone), le troisième membre de la famille FIZZ [45, 126-128]. Dans les cellules mononucléaires du sang périphérique humain, les niveaux d'expression du gène codant pour la résistine semblent être plus élevés par rapport à ceux des adipocytes mais les données protéiques comparatives ne sont pas disponibles. Par ailleurs, l'expression de la

résistine, et plus particulièrement au niveau des cellules mononucléaires, est augmentée par des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF alors que l'IFN γ et la leptine n'ont pas d'effet [129].

Dans les macrophages humains, la stimulation avec du LPS amène une augmentation de l'expression de la résistine. Il y a également une augmentation du niveau de résistine dans le sérum lorsqu'on administre du LPS aux humains [130].

La résistine favorise l'expression de TNF et d'IL6 par les macrophages. Elle stimule également la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-12 et cela à travers la voie dépendante de NF- κ B [129] (Fig. II.10).

Par ailleurs, en inhibant l'activité de NF- κ B par un inhibiteur spécifique, la résistine perd ses activités pro-inflammatoires.

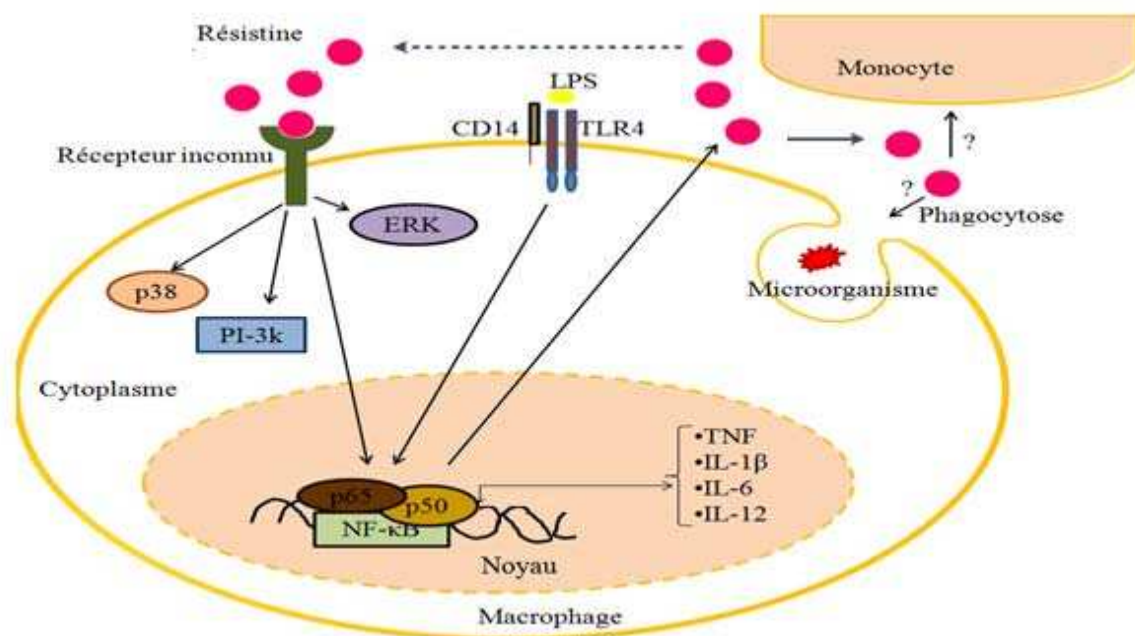


Figure II.10 : Effet de la résistine sur le monocyte/macrophage.

Source : Tilg et al. (2006) [100]

Sur les cellules endothéliales vasculaires humaines, la résistine induit l'expression des molécules d'adhésion VCAM1 (vascular cell-adhesion molecule 1), ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1).

Les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, l'activation du récepteur adrénergique β 3, de l'endothélium-1 et de l'insuline peuvent moduler également l'expression de la résistine. Par ailleurs, l'induction de la synthèse de cette adipokine peut être atténuée par les agonistes PPAR γ . En effet, chez les patients souffrant d'un diabète de type II et traités avec l'agoniste

PPAR γ pioglitazone, il en résulte une diminution de la concentration sérique de la résistine [131].

II.3.4. Les cytokines : Elles sont des glycoprotéines membranaires ou sécrétées suite à une stimulation. Les cytokines peuvent être synthétisées par plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages, les lymphocytes et les adipocytes. Elles peuvent agir, spécifiquement par l'intermédiaire de récepteurs, sur un grand nombre de cellules cibles selon différents modes d'action : autocrine, juxtacrine, paracrine et endocrine.

Les cytokines interviennent dans de nombreux processus biologiques et physiologiques. Elles sont essentielles pour le développement et le fonctionnement de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Il existe plusieurs familles de cytokines que l'on classifie en général par rapport à leur mode d'action et leur structure :

Les Interleukines (IL-): c'est la famille la plus large, aujourd'hui on en dénombre 35. Ces cytokines sont souvent redondantes, et peuvent avoir des effets totalement antagonistes.

Les Interférons (IFN) : sont classés en trois groupes α , β et γ . Ils sont produits suite à une infection virale, bactérienne, parasitaire ou en présence de cellules tumorales. Ils ont pour action principale d'interférer avec la réplication virale, mais ils ont également une action anti-bactérienne, anti-proliférative et d'activation d'autres cellules immunitaire telles que les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes.

Les Tumor necrosis factors (TNF): anciennement appelés cachectines, ce groupe comporte le TNF α et le TNF β .

Les Transforming growth factors (TGF) : ce groupe comporte le TGF α et le TGF β . Ce sont des facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation et le contrôle négatif de l'inflammation.

Les Colony stimulating factors (CSF): ont un rôle dans l'hématopoïèse et peuvent activer les leucocytes matures.

Les chimiokines : sont des cytokines de faible poids moléculaire ayant toutes en commun un pouvoir chimiotactique. On en connaît plus de 40, aujourd'hui. Leur nomenclature est basée sur des points précis de leur structure (CCL1 à CCL28, CXCL1 à CXCL16, XCL1 & 2, CX3CL1).

Elles sont produites lors d'une réponse inflammatoire et ont pour rôle d'activer les cellules immunitaires, ainsi que de les recruter au site de l'inflammation.

De nombreuses cytokines sont retrouvées au sein des foyers inflammatoires. Parmi les cytokines pro-inflammatoires deux sont très étudiées, le TNF α et l'IL-6 ; leurs concentrations plasmatiques augmentent en fonction de la masse du TA et elles sont plus élevées chez les sujets obèses que chez les sujets de poids normal.

Le TNF α est une protéine transmembranaire sous forme trimère de 51 kDa qui est libérée dans la circulation sous forme d'une protéine soluble de 17 kDa, après clivage par une protéinase. Cette cytokine est produite par les macrophages, le muscle et le tissu adipeux chez les rongeurs et chez l'homme. Sa structure est composée de deux feuillets β antiparallèles, eux-mêmes constitués de 8 brins antiparallèles avec une extrémité C-terminale à l'intérieur et N-terminale libre à l'extérieur. Son expression augmente avec l'IMC [132] et diminue avec la perte de poids ou l'amélioration de la résistance à l'insuline [133]. Ainsi, sa libération est stimulée par plusieurs autres médiateurs, comme l'interleukine 1 ou l'endotoxine bactérienne. Il possède plusieurs actions sur divers organes *via* ses récepteurs (TNFR-1 et TNFR-2).

Le TNF α joue un rôle majeur dans l'orchestration de l'inflammation. En effet, les macrophages stimulés par le LPS sécrètent une grande quantité de TNF α qui se lie à ses récepteurs spécifiques situés sur les cellules endothéliales et musculaires lisses des capillaires du site de l'inflammation et induit une intense sécrétion d'IL6 et de chimiokines par ces cellules.

L'IL-6 est une protéine multifonctionnelle de 22 à 27 kDa. Elle est produite par plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales ou les macrophages. Son expression est régulée par un facteur nucléaire proche de C/EBP [134, 135].

Au sein du TA, les macrophages et les adipocytes sécrètent de l'IL-6 qui contribue à 30% de la concentration circulante chez l'homme [136, 137]. Les taux plasmatiques d'IL-6 sont étroitement corrélés à l'IMC et inversement reliés à la sensibilité à l'insuline [138, 139].

L'IL-6 peut agir au niveau central ou périphérique pour moduler la prise de poids et/ou la sensibilité à l'insuline. En effet, l'injection centrale d'IL-6 entraîne l'augmentation de la dépense énergétique et la diminution des dépôts adipeux [140].

En plus, l'IL-6 a un rôle considérable dans la réponse immune comme facteur physiologique de prolifération des lymphocytes B et des plasmocytes. Elle intervient aussi dans l'hématopoïèse, la prolifération des ostéoclastes, la mobilisation du calcium osseux.

Dans l'inflammation, l'IL-6 est sécrétée par les macrophages activés et également par les cellules vasculaires à proximité du site inflammatoire. L'IL-6, comme d'autres cytokines

inflammatoires produites localement (TNF et IL-1), peut gagner la circulation générale et déclencher des effets régionaux.

Parmi les cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 est l'une des protéines agissant sur l'immunité en inhibant la production de certaines cytokines comme l'IL-2, l'IL-3, l'IL-6, le TNF et certains IFN et en modulant le nombre des différentes cellules intervenant dans le système immunitaire, comme les mastocytes et les lymphocytes [141]. L'IL-10 est essentiellement produite par les monocytes mais également par certains lymphocytes T auxiliaires (TH2 chez la souris). Elle agit sur les cellules via des récepteurs IL10R-1 et IL10R-2, le premier étant spécifique de l'interleukine 10, le second interagissant avec d'autres cytokines.

L'IL-10 inhibe aussi la fonction présentatrice d'antigène des cellules accessoires (diminution de l'expression des antigènes d'histocompatibilité de classe II).

Il a été démontré qu'une déficience en IL-10 pourrait intervenir dans certaines maladies inflammatoires digestives, chez les souris [142]. De même, des mutations sur le gène codant pour les récepteurs de l'IL-10 ont été retrouvées dans certaines de ces maladies inflammatoires [143].

L'ensemble de ces propriétés font de l'IL-10 une cytokine très intéressante pour moduler négativement la réponse immune cellulaire et l'inflammation, avec des applications thérapeutiques potentielles.

Enfin, les mécanismes précis d'action de certaines cytokines sur le cerveau (et d'une manière générale les relations entre le cerveau, les cytokines et le système immunitaire) sont encore très mal connus.

Le tableau II résume les effets inflammatoires des adipokines et les maladies associées.

Adipokines	Récepteurs	Effet Inflammatoire	Effet sur l'immunité		Maladies associées
			Innée	Adaptative	
Adiponectine AdipoQ Acr30 AMP1 GBP28	ADIPOR1	Anti - inflammatoire	↓ICAM1	↓lymphocytesB ↓lymphocytesT	Résistance à l'insuline -DT2 Hyperglycémie-Hyperlipidémie Athérosclérose Cancer Arthrite rhumatoïde Maladies cardiovasculaires Maladie du foie gras alcoolisées ou non alcoolisées Maladies Inflammatoires intestinales
	ADIPOR2		↓NF-κB ↓TNFα ↓IL-6 ↓IFNγ ↑IL-10 ↑IL-1RA ↓Phagocytose		
		Pro-inflammatoire	↑CXCL8	–	
Leptine Ob	OBR	Pro-inflammatoire	↑TNFα	↑Lymphopoïès ↑Thymocyte ↑prolifération lymphocytesT ↑réponse TH1 (IL-2 , IFNγ) ↓réponse TH2 (IL-4)	Résistance à l'insuline Asthme Cancer Colite Arthrite Hépatite Encéphalomyélite allergique expérimental
	OBL		↑IL-6 ↑IL-12 ↑CD11b ↑ROS ↑Chemotactic ↑NK		
Résistine FIZZ-3	–	Pro-inflammatoire	↑TNFα ↑IL-1β ↑IL-6 ↑IL-12 ↑NF-κB ↑VCAM1 ↑ICAM1	–	Résistance à l'insuline DT2 Athérosclérose Arthrite rhumatoïde Maladie rénale chronique Maladie du foie gras non alcoolisées

Tableau II : Effets inflammatoires des adipokines et les maladies associées.

Abréviation : Acr30, adipocyte complement-related protein ; AMP1, adipose most abundant gene transcript1 ; CXCL, CXC-chemokine ligand; FIZZ-3, found in inflammatory zone GBP28, gelatin-binding protein; ICAM, intercellular adhesion molecule; IFNγ, interféron-γ; IL, interleukin; IL-1RA, IL-1 receptor antagonist; NF-κB, nuclear factor-κB; NK, natural killer; ROS, reactive oxygen species; TH, T helper; TNFα tumor-necrosis factor; VCAM, vascular cell-adhesion molecule.

III. L'autotaxine : Nouvelle adipocytokine d'intérêt

III. 1. Caractérisation biochimique :

L'autotaxine (ATX) est une glycoprotéine de 100-110 kDa sécrétée dans le milieu extracellulaire et appartenant à la famille des ecto-nucleotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPP) [144, 145]. Elle est aussi nommée E-NPP-2 puisque c'est la deuxième enzyme de cette famille qui a été identifiée, initialement dans le milieu extracellulaire de mélanome, comme un puissant facteur de motilité cellulaire (motility stimulating factor) [146].

L'ATX a un profil d'expression assez large. Chez la souris, le TA est un des principaux tissus exprimant l'ATX mais elle peut être exprimée dans le cerveau, les ovaires, le poumon, l'intestin et le rein. Par ailleurs, le profil de sécrétion de l'ATX est beaucoup moins large que le profil d'expression. En effet, l'ATX est détectée dans les milieux extracellulaires de lignées cellulaires ou d'explants tissulaires comme le tractus intestinal [147], ou les milieux conditionnés de mélanomes [146], de mastocystes [147] ou d'adipocytes [148]. L'ATX est également détectée dans divers fluides biologiques comme dans le sang (plasma/sérum) [149, 150], l'urine [151], les fluides péritonéaux [152], le liquide céphalo-rachidien [153, 154] ou les liquides de bulles cutanées [155].

Dans cette partie, nous allons détailler la structure de l'ATX et de ses différentes isoformes ainsi que ses activités enzymatiques.

La **structure** de l'ATX est complexe et est composée d'une courte partie NH₂ terminale cytoplasmique comportant un peptide signal, d'une région hydrophobe transmembranaire comportant les deux domaines somatomedine B (SMB), et d'un domaine extracellulaire étendu comportant : le domaine catalytique phosphodiester domain (PDE) qui contient un résidu de thréonine très conservé (T210) essentiel pour l'activité catalytique phosphodiesterase et le domaine nuclease-like C-terminal (NUC) (Fig. III .1).

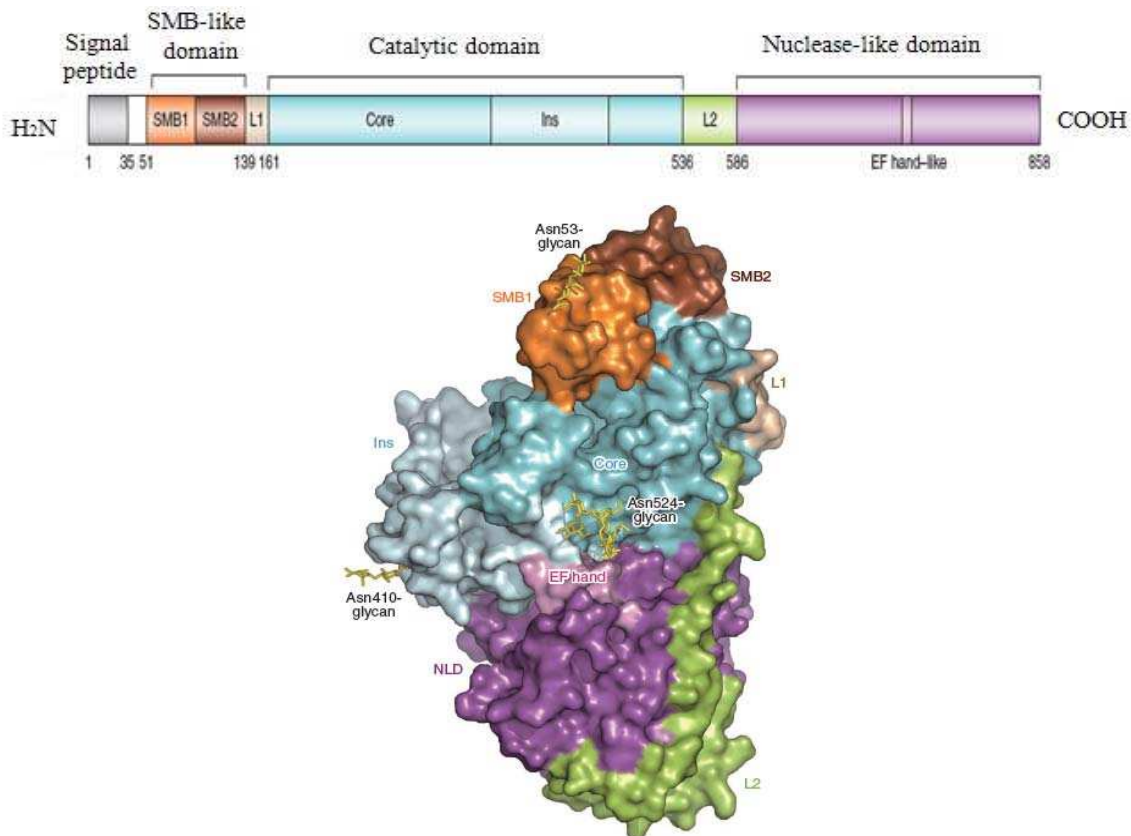


Figure III .1 : Structure de l'autotaxine. Source : Nishimasu et al. (2011) [156]

Les **domaines SMB** sont riches en cystéine, et permettraient la formation de ponts disulfure intra- et inter-moléculaires. Le premier domaine SMB1 contient un domaine d'homologie avec la vitronectine (protéine matricielle capable d'interagir avec le PAI-1). Par ce domaine, l'ATX pourrait interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Le deuxième domaine SMB2 contient un motif RGD (Arginine - Glycine - Acide Aspartique), connu pour lier les intégrines [144, 157]. Par ce motif, l'ATX pourrait générer des effets cellulaires indépendants de son activité enzymatique.

Le **domaine PDE** se trouve au centre de la structure linéaire de la protéine et est composé de 400 acides aminés. Son repliement en 3D serait comparable à celui des phosphatases alcalines. Des approches de mutagenèse dirigée ont montré que la mutation d'un seul acide aminé (la thréonine 210) entraînait la perte des deux activités enzymatiques simultanément : phosphodiesterase/ pyrophosphatase (PED) et Lysophospholipase D (lyso-PLD) [158]. Cela montre que ces deux activités sont portées par le même site catalytique.

Le **domaine nuclease-like** possède une séquence très proche de celle de certaines nucléases, mais l'absence de certains acides aminés clés ne lui confère pas l'activité nucléasique. Son rôle dans la fonction de la protéine n'est pas vraiment déterminé. Des expériences de

mutagenèse dirigée suggèrent que ce domaine est important pour la structure 3D, la localisation cellulaire et la sécrétion de la protéine [159].

Chez l'homme, le gène codant l'ATX est composé de 27 exons. Par un épissage alternatif, trois **isoformes** d'ATX peuvent être obtenues :

ATX-t est l'isoforme issue d'une lignée cellulaire de tératome. C'est l'isoforme la plus courte composée de 863 acides aminés et la plus largement exprimée qui est identique à l'activité lyso-PLD plasmatisée [160].

ATX-m est l'isoforme issue du mélanome. Elle est composée de 915 acides aminés et contient une insertion de 52 acides aminés basiques dans le site catalytique [161].

PD-Ia est l'isoforme exprimée spécifiquement dans le cerveau et principalement dans les oligodendrocytes [162, 163]. Elle est très minoritaire, est composée de 887 acides aminés et contient une insertion de 24 acides aminés au niveau du domaine nuclease-like.

À ce jour nous ne savons pas si ces isoformes possèdent des activités enzymatiques ou des localisations cellulaires différentes.

L'ATX possède trois **activités enzymatiques** :

L'activité de transphosphatidylation permet la production d'acide phosphatidique cyclique (cPA) à partir de lysophosphatidylcholine (LPC) [164]. Le cPA est présent en très faible concentration dans le sérum et le plasma, et ne possède pas de récepteurs spécifiques identifiés à ce jour.

L'activité PDE consiste en l'hydrolyse de nucléotides triphosphates (ATP ou GTP) et à la libération de pyrophosphate (PPi) et de phosphate inorganique (Pi) [165].

Pour l'ATX, ces deux activités enzymatiques semblent être négligeables par rapport à l'activité lyso-PLD [145, 164].

L'activité lyso-PLD a été caractérisée, il y a plus de vingt ans mais n'a été identifiée comme l'ATX que récemment [149, 150, 166]. Cette activité consiste en la production de sphingosine-1 phosphate (S1P) à partir de sphingophosphoryl-choline (SPC) et d'acide lysophosphatidique (LPA) à partir de lysophosphatidylcholine (LPC) [149, 150, 167] (Fig. II.12). La production de LPA par l'ATX est avérée *in vitro* et *in vivo*.

Il est intéressant de noter qu'à ce jour, l'ATX est la seule lyso-PLD soluble décrite [151, 152]. Elle est libérée dans le milieu extracellulaire à la suite d'un clivage protéolytique catalysé par une protéine convertase nommée furine (Fig. III.2). En effet, après son internalisation dans le

réticulum endoplasmique, l'ATX subit le clivage du peptide signal (segment orange). Elle est ensuite exportée vers l'appareil de Golgi où elle subit un nouveau clivage par la protéase furine (segment vert). Enfin, l'ATX est libérée dans le milieu extérieur *via* une voie classique de sécrétion. Deux formes d'ATX semblent être détectées dans le milieu extracellulaire : une « forme courte » ayant subi les deux clivages (signal peptidase et furine) et une « forme longue » n'ayant subi que le premier clivage de signal peptidase. Ces deux formes d'ATX présentent 100% d'activité lyso-PLD.

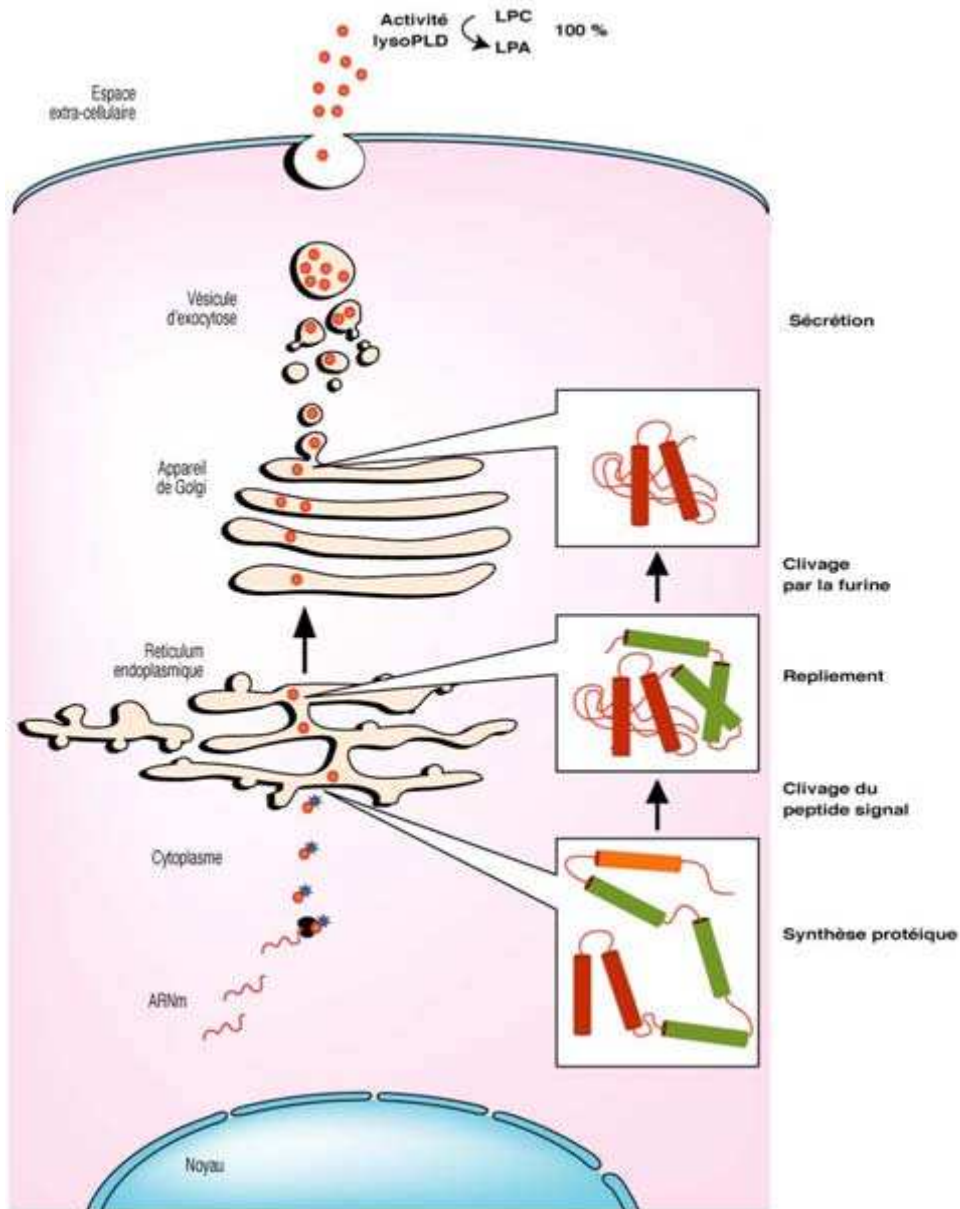


Figure III .2 : Voie de sécrétion de l'ATX. *Source : Jean philippe Pradere (2007)*

III.2. Couple ATX-LPA :

Le **LPA** ou mono-acylglycérol-3-phosphate est un phospholipide « bioactif » composé d'un squelette de glycérol, d'un groupement phosphate et d'une chaîne d'acide gras saturée ou insaturée. Il est considéré comme le plus petit glycérophospholipide qui génère un très grand nombre d'effets cellulaires comme la prolifération, survie, migration cellulaire *via* l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G [168] (Fig. II.12). Il peut être synthétisé aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules. Cependant, en raison de sa nature polaire, la diffusion du LPA au travers des membranes plasmiques est peu probable. À ce jour aucun transporteur membranaire du LPA n'a été mis en évidence. En l'absence de communication entre les compartiments intra- et extra-cellulaires, le LPA doit donc résulter de synthèses intra- et extra-cellulaires distinctes.

A l'intérieur de la cellule, le LPA constitue un important intermédiaire métabolique dans la voie de synthèse des phospholipides membranaires et des TG. Trois voies de synthèse du LPA intra-cellulaires ont été décrites à partir du :

- glycérol-3 phosphate *via* une activité glycérol-3P acyl transferase (GPAT)
- monoacyl-glycérol *via* une activité mono-acyl glycérol kinase (MAGK) [169]
- phosphatidic acid (PA) *via* une activité phospholipase A1 ou A2 (PLA) [170].

A l'extérieur de la cellule, le LPA (de l'ordre du μM) est détecté dans de nombreux fluides biologiques comme : le sang (plasma/sérum) [171], la salive [172], l'urine [151], les fluides péritonéaux [152] ou l'humeur vitrée de l'œil [173]. Parmi ces fluides, le sérum est la source de LPA la mieux caractérisée. Il a été proposé que le LPA détecté dans le sérum soit le produit de la coagulation sanguine ainsi que de l'agrégation plaquettaire. Deux voies principales de synthèse du LPA sont envisagées au cours de l'agrégation plaquettaire à partir de :

- PA *via* une activité PLA1/A2 [174-176]
- LPC *via* une activité lyso-PLD de l'ATX.

La voie de synthèse de LPA extracellulaire *via* l'ATX est la voie majoritaire, produisant plus de 50% du LPA sérique [177]. Il est intéressant de noter qu'à ce jour, l'ATX est la seule lyso-PLD soluble décrite [151, 152], conduisant à la synthèse LPA à partir du LPC.

Le **LPC** est le substrat majoritaire de l'ATX, présent en grande quantité dans le plasma et le sérum ($>100\mu\text{M}$) [178]. Malgré cela, les taux de LPA dans le plasma sont faibles ($0,5\ \mu\text{M}$). Ceci pourrait s'expliquer soit par la dégradation rapide du LPA par les lipides phosphate phosphohydrolases (LPP) associées aux membranes plasmiques (Fig. III.3) soit par la rétro-

inhibition de l'ATX par le LPA [179], limitant fortement l'accumulation de LPA dans le plasma.

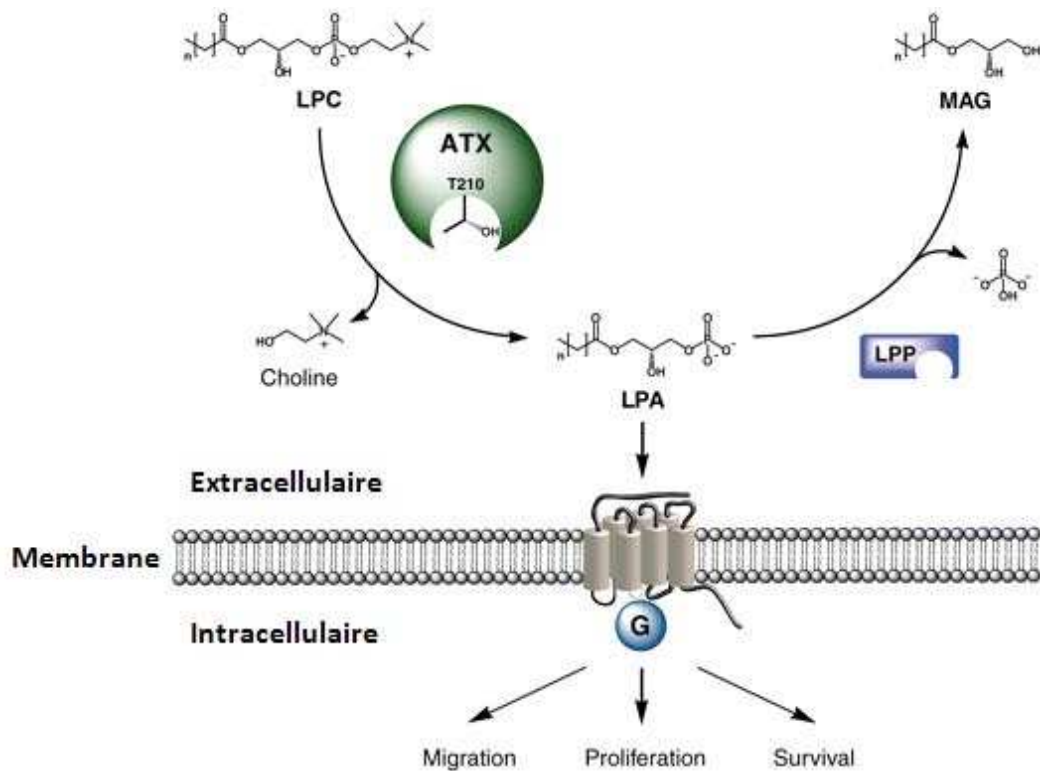


Figure III.3 : Voie de synthèse de LPA par l'ATX (à gauche) et voie de dégradation de LPA par LPP (à droite). *Source : Albers et al. (2010) [180]*

III.3. Récepteurs au LPA :

Les effets cellulaires engendrés par le LPA sont spécifiques et générés par l'intermédiaire de plusieurs sous-types de récepteurs membranaires qui ont été identifiés (Tableau III). Il s'agit de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il a été également proposé que le LPA puisse se lier au récepteur nucléaire PPAR γ et stimuler l'expression de gènes contrôlés par ce récepteur, mais le mécanisme de liaison du LPA extracellulaire au PPAR γ ainsi que les implications physiologiques de cette liaison ne sont pas encore connues [181]. Les récepteurs membranaires au LPA sont divisés en deux familles :

Le premier groupe de récepteurs au LPA, membres de la famille des Endothelial Cell Differentiation Gene (Edg), incluent LPA₁/Edg2, LPA₂/Edg4 et LPA₃/Edg7 [182-188]. Ils sont exprimés de façon ubiquitaire et sont généralement couplés aux petites protéines G $\alpha_{i/o}$, G α_q ou G $\alpha_{12/13}$ et leur activation peut entraîner l'inhibition de l'adénylate cyclase, un influx de

calcium cytosolique, le remodelage du cytosquelette, la migration, l'invasion et l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire comme ERK1/2, Akt ou des GTPases de type Rho [189-191] (Fig. III.5).

Il a été démontré que le récepteur LPA₁ peut aussi être localisé sur la membrane nucléaire et induire l'expression de gènes inflammatoires comme COX-2 (cyclooxygénase 2) et iNOS (Nitric Oxide Synthétases inductible) [192, 193].

Le rôle biologique de ce groupe de récepteurs au LPA a été étudié au travers de modèles de souris transgéniques LPA₁^{-/-}, LPA₂^{-/-} et LPA₃^{-/-} [194, 195].

L'invalidation du récepteur LPA₁ n'est pas létale, mais entraîne chez la souris des défauts comportementaux majeurs pouvant induire une mort post-natale. Ces défauts pourraient s'expliquer par une neurogenèse imparfaite [196] ou déséquilibre de la sécrétion des neurotransmetteurs (sérotonine en particulier), ce qui suggère l'induction des désordres neurologiques apparentés à la schizophrénie [197]. L'invalidation du LPA₂ ne montre aucune anomalie phénotypique évidente. Par contre, la double invalidation LPA₁^{-/-} et LPA₂^{-/-} entraîne la perte totale des réponses cellulaires induites par le LPA (activation de la phospholipase C et d'Akt, mobilisation du Ca²⁺) [186]. Ceci suggère la présence d'un «dialogue» étroit entre les deux récepteurs qui conditionnent l'amplitude de la réponse cellulaire au LPA.

L'invalidation du LPA₃ altère fortement l'implantation de l'embryon dans l'utérus. Cette altération est due à la diminution de production des prostaglandines E2 et I2 consécutives à l'effondrement de l'expression de la COX-2 [195].

Le deuxième groupe de récepteurs au LPA, membres de la famille des récepteurs purinergiques (P2Y), incluent LPA₄/P2Y₉, LPA₅/GPR92, LPA₆/P2Y₅ [198-200] et possiblement LPA₇/GPR87 et LPA₈/P2Y₁₀ [201, 202]. Les récepteurs LPA₄₋₆ sont exprimés faiblement dans la majorité des tissus [203]. Ces récepteurs ont une voie de signalisation différente des autres sous-types de récepteurs. Ils sont capables d'activer l'adénylate cyclase et donc d'induire la production intracellulaire d'AMPc [199] (Fig. III .5).

Plusieurs études seront encore nécessaires afin de déterminer avec précision leur couplage avec les petites protéines G et leurs fonctions.

Le tableau III présente les sous-types des récepteurs LPA₁₋₅ qui se différencient par leurs nomenclatures, composition en acides aminés et dans leur expression tissulaire de l'organisme en général et du cerveau en particulier (Fig. III.4) ainsi que par leurs voies de signalisation (Fig. III .5) [204, 205].

Récepteurs	Pseudonyme	Homologie en acides aminés	Poids moléculaire	Expression tissulaire
LPAR ₁	Lpa1, edg2, vzg-1, recl.3	364 a.a (100%)	41 kDa	Cerveau, cœur
LPAR ₂	Lpa2, edg4	351 a.a (50%)	39 kDa	Pancréas, rein, thymus, testicules, prostate
LPAR ₃	Lpa3, edg7	353 a.a (46%)	40 kDa	Rein, poumon, testicules, prostate
LPAR ₄	Lpa4, P2y9, GPR23	370 a.a (12%)	41 kDa	Ovaires
LPAR ₅	Lpa5, GPR92	372 a.a (10%)	41 kDa	Intestin grêle, Estomac

Tableau III : Récepteurs au LPA

Abréviation: Edg, endothelial differentiation genes; GPR, G protein-coupled receptors ; P2y, Purinergic receptor; LPA, lysophosphatidic acid; Vzg, ventricular zone gene-1

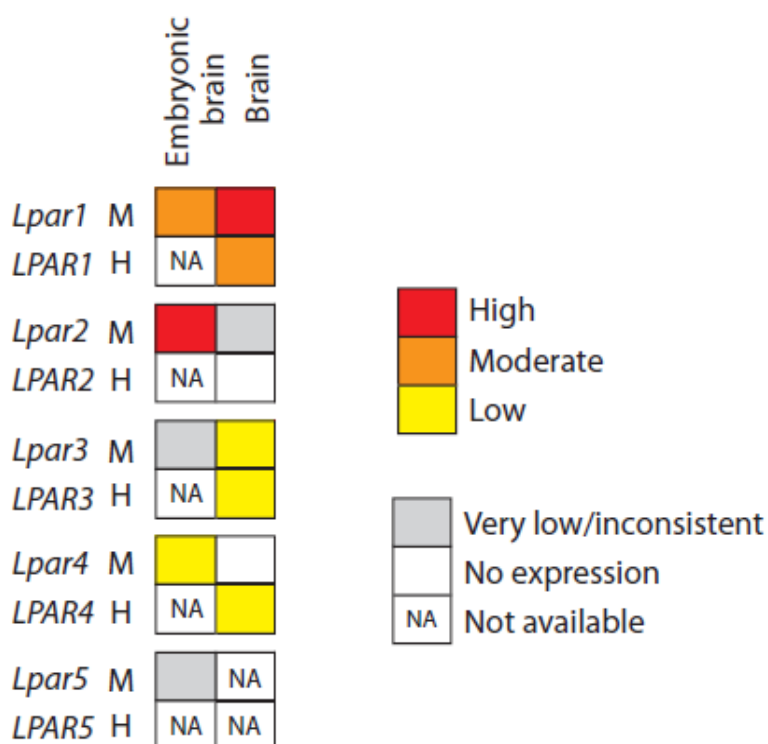


Figure III.4. Expression du gène du récepteur LPA₁₋₅ dans le cerveau murin (M) et humain (H). *Source : Choi et al. (2010) [205]*

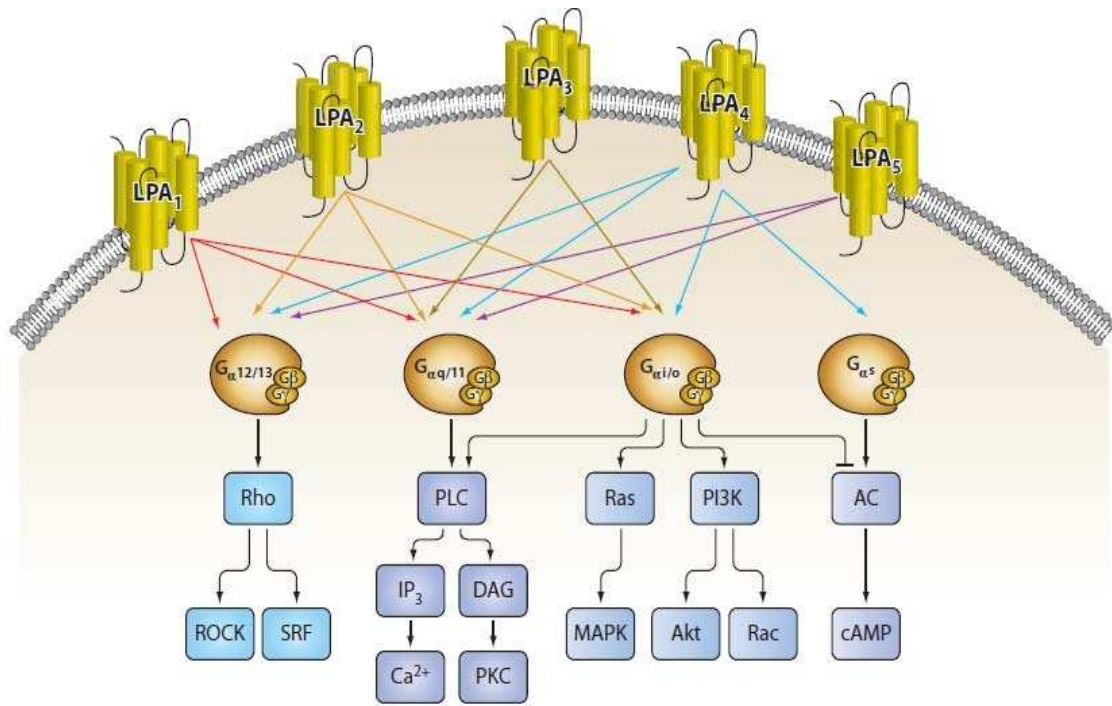


Figure III.5 : Voies de signalisation du récepteur LPA₁₋₅. *Source : Choi et al. (2010) [205]*

Par ce nombre de récepteurs au LPA et leur large distribution tissulaire, le LPA induit un grand nombre d'effets biologiques et est impliqué dans la mise en place de nombreux processus physiopathologiques (cicatrisation, cancer, athérosclérose). Dans la neurophysiologie, le LPA induit des effets puissants sur la morphologie des neurones et des cellules gliales. Il induit la rétraction des neurites que ce soit sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires de neurones *in vitro* [171, 206]. Ainsi, le LPA pourrait être un acteur important de la neurogenèse puisque le remodelage des neurites est fondamental pour la plasticité neuronale et le développement du système nerveux. A l'heure actuelle, il semble que le LPA soit responsable de la plupart des effets biologiques engendrés par l'ATX.

III.4. Effets biologiques :

L'ATX a été décrite pour augmenter la **tumorigenèse** et l'**angiogenèse** *in vitro* et *in vivo*.

À l'origine, l'ATX a été identifiée comme un facteur de motilité tumorale [146], permettant une augmentation de la motilité des cellules tumorales *via* l'induction de l'expression de l'intégrine [207]. Ensuite, il a été démontré que la surexpression de l'ATX dans des fibroblastes favorise l'agressivité de la tumeur, induit l'angiogenèse et protège contre l'apoptose induite par la déprivation en sérum [208, 209]. Par ailleurs, son expression est augmentée dans plusieurs types de cancers humains (cancer du poumon, du sein, de la

prostate, le glioblastome, le neuroblastome, les carcinomes rénaux et thyroïdiens et le lymphome d'Hodgkin) [189, 210, 211]. Dans un modèle d'angiogénèse *in vivo*, l'ATX induit la formation de nouveaux vaisseaux [348]. *In vitro*, l'ATX stimule la croissance des cellules endothéliales humaines sur matrigel, avec des effets similaires à ceux du vascular endothelial growth factor (VEGF) [212]. Ce puissant effet, est aussi retrouvé sur les cellules musculaires lisses des artères coronaires de souris et pourrait s'expliquer par une action synergique avec le Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2) [213].

Cependant, l'ATX est exprimée dans plusieurs tissus non-cancéreux comme le système nerveux central [160, 214], où elle pourrait être impliquée dans la **neurogenèse** et la myélinisation des oligodendrocytes [215], ou encore les cellules mésenchymateuses suggérant un rôle dans le développement embryonnaire [216].

Récemment, il a été démontré le rôle de l'ATX et du LPA au cours de l'**embryogenèse** et plus particulièrement dans le développement vasculaire chez les souris invalidées pour l'ATX [217, 218].

L'ATX est également exprimée dans le tissu adipeux, où elle serait impliquée dans l'**adipogenèse** et dans la mise en place de l'obésité et des pathologies associées [219]. En effet, il a été observé que l'expression de l'ATX augmente au cours de la différenciation adipocytaire *in vitro* et dans le tissu adipeux des souris génétiquement obèses et diabétiques *in vivo* [148] ainsi que chez des patientes massivement obèses et gluco-intolérantes [219]. Par ailleurs, il a été démontré que le LPA était capable de moduler l'adipogenèse en stimulant la prolifération [220] et en inhibant la différenciation des pré-adipocytes *via* le récepteur LPA₁ [221]. Tous ces effets biologiques sont générés par l'ATX grâce à son activité enzymatique et la synthèse de LPA. Cependant, quelques travaux suggèrent que l'ATX pourrait induire des effets biologiques indépendamment de son activité enzymatique.

En effet au niveau du système nerveux central, l'ATX inhibe la différenciation des oligodendrocytes par le blocage de leur liaison à la MEC *via* une diminution de la phosphorylation des protéines d'adhésion : les Focal Adhesion Kinases (FAK). Cet effet passe par un fragment de l'extrémité C-terminale, qui n'interfère pas avec l'activité enzymatique [222]. Cependant, il est envisagé que l'ATX, *via* ce fragment situé en C-terminal, puisse se lier à un récepteur couplé aux protéines G et générer une voie de signalisation conduisant au blocage des processus d'adhésion cellulaire [222].

Enfin, l'ATX pourrait être impliquée dans les processus inflammatoires. L'expression de l'ATX est sous le contrôle de facteur de transcription NFκB [165]. Il est induit par différents

facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor), le FGF (fibroblast growth factor), la BMP-2 (Bone morphogenetic proteins) et est réprimé par le TGF β et certaines cytokines comme l'IL-1, l'IL-4 et l'IF γ [223, 224]. Ces régulations d'expression sont observées exclusivement *in vitro* et sont dépendantes du type cellulaire. Il est donc très difficile d'extrapoler ces résultats *in vivo*.

IV. Les microglies : Principales cellules immunocompétentes résidentes du SNC

IV.1. Description du système nerveux central :

Le SNC comprend l'encéphale et la moelle épinière. Le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral forment l'encéphale qui est protégé par la boîte crânienne alors que la moelle épinière est protégée par la colonne vertébrale.

Chez l'homme, le cerveau représente environ 2% de la masse corporelle et consomme 20 % de l'énergie produite. Contrairement aux autres organes du corps, le cerveau dispose de très peu de réserves en aliments et en oxygène.

Les hémisphères cérébraux constituent la partie la plus importante du cerveau. Ils sont divisés en quatre lobes : le lobe frontal, le lobe occipital, le lobe pariétal et le lobe temporal.

A la base du cerveau se situe l'hypothalamus qui contrôle l'activité endocrinienne de l'organisme en assurant la régulation de l'hypophyse. L'hypophyse (ou glande pituitaire), une petite glande en forme de pois attachée à l'hypothalamus, sécrète des hormones chargées de la régulation des autres glandes endocrines et du contrôle de la croissance, de la reproduction et de nombreuses réactions métaboliques (Fig. IV.1).

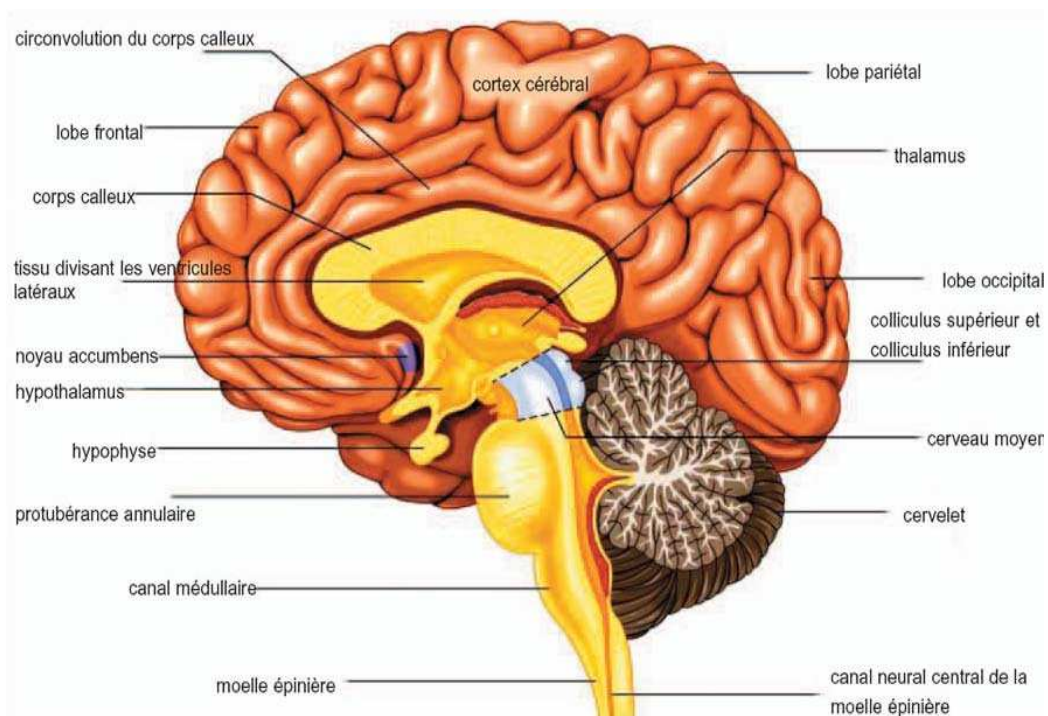


Figure IV.1. Structure du SNC. Source : lookfordiagnosis.com

Le SNC est protégé et nourri par trois feuillets constituant les méninges (la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère) et par le liquide céphalo-rachidien (LCR).

De l'extérieur vers l'intérieur, les méninges se divisent en dure-mère, feuillet conjonctif inextensible enveloppant intégralement le cerveau et la moelle épinière, en arachnoïde, feuillet avasculaire accolé à la dure-mère et envoyant des travées conjonctives vers le troisième feuillet, la pie-mère, fine et transparente, qui adhère totalement à la surface du cerveau et suit le cheminement des vaisseaux sanguins. Entre l'arachnoïde et la pie-mère (espace sous arachnoïdien) circule le **liquide céphalo-rachidien**. Synthétisé au niveau des plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux à partir d'une filtration du sang et résorbé au niveau des sinus veineux, ce liquide est renouvelé jusqu'à quatre fois par jour, assure notamment la protection mécanique du cerveau contre les chocs et permet aussi la circulation de médiateurs de l'immunité.

La **barrière hémato-encéphalique** (BHE) joue également un rôle prépondérant dans la protection du cerveau. La BHE est une membrane qui sépare la circulation sanguine et le LCR. Elle permet d'éviter le passage d'un certain nombre d'éléments toxiques au niveau du SNC (bactéries, toxines, etc.). Elle permet aussi de contrôler la pénétration de molécules (acides aminés, polypeptides et protéines) dans le cerveau. Elle représente un filtre extrêmement sélectif, à travers lequel les aliments nécessaires au cerveau sont transmis, et les déchets sont éliminés. Ce processus d'alimentation et d'élimination est produit par toute une série de mécanismes de transport actif.

Les cellules endothéliales constituant la première couche de la BHE n'ont pas les mêmes propriétés que dans le reste de l'organisme : elles n'ont pas de fenestrations, sont unies les unes aux autres par des jonctions serrées étanches [225], ce qui provoque l'absence de flux intercellulaire.

Entourant les cellules endothéliales, la lame basale des capillaires sanguins constitue un rempart supplémentaire. Constituée essentiellement de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycanes et de fibronectine, elle gêne le mouvement des cellules vers le parenchyme. Inclus dans cette fine lame basale se trouvent les péricytes ayant un rôle structural important et régulant la vasomotricité des capillaires et les macrophages périvasculaires. Les pieds astrocytaires viennent compléter cette BHE. Ceux-ci semblent avoir en effet un rôle fondamental non seulement dans le maintien de la structure de la BHE, mais aussi dans son développement.

IV .2. Du SNC aux microglies :

Le SNC contient plusieurs milliards de cellules, parmi lesquelles on distingue deux types : les neurones (les cellules qui transmettent l'influx nerveux) et les cellules gliales (les cellules qui assurent le soutien et la réparation des neurones) ainsi que de nombreux vaisseaux sanguins. Le parenchyme nerveux, situé sous les méninges, se subdivise en substance grise contenant les corps cellulaires des neurones et en substance blanche où cheminent les fibres myélinisées des neurones.

Autre que les neurones, le SNC comprend deux grandes populations de cellules gliales, les cellules de la microglie et les cellules de la macroglie. Elles se différencient par leur localisation, dans le SNC ou dans le SNP.

La **macroglie**, d'origine neuroectodermale, est constituée des oligodendrocytes assurant la myélinisation des neurones et des astrocytes, cellules de soutien des neurones et qui participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique. Les cellules assurant la défense immunitaire du système nerveux central, d'origine myéломocyttaire ont été nommées par opposition et en raison de leur très petite taille « **microglie** » (Fig. IV.2)

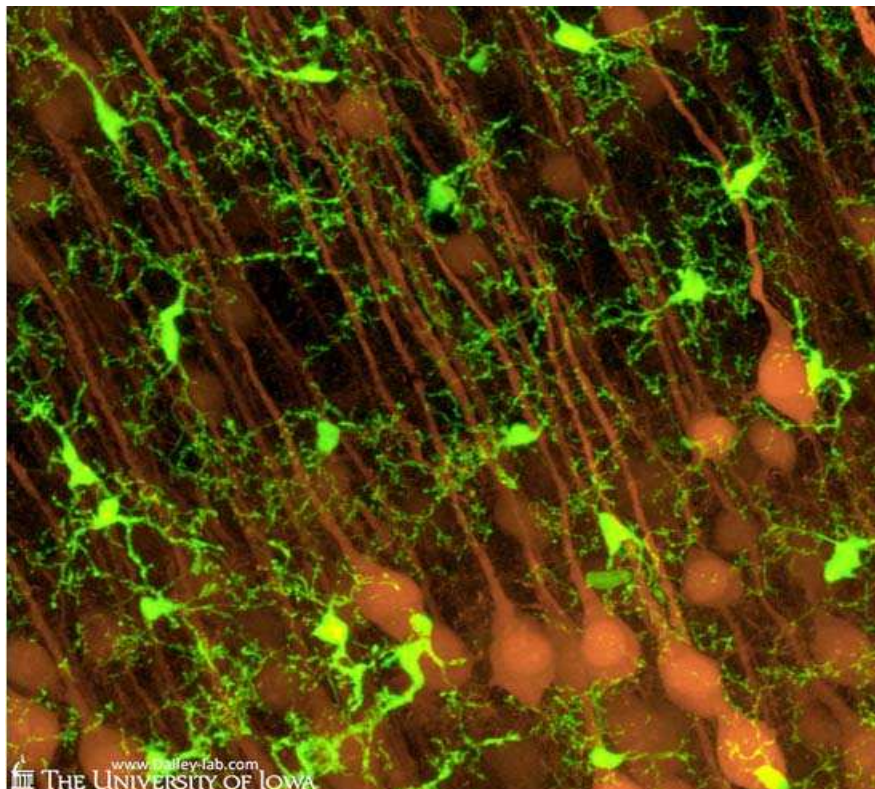


Figure IV.2 : Microglies et neurones du cortex cérébral de souris : GFP⁺ Microglie & YFP⁺ Neurones (CX₃CR1^{GFP/+}:Thy1-YFP). *Source: Images by L. Fuller and M. Dailey biology.uiowa.edu/daileylab*

L'origine des microglies est un débat qui perdure encore de nos jours, du fait de l'absence de marqueurs permettant de les identifier. Trois hypothèses majeures ont été émises : origine mésodermique, origine neuroectodermique et origine hématopoïétique [226] (Figure IV.3).

Les cellules microgliales ont été découvertes par Del Rio Hortega en 1932. IL a formulé l'hypothèse d'une **origine mésodermique** de la microglie, où les cellules microgliales seraient issues de précurseurs du mésoderme s'installant dans le cerveau embryonnaire dans certaines zones préférentielles qu'il avait nommé les « fontaines à microglie ». A partir de ces sources, les cellules microgliales amiboïdes générées par prolifération des précurseurs coloniseraient l'ensemble du système nerveux central, puis finiraient par acquérir leur forme ramifiée définitive retrouvée chez l'adulte.

Appuyant cette hypothèse, Alliot *et al.* (1991) ont mis en évidence une population de cellules précurseurs Mac1+ ayant une capacité de prolifération importante et un phénotype identique à celui des cellules microgliales [227]. Par la suite, plusieurs équipes ont réussi à mettre en évidence de telles populations précurseur capables de proliférer essentiellement en réponse au M-CSF (macrophage colony stimulating factor) [228] ou au GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)[229]. L'origine de ces précurseurs reste également incertaine bien que leur présence dans le sac vitellin ait été montrée dès le huitième jour de vie embryonnaire [230].

L'hypothèse d'une **origine neuroectodermale** de la microglie a également été avancée, selon laquelle des microglioblastes, originaires du neuroectoderme, seraient les précurseurs des cellules microgliales [231], comme des autres cellules gliales (Figure IV.3). Certains auteurs ont d'ailleurs mis en évidence des marqueurs d'oligodendrocyte [232] ou d'astrocyte [233] sur les cellules microgliales ou encore ont obtenu des cellules type microglie à partir de cultures de neurosphères [234]. Ainsi, les cellules microgliales issues de cultures mixtes cultivées sur différents supports et suivant des proportions variables en sérum, peuvent acquérir des morphologies et des marqueurs de cellules macrogliales, notamment d'oligodendrocytes [235]. Malgré ces résultats intrigants, les travaux montrant une potentielle origine neuroectodermale des cellules microgliales restent assez rares et ne sont pas considérés aujourd'hui comme les plus significatifs.

L'hypothèse d'une **origine hématopoïétique** de la microglie a été avancée par Ting *et al.* (1983) en montrant un renouvellement au moins partiel des cellules microgliales par des cellules hématopoïétiques [236]. Ensuite, cette hypothèse a été démontrée grâce aux avancées technologiques permettant la réalisation des greffes de moelle osseuse chez l'animal.

En effet, en utilisant la moelle osseuse d'animaux transgéniques exprimant constitutivement la β -galactosidase et en l'injectant à des animaux irradiés, ils ont mis en évidence un renouvellement partiel des cellules microgliales après un délai relativement long [237]. Cependant, cette étude montrait que peu de cellules parenchymateuses étaient renouvelées, les cellules périvasculaires représentant la majorité des cellules marquées. Plus récemment, des travaux similaires utilisant la greffe de moelle osseuse d'animaux transgéniques exprimant constitutivement le marqueur fluorescent GFP (Green Fluorescent Protein) ont montré que les cellules microgliales parenchymateuses étaient renouvelées de façon non négligeable suite à la greffe et que leur nombre était considérablement augmenté après une lésion du parenchyme cérébral [238-241].

Lorsque la reconstitution est effectuée à partir d'une cellule souche hématopoïétique et non d'un mélange cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses comme habituellement, le renouvellement est nettement plus marqué puisque les cellules GFP+ représentent jusqu'à 40% des cellules microgliales parenchymateuses 12 mois après la reconstitution [242].

Appuyant cette hypothèse de précurseurs hématopoïétiques capables de pénétrer dans le SNC, Banati *et al.* (1991) ont mis en évidence une population progénitrice dans la moelle osseuse ayant les mêmes canaux ioniques que les cellules microgliales [243]. De même, les cellules de la moelle osseuse de souris cultivées en présence de milieu conditionné de cellules gliales peuvent se différencier en cellules ayant la morphologie et les marqueurs de surface de la microglie [244].

Récemment, Davoust *et al.* (2006) ont également mis en évidence dans le cerveau de souris une population progénitrice **myéloïde** CD34+ B220+ CD11b+ capable de se différencier *in vitro* en cellules microgliales et dont la proportion augmente lors d'une inflammation [245].

Les **monocytes** eux-mêmes dérivant de la lignée hématopoïétique ont été envisagés comme une source possible des cellules microgliales. Pendant la vie embryonnaire, cette hypothèse est peu probable dans la mesure où les précurseurs microgliales sont détectés au huitième jour de vie embryonnaire [230] avant la différenciation des monocytes et même du système vasculaire [246]. Cependant, si cette voie n'est pas envisageable lors du développement, il

semblerait qu'elle puisse exister chez l'adulte [241, 247]. En effet, des monocytes de rat ou de donneur sain cultivés en présence de milieu conditionné d'astrocytes acquièrent la morphologie, le phénotype et les caractéristiques électrophysiologiques des cellules microgliales [248-250] (Figure IV.3).

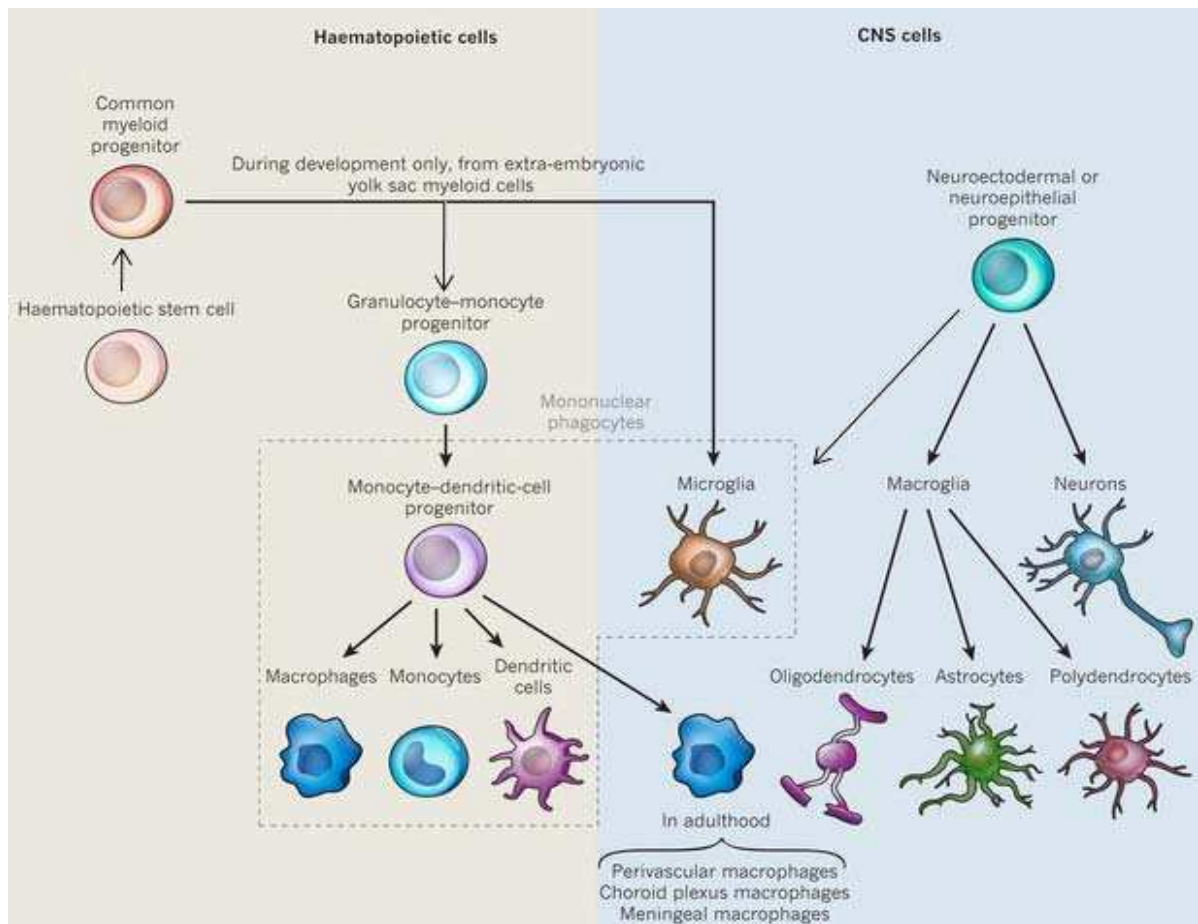


Figure IV.3 : Origine de la microglie et des autres cellules du SNC.

Source : Ransohoff et al. (2010) [251]

Finalement, étant donné l'ensemble de ces résultats, il semble peu probable que la microglie ait une origine unique. Il est reconnu actuellement qu'elle dériverait de précurseurs mésodermiques colonisant très précocement le parenchyme nerveux puis se différenciant en microglie amiboïde foetale. Par la suite, ces cellules adopteraient une morphologie ramifiée, caractéristique de la microglie adulte. Les deux formes amiboïde et ramifiée catégorisent la **microglie résidente**. Ainsi, une autre catégorie de cellules microgliales existe, c'est la **microglie périvasculaire** observée autour des vaisseaux et enfouie dans la lame basale. La microglie résidente ne serait que peu renouvelées contrairement à la microglie périvasculaire.

En cas de perturbation du parenchyme nerveux, les cellules hématopoïétiques (précurseurs de la moelle osseuse et/ou monocytes) pourraient pénétrer dans le SNC, se différencier et renforcer localement le pool de cellules microgliales. A l'heure actuelle, la contribution relative des cellules microgliales résidentes par rapport aux cellules qui se sont différenciées sur place n'a jamais été étudiée lors des processus neurodégénératifs.

IV.3. Caractéristiques des microglies :

Les microglies représentent 5 à 20% des cellules nerveuses totales du cerveau adulte et constituent approximativement 20% de la population des cellules gliales [252]. Elles sont généralement plus abondantes dans la substance grise que dans la substance blanche chez la souris [253]. Chez l'homme, elles sont plus nombreuses dans la substance blanche [254]. Les conséquences fonctionnelles de ces différences ne sont pas connues à l'heure actuelle.

Les microglies sont caractérisées par une grande hétérogénéité morphologique et fonctionnelle aussi bien dans le temps que dans l'espace.

IV.3.1. Hétérogénéité morphologique et fonctionnelle : Très polymorphes, les microglies ont leur phénotype dépendant de l'environnement et du stade de développement. En effet, au cours de la vie de l'individu vont se succéder les cellules microgliales amiboïdes fœtales, les cellules adultes ramifiées puis les cellules microgliales sénescents.

La microglie fœtale, présente au cours du développement embryonnaire, se caractérise par une morphologie amiboïde. Elle disparaît pendant la maturation du cerveau mais elle réapparaît au niveau du mésenchyme chez l'adulte dans certaines conditions pathologiques telles que la lésion ou l'infection cérébrales. La forme amiboïde correspond à la forme **activée** des microglies qui se différencie de la forme en repos par des critères morphologiques phénotypiques et fonctionnels. En effet, les cellules microgliales fœtales se caractérisent par un large corps cellulaire qui contient une grande quantité de cytoplasme et une expression de marqueurs spécifiques. Elles expriment les récepteurs aux LDL (low density lipoprotein) ou encore l'esterase non spécifique [255] et les récepteurs de type « scavenger » [256]. Ces récepteurs sont éteints sur la microglie adulte quiescente. Souvent prises comme modèle pour comprendre les fonctions des cellules microgliales en général et adultes en particulier, les cellules microgliales fœtales possèdent une grande capacité de phagocytose, de prolifération et de migration [257]. Ces propriétés ne sont retrouvées dans les cellules adultes que dans leur état activé [255]. La grande capacité de phagocytose des cellules microgliales activées

pourrait permettre d'éliminer tous les débris issus de la formation des réseaux neuronaux [258]. Ainsi, elles sont soupçonnées de participer au remodelage du tissu nerveux. Elles auraient également une grande influence sur la survie neuronale, tant en favorisant leur apoptose pour réguler la formation des réseaux neuronaux [259] que leur croissance et leur survie en cas de neurodégénérescence [260]. Par ailleurs, leur apparition avant les vaisseaux sanguins et leur association étroite à ceux-ci dans une greffe neurale suggèrent qu'elles pourraient aussi intervenir dans la vascularisation du SNC [261]. Floden et Combs ont montré que les cellules microgliales fœtales peuvent s'avérer dangereuses dans des processus neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer : en effet, une stimulation par le peptide amyloïde β sous forme fibrillaire entraîne une forte capacité de phagocytose ainsi que la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ par la microglie fœtale alors que la microglie adulte est incapable d'en faire autant [262].

La microglie adulte, présente au stade mature de la microglie, adopte en majorité une morphologie ramifiée avec un ou plusieurs longs et fins prolongements cytoplasmiques munis de très nombreux spicules s'alignant le long des faisceaux nerveux et permettant de les distinguer des autres membres de la famille myélo-monocytaire [263].

Cependant, elle présente une variation importante de leur morphologie en fonction des régions et de leur stade d'activation (Fig. IV.4).

Elle pourra être plutôt arrondie dans les zones dépourvues de barrière hémato-encéphalique (éminence médiane, organe subfornical), bipolaire dans les zones riches en fibres nerveuses (corps calleux, fimbrié) ou présenter des ramifications radiales très élaborées dans le reste du tissu nerveux [253].

Les cellules microgliales ramifiées sont dites « **quiescentes** » mais ce terme semble finalement bien mal adapté dans le sens où cette population est loin d'être inactive. En effet, en utilisant une technologie d'imagerie en temps réel, Nimmerjahn *et al.* (2005) ont montré que si leur corps cellulaire reste plus ou moins statique, en revanche les prolongements cytoplasmiques de ces cellules sont en perpétuel mouvement et leur permettent donc d'analyser en permanence leur microenvironnement [264].

D'un point de vue phénotypique, les cellules microgliales quiescentes se caractérisent par une expression faible du CD11b, du marqueur leucocytaire CD45, et quasiment pas d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH cl.I ou II).

Assurant une fonction d'immunosurveillance du parenchyme nerveux, elles seront très rapidement **activées** à la moindre perturbation de celui-ci [265].

Une caractéristique principale des cellules microgliales activées, qui la différencie des autres types de macrophages, est leur extraordinaire capacité à proliférer et à s'accumuler sur le site de la lésion. Une étude réalisée sur des cerveaux ischémiques de rat a ainsi montré une multiplication d'un facteur supérieur à 7 du nombre de cellules microgliales dans l'hippocampe des animaux malades [266]. Leur programme d'activation est séquentiel et comprend des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles [267].

Les cellules microgliales activées perdent ainsi progressivement leurs prolongements cytoplasmiques, ce qui s'accompagne d'une hypertrophie de leur corps cellulaire (Fig. IV.4). Elles vont également exprimer plus fortement les molécules CD11b et CD45 et induire l'expression de toutes les molécules nécessaires à une présentation antigénique efficace : CMH cl.I et II, costimulateurs de la famille B7. Par ailleurs, elles sont capables de sécréter tout un éventail de facteurs susceptibles de réguler la réponse immunitaire (cytokines pro- ou anti-inflammatoires, facteurs cytotoxiques ou neurotrophiques). Enfin, selon les circonstances, elles peuvent également assurer une fonction phagocytaire.

Ainsi, des cellules microgliales activées ne deviendront pas nécessairement des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et peuvent retourner à l'état quiescent lorsque le stimulus cesse.

Dans leur dernier stade d'activation, atteint en cas de neurodégénérescence intense, les cellules microgliales deviennent **réactives**. Elles ont alors une morphologie hypertrophiée avec éventuellement de rares prolongements épais et sont sous cette forme totalement indiscernables des macrophages périphériques tant du point de vue morphologique que phénotypique (Fig. IV.4). Conservant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles du stade précédent, elles ont une activité phagocytaire intense et seront éliminées par un mécanisme d'apoptose induit par leur sur-activation : Jung *et al.* (2005) ont ainsi montré une induction de N-myc après stimulation de la microglie par IFN γ et LPS qui conduisait à leur sensibilité accrue aux médiateurs toxiques autocrines tels que le monoxyde d'azote NO [268].

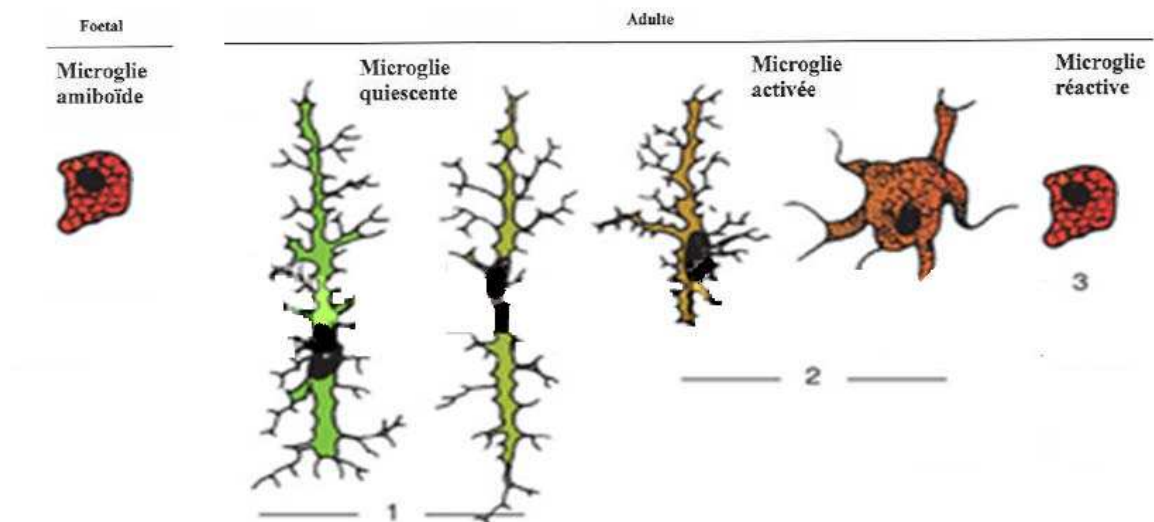


Figure IV.4. Hétérogénéité morphologique de la microglie.

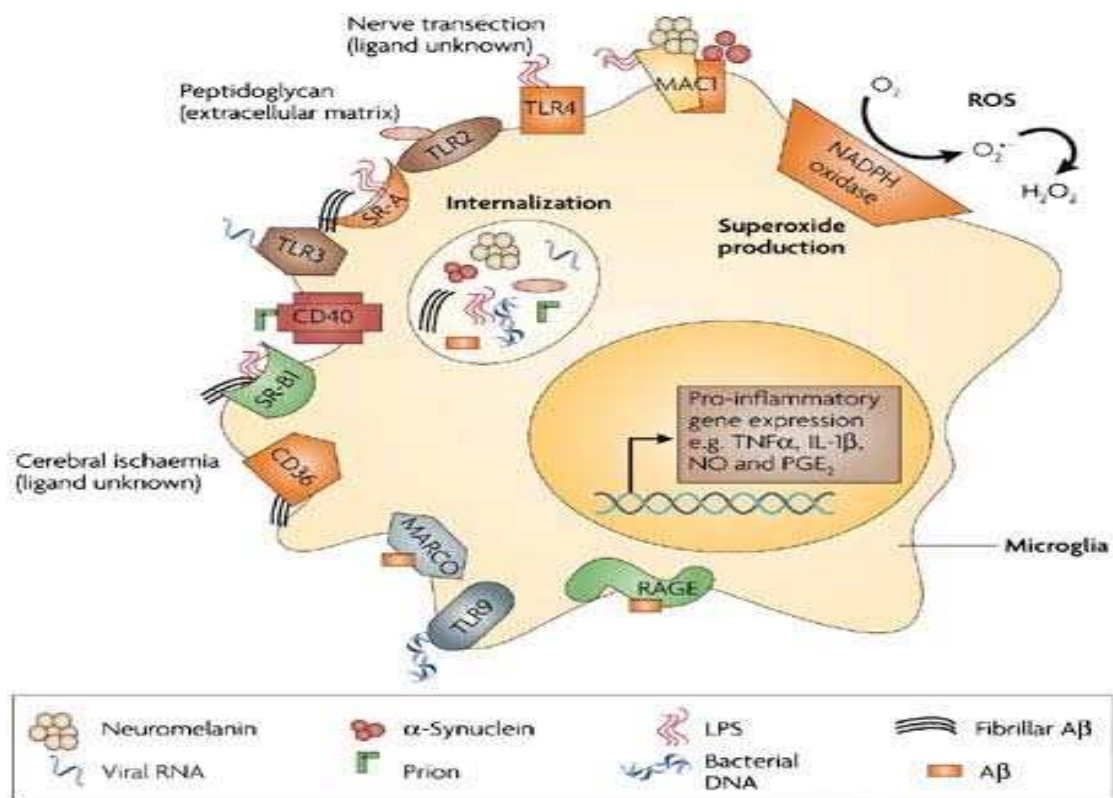
Source : Kreutzberg et al. (1996) [269].

La microglie sénescence évolue en dehors de toute pathologie avec l'âge de l'individu [270]. Elle peut présenter un phénotype et une morphologie altérée chez les rongeurs âgés, mais ce phénomène est nettement plus marqué chez l'homme et a abouti à la définition de la microglie « dystrophique » [271]. Bien que les conséquences d'une telle transformation ne soient pas connues, il est possible que cette sénescence microgliale, étant donné le lien très étroit unissant cellules microgliales et neurones, favorise l'apparition des maladies neurodégénératives liées à l'âge.

IV.3.2. Activation rapide : Quelle que soit la perturbation touchant le système nerveux central, l'une des principales caractéristiques est la réponse très rapide des cellules microgliales [272], décrite lors d'infections bactériennes, virales [273], lors d'ischémies cérébrales partielles ou complètes [274], lors de dégénérescence axonale par coupure de nerf ou lésions excitotoxiques, ou lors de maladies neurodégénératives [275-277]. Cette activation rapide peut s'expliquer par les très nombreux récepteurs qu'elles expriment permettant : une activation directe par les récepteurs de l'immunité innée en cas d'infection, une activation indirecte par des cytokines pro-inflammatoires secrétées par d'autres cellules ou encore une activation par la détection d'un dysfonctionnement neuronal grâce aux récepteurs aux neurotransmetteurs ou au CD200R, récepteur inhibiteur des cellules myéloïdes [278].

Les récepteurs de l'immunité innée permettent la reconnaissance des pathogènes ainsi que du soi modifié [279]. Les pathogènes expriment en effet plusieurs signatures moléculaires ou

PAMPs (« pathogen associated molecular patterns ») telles que des oligosaccharides, des acides nucléiques modifiés, des glycanes reconnus par divers récepteurs du système immunitaire. De la même façon, le soi modifié ainsi que les cellules apoptotiques vont être reconnus par l'intermédiaire d'un certain nombre de molécules ou de signaux tels que la phosphatidylsérine, les lipoprotéines oxydées de faible densité ou encore les changements de potentiels électriques. Il existe plusieurs familles de récepteurs de l'immunité innée sur les cellules microgliales (Fig. IV.5) : les récepteurs d'épuration, les récepteurs de la famille Toll et les récepteurs au complément.



Nature Reviews | Neuroscience

Figure IV.5. Activation de la microglie par les récepteurs de l'immunité innée.

Source: Block et al. (2007) [280]

Aβ, amyloidβ; H₂O₂, hydrogen peroxide; IL-1, interleukin 1; LPS, lipopolysaccharide; MAC1, macrophage antigen complex; MARCO, macrophage receptor with collagenous domain (scavenger receptor); NO, nitric oxide; O₂⁻, superoxide; PGE₂, prostaglandin E₂; RAGE, receptor for advanced glycation endproducts; ROS, reactive oxygen species; SR-A, scavenger receptor class A; TLR2, Toll-like receptor 2; TNF α, Tumour necrosis factor α

Les récepteurs d'épuration (SR, scavenger receptors) permettent la reconnaissance et l'élimination des lipoprotéines modifiées mais également de cellules apoptotiques, de bactéries ou encore de substances telles que le peptide amyloïde bêta, associé à la maladie d'Alzheimer [281-285].

L'expression de la plupart de ces récepteurs comme SR-A, SR-BI, CD36, RAGE (receptor for advanced glycation end products), LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), MARCO (macrophage receptor containing a collagenous domain) a été décrite sur les cellules microgliales [286].

Cependant, si la plupart de ces récepteurs est constitutivement exprimé par la microglie néonatale, d'autres comme SR-A et SR-BI s'éteignent à l'âge adulte et ne sont ré-induits qu'en cas d'inflammation. La conséquence de l'engagement des récepteurs d'épuration sur les cellules microgliales n'est pas bien caractérisée et a surtout été étudiée au cours de la maladie d'Alzheimer, caractérisée par l'agrégation de protéines formant des plaques amyloïdes. Le peptide bêta amyloïde à l'origine de ces plaques est reconnu et internalisé par la microglie par l'intermédiaire de divers récepteurs d'épuration, ce qui induit sa sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène [256, 287]. Le récepteur MARCO quant à lui, en plus de fonctions d'internalisation, interviendrait également dans le changement de morphologie des cellules microgliales après leur activation [256].

Les récepteurs de la famille Toll (TLR, Toll like receptor), initialement décrits chez la drosophile, comprennent une dizaine de membres. Ces récepteurs sont extrêmement conservés et ont évolué pour reconnaître les motifs communs des bactéries, virus, parasites ou champignons [288-290]. Ces récepteurs transmembranaires sont exprimés par les cellules immunitaires innées (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes NK, B et T et adipocytes) [291-302] et se situent à la surface de la cellule (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 11) ou dans la membrane de vésicules intracellulaires (TLR3, 7, 8, 9).

Les TLR ont également une fonction importante au sein du système nerveux central, dans la mesure où leur expression est rapidement augmentée lors de diverses perturbations du parenchyme nerveux [301]. L'expression des TLR3, 4 et 8 a été mise en évidence dans les neurones [303-305] et tous les TLR ont été détectés dans les astrocytes [306] avec une expression préférentielle du TLR3 [268].

Dans les cellules microgliales, les TLR 1 à 9 semblent exprimés constitutivement aussi bien chez la souris [307] que chez l'homme [268], même si leur niveau d'expression est variable d'un individu à l'autre.

Les agonistes des TLR sont des activateurs efficaces des cellules microgliales, en particulier le LPS (lipopolysaccharide, agoniste du TLR4). La formation des plaques amyloïdes dans différentes maladies neurodégénératives peut aussi activer les cellules microgliales par les TLR. Après activation, ils induisent une cascade de signalisation intra-cellulaire mettant en jeu l'adaptateur MyD88 [308]. Ils aboutissent ensuite à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, permettant la synthèse de gènes de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, NO (Figure IV.6 en vert) ou encore favoriser la fonction de présentation antigénique de la microglie [307, 309].

De façon intéressante, pour certains récepteurs et en particulier le TLR4, une voie indépendante de MyD88 a été décrite [310], aboutissant à l'activation du facteur de transcription IRF-3 et à la synthèse des membres de la famille des gènes inductibles par l'IFN. Cela pourrait conduire à la neuroprotection par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Fig. IV.6 en bleu). En outre, des études récentes suggèrent le rôle des TLR 2, 4, et 9 dans la modulation de la phagocytose et de la clairance du dépôt amyloïde neurotoxique (Fig. IV.6 en rouge).

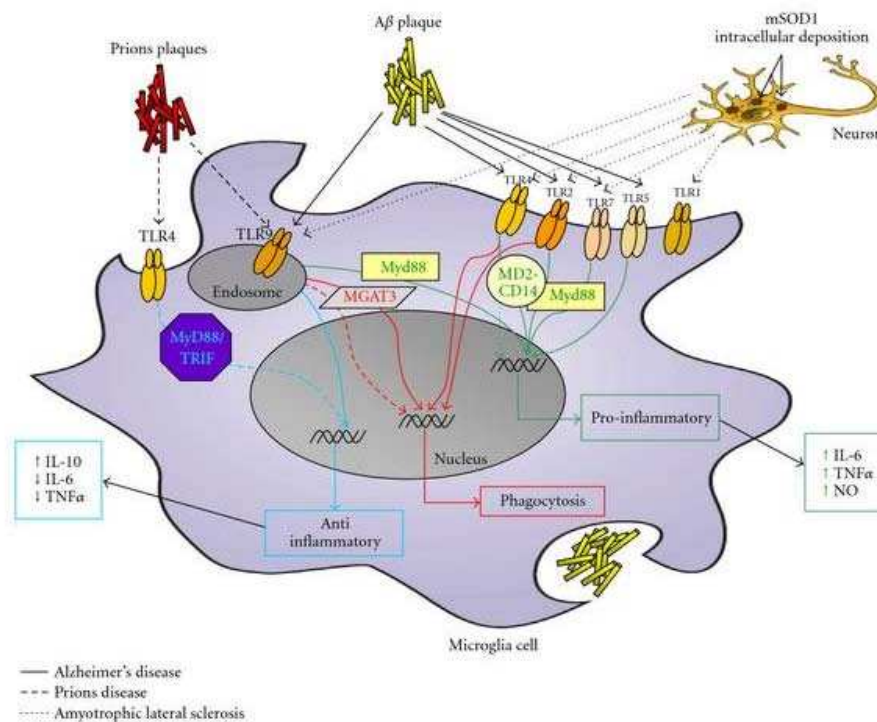


Figure IV.6. Voie de signalisation de TLRs dans la microglie lors des maladies neurodégénératives. *Source : Trudler et al. (2010) [311]*

Les récepteurs au complément (CR) 1, 3 et 4 sont exprimés constitutivement par les cellules microgliales, dont le niveau d'expression augmente après activation [312, 313]. La plupart de ces récepteurs favorisent la phagocytose des pathogènes ou débris cellulaires. Le CR3 (CD11b/CD18), souvent utilisé pour marquer les cellules microgliales *in situ* chez la souris, permettrait par ailleurs une reconnaissance directe de certains motifs bactériens tels que le LPS [314] et par conséquent une activation rapide des cellules l'exprimant.

L'activation du complément aux stades précoces de la maladie d'Alzheimer serait intéressante et bénéfique en termes de phagocytose et de clairance des molécules et débris, potentiellement toxiques et susceptibles d'engendrer des réactions inflammatoires supplémentaires nocives [315].

Les cytokines présentes dans l'environnement peuvent également activer les cellules microgliales. Ainsi ces cellules expriment un éventail large de récepteurs pour les cytokines. Parmi les différentes cytokines capables d'activer la microglie, l'**IFN γ** a été particulièrement étudié. Il permet d'augmenter l'expression des molécules du CMH cl. I et II, des costimulateurs CD80 et CD86, des récepteurs au complément, de molécules d'adhérence comme ICAM-1 à la surface de la microglie et potentialise donc leurs fonctions de présentation d'antigènes et de phagocytose. Il entraîne également la synthèse d'autres cytokines par la microglie comme le TNF α ou l'IL-6 et contribue donc à créer une cascade inflammatoire lors d'une infection.

Les cellules microgliales sont également sensibles à certains facteurs de croissance hématopoïétiques comme le **M-CSF**, le **GM-CSF** ou l'IL-3 permettant leur prolifération [316-318].

Le cerveau est protégé derrière la barrière hémato-encéphalique, cependant certaines maladies neurodégénératives s'accompagnent d'une rupture partielle de celle-ci, permettant l'infiltration intra-parenchymateuse des éléments du sérum. L'albumine est la protéine la plus représentée dans le sérum et de façon intéressante, elle entraîne la prolifération et une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules microgliales [319].

Enfin, les cellules microgliales sont rapidement activées suite à n'importe quel traumatisme neuronal même en dehors de toute infection. Ainsi, elles expriment des **récepteurs purinergiques** [320] ou à certains neurotransmetteurs [321-323], la présence excessive d'ATP ou de glutamate dans l'environnement étant synonyme de lésion cellulaire. De même,

toute rupture physique du signal entre neurones et cellules microgliales entraînerait l'activation de ces dernières, en particulier par l'absence d'interaction entre la molécule CD200 et son récepteur [324].

IV.4. Microglie face à l'inflammation :

L'inflammation est une réponse normale des tissus vascularisés à divers types d'agressions qu'ils soient physiques, chimiques ou encore d'origine infectieuse. Cette réaction est immédiate et transitoire. Son intensité dépend de la nature et de l'intensité de l'agression.

Pour communiquer entre elles et réguler les réponses inflammatoires, les cellules immunitaires utilisent des facteurs solubles que sont les cytokines. Les cellules microgliales sont ainsi capables de sécréter tout un éventail de cytokines aussi bien pro- que anti-inflammatoires, ou encore des facteurs cytotoxiques ou neurotrophiques.

Elles sécrètent notamment du **TGF β** généralement après avoir été activées [325, 326], ce qui contribue au statut immunitaire particulier du système nerveux central.

Elles peuvent également contrôler leur propre activation et un environnement pro-inflammatoire en sécrétant de **IL-10** dont les activités anti-inflammatoires sont bien connues [327, 328].

De même, elles sont une source potentielle de **1,25-dihydroxyvitamine D3** [329, 330], responsable notamment de la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les astrocytes [331-333].

En cas d'inflammation, les cellules microgliales deviennent une source importante de cytokines pro-inflammatoires ou de facteurs cytotoxiques qui pourront avoir des effets bénéfiques comme néfastes.

IL-1 par exemple, participe normalement à la régulation du sommeil, de l'alimentation ou à la transmission synaptique. Lors d'une inflammation, les cellules microgliales sont une source importante et très précoce de cette cytokine [334] qui provoque alors la production de médiateurs de l'inflammation tels que **TNF α** , **IL-6** ou **COX-2** [335], ce qui placerait **IL-1** en tête des cascades inflammatoires dans le système nerveux central [336].

Le **TNF α** produit par la suite montre également des effets ambigus. Il a une action pro-inflammatoire et par un effet autocrine permet une activation plus importante de la microglie [337]. Cette cytokine a aussi une action toxique directe sur les neurones et les oligodendrocytes [338], montrant un côté néfaste de l'activation microgliale.

Pourtant les effets du TNF α ne sont pas uniquement délétères et des souris déficientes pour cette cytokine sont plus sensibles aux affections neuronales [339]. De la même façon, le TNF α peut favoriser la survie et la prolifération des neurones en induisant la sécrétion de facteurs neurotrophiques [340]. Ainsi, de faibles concentrations en TNF α seraient bénéfiques alors que de fortes concentrations et/ou une présence chronique auraient des effets toxiques.

Après stimulation par de l'IFN γ ou du LPS ou après contact avec des lymphocytes TH1, les cellules microgliales sont capables de sécréter des cytokines de la famille de l'IL-12, ce qui plaide en faveur de leur capacité à présenter les antigènes [341].

La microglie, en plus de l'IL-12, peut ainsi sécréter de l'IL-23 et de l'IL-27 [342-345] et favoriser une réponse TH1 [345, 346].

En contrôlant la balance TH1/TH2 dans le cerveau [347], la microglie peut ainsi favoriser le développement d'une réponse cytotoxique bénéfique pour l'élimination d'une infection virale ou d'une tumeur, mais néfaste dans le cas d'un modèle de maladie auto-immune dépendant des lymphocytes TH1 telle que l'EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis).

Une étude récente réalisée par Pinteaux *et al.* (2007) montre que la leptine augmente la production d'IL-6 dans des cultures primaires de microglies. En effet, il a été démontré que la leptine est libérée dans la circulation à partir du TA périphérique et agit directement sur le cerveau par un mécanisme de transport actif. Les microglies expriment ainsi les récepteurs de la leptine OBR.

Après traitement avec la leptine, les microglies augmentent leur expression d'OBR1 [348]. En se liant à son récepteur, OBR1 active JAK2, qui à son tour phosphoryle les protéines IRS et stimule la voie de signalisation de l'IRS-PI3K. PI3K active ensuite Akt qui est un facteur important dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, l'adhésion et les réactions inflammatoires. La phosphorylation d'Akt induit l'activation de l'IKK α /IKK β qui permet la phosphorylation de p65 et la liaison avec p50 au site de NF- κ B. Par ailleurs, les données bibliographiques montrent que c'est l'activation de NF- κ B par l'interaction avec p300/CREB protéine de liaison qui contribue à la production de l'IL-6 dans les microglies (Fig.IV.7).

La leptine permet également la production d'IL-1 β dans les cellules microgliales de rat à travers un mécanisme caspase 1 dépendant [48]. L'IL-1 β est la forme principale libérée d'IL-1 et elle existe comme étant une molécule inactive précurseur qui requiert un clivage par une

enzyme, la caspase 1, en sa forme biologique active mature. Toutes ses actions sont inhibées par son récepteur antagoniste IL-RA qui bloque la liaison d'IL-1 à son récepteur. La libération d'IL-1 β est médiée par l'activation de la voie de signalisation STAT3 [349].

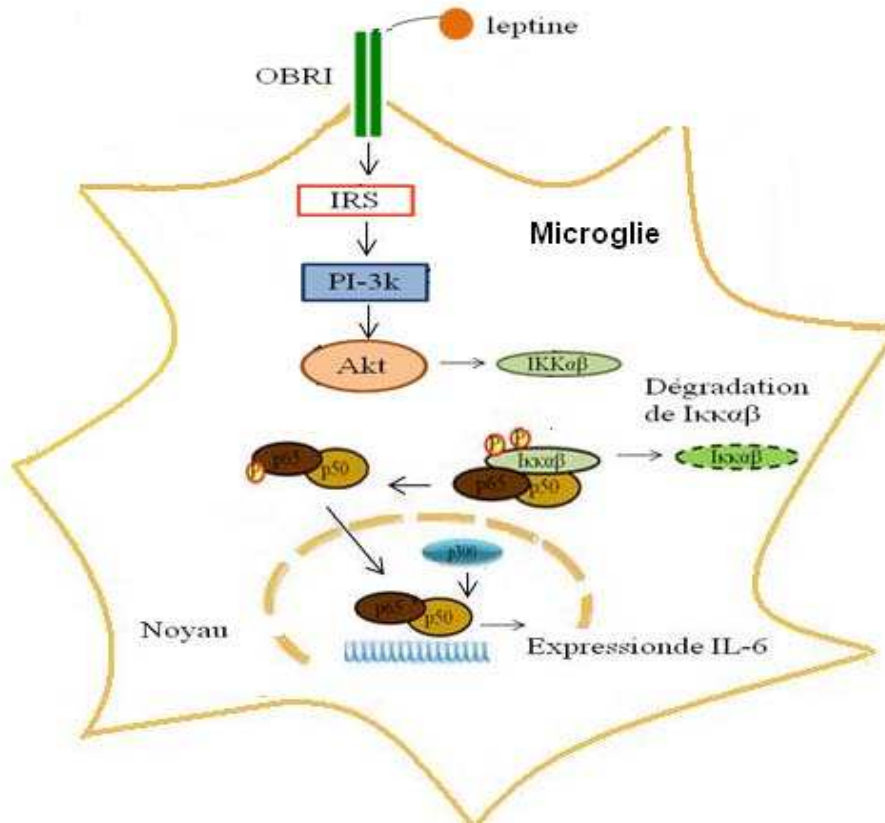


Figure IV.7 : Effet de la leptine sur la microglie. *Source : Tang et al. (2007) [348]*

IV .5. Microglie face au stress oxydant :

Il y a plus de 50 ans, la présence de radicaux libres dans les systèmes biologiques a été découverte [350]. Les radicaux libres sont des molécules ou des fragments moléculaires contenant des électrons non-appariés dans des orbitales atomiques ou moléculaires [351]. La formation de radicaux libres est un processus physiologique et certains jouent des rôles importants dans la signalisation cellulaire et moléculaire [352, 353]. Dans les conditions normales, ces radicaux libres sont éliminés par le système antioxydant intracellulaire afin de maintenir un équilibre entre les oxydants et les antioxydants. Cependant, au cours de certaines pathologies, cet équilibre est détruit, soit par une augmentation de radicaux libres dépassant la capacité de la défense antioxydante, soit par une altération du système antioxydant, créant une situation de stress oxydatif. Le stress oxydatif a été découvert dans plusieurs maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington [354-357].

Un des groupes les plus importants de radicaux libres provient du métabolisme de l'oxygène, et s'appelle les espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species », ROS).

Les ROS majeurs incluent l'anion superoxyde (O_2^{\ominus}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\ominus}) [358] (Fig. IV.8).

O_2^{\ominus} est le « chef de famille » des radicaux libres, relativement peu réactifs. Il est généré principalement dans la mitochondrie où l'oxygène n'est pas complètement réduit par la chaîne respiratoire. Il est considéré comme une ROS primaire en réagissant avec d'autres molécules pour former les ROS secondaires les plus dangereuses [351]. Etant donné que O_2^{\ominus} est un anion, il requiert des transporteurs pour pénétrer les membranes mitochondriales tandis que H_2O_2 , l'autre membre important des ROS, est capable de traverser les membranes [358].

O_2^{\ominus} est éliminé ou du moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par les enzymes antioxydantes superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de O_2^{\ominus} en H_2O_2 et O_2 [359].

H_2O_2 est l'intermédiaire réduit de l'oxygène, relativement peu toxique. Il est produit lorsque les cellules détoxifient O_2^{\ominus} par la Cu/Zn-SOD dans le cytosol ou par la Mn-SOD dans la mitochondrie [360]. H_2O_2 n'est pas un radical libre, mais vu qu'il peut diffuser à travers les membranes et former les autres ROS intracellulaires, H_2O_2 est également considéré comme un membre des ROS [351]. Normalement, H_2O_2 est éliminé par les enzymes antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase) [361]. Cependant, il est toxique pour les cellules lors de son accumulation intracellulaire due à une diminution de l'activité d'antioxydants [360, 362]. Un

des rôles du H_2O_2 est la formation de l'eau par la catalase ou la glutathion peroxydase (GPx) ainsi que la formation de HO^\bullet par la catalyse des ions métalliques (Fe^{2+} ou Cu^+) dans les peroxysomes *via* la réaction de Fenton [363].

HO^\bullet a été proposé comme étant le radical libre le plus toxique en raison de sa forte réactivité et des modifications irréversibles qu'il engendre dans les protéines, les lipides et l'ADN [360, 362]. Il réagit avec les bases (purines et pyrimidines) et le squelette de désoxyriboses de l'ADN, ce qui induit une lésion de l'ADN, par exemple, *via* une formation de 8-OH-G due aux ROS [364, 365].

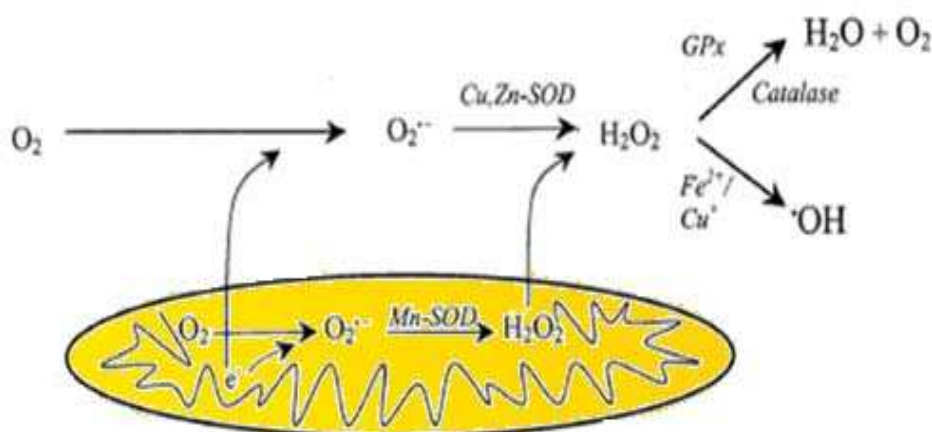


Figure. IV.8 : Formation de ROS. Source Nordberg and Arner (2001) [358]

Autre que les dérivés réactifs de l'oxygène ROS, il existe les dérivés réactifs de l'azote (« reactive nitrogen species », RNS).

La formation de **RNS** est dépendante de O_2^\bullet , par exemple le peroxyxynitrite (ONOO^\bullet) est obtenu par interaction entre O_2^\bullet et l'oxyde nitrique (NO^\bullet).

ONOO^\bullet est réduit par la peroxydase en ONOOH , qui se décompose en d'autres RNS tel NO_2 . Ce dernier peut être généré par d'autres réactions [366, 367] (Fig. IV.9). ONOO^\bullet est connu pour ses effets délétères au niveau des protéines, où il réagit fortement avec les métaux qui y sont fixés. Il participe également à la nitration du résidu cystéine et tyrosine, ce qui induit un repliement erroné de protéine et forme des agrégats protéiques et un dysfonctionnement de ces protéines [368].

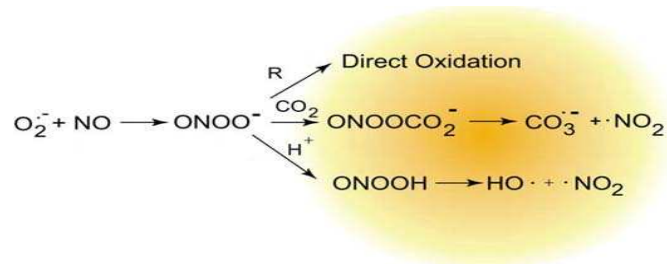


Figure IV.9 : Formation de RNS. *Source : Pacher et al. (2007) [366]*

NO^\bullet est un radical vasodilatateur indispensable produit par les NO synthétases (NOS) dans de nombreuses cellules comme les phagocytes et les cellules vasculaires endothéliales [369]. Au niveau du cerveau, le NO^\bullet joue un rôle physiologique important en tant que neurotransmetteur, pour l'établissement de synapses, ou pour la différenciation de certaines populations neuronales [370]. Il a un rôle primordial dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire. Il existe trois formes de NOS dans le cerveau dont la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). En général, tous les neurones expriment nNOS, mais certains neurones expriment aussi iNOS [371]. Les trois NOS sont exprimées par les astrocytes [372, 373]. Cependant, NO^\bullet devient particulièrement dangereux lorsqu'il réagit avec O_2^\bullet pour former le radical peroxynitrite, ce qui endommage la chaîne respiratoire de la mitochondrie [374] et induit ensuite la mort neuronale [366]. Mais là encore, les effets observés du NO sont variables et semblent dépendre de l'état d'oxydation de cette molécule, le radical libre NO^\bullet étant toxique et l'ion nitrosonium NO^+ étant plutôt neuroprotecteur [375]

Ces deux groupes de radicaux libres ROS et RNS ont des sources de production multiples dont certaines sont d'origine exogène et d'autres d'origine endogène. Les **sources exogènes** regroupent entre autres la pollution atmosphérique, le tabac ou les drogues, les radiations ionisantes et non-ionisantes (UV), pénétrant l'organisme *via* le système respiratoire, l'alimentation ou les muqueuses [376].

Les **sources endogènes** proviennent de la respiration mitochondriale, de l'auto-oxydation des aldoses et de l'inflammation. (Fig. IV.10).

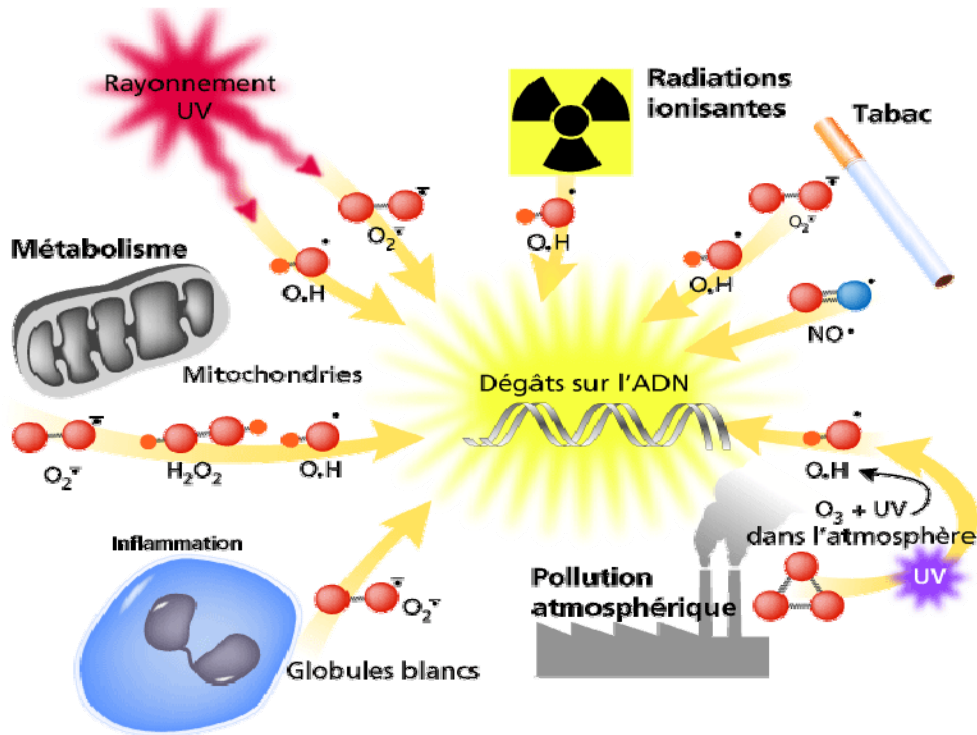


Figure IV.10 : Les principales sources de radicaux libres. *Source : lanutrition.fr*

Lors de la respiration mitochondriale et au cours du transport des électrons par la chaîne respiratoire, des substances oxygénées réactives sont générées et environ 2% de l'oxygène est converti en radicaux superoxydes directement réactifs au voisinage de la mitochondrie [377]. Les radicaux libres peuvent également être générés par l'auto-oxydation des aldoses comme le glucose [378]. Ce phénomène est particulièrement important dans la pathologie diabétique où le glucose s'accumule dans la circulation et les tissus périphériques.

Lors de l'inflammation, les cellules phagocytaires activées sont le lieu d'une explosion oxydative, où une production massive d'anions superoxydes se produit à la membrane cellulaire par le complexe NADPH oxydase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydase) [379-381]. Ce mécanisme essentiel permet de détruire les bactéries au sein des cellules phagocytaires.

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique inactif qui catalyse la réduction à un électron de l'oxygène en ion superoxyde, en réponse à une invasion par des bactéries et/ou lors d'un stress oxydant : $NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + H^+ + O_2^{\cdot-}$

L'activité NADPH oxydase nécessite l'association de protéines membranaires (Nox2, p22^{phox}) et cytosoliques (p67^{phox}, p47^{phox}, Rac1, p40^{phox}). Cette association conduit à la formation du complexe actif qui produit des anions superoxydes.

Dans les conditions normales, les microglies possèdent un complexe cytosolique non lié à Nox2 et Rac1 lié à GDP. Lors de l'activation des microglies, Nox2 est activé et la sous-unité p47 devient phosphorylée et le complexe cytosolique diffuse à la membrane (Fig. IV.11).

Harraz *et al.* (2008) a montré que SOD1 régule l'activation Nox2/Rac1-GTP [382]. La formation du complexe actif produit ensuite des anions superoxydes $O_2^{\cdot-}$ dans les microglies qui pourraient participer à la signalisation intra- et inter-cellulaire. Une étude montre que le NO produit également en grande quantité lors de l'activation microgliale après stimulation par du LPS. En se combinant à un anion superoxyde notamment, il va générer du peroxyde nitrique et devenir hautement toxique pour les oligodendrocytes [383] et entraîner la mort des cellules neuronales [384].

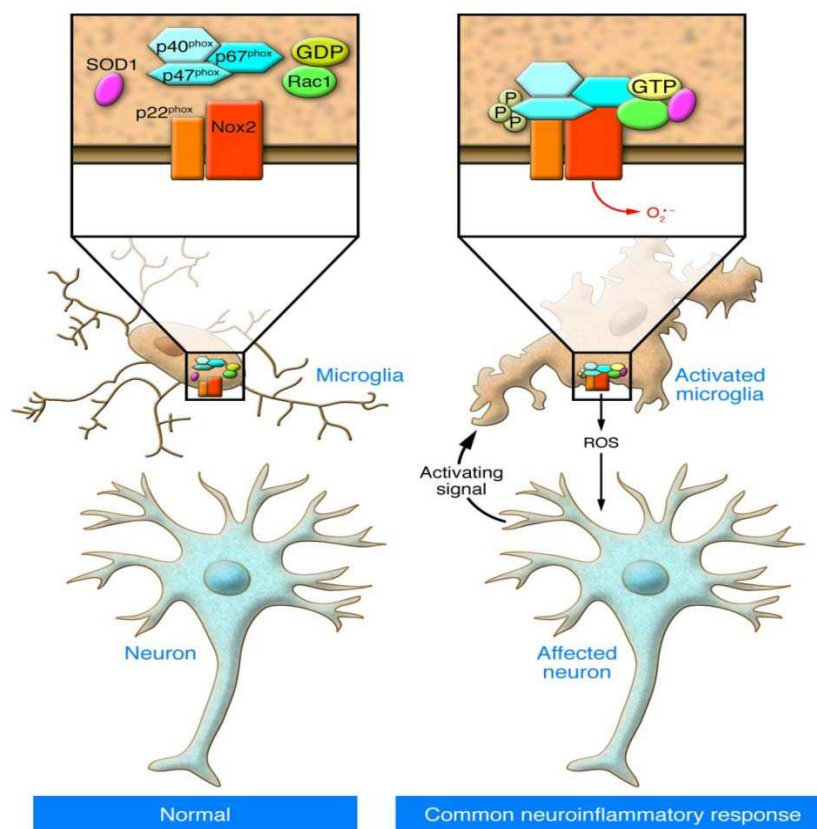


Figure IV.11 : Activation du complexe NADPH oxydase dans les microglies.

Source : Bouillée *et al.*, 2008 [384]

Enfin, divers facteurs endogènes et exogènes peuvent stimuler la production de ROS dans les cellules microgliales directement ou indirectement par l'intermédiaire de la NADPH oxydase et les mitochondries en causant des dommages de la membrane mitochondriale. Les ROS peuvent activer ensuite les protéines kinases comme PKC, p38, MAPK, ERK1/2 et PI3 kinase qui seraient impliquées dans la voie de signalisation de facteurs de transcription

NF- κ B, la phosphorylation de la sous-unité de la NADPH oxydase et l'augmentation de l'expression des enzymes protectrices et gènes anti-apoptotiques. Par contre, le dysfonctionnement mitochondrial conduit à l'augmentation des protéines pro-apoptotiques et à la mort des cellules neuronales [385]. La mort des neurones conduit à son tour à l'activation des cellules microgliales et la production du ROS et des cytokines pro-inflammatoires; ces cytokines induisent aussi la voie NF- κ B conduisant à des réponses inflammatoires et à la formation des cercles vicieux de l'inflammation chronique et mort cellulaire (Fig. IV.12).

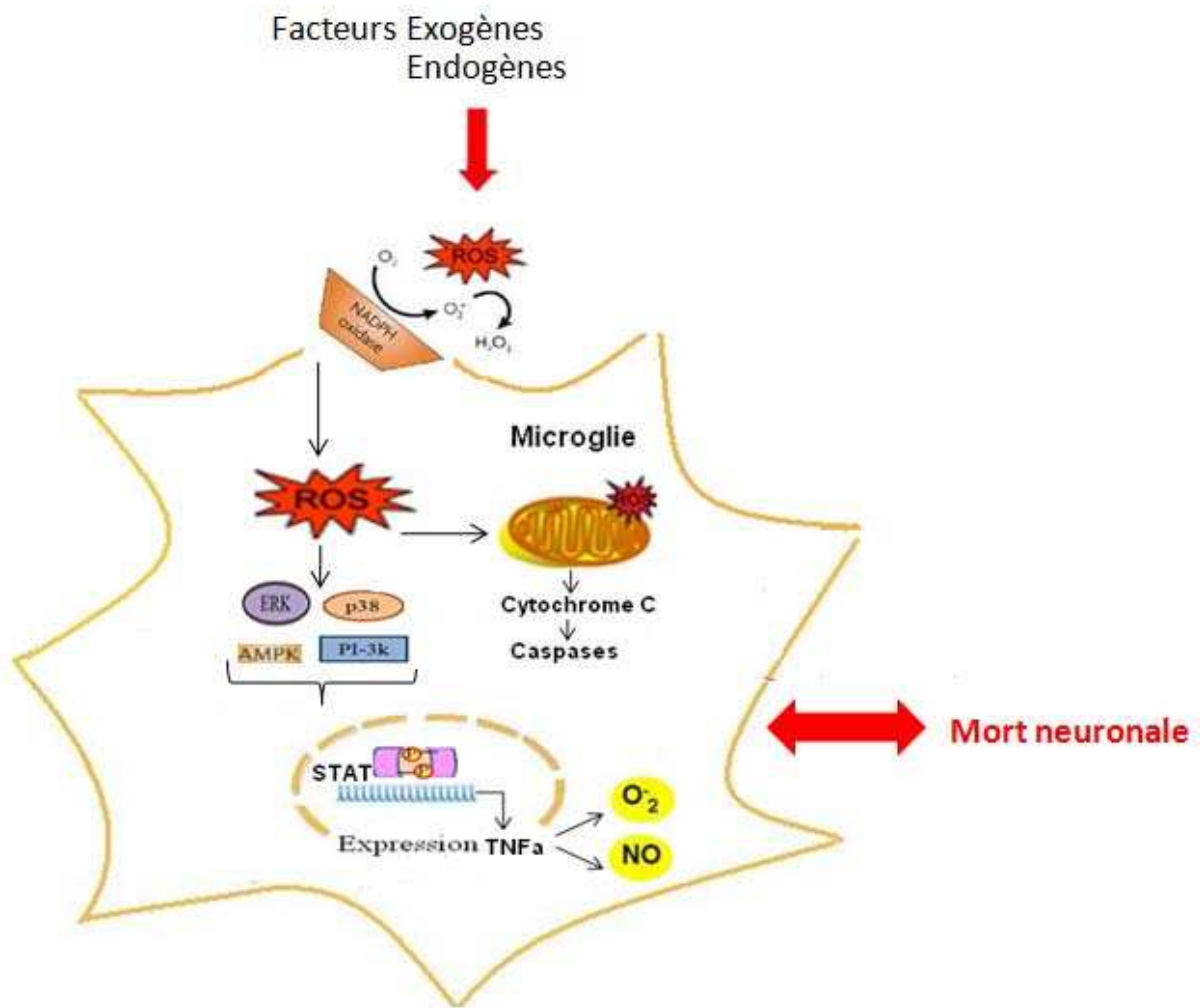
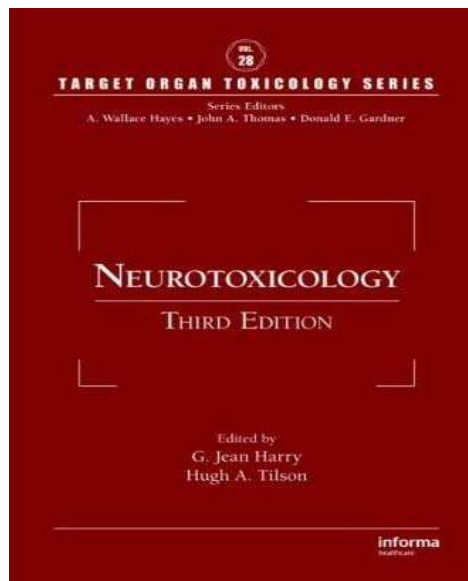


Figure IV.12 : Voie oxydative dans les microglies

Review

White fat tissue, obesity, and possible role in neurodegeneration

Ravanan P, Awada R, Harry J, Lefebvre d'Hellencourt C



7 White Fat Tissue, Obesity, and Possible Role in Neurodegeneration

Palaniyandi Ravanan

Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université de La Réunion, Ile de La Réunion, France
Present address: Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California, U.S.A.

Rana Awada

Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université de La Réunion, Ile de La Réunion, France

G. Jean Harry

Neurotoxicology Group, Laboratory of Molecular Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A.

Christian Lefebvre d'Hellencourt

Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université de La Réunion, Ile de La Réunion, France

INTRODUCTION

Obesity is considered as one of the major health issue in the world. The prevalence of obesity worldwide has progressively increased over the past decades. In the past, it has only been considered as a problem in high-income countries. Recently, it is dramatically on the rise even in low- and middle-income countries. According to the World Health Organization (WHO) more than one billion adults are overweight and 300 million of them are obese. The WHO assumes that by the year of 2015, approximately 2.3 billion adults will be overweight and more than 700 million will be obese. Since 1980, obesity rates have risen more than three-fold in some areas of North America, the U.K., Eastern Europe, the Middle East, the Pacific Islands, Australia, and China. In 2002, obesity prevalence in the U.S.A. was 34.9%, which has grown to 39% in 2005 and the WHO estimates that by 2015, it will be 53%. Obesity prevalence is rapidly increasing among children as well as adolescents worldwide. At least 20 million children under the age of five were overweight worldwide in 2005 (<http://www.who.int>). Obesity is a direct result of an imbalance between energy intake and energy expenditure. The tendency toward obesity is most of the time multifactorial. The main causes are genetic and environmental factors such as decreased physical activity and consumption of foods that are high in fats and sugars but low in vitamins and minerals.

Different parameters can be used to estimate the fat content in human; the most cited measurement is the body mass index (BMI) corresponding to the ratio:

$$\text{BMI} = \frac{\text{weight (Kg)}}{\text{Height}^2 (\text{m}^2)}$$

Applying this formula, a BMI under 18.5 is considered as underweight, between 18.5 and 24.9 corresponds to normal weight, between 25 and 29.9 is overweight, and above 30 is obese. BMI is an easy way to define overweight and obesity but has limitations, for example, BMI may be elevated for athletes. Other measurements are frequently used such as the waist circumference and waist to hip ratio (1).

ADIPOSE TISSUE

Adipose tissue is a specialized connective tissue that functions as a major storage of fat in the

form of triglycerides. In mammals, there are two forms of adipose tissue. One is brown adipose tissue which is present mainly in hibernating mammals or in human neonates and is involved in regulating the body temperature through non-shivering thermogenesis. Another form of adipose tissue is white adipose tissue (WAT), which is commonly spread, all over the body. It is a source of energy and is involved in heat insulation and mechanical cushion. WAT can be located in subcutaneous or in visceral area. Subcutaneous adipose tissue is largely defined as fat tissue between the skin and muscle, whereas visceral adipose is found within the main cavities of the body, primarily in the abdominal cavity. Abdominal visceral adipocytes are more metabolically active than abdominal subcutaneous adipocytes, as they have high lipolytic activity and release large amounts of free fatty acids. In "normal weight" people, WAT represents around 15–20% of body weight and in obese individuals it is up to 50%. WAT contains approximately 50–70% of mature adipocytes, 20–40% of stromal pre-adipocytes, 1–10% of endothelial cells, and 1–30% macrophages (Fig. 1) (2). All the above-mentioned cells are involved in adipose tissue homeostasis. Pre-adipocytes and endothelial cells make up the vasculature of tissues and enable processes such as adipose tissue growth and development. Secretion of proangiogenic factors by mature adipocytes such as vascular endothelial growth factor, contributes to ongoing angiogenesis within WAT at all times (3). Macrophages and monocytes are present in WAT and thought to aid in the clearance of necrotic adipocytes. Cells from the stromal vascular fraction of adipose tissue have shown an interesting plasticity, with the possibility to differentiate into several different lineages (Fig. 2). These cells produce a number of different inflammatory-related factors (Fig. 3) and bring hope for new therapeutics avenues (4–7).

As will be discussed later, excess of WAT increase the risk to develop pathologies, but WAT has an important role in the normal physiology. The role of adipocytes for health has been demonstrated with a model of genetically modified mouse (A-ZIP/F-1 mice) with virtually no WAT (8). This mouse model mimics human patients with severe lipodystrophic diabetes and shows insulin resistance, hyperglycemia, and fatty liver. Transplantation of a WAT from non-genetically modified mice to A-ZIP/F-1 mice reversed the phenotype to a normal situation (8, 9).

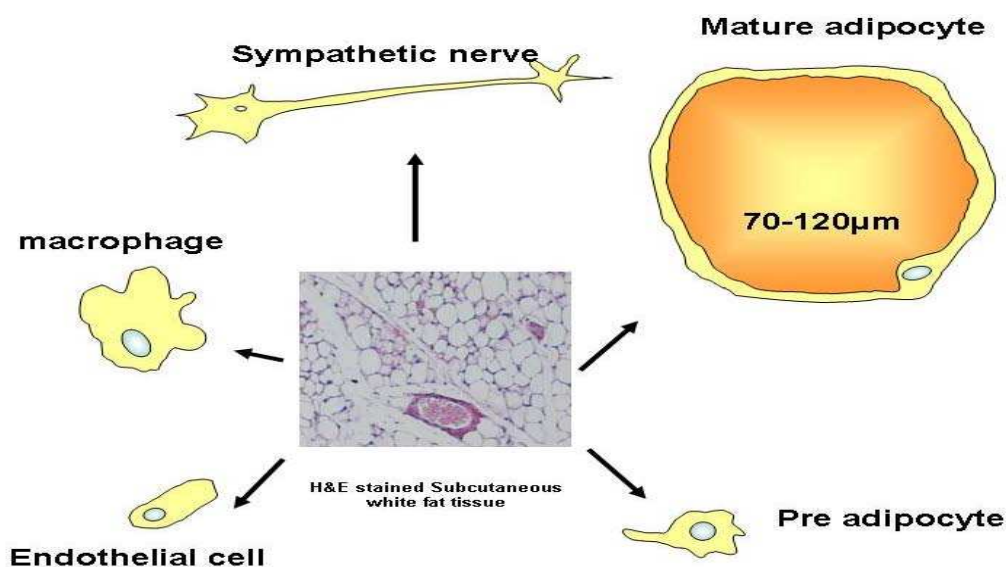


Figure 1 Cells present in the fat tissue. Source: Adapted from Ref. 3.

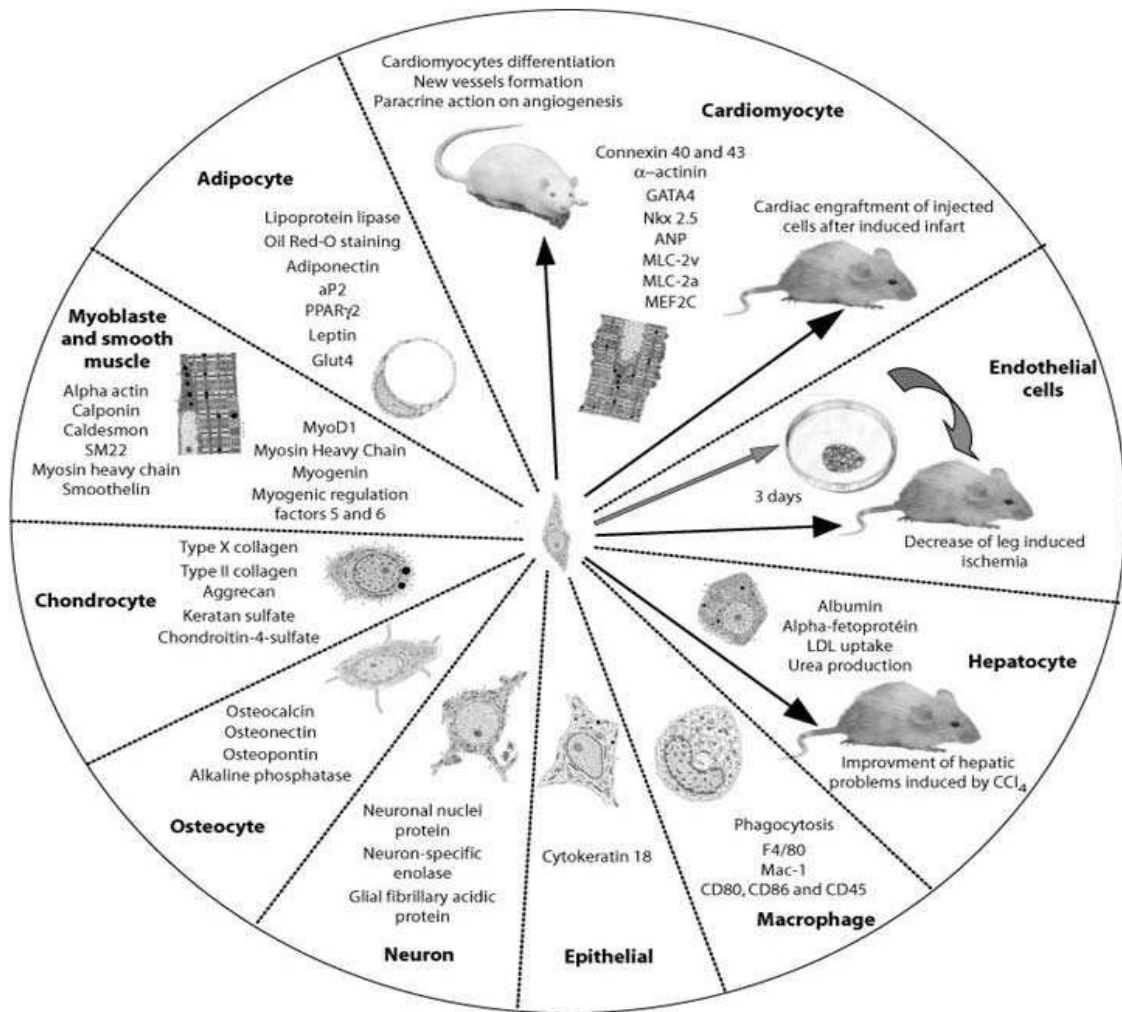


Figure 2 Differentiation potential in vitro and in vivo of adipose tissue derived SVF cells. All of the markers enabling the characterization of each cell type are presented. Source: From Ref. 4. Abbreviation: SVF, stromal vascular fraction.

Adipokines

WAT is the most familiar type of tissue in which triglycerides are stored and from there, lipids are mobilized for systemic utilization, when other tissues require energy. It was assumed in the past that, adipose tissue was just for storage of fat and it had no other function. However, in 1994, this concept was changed after the discovery of leptin, which is secreted from adipocytes to blood. Leptin acts on hypothalamus (10) and also on many other organs (11). A mutation in the gene coding for leptin (*ob*) induces obesity (10, 12). Similar consequences are observed when the gene coding for the leptin receptor is not functioning (13). Leptin concentration is correlated to the fat tissue mass. This hormone can cross the blood-brain barrier (BBB) and interact with neurons involved in food intake (14). Leptin is produced by WAT, but also by placenta, bones, mammary glands, ovarian follicles, or stomach, and the leptin receptors are founded in most of the tissues (15). Leptin activates anorexigenic neurons through a neuronal network in the hypothalamus nucleus and inhibits orexigenic neurons (16). In addition to its effects on food intake, leptin has immunomodulatory properties and is considered as a pro-inflammatory factor (17), for instance, it increases macrophages production of inflammatory cytokines (18). Beside leptin, adipocytes can produce several soluble factors, called adipokines (or adipocytokines), with

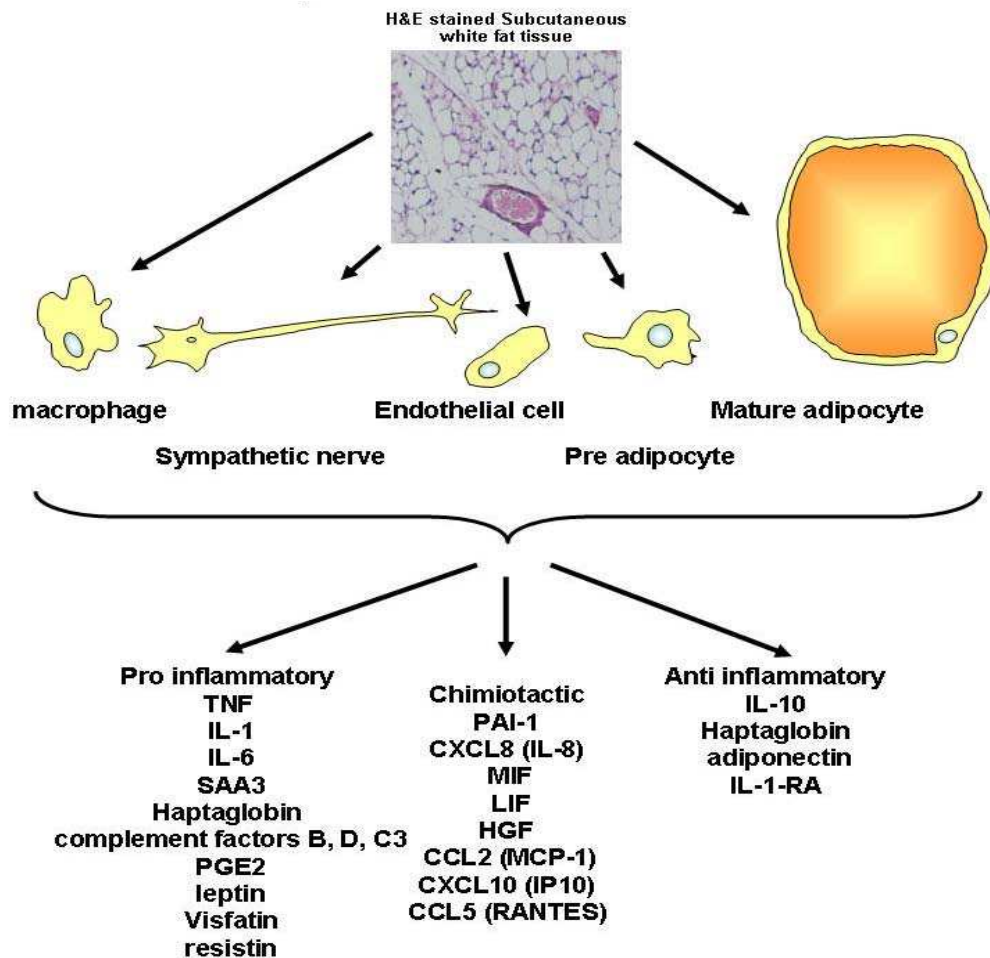


Figure 3 Inflammatory factors produced by fat tissue cells. These factors could be classified in pro-inflammatory or anti-inflammatory based on literature (160-165). Chemokines produced by white adipose tissue may play a role in the monocyte/macrophage recruitment. Source: Adapted from Refs. 2, 7 and 20.

autocrine, paracrine, or endocrine actions. These include tumor necrosis factor α (TNF- α), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), interleukin (IL) -1 α , IL-6, IL-8, IL-10, and IL-15, leukemia inhibitory factor, hepatocyte growth factor, serum amyloid A3 (SAA3), macrophage migration inhibitory factor, haptoglobin, complement factors B, D, C3, prostaglandin E2, adiponectin, and resistin (19-21). Some of these factors are involved in the regulation of the inflammatory response (Fig. 3), others such as omentin, apelin, or vaspin are produced by the fat tissue and could affect the inflammation (22-29).

In normal physiological conditions, about one-third of IL-6 circulating level is produced by WAT (30). As for leptin, IL-6 sera concentration is correlated to WAT mass. IL-6 induces a decrease of food intake and an increase of energy expenditure, in the CNS. An IL-6 knockout mouse develops obesity (31). TNF is another example of inflammatory cytokine produced by WAT. Correlations between TNF concentration, obesity level, and hyperinsulinemia level have been described (32).

INFLAMMATION AND OBESITY

Acute or chronic inflammation can be defined as the protective response of tissues of the body to irritation or injury; characterized by redness, heat, swelling, or pain.

More mechanistic definitions of inflammation have now been established, including invasion of circulating immune cells (lymphocytes and macrophages) and induction or activation of inflammatory mediators such as kinins, cyclooxygenase products, and cytokines. Chronic inflammation is an inflammatory response of prolonged duration from weeks, months, or even indefinitely whereas acute inflammation is short, lasting only a few days. Acute inflammation may be due to physical damage, chemical substances such as environmental agents, microorganisms, or other agents. Inflammation leads to a generalized sequence of events as a host defence response to limit the proliferation of pathogens. That includes production of acute phase proteins by the liver, activation of the sympathetic nervous system, changes in cardiovascular function, activation of hypothalamic pituitary leading to the production of anti-inflammatory steroids, behavioural changes which lead to energy conservation such as increased sleep, lethargy, reduced appetite, and fever which can limit the bacterial proliferation. Results of above-mentioned responses have clear benefits in infectious status. However, when these responses are not properly controlled or prolonged, it leads to excessive or inappropriate inflammation. This is the cause of many diseases including rheumatoid arthritis, psoriasis, inflammatory bowel disease, and the fundamental contributor to some types of cancer, diabetes, coronary and vascular disease, stroke, and cardiovascular diseases.

Several studies have shown that excess of fat leads to a chronic inflammation (9, 33–36). Interestingly, in insect the main strategy of defence against infection rely on the fat body which drives an innate immune response. Bacteria and fungi are recognized by receptors, i.e., toll like receptor (TLR) present on the surface of fat body cells (37–40). The NF- κ B signaling pathway is then activated and induces defence mechanisms. The fat body also has liver-like functions and stores lipids (20, 41). At some point during evolution, vertebrates split these metabolic duties between the liver and adipose tissue. However, it seems that some functions of the innate immune response have been kept in adipose tissue (42). In 1993, it was discovered that TNF- α expression was up-regulated in WAT of obese mice. This was the first study to show the link between obesity and inflammation (43). Recently we have shown the presence of TLRs on human adipocytes with expression levels of TLR type 2 (TLR2) and TLR type 4 (TLR 4) higher than those of the monocyte cell line THP-1 (44). The link between obesity and inflammation has been further illustrated in obese patients by the increased plasma levels of several pro-inflammatory markers including cytokines, fibrinogen or serum amyloids, and acute phase proteins like C-reactive protein (CRP) which was long known as a marker of inflammation, obesity, and cardiovascular diseases (45). Many of the inflammatory markers found in plasma of obese individuals appear to originate from adipose tissue (46). Adipose tissue was not usually thought of as an immune or inflammatory organ, however, evidence of a connection between obesity and inflammation has been found in the context of clinical weight loss studies. Whether the weight loss is attributable to decreased dietary intake, increased fuel use through exercise, or liposuction, loss of adipose tissue is associated with a decrease in markers of inflammation (47, 48). Furthermore, the discovery of elevated secretion of these factors from obese adipose tissue provided the first evidence of a direct relationship between obesity and systemic inflammation. The observed increase in the concentrations of these adipocytokines is now suspected to play a determinant role in the development of most of the complications of obesity (36). From this perspective, obesity can be described as a pro-inflammatory condition.

The mechanisms responsible for the up regulation of inflammation in fat tissue are not totally clear. Macrophages as well as adipocytes are likely to be key players in the development of

inflammation (49). One hypothesis proposed that accumulation of mature adipocytes without a sufficient vascularization lead some adipocytes to be in a hypoxic environment and stimulate an inflammatory response (69-72). Macrophages could then be recruited by the adipocytes-produced chemokine CCL2 and participate to the inflammation response (50, 51). Other results suggest that interactions between free fatty acids and TLRs could activate the corresponding signalling pathways and produce inflammatory factors (52, 53).

OBESITY ASSOCIATED DISEASES

Obesity is associated with number of disorders and increases the risk for a vast array of diseases, with significant impact on morbidity and mortality. The molecular basis of the link between obesity and diseases such as type 2 diabetes, fatty liver disease, atherosclerosis, hypertension, and stroke are well documented and studied. In comparison, less data are available concerning the link with diseases such as cancer, asthma, sleep apnoea, osteoarthritis, neurodegeneration or gall bladder disease (54).

Insulin Resistance and Type 2 Diabetes

Type 2 diabetes is characterized by insulin resistance which is strongly associated with obesity and physical inactivity. Insulin is released by the pancreatic beta cells in response to elevations in blood glucose. It promotes adipocyte triglycerides storage by a number of mechanisms, including fostering the differentiation of preadipocytes into mature adipocytes, stimulating glucose transport, and triglyceride synthesis as well as inhibiting lipolysis. Insulin also increases the uptake of fatty acids derived from circulating lipoproteins by stimulating lipoprotein lipase activity in adipose tissue. Insulin's metabolic effects are mediated by a broad array of tissue specific actions that involve rapid changes in protein phosphorylation and function, as well as changes in gene expression.

Insulin brings its metabolic responses by binding and activating tyrosine kinase receptor that is present on the plasma membrane. Insulin receptor substrate (IRS) proteins are efficiently phosphorylated on tyrosine on several sites leading to a cascade of intracellular events. Insulin activates a series of lipid and protein kinase enzymes which are linked to the glycogen synthesis or glucose transporters. The term "insulin resistance" corresponds to the resistance to insulin effect on glucose uptake, metabolism, or storage. Negative regulation of insulin resistance can be mediated via various pathways regulated by phosphorylation and dephosphorylation of IRS proteins (55,56). Increased production of inflammatory cytokines in WAT can affect the insulin signalling cascade. For example TNF- α and IL-6 are increased in obesity and affect the insulin signalling pathways (57-59).

On the one hand there are several evidences suggesting that a number of degenerative diseases including Alzheimer disease, Parkinson disease, Down syndrome/trisomy 21, Friedreich ataxia, Huntington disease, or Prader-Willi syndrome are the cause of an associated diabetes (60). On the other hand, diabetic neuropathy is a frequent consequence of diabetes type 2. High glucose concentration over time may damage peripheral nerves (61) and provokes numerous different symptoms such as dysesthesia, diarrhea, muscle weakness and paralysis, incontinence, or impotence among others. The control of glucose level in the blood and the duration of diabetes are important elements determining the severity of the diabetic neuropathy (60).

The mechanisms of the diabetic neuropathy development are not totally elucidated, but increase of the advanced glycation end products (62), activation of the polyol pathway (63), activation of protein kinase C and mitogen activated protein kinase (64), and deficiency in growth factors (65) have been shown to be involved in the neuropathy. In addition to the

diabetic neuropathy, an association between diabetes and neurodegenerative disorder such as Alzheimer disease, Parkinson, or Friedreich's Ataxia leading to dementia has been shown (66). A dysfunction of mitochondria could constitute a possible link between diabetes and these neurodegenerative disorders (67-69).

Cardiovascular and Metabolic Diseases

Cardiovascular disease is the major cause of death in industrialized countries. The excessive fat accumulation in adipose tissue strongly predisposes the whole body to the development of metabolic abnormalities that often accompany obesity, including hypertension, impaired glucose tolerance, insulin resistance leading to hyperinsulinemia, hyperglycaemia, and dyslipidemia. Collectively, these abnormalities have been clustered into the metabolic syndrome and individuals who are diagnosed with metabolic syndrome have significantly increased risk of developing cardiovascular disease (70). Fat distribution varies from individual to individual, and is also dependent of the gender, with an accumulation in the hip area for female and in abdomen area for men (71). Visceral obesity increases the relative risk of metabolic syndrome by more than 10 fold (70, 72). Obesity increases the risk of vascular diseases by altering the vasculature through factors produced by the WAT (73). As already discussed, obesity is associated with a chronic inflammation which will affect the vasculature. Alteration of the vessel and circulation has an impact on different organs including the heart and the brain. There is an association between obesity and ischemic stroke independently of hypertension, diabetes and cholesterol level (74-76).

Environmental Factors and Fat Tissue

The high lipophilicity of many environmental factors or industrial chemicals, such as organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs), favors their accumulation in the fat tissue (77-79). A recent study showed that PCBs promotes obesity and atherosclerosis, and induces adipocytes differentiation and pro-inflammatory adipokines production (80). Similarly it has been suggested that exposure to dioxin could affect WAT and increase the development of type 2 diabetes (81). Furthermore, some environmental factors acting as endocrine disruptors can modulate the endocrine/paracrine production of WAT. This is the case for organotin, such as tributyltin (82-84), or diethylstilbestrol, which interact with retinoic receptor and affect adipocytes differentiation (85-87). Thus, it is possible that with the long-term bioaccumulation of toxic compounds, such as dioxin, PCB, or the polybrominated biphenyl flame retardant compounds, the WAT becomes, not only a sink for these compounds, but also a target site and source of pro-inflammatory cytokines with the continued exposure. The dramatic disproportion of WAT in obese subjects may represent an elevated risk factor for adverse effects of environmental chemical exposure based upon the production of pro-inflammatory cytokines.

While concern is raised with regards to chronic inflammation, the impact of elevated cytokine production by WAT on acute toxicity is a significant consideration.

ANIMAL MODELS FOR OBESITY

Animal models of obesity have been very useful and important to understand the regulation of food intake and the imbalance in energy expenditure (Fig. 4). The first models described corresponded to spontaneous single gene mutation leading to the loss of the gene function (88). The oldest of these models described is the agouti mouse (89, 90). The mutation of the agouti gene is associated with pleiotropic effects including obesity and increased susceptibility to diabetes (90). The agouti gene involved in these phenotypes has been cloned

in 1992 (91). The cause of obesity in agouti mouse result of the agouti protein interaction with the melanocortin receptors (92). Other frequently used obesity models include invalidation of the leptin pathway either at the leptin level (*ob/ob* mouse) (10, 93) or at the receptor level (*db/db* mouse), of the *tubby* or *carboxypeptidase E* genes (94, 95). Around ten other genes have been characterized as single mutation (88). As several genes have been found to be involved in energy balance regulation and with the possibility of knocking in (KI) or out (KO) specific genes in mouse, the number of mouse models of obesity has dramatically increased (96). However, the limitations of these models are the same as in other research area, i.e., the selected gene may be needed for a correct development or compensated with others genes. These issues could be bypassed by the generation of conditional KO or KI. The gene of interest is then KO or KI after the development of the organism with system such as *cre/lox*. However, the generation of conditional mice remains difficult (97).

It should be stressed that in human single gene mutation remain rare, and most of the time obesity is polygenic. Because of the relative easiness of modifying mouse gene, mice are the most widely used model. In addition to rats, other species have been used to study obesity related issues. These include, pigs, chicken, and even bats (88, 98, and 99). Experimental studies on lower evolved organisms such as worm, *drosophila*, or zebra fish have not been used often in obesity studies but their use could contribute to understanding the basic mechanisms of energy metabolism (100).

In addition to genetically modified or selected animals, several diet-induced obese models (DIO) have been described. However, as many different specific diets leading to obesity exist, comparisons between studies are difficult (101,102). In animal models, a basic indication of the fat quantity can be estimated by measuring the total weight or the weight of the WAT after dissection. However, dual energy X ray absorption with appropriate validations could be used to quantify the fat *in vivo* and allows to follow an animal over time (103). An example of such measurements with different fat contents in mice is shown in Figure 5. This demonstrates an imaging method for determining body fat as well as skeletal alterations.

NEURODEGENERATION AND OBESITY

Interactions between WAT and nervous system are well known and review articles on factors involved in communication between WAT and sympathetic nervous system or CNS have been published (104–106).

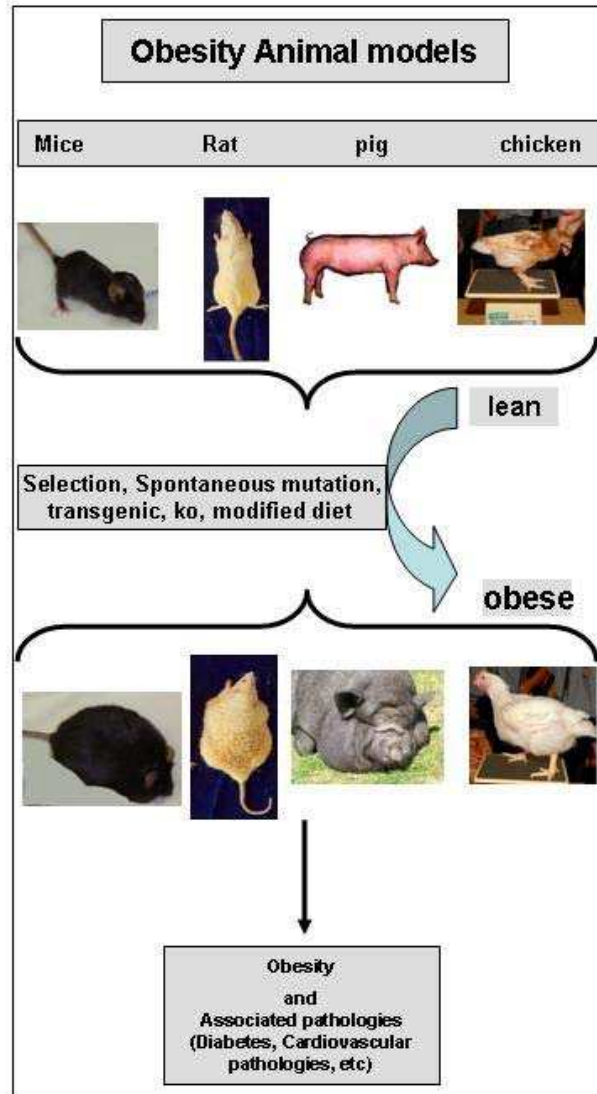


Figure 4 Animal models of obesity. Different animal species can be used to study obesity-related disorders including selection, spontaneous mutations, overexpression or impairing of genes, or modified diet. Abbreviation: KO, knock out.

As already seen, the cells present in the WAT can produce adipokines and cytokines playing a role in weight regulation and inflammation. Interactions between peripheral cytokines and brain have been reported, even in presence of an intact BBB (107). In case of brain or spinal cord injury, damage to the barriers would allow for an increased transport of blood borne substances and under these conditions it is likely that adipokines could then reach the brain parenchyma (108).

Neuronal damage can occur as a function of an acute injury or manifest over a prolonged

period of time. Neurodegeneration can be characterized by either a structural or functional neuronal lost. Acute neurodegeneration occurs in timely exogenous events such as traumatic injury, chemical exposure, or endogenous events such as ischemia or cerebral vascular accidents.

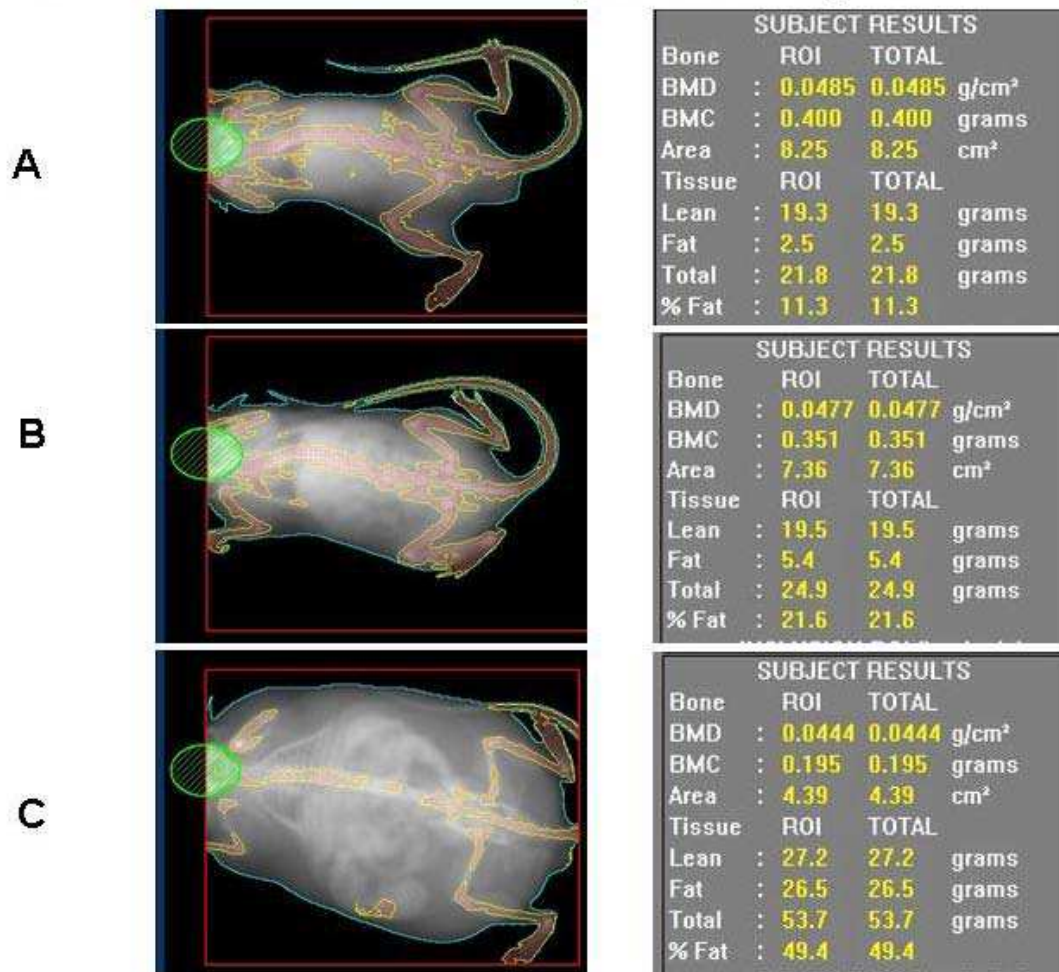


Figure 5 fat measurements. Estimation of fat content by dual energy X-ray absorptiometry using a LUNAR PIXImus bone densitometer (GE Healthcare, Fairfield, CT) as described previously (166) in 10 week-old male mouse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.). (A) C57BL/6J mouse, (B) agouti (B6.Cg-Ay/J) mouse, (C) Ob/ob mouse (B6.V-Lepob/J). Abbreviations: BMD, bone mineral density; BMC, bone mineral content; ROI, region of interest.

Chronic neurodegeneration is often associated with more progressive neurodegenerative diseases as seen in pathologies such as Alzheimer, Parkinson, or Huntington diseases.

Numerous studies have demonstrated a link between neuroinflammation and neurodegeneration. With brain injury and in neurodegenerative disease states there is an associated reaction of the brain non-neuronal cells. The glial cells, primarily the microglia and astrocytes, response can serve as both a source of growth factors and neurotoxic factors to the localized brain tissue.

Based upon their localization and production of pro-inflammatory cytokines, microglia have been suggested to play a role in neurodegenerative diseases (109,110). Details of microglia

and neuroinflammation are provided in a separate chapter. It is well accepted that activated microglia serve as an important source of inflammatory cytokines. While in vitro studies have demonstrated that the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha can induce death of oligodendroglia (the myelinating cells of the brain), other in vivo studies have suggested that this pro-inflammatory cytokine can initiate neuronal death in either acute organotin toxicity or in the penumbra surrounding an ischemic infarct. As in periphery, inflammation can have both beneficial and deleterious effects depending upon the in vivo regulatory mechanisms (110). Inflammation is not always the origin of neuronal death, but even if it is a secondary event, it can influence the more long-term fate of the neuron (111). A recent study has demonstrated an induction of adipokines expression in the brain following traumatic brain injury (112). Given that inflammatory factors are maintained under strict regulatory control in the normal brain, any contributor however minor may be significant in the overall homeostatic, injury, and repair process. It is possible that the adipokines contribute in the overall induction and regulation of the inflammatory response in the brain.

Diet

Food and diet quantity are key elements in overweight and obesity development, but food composition can also influence directly and indirectly the CNS functioning (Fig. 6). Epidemiologic results as well as experimental animal studies show that developed country diet type (i.e., rich in total fat, saturated fat, linoleic acid, cholesterol, and refined sugar) are associated with an increased risk for dementia and a decrease of neuronal plasticity and learning (113,114). Oxidative stress and inflammation in cerebral cortex and decrease of the neurotrophic factor brain derived neurotrophic factor (BDNF) could be a significant contributor to these negative effects (114,115). In comparison, a diet including foods rich in polyunsaturated fat (found in fish), could reduce the risk of neurodegenerative or vascular dementia (113,116). Presence of curcuma or feluric acid in the diet could also have neuroprotective effects (117). As an alternative to a diet rich in fat, intermittent fasting is more beneficial than caloric restriction in terms of reducing serum glucose and insulin and increasing neuronal resistance to excitotoxic stress (118).

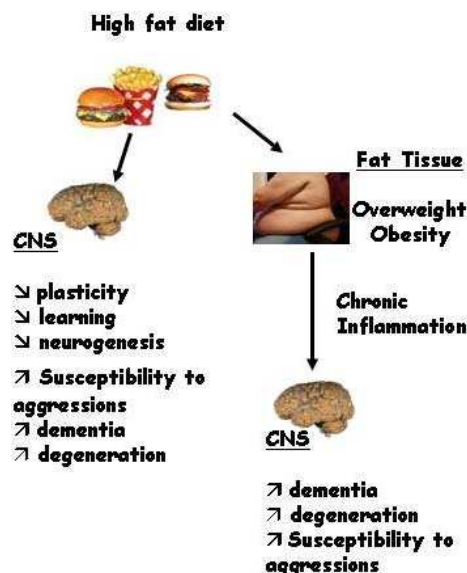


Figure 6 Diet and fat tissue influence on CNS. Diets rich in saturated fat, cholesterol, linoleic acid, or refined sugar directly affect the CNS and also contribute to the development of fat tissue and chronic inflammation. Obesity and overweight are associated with CNS disorders.

As seen previously, diet influences CNS functioning and development of fat tissue due to disequilibrium in the energetic balance, will also affect the CNS. It is well accepted that obesity induces a chronic inflammation which influence the development of obesity associated pathologies (59,105). Several studies have shown the link between these pathologies and obesity, but very few data are available concerning the role of WAT excess on neurodegenerative disorders.

It is possible that chronic inflammation would serve to change the normal constitutive level of circulating cytokines and modify the CNS response to injuries as suggested by a recent study showing that lipopolysaccharide induced systemic inflammation provokes a chronic neuroinflammation and a progressive neurodegeneration (119). As we will discuss in the last part, stem cell sources have been found in the CNS, however neurons regeneration capacities are often limited. The different cell type present in the CNS has variable sensibility to pathologies or traumatism and it is possible that obesity could influence this susceptibility (Fig. 6) (120).

Human Epidemiologic Data

Epidemiologic studies suggest that obesity influence CNS functionality. Indeed obesity is associated with decrease cognitive functioning, hypertension, depression, and suicidal thoughts, in child and teens (121,122). Obesity is also associated with sleeping apnea, anxieties and bipolar disorders. Furthermore, numerous clinical studies have demonstrated that obese patients have a higher risk to develop neurodegenerative diseases, including Alzheimer disease (123).

Pr D. Gustafson from the Institute for Neuroscience and Physiology, (Göteborg University, Sweden) was one of the first to demonstrated, in a Swedish population sample, a relationship between overweight and risks to develop Alzheimer disease (124). The risk increase could be due to vascular disorders or to WAT secreted factors (125). It should be stressed that patients before entering in a dementia phase, have a tendency to lose weight, which changed their BMI and that a weight under normal is associated with Alzheimer disease (124). It is thus important in such epidemiologic studies to take this factor in account and to use an index estimating fat mass before the development of the pathology. Overweight or obesity effects are not limited to

Alzheimer disease, as a relationship between BMI, cerebral atrophy and white matter lesions in elderly woman have also been described (126,127).

Animal Models of Neurodegenerative Diseases

Numerous animal models of neurodegeneration have been described, murine models being the most used. However, neurodegeneration models have also been developed with invertebrates, such as nematodes or drosophila and with low evolved vertebrate, such as zebra fish (128,129). Neurodegeneration can be induced by over expression or under expression of a gene, by a trauma or by chemical agents (Fig. 7).

In murine model of obesity, an increased susceptibility of CNS to trauma has been observed. High dietary fat is a significant risk for cerebral oxidative stress development, neuronal inflammation, vascular dementia, and Alzheimer disease (113,115). In genetic models, obesity is an aggravating factor in chemical-induced neurodegeneration. In mice deficient for the leptin gene (ob/ob), the effects of two neurotoxicants are exacerbated. Two different chemicals have been used in this study, methamphetamine, which affects dopaminergic neurons and kainic acid, affecting the hippocampus (130). Furthermore, an increase in the susceptibility of dopaminergic neurons in the substantia nigra in response of a treatment with the chemical 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) has been

observed in high-fat diet-induced obesity. MPTP is often used in animal models of Parkinson disease. An increase in systemic inflammation, a decrease in an enzyme playing a role in free radical defence concentration in substantia nigra (super oxide dismutase), a modification in the lipid peroxidation and an increase of the striatal nitric oxide synthase (nNOAS) could play a role in this exacerbated response (131).

ADULT NEUROGENESIS AND OBESITY

It is now known that in the adult brain there exists the capacity for the generation of new neurons and glia. The idea of the presence of a population of stem cells capable of proliferation and differentiation in the adult CNS is not new, Altman and Bayer proposed this concept as early as 1962 (132).

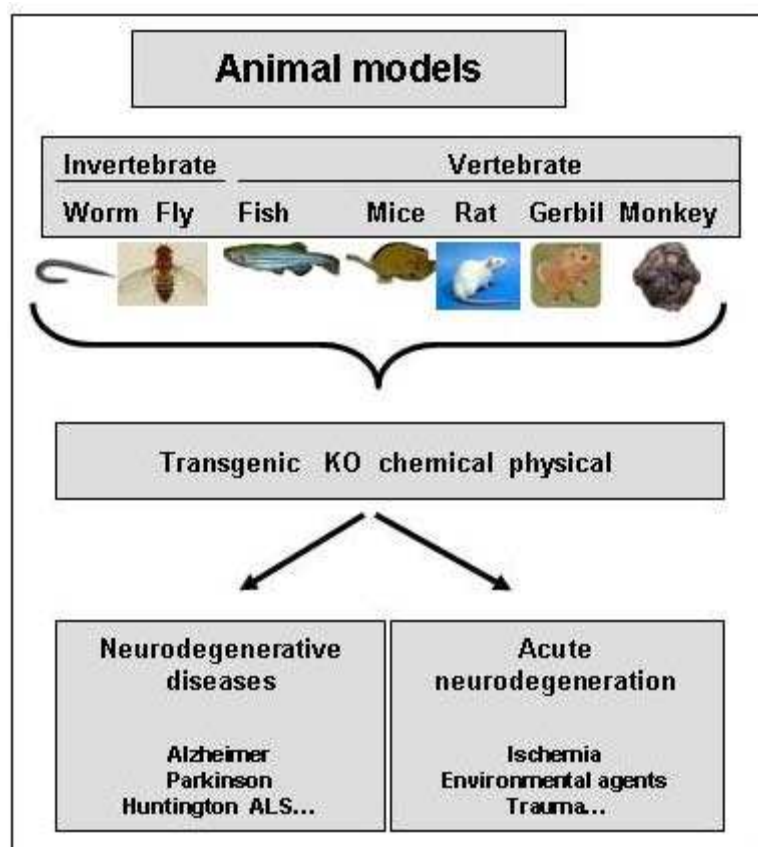


Figure 7 Animal models of neurodegeneration. Different animal species can be used to study neurodegenerative disorders induced by over expression or impairing of genes, by neurotoxic agents or physically. These models mimic acute or chronic neurodegeneration disorders. Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; KO, knock out.

However, it was not until the 1990s that several laboratories identified neurogenic regions within the adult rodent and avian brain. The presence of stem cells was demonstrated primarily in the subventricular zone (133). These stem cells migrate in the rostral migratory stream to reach the olfactory bulb where these cells differentiate in granular and periglomerular neurons. Further examination showed that the subgranular zone of the hippocampus represented another neurogenic region of the adult brain (134). These works open the way to a new and extensive field of research and to new therapeutic strategies based

on brain neurogenesis (135). Neurogenesis in the adult CNS is not limited to the sub ventricular zone and the hippocampus regions, recent studies have shown that new neurons can be observed in the hypothalamus (136). It is now well accepted that a constitutive neurogenesis exists in adult, but several factors can modulate the production of new neurons (Fig. 8). For example, exercise or an enriched environment (cage with more space and enriched with stimulating elements such as tunnels or shelters) induces increases in the number of proliferating neurons in both the hippocampus and the subventricular zone (137,138). More importantly, with regards to inflammatory factors, injury to the brain such as ischemia (139), epilepsy (140), or chemically induced neurodegeneration (141) induces an increase in neurogenesis. This induction has been termed "injury-induced neurogenesis." This topic is covered in more detail in a separate chapter in this issue, however, it is briefly mentioned here as an alternative nervous system process that can be influenced by the underlying inflammatory state of the tissue.

Addition of exogenous trophic factors including epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), BDNF, glial-derived neurotrophic factor (GDNF), or insulin-like growth factors-1 and -2 (IGF-1, IGF-2) also induce neurogenesis (142). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces a hypothalamus neurogenesis and more specifically in the satiety centres, inducing a weight loss persisting after the treatment (143).

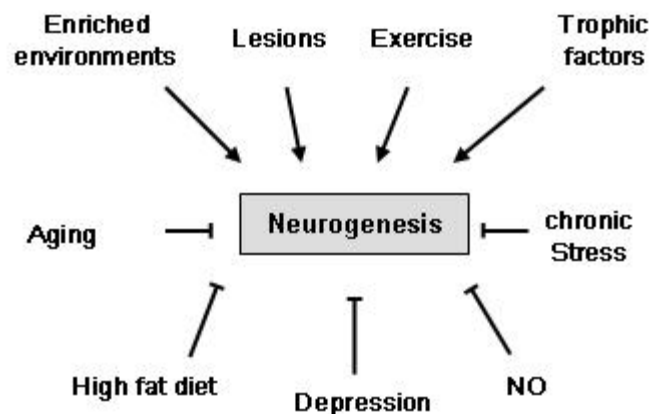


Figure 8 Factors modulating neurogenesis activity. ↓, neurogenesis augmentation; ↑, neurogenesis inhibition

Diet has been shown to influence adult neurogenesis in that adult male rats maintained on a high fat diet show a decrease in the level of constitutive hippocampal neurogenesis. This occurs in the absence of overt obesity and is proposed to occur through an increase in serum corticosterone levels (144). Any longterm impact of a change in this process, either as an acute or chronic change leading to a decline or increase in the number of new cells generated has not been determined. However, the observation that diet can alter the constitutive levels and the susceptibility of these cells to metabolic or inflammatory changes may represent a new target cell and process within the brain that could be altered by the body fat status.

EXERCISE, OBESITY, AND NEURODEGENERATION

As previously mentioned, exercise has a positive effect on neurogenesis and brain health in animal model and human (145). The protective effect of exercise on neurodegenerative disorder is suggested in several studies on different pathologies (146) including spinal cord injury (147), stroke (148), ischemia (149), and spinal muscular atrophy (150,151). In model of Parkinson, exercise does not demonstrate a direct preventive type effect however it seems to offer an improvement of recovery of function (152,153). However the exercise intensity requirement remains to be determined (154), as intense or forced exercise can increase vulnerability in chemically induced neurodegeneration (155). The mechanisms of exercise inducing neurogenesis and neuroprotection may involve glia maturation factor (GMF) and BDNF (156,157). Interestingly, it has been recently demonstrated that exercise reduces resistin and inflammatory cytokines in diabetes type 2 patients (158,159).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In the context of life duration expenditure and pandemic development of obesity, it is important to study factors influencing the CNS response to chronic and acute aggressions. Epidemiologic as well as animal studies suggest a negative role of overweight and obesity on neurodegenerative diseases development as well as on acute neurodegeneration disorders.

A better understanding of the molecular mechanisms leading to this increased susceptibility of the CNS to aggressions should bring new perspectives on prevention and open the way to new therapeutic targets. Diet influences directly CNS functioning and specific diet could be beneficial in terms of neurons resistance to chronic or acute aggressions. As exercise improves several obesity associated pathologies symptoms, as well as induces neurogenesis, it is also an interesting therapeutic option to further explore, but the parameters of this physical activity remains to be better determined. The effects of WAT excess on constitutive or induced neurogenesis remain to be determined and are probably an important factor to consider in order to develop reparative therapeutic strategies based on the use of endogenous or exogenous stem cells.

ACKNOWLEDGMENTS

R.P. has been funded by fellowships from Conseil Régional de La Réunion.

REFERENCES

1. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-28.
2. Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 163-9.
3. Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 2004; 83: 653-8.
4. Roche R, Hoareau L, Mounet F, Festy F. Adult stem cells for cardiovascular diseases: the adipose tissue potential. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 791-8.
5. Noel D, Caton D, Roche S, et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008; 314: 1575-84.
6. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells - basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-27.
7. Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 2006; 32: 393-401.
8. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 271-8.
9. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 461S-5S.
10. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.
11. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-70.
12. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950; 41: 317-18.
13. Chua SC Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996; 271: 994-6.
14. Schwartz MW, Woods SC, Seeley RJ, et al. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* 2003; 52: 232-8.
15. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. Nonadipose tissue production of leptin, leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-33.
16. Kalra SP, Dube MG, Pu S, et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999; 20: 68-100.
17. Lago R, Gomez R, Lago F, et al. Leptin beyond body weight regulation-current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cell Immunol* 2008.
18. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998; 12: 57-65.
19. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006; 27: 762-78.
20. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 939-49.
21. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145: 2273-82.
22. Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, et al. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1732: 96-102.
23. de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 2007; 56: 1655-61.
24. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E1253-61.
25. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471-6.
26. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764-71.
27. Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, et al. Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol* 2005; 245: 7-9.
28. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, et al. TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 2006; 20: 1528-30.
29. Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10610-15.
30. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847-50.

31. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002; 8: 75-9.
32. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-15.
33. Cencello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 2006; 113: 1141-7.
34. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 2001; 17: 953-66.
35. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 911-9; quiz 920.
36. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 2007; 56: 1010-3.
37. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-6.
38. Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 2003; 426: 33-8.
39. Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, et al. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* 2003; 302: 2126-30.
40. Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 512-20.
41. Rolff J, Siva-Jothy MT. Invertebrate ecological immunology. *Science* 2003; 301: 472-5.
42. Mortensen RF. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res* 2001; 4: 163-76.
43. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
44. Bes-Houtmann S, Roche R, Hoareau L, et al. Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 131-7.
45. Vidal H. [Obesity and inflammation: the adipocytokines]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2003; 64: S40-4.
46. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1078-81.
47. Nicoletti G, Giugliano G, Pontillo A, et al. Effect of a multidisciplinary program of weight reduction on endothelial functions in obese women. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: RC5-8.
48. Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 968-70.
49. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-808.
50. Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 2006; 116: 33-5.
51. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006; 116: 115-24.
52. Kim F, Pham M, Luttrell I, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* 2007; 100: 1589-96.
53. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007; 282: 35279-92.
54. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-7.
55. Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 972-9.
56. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E413-22.
57. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144: 3765-73.
58. Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 363-78.
59. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-30.
60. Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med* 2004; 82: 510-29.

61. Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 36-45.
62. Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 953-61.
63. Oates PJ. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 14-36.
64. Chan L, Terashima T, Fujimiya M, Kojima H. Chronic diabetic complications: the body's adaptive response to hyperglycemia gone awry? *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006; 117: 341-52.
65. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2004; 9: 26-53.
66. Pasquier F, Boulogne A, Leys D, Fontaine P. Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes Metab* 2006; 32: 403-14.
67. Moreira PI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci* 2007; 257: 206-14.
68. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vecsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 2007; 257: 221-39.
69. Calabrese V, Lodi R, Tonon C, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 2005; 233: 145-62.
70. Mathieu P, Pibarot P, Larose E, et al. Visceral obesity and the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 821-36.
71. Vague P. [Obesity and thinness; obesity, diabetes and arteriosclerosis.]. *Vie Med* 1954; 35: 497-502.
72. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, et al. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2003; 163: 427-36.
73. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 996-1003.
74. Hankey GJ. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? *Stroke* 2006; 37: 2181-8.
75. Kurth T, Gaziano JM, Berger K, et al. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2557-62.
76. Kurth T, Gaziano JM, Rexrode KM, et al. Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women. *Circulation* 2005; 111: 1992-8.
77. Mullerova D, Kopecky J. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res* 2007; 56: 375-81.
78. Kutz FW, Wood PH, Bottimore DP. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Rev Environ Contam Toxicol* 1991; 120: 1-82.
79. Quintana PJ, DelPino RJ, Korrick S, et al. Adipose tissue levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 854-61.
80. Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, et al. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 761-8.
81. Fujiyoshi PT, Michalek JE, Matsumura F. Molecular epidemiologic evidence for diabetogenic effects of dioxin exposure in U.S. Air force veterans of the Vietnam war. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1677-83.
82. Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2141-55.
83. Grun F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 2006; 147: S50-S55.
84. Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, et al. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 766-74.
85. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Heindel JJ. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl* 2008; 31: 201-8.
86. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Jefferson WN. Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 912-17.
87. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 290-6.
88. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. *Obes Rev* 2007; 8 (Suppl 1):55-61.
89. Dickies MM. A new viable yellow mutation in the house mouse. *J Hered* 1962; 53: 84-6.

90. Yen TT, Gill AM, Frigeri LG, et al. Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow A(vy)⁻ mice: ectopic expression of the agouti gene. *FASEB J* 1994; 8: 479-88.
91. Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 1992; 71: 1195-204.
92. Ellacott KL, Cone RD. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361:1265-74.
93. Carroll L, Voisey J, van Daal A. Mouse models of obesity. *Clin Dermatol* 2004; 22: 345-9.
94. Kleyen PW, Fan W, Kovats SG, et al. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. *Cell* 1996; 85: 281-90.
95. Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, et al. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* 1995; 10: 135-42.
96. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 2006; 14: 529-644.
97. Rossant J, McMahon A. Cre⁻ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev* 1999; 13: 142-5.
98. Hen G, Yosefi S, Simchaev V, et al. The melanocortin circuit in obese and lean strains of chicks. *J Endocrinol* 2006; 190: 527-35.
99. Dietrich HM. Housing, breeding and selecting chickens of the Obese strain (OS) with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Lab Anim* 1989; 23: 345-52.
100. Schlegel A, Stainier DY. Lessons from lower organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet* 2007; 3: e199.
101. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36: 485-501.
102. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007; 15: 798-808.
103. Nagy TR, Clair AL. Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obes Res* 2000; 8: 392-8.
104. Bartness TJ, Kay Song C, Shi H, et al. Brain-adipose tissue cross talk. *Proc Nutr Soc* 2005; 64:53-64.
105. Canello R, Tounian A, Poitou C, Clement K. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab* 2004; 30: 215-27.
106. Turtzo LC, Lane MD. Completing the loop: neuron-adipocyte interactions and the control of energy homeostasis. *Horm Metab Res* 2002; 34: 607-15.
107. Pan W, Kastin AJ. Interactions of cytokines with the blood-brain barrier: implications for feeding. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 827-31.
108. Pan W, Kastin AJ, Rigai T, et al. Increased hippocampal uptake of tumor necrosis factor alpha and behavioral change in mice. *Exp Brain Res* 2003; 149: 195-9.
109. Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol* 2007; 82: 235-46.
110. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease - a double-edged sword. *Neuron* 2002; 35: 419-32.
111. Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2006; 29: 518-27.
112. Brown R, Thompson HJ, Imran SA, et al. Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain. *Neurosci Lett* 2008; 432: 73-8.
113. Kalmijn S. Fatty acid intake and the risk of dementia and cognitive decline: a review of clinical and epidemiological studies. *J Nutr Health Aging* 2000; 4: 202-7.
114. Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, et al. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 2002; 112: 803-14.
115. Zhang X, Dong F, Ren J, et al. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 2005; 191: 318-25. *Med Sci (Paris)* 2000; 16: 164-70.
116. Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, et al. Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia. *Exp Gerontol* 2005; 40: 257-70.
117. Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, et al. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Res* 2007; 32: 757-73.

118. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6216-20.
119. Qin L, Wu X, Block ML, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007; 55: 453-62.
120. Palaniyandi R. Modulation of inflammation in fat tissue: Potential involvement in chemically induced neurodegeneration [Thèse de doctorat]. Saint Denis: Université de La Réunion. 2007: 171.
121. Zimetkin AJ, Zoon CK, Klein HW, Munson S. Psychiatric aspects of child and adolescent obesity: a review of the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004; 43: 134-50.
122. Li Y, Dai Q, Jackson JC, Zhang J. Overweight Is Associated With Decreased Cognitive Functioning Among School-age Children and Adolescents. *Obesity* 2008, (Silver Spring).
123. Whitmer RA. The epidemiology of adiposity and dementia. *Curr Alzheimer Res* 2007; 4: 117-22.
124. Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, et al. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1524-8.
125. Gustafson D. Adiposity indices and dementia. *Lancet Neurol* 2006; 5: 713-20.
126. Gustafson D, Lissner L, Bengtsson C, et al. A 24-year follow-up of body mass index and cerebral atrophy. *Neurology* 2004; 63: 1876-81.
127. Gustafson DR, Steen B, Skoog I. Body mass index and white matter lesions in elderly women. An 18-year longitudinal study. *Int Psychogeriatr* 2004; 16: 327-36.
128. Birman S. La drosophile, un modèle génétique pour l'étude des maladies neurodégénératives.
129. Schmidt E, Seifert M, Baumeister R. *Caenorhabditis elegans* as a model system for Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 2007; 4: 199-217.
130. Sriram K, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP. Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. *Neuroscience* 2002; 115: 1335-46.
131. Choi JY, Jang EH, Park CS, Kang JH. Enhanced susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in high-fat diet-induced obesity. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 806-16.
132. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962; 135: 1127-8.
133. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8591-5.
134. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 92: 11879-83.
135. Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, et al. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J Neurochem* 2007; 102: 1459-65.
136. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol* 2007; 505: 209-20.
137. Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, et al. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2042-6.
138. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13427-31.
139. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 1998; 18: 7768-78.
140. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, et al. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10432-7.
141. Harry GJ, McPherson CA, Wine RN, et al. Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotox Res* 2004; 5: 623-7.
142. Chen H, Tung YC, Li B, et al. Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 1148-62.
143. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 2005; 310: 679-83.
144. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 2006; 13: 1385-8.
145. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 2007; 30: 464-72.

146. Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 2001; 21: 5678-84.
147. Rojas Vega S, Abel T, Lindschulten R, et al. Impact of exercise on neuroplasticity-related proteins in spinal cord injured humans. *Neuroscience* 2008; 153: 1064-70.
148. Guo M, Cox B, Mahale S, et al. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke. *Neuroscience* 2008; 151: 340-51.
149. Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience* 2004; 124: 583-91.
150. Grondard C, Biondi O, Armand AS, et al. Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 2005; 25: 7615-22.
151. Biondi O, Grondard C, Lecolle S, et al. Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 2008; 28: 953-62.
152. O'Dell SJ, Gross NB, Fricks AN, et al. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. *Neuroscience* 2007; 144: 1141-51.
153. Tillerson JL, Caudle WM, Reveron ME, Miller GW. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2003; 119: 899-911.
154. McCrate ME, Kaspar BK. Physical activity and neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med* 2008; 10: 108-17.
155. Ramsden M, Berchtold NC, Kesslak JP, et al. Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion. *Brain Res* 2003; 971: 239-44.
156. Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 61: 147-53.
157. Zaheer A, Haas JT, Reyes C, et al. GMF-knockout mice are unable to induce brain-derived neurotrophic factor after exercise. *Neurochem Res* 2006; 31: 579-84.
158. Kadoglou NP, Iliadis F, Angelopoulou N. The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14: 837-43.
159. Kadoglou NP, Perrea D, Iliadis F, et al. Exercise reduces resistin and inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 719-21.
160. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007; 178: 1748-58.
161. Beltowski J. Apelin and visfatin: unique beneficial adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 2006; 12: RA112-19.
162. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, et al. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005; 174: 5789-95.
163. Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PLoS ONE* 2006; 1: e31.
164. Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008.
165. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, et al. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2272-9.
166. Myers LK, Bhattacharya SD, Herring PA, et al. The isozyme-specific effects of cyclooxygenase-deficiency on bone in mice. *Bone* 2006; 39: 1048-52.
167. Leonard BE. Inflammation, depression and dementia: are they connected? *Neurochem Res* 2007; 32: 1749-56.
168. Lee YH, Tharp WG, Maple RL, et al. Amyloid Precursor Protein Expression Is Upregulated in Adipocytes in Obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 2008.



Objectifs de la thèse

L'activité de recherche du GEICO « Groupe d'Étude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (EA 4516) », dirigé par le Pr. Lefebvre d'Hellencourt, est centrée sur la fonction sécrétoire du tissu adipeux et son rôle dans l'inflammation et la résistance à l'insuline.

Ce groupe de recherche s'investit dans trois champs d'études :

Le premier concerne l'inflammation et l'immunité innée. Il porte sur l'étude des mécanismes de régulation du statut inflammatoire de l'adipocyte par les acides gras et les endocannabinoïdes *via* les récepteurs TLR et CBs. Cette étude est essentiellement basée sur l'utilisation d'approches siRNA sur des modèles d'adipocytes *in vitro*, et sur l'utilisation de modèles de souris transgéniques invalidées pour ces récepteurs.

Le deuxième concerne le stress oxydant et la physiopathologie cellulaire. Il porte sur la glycation de l'albumine et son impact sur les propriétés anti-oxydantes de l'albumine dans le cadre du diabète et de l'obésité. Cet axe s'appuie essentiellement sur la purification et l'analyse structurale et fonctionnelle (*in vitro* et *in vivo*) de l'albumine glyquée à partir de plasma de patients diabétiques.

Le troisième concerne la recherche de stratégies anti-inflammatoires d'ordre nutritionnel et médicinal face à l'obésité et au diabète associé. Il a pour objectif d'étudier la composition en antioxydants de produits naturels issus de la biodiversité végétale de La Réunion (en particulier fruits tropicaux et plantes à parfum, aromatiques et médicinales) et d'évaluer leur effet anti-inflammatoire (*in vitro* et *in vivo*) et potentiel santé face à la dérégulation de l'adipocyte au cours de l'obésité.

Mon projet de thèse s'inscrit dans les thématiques principales du GEICO, l'inflammation et le stress oxydant dans l'obésité et les pathologies associées. Il a été démontré que le tissu adipeux sécrète des médiateurs de l'inflammation qui pourraient influencer la réponse inflammatoire cérébrale et l'activation des microglies. Par ailleurs, des études récentes ont permis de montrer l'importance de la réponse inflammatoire cérébrale dans les pathologies neurodégénératives et dans certains modèles de neurodégénérescence, notamment le modèle de neurodégénérescence aigüe de l'hippocampe, induite par un agent neurotoxique [386]. Mais, le rôle potentiel de médiateurs de l'inflammation produits par le tissu adipeux sur la neurodégénérescence du SNC n'a pas encore été étudié.

L'objectif principal de ce projet est de mettre en évidence l'importance de ces médiateurs dans la modulation du stress oxydant et de la réponse inflammatoire des microglies.

Au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes d'abord intéressés à l'autotaxine comme un de médiateurs de l'inflammation sécrétés à la fois par le tissu adipeux et le SNC. Son effet

sur les microglies dans le contexte de stress oxydant et d'inflammation n'ayant jamais été étudié auparavant.

Pour ce faire, nous avons mené quatre principales investigations :

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'ATX sur le stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans les cellules microgliales murines BV₂ (Article 1, en révision dans le journal *free radical biology and medicine*).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'ATX sur l'inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS) ou le triméthylétain (TMT) aussi bien par exploration *in vitro* sur le modèle de culture cellulaire de la lignée microgliale BV₂ que par expérimentation *in vivo* sur un modèle animal de neurodégénérescence aiguë (Article 2, résultats non publiés).

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet du TMT sur le tissu adipeux afin de déterminer la contribution possible du TA à l'inflammation induite par le TMT (Article 3, résultats publiés).

Ensuite, nous avons orienté nos travaux sur trois principaux médiateurs de l'inflammation produits par le tissu adipeux et agissant à distance sur le SNC par voie endocrine : la leptine, l'adiponectine et la résistine. Les connaissances actuelles concernant la leptine nous indiquent qu'elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique du SNC et agir dans le contrôle de l'appétit et permettre une libération de cytokines pro-inflammatoires par l'activation de la voie NF- κ B dans les microglies. Quant à l'adiponectine et la résistine, leurs effets sur les microglies n'ont pas encore été étudiés.

Notre démarche a été de sous-cloner les ADNc de l'adiponectine et de la résistine dans des vecteurs d'expression eucaryotes afin d'étudier leurs effets sur les cellules microgliales dans des conditions normales ou inflammatoires (chapitre 4).

De manière générale, ces études pourront nous permettre de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de la neurodégénérescence et de leur relation avec la réponse inflammatoire du tissu adipeux ainsi que de l'influence du tissu adipeux sur le SNC. Finalement, ce travail contribuera à comprendre la relation entre l'obésité et les maladies neurodégénératives afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

Résultats et Discussion

AUTOTAXIN PROTECTS MICROGLIAL CELLS AGAINST OXIDATIVE STRESS

**Rana Awada¹, Philippe Rondeau¹, Sandra Grès², Jean Sébastien Saulnier-Blache²,
Christian Lefebvre d'Helencourt^{1*}, Emmanuel Bourdon^{1*}**

¹ Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (LBGM), Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Plateforme CYROI, Université de La Réunion, Saint Denis de La Réunion, France.

² INSERM U1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC). 1 avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432 Toulouse, Cedex 4, France.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Outre Mer and the Université de La Réunion and the Conseil Régional de La Réunion and l'Europe. RA is a recipient of fellowships for both teaching and research activities from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. SG and JSSB were supported by INSERM (France), and by the Fondation de la Recherche Médicale (France) (grant #LRM20100618582).

*** Corresponding authors**

These authors contributed equally to this work and should be considered as co-last Authors.

Running title: **Effects of autotaxin overexpression.**

ABSTRACT

Oxidative stress occurs when antioxidant defenses are overwhelmed by oxygen-reactive species, and can lead to cellular damage, as seen in several neurodegenerative disorders. Microglia are specialized cells in the central nervous system that act as the first and main form of active immune defense in the response to pathological events. Autotaxin (ATX) plays an important role in the modulation of critical cellular functions, through its enzymatic production of lysophosphatidic acid (LPA). In this study, we investigated the potential role of ATX in the response of microglial cells to oxidative stress. We show that treatment of a microglial BV2 cell line with hydrogen peroxide (H₂O₂) stimulates ATX expression and LPA production. Stable overexpression of ATX inhibits microglial activation (CD11b expression) and protects against H₂O₂-treatment induced cellular damage. This protective effect of ATX was partially reduced in the presence of the LPA-receptor antagonist Ki16425. ATX overexpression was also associated with a reduction in intracellular ROS formation, carbonylated protein accumulation, proteasomal activity and catalase expression. Our results suggest that up-regulation of ATX expression in microglia could be a mechanism for protection against oxidative stress, thereby reducing inflammation in the nervous system.

Word count: 188

Keywords: Autotaxin, microglia, oxidative stress

Introduction

Free radicals are a normal product of cellular oxygen metabolism in mammals, and are central players in the physiological control of cellular function [1]. However, in certain situations, free radical-associated damage occurs, which may be an important factor in many pathological processes [2]. The incidence of neurodegenerative diseases has dramatically risen over the last several decades; many of these diseases, such as Alzheimer's or Parkinson's disease, are accompanied by the accumulation of oxidized proteins. The human brain is particularly exposed to oxidative stress, at least in part because of its high oxygen consumption. Glial cells are essential to assist, protect and support neuron physiology. Microglia cells are the nervous system equivalent of monocytes-macrophages and constitute a key element of the immune response in the brain. At inflammation sites, activated microglial cells produce high levels of free radicals, such as NO, as well as proinflammatory cytokines, which can be found at abnormal levels in affected regions of the nervous system in pathological situations: for example, multiple sclerosis, Alzheimer's and Parkinson's disease [3].

Autotaxin (ATX) was first identified as a cancer cell motility factor, but was recently discovered to possess lysophospholipase D activity, and converts lysophospholipids such as lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid (LPA) [4] (review in [5]).

Recent reports indicate that ATX plays a role in the progression of inflammatory-associated pathologies. ATX expression is increased at the protein level in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients [6], and at the mRNA level in the frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients [7]. In adipose tissues, ATX mRNA was found to be increased during adipocyte differentiation and was up-regulated in genetically obese diabetic mice (db/db) [8].

The surface expression of LPA receptors (LPAR1) in microglia is now well established [9]. However, despite the fact that microglial activation is widely considered to be a hallmark of neurodegenerative disorders, the importance of ATX expression by microglia under oxidative stress conditions remains unclear.

Therefore, the current study was undertaken to investigate the potential role of ATX in the response of microglia to oxidative stress. We first determined that oxidative stress stimulates ATX expression in a microglial BV2 cell line. Then, we demonstrated that ATX overexpression in BV2 cells protects against oxidative stress-induced cellular damage. Taken together, our results suggest that oxidative stress-mediated enhancement of autotaxin secretion by microglia could represent a protection mechanism in the CNS against oxidative stress induced during an inflammatory response.

Materials and Methods

Culture of BV2 and EOC cells

Mouse microglial BV-2 and EOC cell lines were cultured in DMEM medium with 10% SVF, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). For EOC cells, 20 % of CSF-1-conditioned medium was added to the culture medium as previously described [10]. Cells were grown in a 5% CO₂ incubator at 37°C. For all experiments, cells were plated in triplicate for each condition, at a density of 10⁴ cells per well in sterile 96-well plates for cytotoxicity analyses, and at a density of 10⁵ cells per well in sterile 6-well plates for ROS assays, Western-blot and proteasome activity measurement experiments. Thereafter, cells were maintained in a humidified CO₂ incubator for 24h before further analyses. Before measurement of proteasomal activity and carbonyl Western blotting, cells were washed three times with PBS and were treated at 4°C for 30 min with lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) without protease inhibitors. Cell lysates were then centrifuged and protein concentrations in the supernatant were determined by the BCA method [11].

BV2 cell transfection with pcDNA3 autotaxin

BV2 cells were transfected with 2 µg of pcDNA3 vector alone (empty-vector control) or a pcDNA3 expression vector containing the cDNA of murine autotoxin, using lipofectamine and PlusTM Reagent (Invitrogen). Murine autotoxin cDNA was prepared as described [8] and subcloned into a pcDNA3 mammalian expression vector. Stable transfectants were selected with geneticin for 3 weeks. Several control clones and several A⁺ clones were chosen for characterization, and, to avoid clonal specific effects, all further experiments were performed on at least 3 independent clones.

Measurement of LPA production

LPA was quantified using a radioenzymatic assay as previously described [12]. Briefly, lipids were extracted from conditioned media with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [¹⁴C]PA using recombinant LPA acyl-transferase in the presence of [¹⁴C] oleoyl-CoA. Products of the reaction were extracted, separated by one dimensional TLC and analyzed by autoradiography.

H₂O₂ treatment

Empty-vector transfected cells (EV) and autotaxin-overexpressing cells (A+) were cultured in 96- or 6-well plates. A+ clones correspond to clone #2. Once confluent, cells were washed and fresh medium (without serum) containing increasing concentrations of H₂O₂ were added for 24 h.

LPA and Ki16425 treatments

Lysophosphatidic acid (LPA) was used for cellular treatments and was obtained from Sigma. This commercial LPA contains an oleic acid at the sn-1 position of the glycerol. Ki16425 (KI) is a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist [13] and was obtained from Cayman. BV2 cells were treated with H₂O₂ in the absence or presence of 1 μM LPA or 20 μM KI, to stimulate or block LPA1, respectively [14, 15].

Cell viability

Cell viability was monitored by the trypan blue exclusion technique. Briefly, 5 μl of a 0.4% solution of trypan blue in PBS was added to 45 μl of cell suspension for 5 min; cell count results were expressed as the percentage of dye impermeant cells to the total cell number.

Proliferation assay

An MTT-assay, using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma), was conducted to evaluate the effect of H₂O₂ on cell proliferation [16]. The MTT-assay is based on cleavage of a yellow tetrazolium salt (MTT) by metabolically active cells, yielding a purple formazan which can be photometrically quantified. An increase in the number of living cells results in an increase in total metabolic activity, and thus increased color formation. After overnight incubation of cells in the presence of different reagents, 20 µL of MTT dye (5 mg/ml) was added to each well, followed by 4 h of incubation. After discarding the media, 150 µl of isopropanol was added to each well and plates were agitated in the dark for 30 min to solubilize the resulting dark blue formazan crystals. Plates were read using a microplate reader at a wavelength of 595 nm. A negative control well (medium only; no cells and no reagent) was used as reference to zero the absorbance.

Cytotoxicity: Lactate dehydrogenase (LDH) assay

To measure cellular toxicity to H₂O₂, a lactate dehydrogenase assay was performed [17], based on measurement of the release of LDH into the culture medium by dead cells. BV2 cells were incubated overnight, culture mediums were collected and centrifuged at 3000 g at 4°C for 5 min, and supernatants were collected in fresh tubes. A total of 120 µL of LDH assay lysis solution was added to the cells, and tubes were incubated at 37°C for 45 min. Tubes were centrifuged at 250 g for 45 minutes and supernatants (lysates) were transferred into a new tube. A total of 100 µl of supernatant (medium and lysates) was used for the assay, and LDH activity was measured according to the manufacturer's instructions (Sigma #TOX7). Reactions were performed in a new 96-well plate and absorbance at 492 nm and 690 nm (control) was measured using a microplate reader (Fluostar - BMG France).

Cytology staining

Cell nuclei were stained blue with Hematoxylin, and cytoplasm were counterstained red with eosin. BV-2 cells, empty-vector transfected cells (EV) and cells overexpressing autotaxin (A+), were seeded on glass cover slips in 4 well plates and treated with 100 μ M H₂O₂ (control cells were untreated). After 24 h treatment, cells were fixed in pure acetone at -20°C for 5-10 min and stained with hematoxylin solution (Vector®). Cells were washed 10 times in 2% glacial acetic solution and incubated in bluing solution (1.5 mL NH₄OH 30% stock solution in 98.5 mL of 70% ethanol) for 1 min, rinsed with water and stained by incubation with eosin solution for 7 min. Cells were imaged using a Nikon eclipse microscope and NIS-Element software (Nikon).

Proteasome activity measurements

Chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like proteasome activities were assayed using fluorogenic peptides (from Sigma) Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-MCA at 25 μ M), N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LSTR-MCA at 40 μ M) and N-Cbz-Leu-Leu-Glu-b-naphthylamide (LLE-NA at 150 μ M), respectively [18]. Assays were carried out on approximately 50 μ g of cell lysate in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) and the appropriate substrate, which were incubated together at 37°C for 0-30 minutes. Aminomethylcoumarin and β -naphthylamine fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 350/440 and 333/410 nm, respectively, using a fluorometric microplate reader (Fluostar - BMG France). Peptidase activities were measured in the absence or presence (20 μ M) of the proteasome inhibitor, MG132 (N-Cbz-Leu-Leu-leucinal), and the difference between the two values was attributed to proteasome activity.

Western blots

Carbonylated proteins were analyzed using an Oxyblot kit (Oxyblot Detection, Chemicon International Inc) [19]. Briefly, approximately 6 µg of proteins (1 µg/µL) was denatured in 5 µL 12% SDS for 10 min at room temperature. Samples were then treated with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution in 2 M HCl for 15 min at room temperature and neutralized. Derivatized proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Biorad). A primary antibody directed against the 2,4-dinitrophenol moiety was used for detection, and membranes were developed with ECL reagent (GE Healthcare).

Quantification of intracellular ROS levels

Twenty-four hours after treatment, cells were washed twice with PBS, and incubated with 10 µM DCF-DA at 37°C. After 30 min, cells were washed once with PBS, and the fluorescence intensity of the oxidized form of DCF was measured in a microplate-reader at 492 nm (excitation) and 520 nm (emission). Fluorescence values were calculated after background subtraction (using identical conditions without DCF).

Quantification of microglial gene expression by RT-PCR

Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from cell cultures using Trizol reagent (Invitrogen). 6 µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using Random primers (Sigma) and Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV, Invitrogen). The cDNA was amplified by PCR, using the SYBR green master-mix and 2 specific oligo nucleotide murine primers (purchased from Eurogentec).

The primer sequences were as follows:

- GAPDH [primers: forward 5' TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' and reverse 5' GGCATGGACTGTGGTCATGA-3']
- SOD [primers: forward 5' GCAGGGAACCATCCACTT-3' and reverse 5' TACAACCTCTGGACCCGT-3']
- ATX [primers: forward 5' GACCCTAAAGCCATTATTGCTAA-3' and reverse 5' GGGAAAGGTGCTGTTTCATGT-3']
- CATALASE [primers: forward 5' CCTCCTCGTTCAGGATGTGGTT-3' and reverse 5' CGAGGGTCACGAACTGTGTCAG-3']
- iNOS [primers: forward 5' GCAGCCTGTGAGACCTTTG-3' and reverse 5' GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3']

Each PCR cycle was run for 15s at 95°C and 1min at 60°C. All primer mRNA levels were normalized to GAPDH. Results were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software.

CD11b expression on microglia by FACS

Cells in a confluent 6-well plate were treated (or not) with 100 μ M H₂O₂ and washed with PBS. Cells were detached by scrapping on ice in PBS and collected cells were incubated with blocking buffer (BSA 1% in PBS) for 10 min. Cells were then incubated in blocking buffer containing mouse monoclonal anti-CD11b (1:200 dilution) (Bioscience) for 1h at 4°C, washed three times with PBS, and incubated with PE-conjugated secondary IgG (1:1000 dilution) for 30 min at 4°C. Resulting cells were analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson).

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) from 3 independent experiments, which were each performed in triplicate. Statistical analyses were performed using unpaired Student's t-tests or one-way ANOVA (followed by the Tukey test). In some cases, two-way ANOVA was used for multiple comparisons. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Hydrogen peroxide enhances autotaxin expression

The impact of oxidative stress on autotaxin expression in murine microglia BV2 cells was evaluated (Figure 1). Oxidative stress was generated by treating cells with mild concentrations of H₂O₂ (100 and 200 μ M). Autotaxin expression was evaluated at the mRNA level (Fig 1A) and at the level of LPA activity (Fig 1B), and significant enhancements in autotaxin expression were observed in BV2 cells treated with 100 or 200 μ M H₂O₂. It should be noted that these H₂O₂ concentrations may be physiologically relevant; in fact, under extreme conditions, such as oxidative burst during pathogen invasion or in the aqueous humor surrounding the ocular lens, H₂O₂ concentrations can reach 100 μ M [1].

In addition, after Fenton reaction with trace metals present in the cell media, H₂O₂ mainly generates hydroxyl radicals, which are among the most reactive species in biological systems [20]. In the following experiments, we chose to focus our work on the role of autotaxin at the microglia level, by investigating autotaxin overexpression in cells subjected to hydrogen peroxide treatment, a common free radical initiator [21].

To determine the level of LPA involvement in the action of autotaxin in cells challenged with oxidative stress, we treated untransfected BV2 cells with Ki16425 (KI), a mixed LPA1-3R antagonist of LPAR1 [13]. Inhibition of LPAR1 resulted in enhancement of DCF fluorescence in H₂O₂-treated cells (Fig 2A). In addition, BV2 cells stressed with 100 μM H₂O₂ in the presence of LPA exhibited significantly higher DCF fluorescence (Fig 2B). Similar results were obtained in EOC cells, another microglia cell line, which had been stressed with H₂O₂ in the absence or presence of LPA or KI16425 (Fig 2C).

Characterization of stably autotaxin-transfected microglia cells

To evaluate the functional consequences of increased ATX expression on microglial cells, BV2 microglia were stably transfected with empty pcDNA3 (EV control cells) or with pcDNA3 containing murine autotaxin cDNA (A⁺ cells). Stably transfected cells were used to investigate the role of autotaxin in the microglia response to oxidative stress.

We selected 3 clones whose mRNA expression was significantly enhanced compared to wild-type BV2 cells (untransfected or NT) or empty-vector transfected cells (EV) (Figure 3A). We noted a modest but significant increase in ATX mRNA levels between NT and EV cells. As can be seen in Figure 3B, NT and control cells produced the equivalent amounts of LPA in the medium (Figure 3B): approximately 2 pmol LPA/mg of cell protein in 24 h. In contrast, our 3 selected clones (stably expressing ATX) exhibited significantly enhanced LPA production in the cellular media, with approximately 14 pmol LPA/mg of cell protein in 24 h. Accumulation of autotaxin in both the cell and the media was also observed by Western blot (data not shown).

Because wild-type (untransfected) and empty-vector transfected cells secreted the same amount of autotaxin in the medium, and accumulated equivalent amounts of cellular autotaxin

mRNA and protein in cell lysates, we used empty vector transfected cells as controls in the following experiments.

High expression of ATX anneals H₂O₂-mediated microglial activation

CD11b is a biologically significant microglial surface marker, and increased CD11b expression in various neuroinflammatory diseases has been reported to correlate with the severity of microglial activation [22]. Autotaxin overexpression completely abolished H₂O₂-mediated enhancement of CD11b surface expression in microglia cells (Fig 4AB).

High expression of autotaxin improves cell resistance against H₂O₂-mediated stress

EV and A+ cells were treated with H₂O₂ for 24 h under serum-free conditions. Cell viability was measured using trypan blue, MTT and LDH assays. Exogenous H₂O₂ (100-1000 μ M) represents acute oxidative stress. As shown in Figure 5A, autotaxin overexpression significantly protects cells against H₂O₂-induced cell toxicity. Upon exposure to 100 μ M H₂O₂, control cells lost their polyhedral-shaped morphology, with characteristic cytoplasmic extension. In contrast, autotaxin overexpressing cells cultured for 24 h in the presence of 100 μ M H₂O₂ maintained the classic polyhedral shape typical of microglia. By the trypan blue exclusion technique, treatment with 100 μ M H₂O₂ resulted in 70% and 20% decreases in cell viability for control and A+ cells (corresponding to clone #2), respectively (Figure 5B). The decrease in cell viability observed upon treatment with 200 μ M H₂O₂ was also significantly lower in A+ versus control cells (30 % vs. 84 %, p<0.001).

Similar results were obtained from the MTT assay (Figure 5C). The MTT assay method enables evaluation of cell proliferation by quantification of relative cellular metabolic activity. Cells incubated in the presence of 200 μ M H₂O₂ showed significantly higher metabolic activity when overexpressing autotaxin. In order to obtain a more complete picture of the

effects of autotaxin overexpression on cell viability, we also applied the LDH method. As shown in Figure 5D, significantly lower LDH activity was measured in the medium of cells incubated with 200 μM H_2O_2 when overexpressing autotaxin. In addition, we tested high concentrations of H_2O_2 (500 μM up to 1 mM) on LDH production by EV and A+ cells, and observed no significant differences; however, upon exposure to such high H_2O_2 concentrations, most cells died. Therefore, in the following experiments, we chose relatively low H_2O_2 concentrations of 100 and 200 μM for cellular treatments.

In order to determine the involvement LPA in autotaxin-mediated protection of cells challenged by H_2O_2 , we treated EV and A+ cells with Ki16425 (KI), a mixed LPA1-3R antagonist of LPAR1 [13] (Fig. 5E.). Blocking LPA-receptors resulted in significantly reduced cell viability for both EV and A+ cells incubated in the absence of H_2O_2 . Interestingly, KI treatment of EV cells subjected to 100 or 200 μM H_2O_2 did not induce higher cell mortality than observed in control cells incubated in the absence of LPAR1 receptor agonist. Conversely, KI treatment of autotoxin-overexpressing cells resulted in a significant loss of viability protection against 100 or 200 μM H_2O_2 -mediated stress insult.

High autotaxin expression reduced intracellular reactive oxygen species in microglia cells

To verify if autotaxin attenuates ROS generation in microglia, we measured intracellular ROS levels in control cells versus 3 autotaxin overexpressing clones upon treatment with H_2O_2 (100 or 200 μM), using the dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. As shown in Figure 6, under basal conditions (no H_2O_2), autotaxin overexpressing cells exhibited 3-fold lower ROS levels than control cells. Treatment with H_2O_2 significantly increased ROS levels in control cells; however, in autotaxin overexpressing cells treated with increasing concentrations of H_2O_2 , ROS levels remained quite stable and significantly lower than in

control cells. No clonal specific effect is suspected, because these results were obtained in 3 independent clones (Fig 6).

Carbonylated proteins and proteasomal activity levels in H₂O₂-treated microglia cells

Oxidative stress has been shown to result in increased accumulation of oxidized proteins in cells [23]. In order to evaluate if autotaxin expression prevents H₂O₂ damage to cellular proteins, we used the carbonyl assay to measure cellular protein oxidation levels in lysates from control and A+ cells (clone #2), treated or not with H₂O₂. Noteworthy enough, untreated control cells display a higher carbonylated profile than untreated A+ cells (data not shown). Accumulation of carbonylated protein was quantified by ELISA (Fig 7). Similarly, when cells were treated with H₂O₂ (200 μM), a significant 13% decrease in carbonylated protein accumulation was measured in protein lysates from control cells versus A+ cells.

Reduced oxidative damage in autotaxin overexpressing cells may be due to modified proteolytic system activities. The proteasome represents the major proteolytic pathway for the degradation of oxidized proteins, and includes a minimum of 3 distinct peptidase activities: chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like activities [24].

Figure 8 reports proteasomal activities measured in control and autotaxin overexpressing cells, which had been incubated in the absence or presence of 100 or 200 μM H₂O₂. A significant increase in chymotrypsin-like activity (LLVY) was observed in 100 μM H₂O₂-incubated cells. LLVY activity returned to basal levels in cells treated with 200 μM H₂O₂. Grüne et al. reported that exposure of the proteasome to oxidized proteins leads to a biphasic proteolytic response, where "at moderate oxidant concentrations proteolytic susceptibility increases, whereas at higher oxidant concentration, a decrease (sometimes even below the "basal degradation" level) in proteolytic susceptibility occurs"[25].

A significant and important decrease in trypsin-like activity (LSTR) was measured in A+ (clone #2) cells (both H₂O₂ treated and untreated) versus control cells. Conversely, LMP2 proteasome subunit expression was similar in A+ and control cells (data not shown); indicating that the observed impairment of trypsin-like activity in autotaxin overexpressing cells is not due to a decrease in proteasome levels. With respect to caspase-like activity (LLE), no significant difference was observed between control and autotaxin overexpressing cells (independent of H₂O₂ treatment) (data not shown).

Autotaxin and expression of enzymes involved in cell redox control

Copper/zinc superoxide dismutase (SOD) is one of the main antioxidant enzymes, which catalyzes dismutation of the superoxide anion into hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide can then be readily removed by catalase action, which transforms H₂O₂ into H₂O and O₂. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is one of 3 enzymes responsible for the formation of nitric oxide (NO), which affects many signal transduction pathways [26].

Notably, significant increases in autotaxin, SOD and iNOS mRNA expression were measured in control and A+ cells, following incubation with 100 or 200 μM H₂O₂ (Fig 9AB and D). Very interestingly, autotaxin-overexpressing cells, incubated with 100 or 200 μM H₂O₂, exhibited a very substantial increase in catalase mRNA levels versus control cells (Fig 9C).

Discussion

The current study was undertaken to evaluate the role of autotaxin synthesis in microglia cells subjected to oxidative stress. Our results clearly show that autotaxin synthesis and secretion by microglia is stimulated by oxidative stress, and suggest a beneficial role for autotaxin overexpression in microglia challenged with hydrogen peroxide. Autotaxin appears to exert its protective effects by mitigating intracellular oxidation. These findings clearly demonstrate a novel antioxidant role for autotoxin, in particular at the brain level.

The adult brain contains at least twice as many neuroglial cells than neurons [27]. Microglial cells play a special role as the main immune cells of the central nervous system, ensuring protection against pathological events [28]. Microglia activation has been implicated in many neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, and multiple sclerosis [29]. During the pathogenesis of different neurodegenerative diseases, the number of microglial cells increases from approximately 2-3% to as high as 12-15% of total brain cells. Microglial activation is always associated with neuronal inflammation, and eventually neuronal apoptosis. Neurodegenerative diseases and oxidative stress are closely interlinked [30]. Reactive oxygen species play a pivotal role in the modulation of cellular functions, especially for neurons, astrocytes and microglia. Although inflammation may be a good response to "an attack" in the brain, in a neurodegenerating microenvironment, ROS production can exceed antioxidant defenses, leading to oxidative stress and causing detrimental effects [22]. In fact, accumulation of large amounts of oxidized protein in the diseased brain is a hallmark of several neurodegenerative diseases [31, 32].

Autotaxin was originally isolated as an autocrine motility factor from melanoma cells in 1992 [33]. Autotaxin has been since shown to be an enzyme, exerting many biological roles through production of lysophosphatidic acid (LPA). LPA is produced under various

conditions, both in cells and biological fluids, and acts on G protein-coupled receptors [34]. In addition to its role in cancer, autotaxin/LPA has been implicated in inflammation [35], fibrotic diseases [36], and thrombosis [37]. Although ATX production in cancer or during the inflammation response has been evaluated, its expression in the brain by microglial cells under oxidative stress has never been investigated.

Under our experimental conditions, using a BV2 microglia cell line, we show that ROS stimulates ATX secretion. A significant increase in ATX mRNA levels, intra and extracellular ATX protein levels, and LPA production, were observed in cells treated with 100 μ M H_2O_2 . This H_2O_2 concentration may be physiologically relevant, and could be encountered *in vivo* under extreme conditions [1].

Several studies have demonstrated stimulation of autotaxin secretion during inflammation.

ATX expression has been shown to be increased at the protein level in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients [6], and at the mRNA level in the frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients [7]. In addition, in adipose tissues, ATX mRNA levels were found to be increased during adipocyte differentiation, and up-regulated in genetically obese diabetic mice (db/db) [8]. However, the present study is the first report of the effect of direct oxidative stress on autotaxin expression.

In order to evaluate the antioxidant role of ATX secretion by microglia cells, we subjected transfected BV2 cells overexpressing ATX to H_2O_2 challenge. Exogenous addition of H_2O_2 in the culture medium of brain cells has often been used to model acute oxidative stress [22, 38 and 39]. Here, we show significant protection in terms of cell viability in ATX overexpressing microglia challenged with H_2O_2 (Fig 3). The beneficial role of ATX in the microglia response to oxidative stress is further supported by the decreased free radical formation and reduced accumulation of carbonylated proteins observed in ATX overexpressing cells treated with hydrogen-peroxide (Fig 4 and 5). Moreover, ROS levels in microglial cells incubated with

H₂O₂ were significantly lower when treated with LPA, and higher when treated with LPAR1 antagonist (KI). The involvement of autotaxin in protecting microglial cells against oxidative stress was observed using 3 autotaxin overexpressing BV2 clones, and EOC clones (another microglial cell line) (data not shown).

The proteasome is the main proteolytic pathway for the degradation of oxidized proteins [24]. Enhanced proteasomal chymotrypsin-like activity was observed in cells incubated with 100 μ M H₂O₂. Grüne et al. (2003) reported that exposure of the proteasome to oxidized protein may lead to a biphasic proteolytic response [25].

Interestingly, lower trypsin-like activity was observed in autotaxin overexpressing cells versus controls. Furthermore, this reduced activity was further decreased in autotaxin overexpressing cells following treated with 100 or 200 μ M H₂O₂. Many reports suggest that the proteasome undergoes structural and functional modifications in pathophysiological situations where oxidative stress is enhanced, such as cardiac ischemia/reperfusion, cerebral ischemia, and aging (review in [24]). In particular, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), a product of lipid peroxidation, was shown to mainly modulate the trypsin-like activity of the proteasome [40, 41].

Autotaxin is a well-known tumor factor, which increases cell survival, proliferation, angiogenesis and metastasis [42] [43]. In the presence of oxidative stress, cells have two available end points: 1) proteasome function is sufficient to maintain redox homeostasis; or 2) proteasome function is reduced or impaired, resulting in activation of apoptosis.

In view of the above, one would expect enhanced proteasomal activity in autotaxin overexpressing cells. Very recently, ATX was shown to catalyze the formation of cyclic phosphatidic acid (cPA), in addition to LPA [44]. Interestingly, cPa has been shown to have an antitumor effect, by inhibiting cell division, cancer invasion and metastasis. Our results concerning proteasome activities also seem to support a dual role for autotaxin in

inflammatory situations. Further analyses of autotaxin secretion by microglia cells subjected to mild oxidative stress should consider cPA formation as well as LPA production.

It is now established that the expression of CD11b, a microglial beta-integrin marker, is strongly enhanced in various neuroinflammatory diseases, and that CD11b expression levels reflect the severity of microglial activation [45] [46].

In the present study, we show that autotaxin overexpression completely abolishes the strong H₂O₂-mediated increase in CD11 surface expression in microglial cells (Fig 4AB). This important result should be considered in light of an interesting recent report by Roy et al. (2008) [22], who showed that up-regulation of CD11b in microglia treated in inflammatory situations (LPS or H₂O₂ treatments) involved ROS formation. Furthermore, microglial activation was shown to be regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase [22, 47, 48].

Our results are in full agreement with these works, and a significant reduction in ROS formation and CD11b was observed in autotaxin overexpressing microglia. In fact, ROS may be a key player in microglial activation and was shown to increase CD11b expression via NO [22]. Under our experimental conditions, a significant enhancement in microglia expression of SOD and iNOS mRNA was observed in cells treated with H₂O₂. Conversely, autotaxin overexpression does not seem to affect the influence of oxidative stress on expression of these genes.

Very interestingly, catalase expression was considerably enhanced in autotaxin-overexpressing cells challenged by oxidative stress. Thus, it is conceivable that the overproduction of SOD observed in cells treated with H₂O₂ could result in increased generation of additional hydrogen peroxide, which is more readily removed by catalase in autotaxin overexpressing cells. The higher catalase expression in A⁺ cells must lead to reduced levels of deleterious hydroxyl radicals via the Fenton reaction than control cells [49].

Similarly, reduced hydroxyl radical formation in autotaxin-overexpressing cells should be associated with reduced formation of peroxynitrite, a strong oxidant implicated in protein damage [26].

Treatment of microglia cells *in vitro*, with relatively low concentrations of hydrogen peroxide, does not allow for extrapolation of our results to the *in vivo* behavior of microglia in inflammatory situations in the brains of patients. Nonetheless, our results do provide evidence of a new role for autotaxin at the microglial cell level, where it mitigates ROS formation and activation under oxidative stress conditions known to be enhanced in neurodegenerative disorders.

Using the red blood hemolysis test, we demonstrate enhanced antioxidant activity in the culture media of A+ cells versus media from control cells (EV); indicating that protection of autotaxin overexpressing cells from oxidative insult could be due at least in part to secreted products (data not shown). Thus, autotaxin secreted by stressed microglia could protect the cell, and surrounding cells in the brain, from oxidative damage. In support of this, autotaxin has been shown to be strongly up-regulated in regions of the brain adjacent to lesion following neurotrauma [50]. □Cross talk□ between microglia and other glial cells, such as astrocytes or oligodendrocytes, has been reported to play a key role in many neurological disorders associated with oxidative stress and neuroinflammation [51] [52] [53]. LPA was shown to support oligodendrocyte differentiation, by regulating later stages of their maturation [53]. Interestingly, culture media from LPS-activated microglia induces expression of antioxidative enzymes in astrocytes, and renders them more resistant to H₂O₂ treatment [51].

Unpublished data from our group suggests an anti-inflammatory role for autotaxin in BV2 and EOC cells submitted to LPS treatments. Ongoing experiments in our laboratory aim to

increase our understanding of the cellular signaling cascades involved in autotaxin anti-inflammatory and antioxidant activities at the microglial cell level.

The observations presented here indicate that endogenous autotaxin expression is an important factor in the protection of microglial cells subjected to oxidative stress. The antioxidant activity of autotaxin has never before been reported. In summary, we demonstrated that autotaxin secretion by microglial cells is stimulated by oxidative stress and that autotaxin overexpression protects microglia from hydrogen peroxide-induced damage. Furthermore, autotaxin strongly reduces ROS-mediated microglia activation. We propose therefore, that oxidative stress-mediated enhancement of autotaxin secretion by microglial cells may represent a mechanism to mitigate ROS damage during the oxidative burst of inflammation in the brain, at least to a certain extent. This hypothesis, as well as the importance of autotaxin in the brain, warrants further investigation.

References

- [1] Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**:47-95; 2002.
- [2] Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**:1220-1224; 1992.
- [3] Meda, L.; Cassatella, M. A.; Szendrei, G. I.; Otvos, L., Jr.; Baron, P.; Villalba, M.; Ferrari, D.; Rossi, F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* **374**:647-650; 1995.
- [4] Tokumura, A.; Majima, E.; Kariya, Y.; Tominaga, K.; Kogure, K.; Yasuda, K.; Fukuzawa, K. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* **277**:39436-39442; 2002.
- [5] Boutin, J. A.; Ferry, G. Autotaxin. *Cell Mol Life Sci* **66**:3009-3021; 2009.
- [6] Hammack, B. N.; Fung, K. Y.; Hunsucker, S. W.; Duncan, M. W.; Burgoon, M. P.; Owens, G. P.; Gilden, D. H. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* **10**:245-260; 2004.
- [7] Umemura, K.; Yamashita, N.; Yu, X.; Arima, K.; Asada, T.; Makifuchi, T.; Murayama, S.; Saito, Y.; Kanamaru, K.; Goto, Y.; Kohsaka, S.; Kanazawa, I.; Kimura, H. Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neurosci Lett* **400**:97-100; 2006.
- [8] Ferry, G.; Tellier, E.; Try, A.; Gres, S.; Naime, I.; Simon, M. F.; Rodriguez, M.; Boucher, J.; Tack, I.; Gesta, S.; Chomarat, P.; Dieu, M.; Raes, M.; Galizzi, J. P.; Valet, P.; Boutin, J. A.; Saulnier-Blache, J. S. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* **278**:18162-18169; 2003.
- [9] Than, C. S.; Lin, F. F.; Rao, T. S.; Yu, N.; Webb, M. Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *Dev Neurosci* **21**:431-443; 2003.
- [10] Lefebvre d'Hellencourt, C.; Montero-Menei, C. N.; Bernard, R.; Couez, D. Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. *J Neurosci Res* **71**:575-582; 2003.
- [11] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85; 1985.
- [12] Saulnier-Blache, J. S.; Girard, A.; Simon, M. F.; Lafontan, M.; Valet, P. A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J Lipid Res* **41**:1947-1951; 2000.
- [13] Ohta, H.; Sato, K.; Murata, N.; Damirin, A.; Malchinkhuu, E.; Kon, J.; Kimura, T.; Tobo, M.; Yamazaki, Y.; Watanabe, T.; Yagi, M.; Sato, M.; Suzuki, R.; Murooka, H.; Sakai, T.; Nishitoba, T.; Im, D.-S.; Nochi, H.; Tamoto, K.; Tomura, H.; Okajima, F. Ki16425, a Subtype-Selective Antagonist for EDG-Family Lysophosphatidic Acid Receptors. *Molecular Pharmacology* **64**:994-1005; 2003.
- [14] Damirin, A.; Tomura, H.; Komachi, M.; Liu, J. P.; Mogi, C.; Tobo, M.; Wang, J. Q.; Kimura, T.; Kuwabara, A.; Yamazaki, Y.; Ohta, H.; Im, D. S.; Sato, K.; Okajima, F. Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H2513-2522; 2007.
- [15] Fujita, R.; Ma, Y.; Ueda, H. Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia. *J Neurochem* **107**:152-160; 2008.

- [16] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55-63; 1983.
- [17] Legrand, C.; Bour, J. M.; Jacob, C.; Capiamont, J.; Martial, A.; Marc, A.; Wudtke, M.; Kretzmer, G.; Demangel, C.; Duval, D. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium *J Biotechnol*. **25**:231-243. ; 1992.
- [18] Le Pecheur, M.; Bourdon, E.; Paly, E.; Farout, L.; Friguet, B.; London, J. Oxidized SOD1 alters proteasome activities in vitro and in the cortex of SOD1 overexpressing mice. *FEBS Lett* **579**:3613-3618; 2005.
- [19] Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**:346-357; 1994.
- [20] Halliwell, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* **44**:6-13; 1996.
- [21] Halliwell, B.; Clement, M. V.; Long, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* **486**:10-13; 2000.
- [22] Roy, A.; Jana, A.; Yatish, K.; Freidt, M. B.; Fung, Y. K.; Martinson, J. A.; Pahan, K. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* **45**:686-699; 2008.
- [23] Singh, N. R.; Rondeau, P.; Hoareau, L.; Bourdon, E. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res* **41**:1078-1088; 2007.
- [24] Friguet, B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett*. **580**:2910-2916; 2006.
- [25] Grune, T.; Merker, K.; Sandig, G.; Davies, K. J. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **305**:709-718; 2003.
- [26] Malinski, T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **11**:207-218; 2007.
- [27] Perry, V. H.; Nicoll, J. A.; Holmes, C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **6**:193-201.
- [28] Graeber, M. B. Changing face of microglia. *Science* **330**:783-788.
- [29] Gonzalez-Scarano, F.; Baltuch, G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* **22**:219-240; 1999.
- [30] Emerit, J.; Edeas, M.; Bricaire, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* **58**:39-46; 2004.
- [31] Stolzing, A.; Widmer, R.; Jung, T.; Voss, P.; Grune, T. Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells. *Free Radic Biol Med* **40**:1017-1027; 2006.
- [32] Liu, R.; Liu, I. Y.; Bi, X.; Thompson, R. F.; Doctrow, S. R.; Malfroy, B.; Baudry, M. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8526-8531; 2003.
- [33] Stracke, M. L.; Krutzsch, H. C.; Unsworth, E. J.; Arestad, A.; Cioce, V.; Schiffmann, E.; Liotta, L. A. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* **267**:2524-2529; 1992.
- [34] Nakanaga, K.; Hama, K.; Aoki, J. Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* **148**:13-24; 2010.
- [35] Kanda, H.; Newton, R.; Klein, R.; Morita, Y.; Gunn, M. D.; Rosen, S. D. Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* **9**:415-423; 2008.

- [36] Pradere, J. P.; Tarnus, E.; Gres, S.; Valet, P.; Saulnier-Blache, J. S. Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim Biophys Acta* **1771**:93-102; 2007.
- [37] Pamuklar, Z.; Federico, L.; Liu, S.; Umezu-Goto, M.; Dong, A.; Panchatcharam, M.; Fulerson, Z.; Berdyshev, E.; Natarajan, V.; Fang, X.; van Meeteren, L. A.; Moolenaar, W. H.; Mills, G. B.; Morris, A. J.; Smyth, S. S. Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* **284**:7385-7394; 2009.
- [38] Park, S. J.; Kim, H. Y.; Kim, H.; Park, S. M.; Joe, E. H.; Jou, I.; Choi, Y. H. Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free Radic Biol Med* **46**:1694-1702; 2009.
- [39] Gorina, R.; Sanfeliu, C.; Galito, A.; Messeguer, A.; Planas, A. M. Exposure of glia to pro-oxidant agents revealed selective Stat1 activation by H₂O₂ and Jak2-independent antioxidant features of the Jak2 inhibitor AG490. *Glia* **55**:1313-1324; 2007.
- [40] Bulteau, A. L.; Lundberg, K. C.; Humphries, K. M.; Sadek, H. A.; Szweda, P. A.; Friguet, B.; Szweda, L. I. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* **276**:30057-30063; 2001.
- [41] Farout, L.; Mary, J.; Vinh, J.; Szweda, L. I.; Friguet, B. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Arch Biochem Biophys* **453**:135-142; 2006.
- [42] Park, S. Y.; Jeong, K. J.; Panupinthu, N.; Yu, S.; Lee, J.; Han, J. W.; Kim, J. M.; Lee, J. S.; Kang, J.; Park, C. G.; Mills, G. B.; Lee, H. Y. Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene*.
- [43] Wu, J. M.; Xu, Y.; Skill, N. J.; Sheng, H.; Zhao, Z.; Yu, M.; Saxena, R.; Maluccio, M. A. Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* **9**:71.
- [44] Tania, M.; Khan, A.; Zhang, H.; Li, J.; Song, Y. Autotaxin: a protein with two faces. *Biochem Biophys Res Commun* **401**:493-497.
- [45] Akiyama, H.; McGeer, P. L. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol* **30**:81-93; 1990.
- [46] Ladeby, R.; Wirenfeldt, M.; Garcia-Ovejero, D.; Fenger, C.; Dissing-Olesen, L.; Dalmau, I.; Finsen, B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* **48**:196-206; 2005.
- [47] Mander, P. K.; Jekabsone, A.; Brown, G. C. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol* **176**:1046-1052; 2006.
- [48] Jekabsone, A.; Mander, P. K.; Tickler, A.; Sharpe, M.; Brown, G. C. Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H₂O₂ derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation* **3**:24; 2006.
- [49] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* **307**:108-112; 1992.
- [50] Savaskan, N. E.; Rocha, L.; Kotter, M. R.; Baer, A.; Lubec, G.; van Meeteren, L. A.; Kishi, Y.; Aoki, J.; Moolenaar, W. H.; Nitsch, R.; Brauer, A. U. Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci* **64**:230-243; 2007.
- [51] Rohl, C.; Armbrust, E.; Herbst, E.; Jess, A.; Gulden, M.; Maser, E.; Rimbach, G.; Bosch-Saadatmandi, C. Mechanisms involved in the modulation of astroglial resistance to oxidative stress induced by activated microglia: antioxidative systems, peroxide elimination, radical generation, lipid peroxidation. *Neurotox Res* **17**:317-331.

- [52] Kim, J. H.; Min, K. J.; Seol, W.; Jou, I.; Joe, E. H. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *J Neurochem* **115**:1161-1171.
- [53] Nogaroli, L.; Yuelling, L. M.; Dennis, J.; Gorse, K.; Payne, S. G.; Fuss, B. Lysophosphatidic acid can support the formation of membranous structures and an increase in MBP mRNA levels in differentiating oligodendrocytes. *Neurochem Res* **34**:182-193; 2009.

Figure legends

Figure 1: Hydrogen peroxide enhances autotaxin expression.

BV2 cells were treated for 24 h at 37°C in the absence or presence of 100 or 200 μM H_2O_2 . Autotaxin mRNA levels (A) and LPA production (B) were measured using Q-PCR and RIA quantification, respectively, as described in Materials and Methods. Results are the mean \pm SD from experiments performed in triplicate. Pearson univariate coefficients were determined using Prism® software. ** $P < 0.01$ compared to untreated cells (CTL) using Student's t test for unpaired samples ($n=3$).

Figure 2: Effects of LPA or the LPA-receptor antagonist, Ki16425, on H_2O_2 -mediated oxidative stress.

BV2 cells were similarly treated with H_2O_2 in the absence or presence of 10 μg KI-16425 (KI) (A), or 1 μg LPA (B). EOC microglial cells were treated with H_2O_2 in the absence or presence of 10 μg KI or 1 μg LPA (C). ROS levels were determined by measuring rates of DCF oxidation, as detailed in Materials and Methods. Results are the mean \pm SD from experiments performed in triplicate. Statistics are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to control cells incubated with identical H_2O_2 concentrations, using Student's t test for unpaired samples.

Figure 3: Stably transfected BV2 microglial cells overexpressing autotaxin.

Autotaxin mRNA levels (A) and LPA accumulation (B) were quantified after 24 h of culture in cell lysates or culture media from BV2 cells transfected with pcDNA3-autotaxin (clones #1, #2 and #3) or empty vector (EV), or from non-transfected cells (NT).

Results are the mean \pm SD from experiments performed in triplicate. Dunnett's one way ANOVA analysis is *P<0.05, **P<0.01 compared to NT.

Figure 4: Autotaxin and microglial activation.

Non-transfected cells (NT), empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h with or without H₂O₂. CD11b expression at the surface of cells (A, B) was evaluated by FACS. Bars represent the mean \pm S.D. (n=3), P values were obtained using Student's t test for unpaired samples, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to respective control cells incubated in the absence of H₂O₂.

Figure 5: High expression of autotaxin improves cell resistance to H₂O₂-mediated stress.

Empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h in the absence or presence of different concentrations of H₂O₂. Cell morphology (A) was visualized following cell staining as described in the Methods section. Cell viability was analyzed using the trypan blue (B), MTT (C) and LDH (D) methods. Viability results from trypan blue (E) were obtained for empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells incubated for 24 h, with or without 100 or 200 μ M H₂O₂, in the presence or absence of 20 μ M Ki16425 (KI). Results are the mean \pm SD of experiments performed in triplicate. Statistics are *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to NT cells incubated with identical H₂O₂ concentrations, using Student's t test for unpaired samples.

Figure 6: High autotaxin expression reduces the level intracellular reactive oxygen species in microglia cells.

Non-transfected cells (NT), empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h with or without H₂O₂. ROS levels were determined by measuring rates of

DCF oxidation as detailed in the Materials and Methods. Results are the mean \pm SD of experiments performed in triplicate. Statistics are *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to control cells incubated with identical H₂O₂ concentrations, using Student's t test for unpaired samples.

Figure 7: Carbonylated proteins in H₂O₂-treated microglia cells

Empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h in the absence or presence of 100 or 200 μ M H₂O₂. Protein oxidation was determined by measuring carbonyl content in cell lysates by Western blot (A) and ELISA (B). The carbonyl content has shown in (A) represents three independent analyses. ELISA results are the mean \pm SD of experiments performed in triplicate. Data were analyzed by two way ANOVA followed by Tukey's test. Effect of transfection (A+ vs. NT): *P<0.05

Figure 8: Proteasomal activity in H₂O₂-treated microglia cells

Empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h in the absence or presence of 100 or 200 μ M H₂O₂. Cells were washed and lysates were prepared as described in the Materials and Methods section. Chymotrypsin-like (A) and trypsin-like (B) activities of the proteasome were assayed using fluorogenic peptides substrates LLVY-AMC and LSTR-AMC, respectively, at 12.5 μ M final concentration. Assays were carried out with 50 μ L of cell lysates in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), and with the appropriate substrate at 37°C for 0–30 min incubation. The fluorescence of each sample was evaluated using a multiplate spectrofluorimeter (BMG Labtech) at excitation/emission wavelengths of 350/440 for aminomethylcoumarin. Peptidase activities were measured in the absence or presence (10 μ M) of the proteasome inhibitor MG132, and the difference between the two values was attributed to proteasome activity. Bars represent the mean \pm S.D. (n=3), P values were

obtained using Student's t test. °P<0.05, °°P<0.01 compared to control cells incubated with identical H₂O₂ concentrations, using Student's t test for unpaired samples. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to respective control cells incubated in the absence of H₂O₂

Figure 9: Autotaxin and expression of enzymes involved in cell redox control

Empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h in the absence or presence of H₂O₂ (100 or 200 µM). mRNA encoding Autotaxin (A), SOD (B), Catalase (C) and iNOS (D) were quantified by RT PCR as described in the Materials and Methods. Bars represent the mean ± S.D. (n=3), for A B and D. P values were obtained using two way ANOVA followed by Tukey's test, and for C, P values were obtained using Student's t test for unpaired samples. °°°P<0.001 interaction between transfection (ATX overexpression) and H₂O₂ treatment. #P<0.05, ####P<0.001, effect of H₂O₂ treatment compared to respective control cells incubated in the absence of H₂O₂. **P<0.01 and ***P<0.001 compared to respective control cells incubated in the absence of H₂O₂.

Fig. 1A

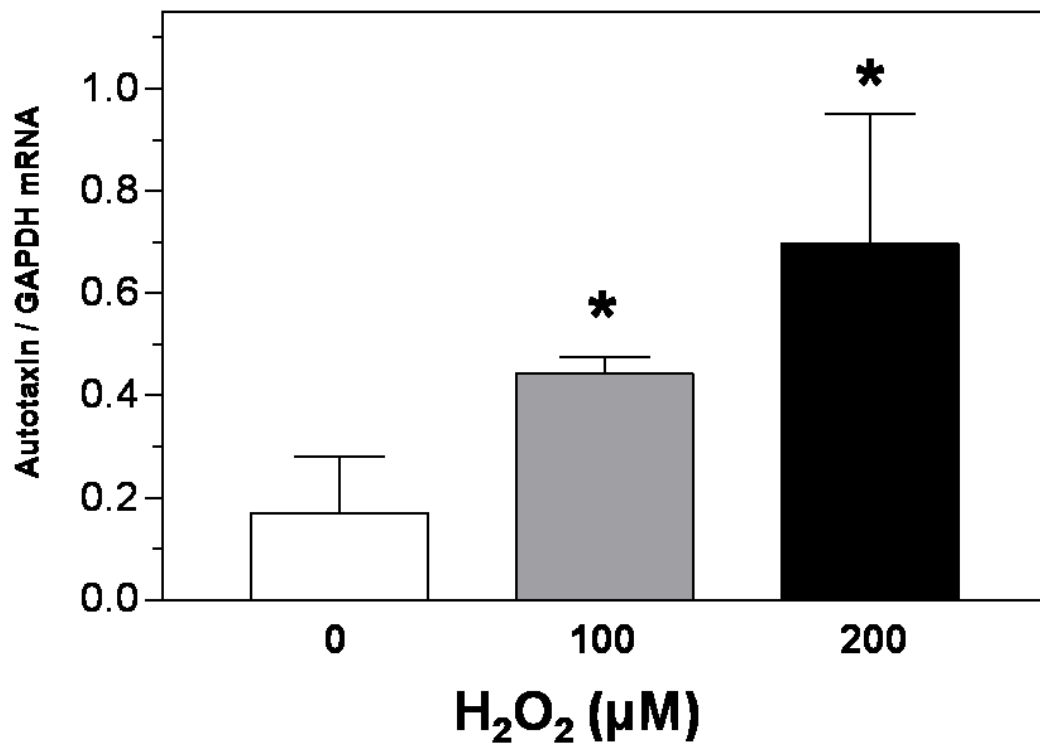


Fig. 1B

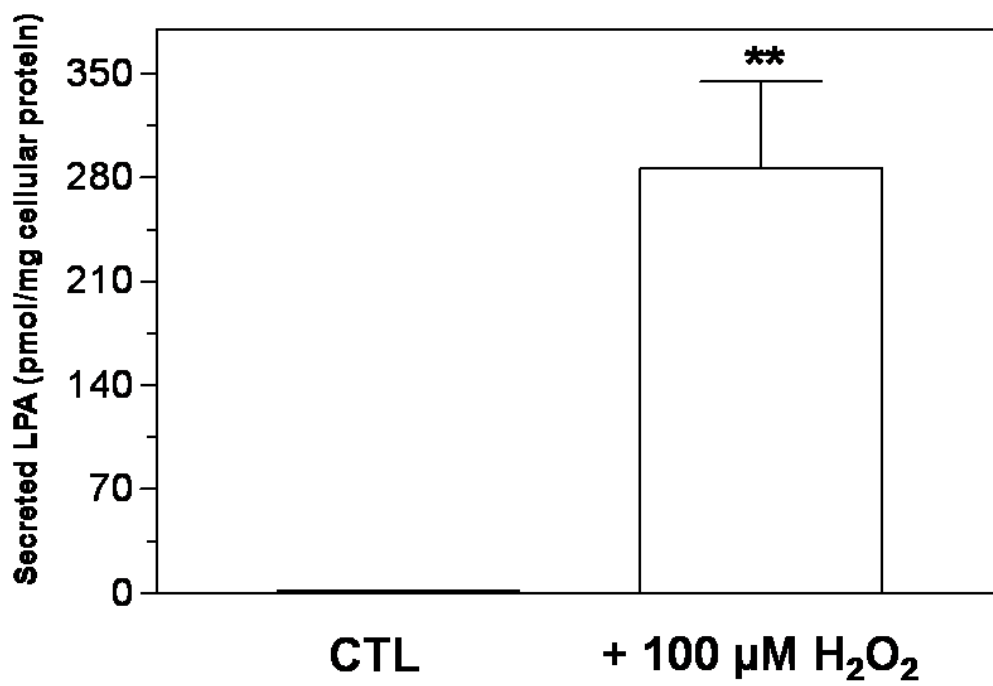


Fig. 2A

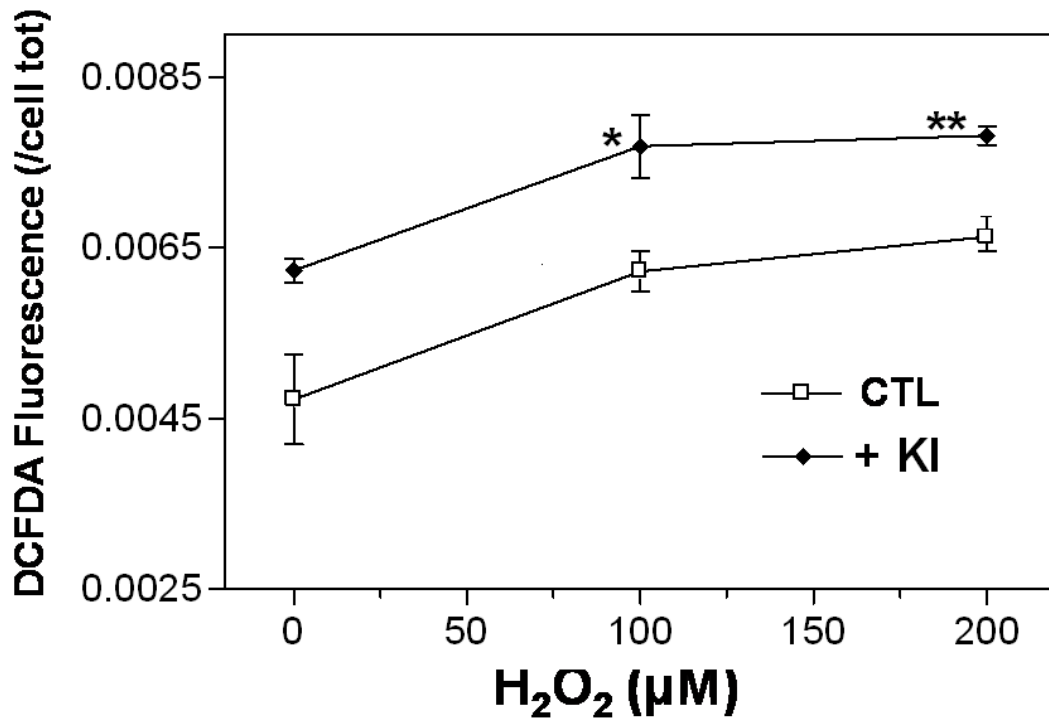


Fig. 2B

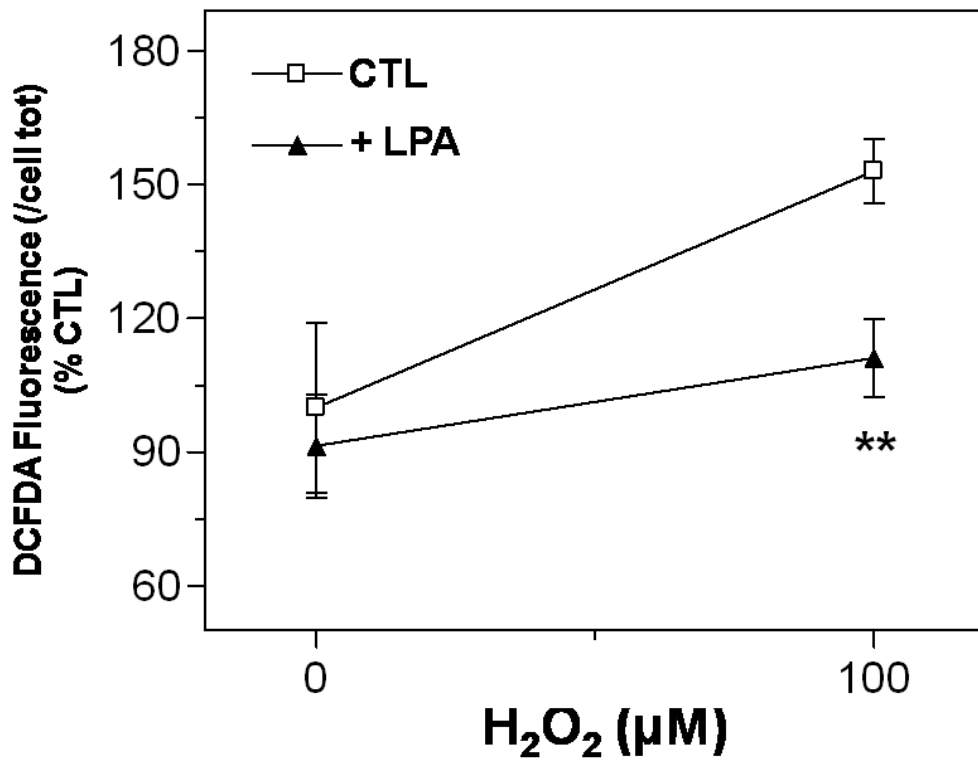


Fig. 2C

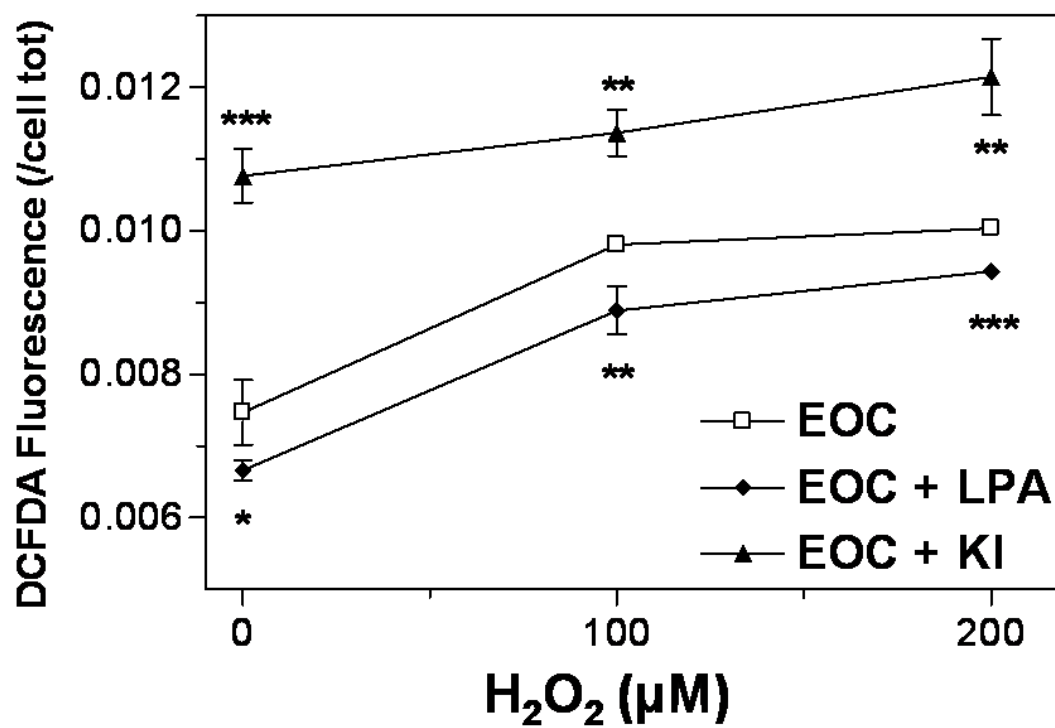


Fig. 3A

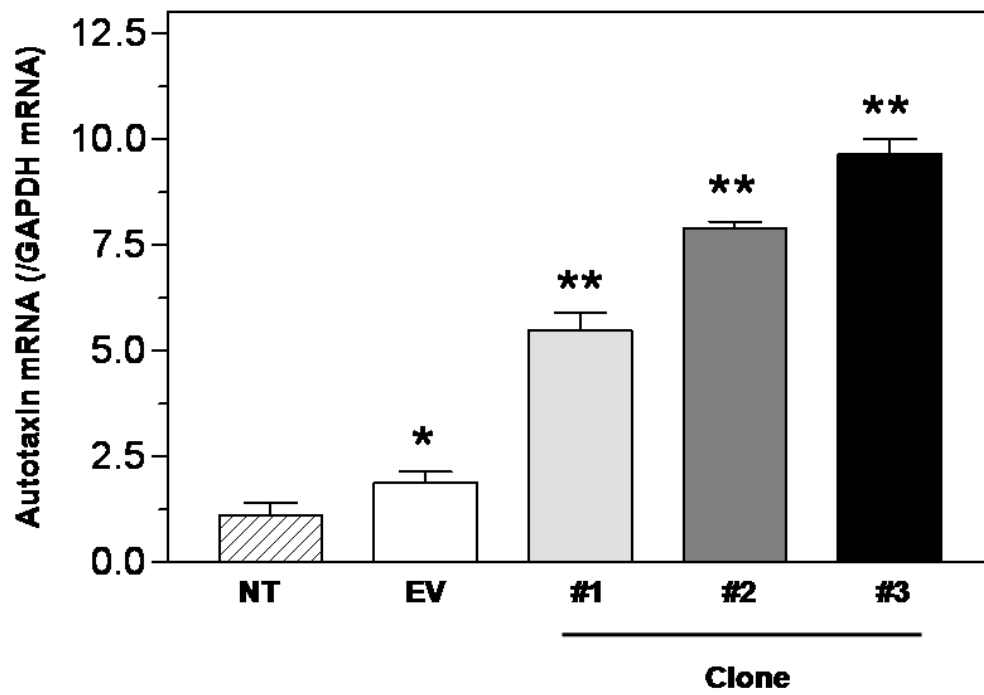


Fig. 3B

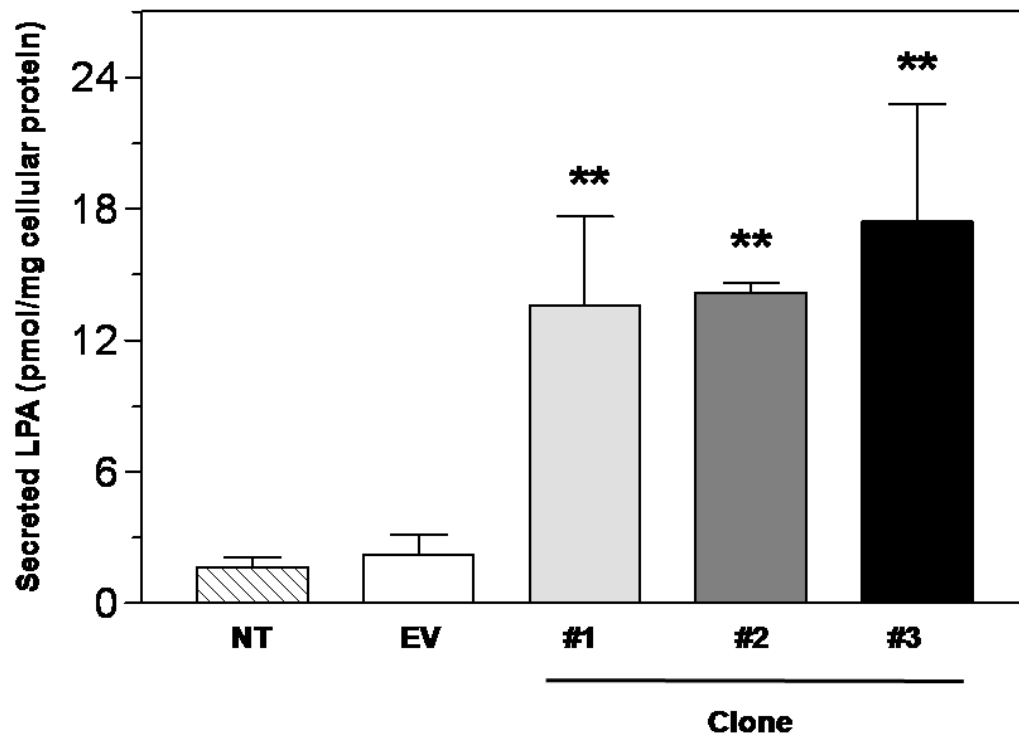


Fig. 4A

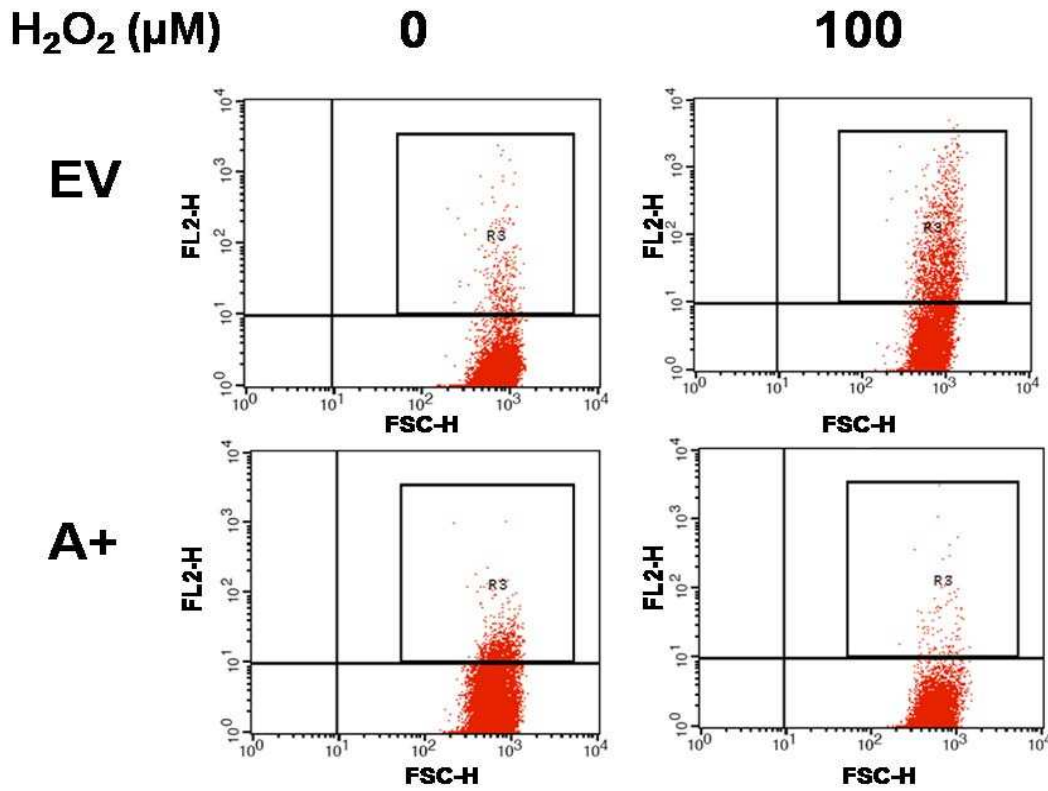


Fig. 4B

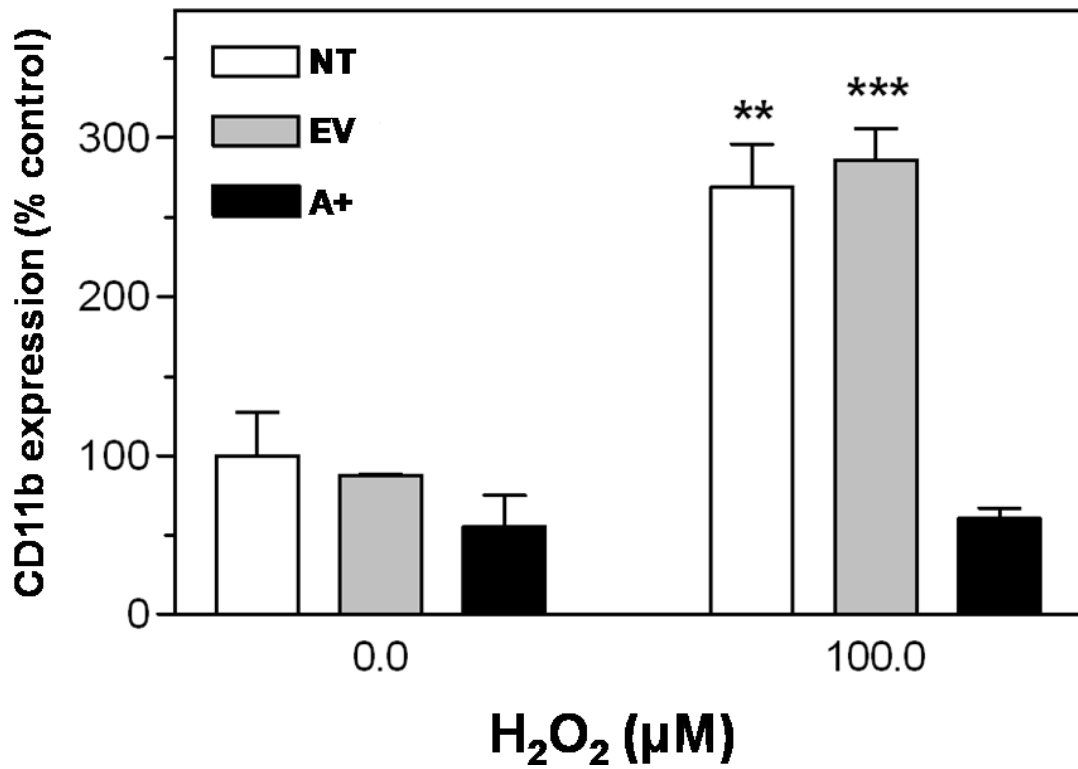


Fig. 5A

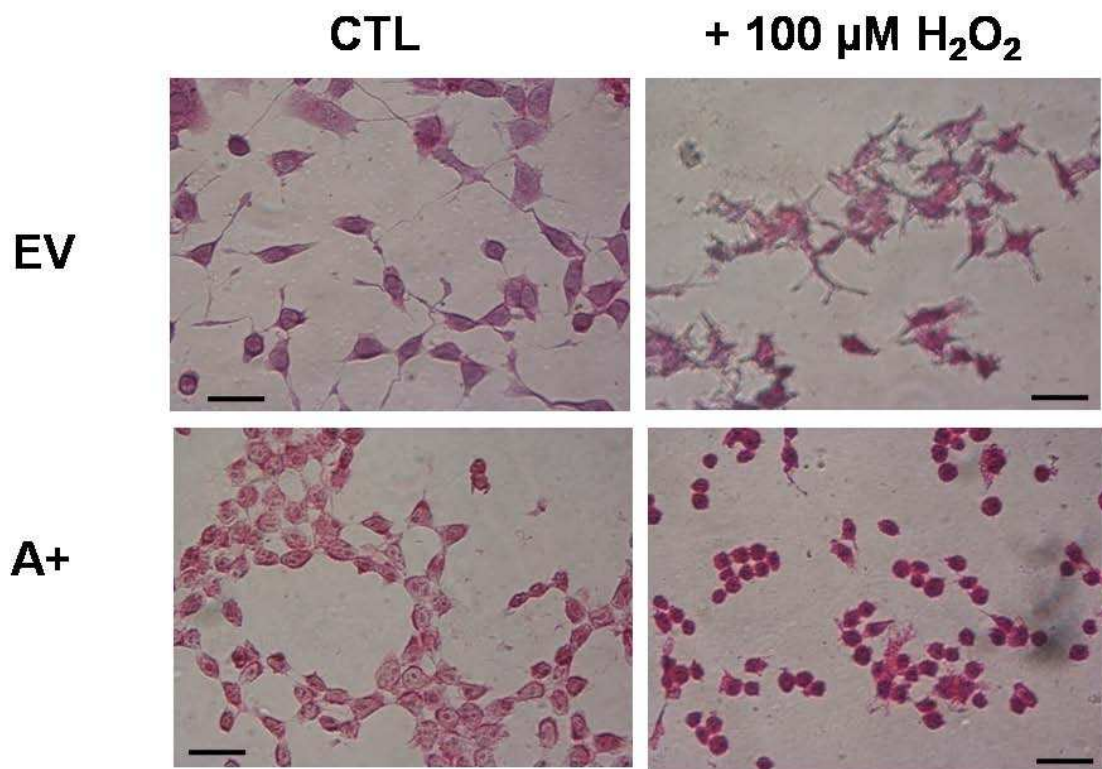


Fig. 5B

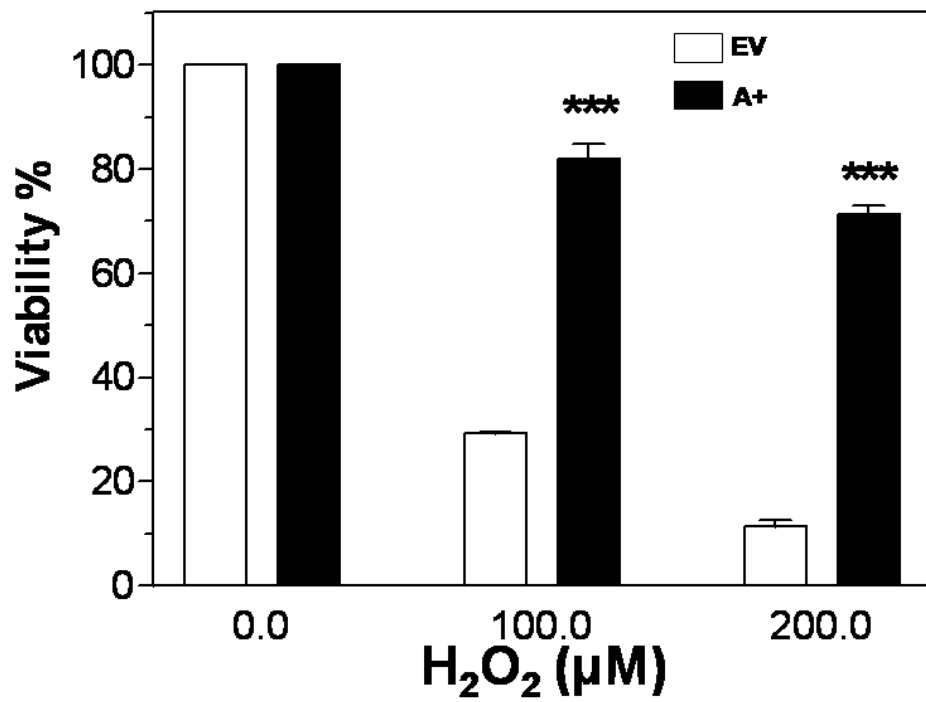


Fig. 5C

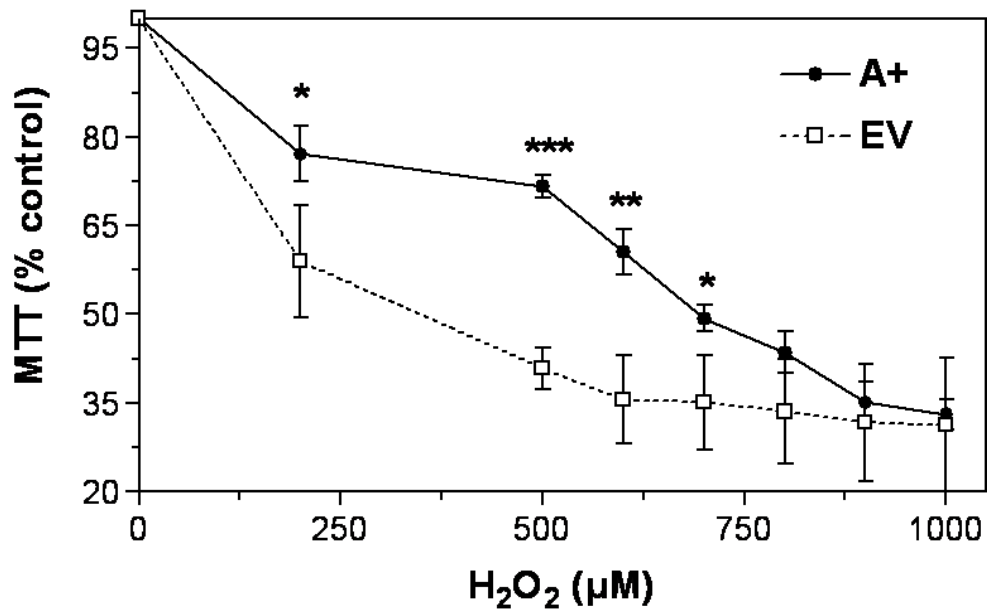


Fig. 5D

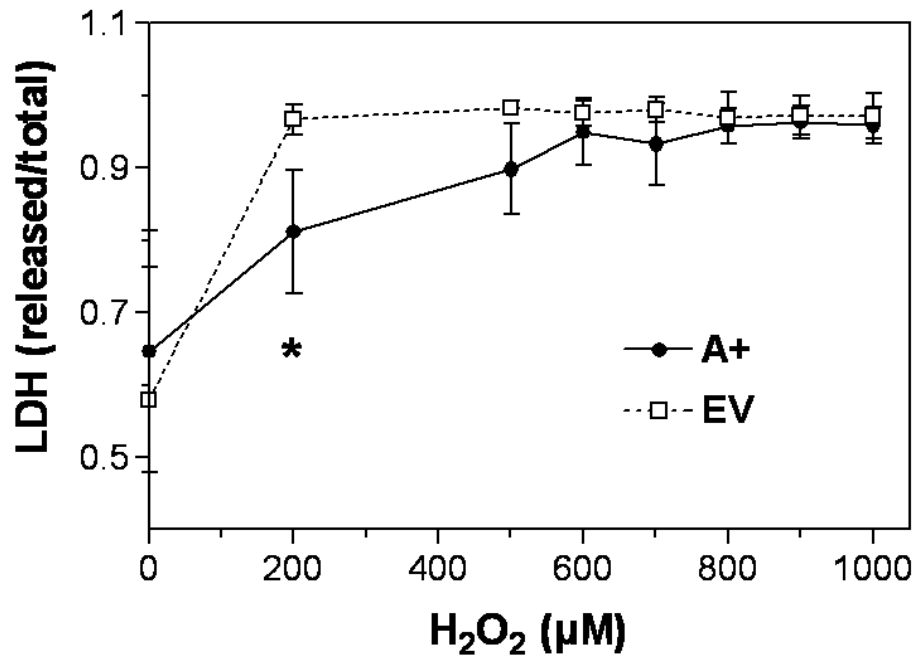


Fig. 5E

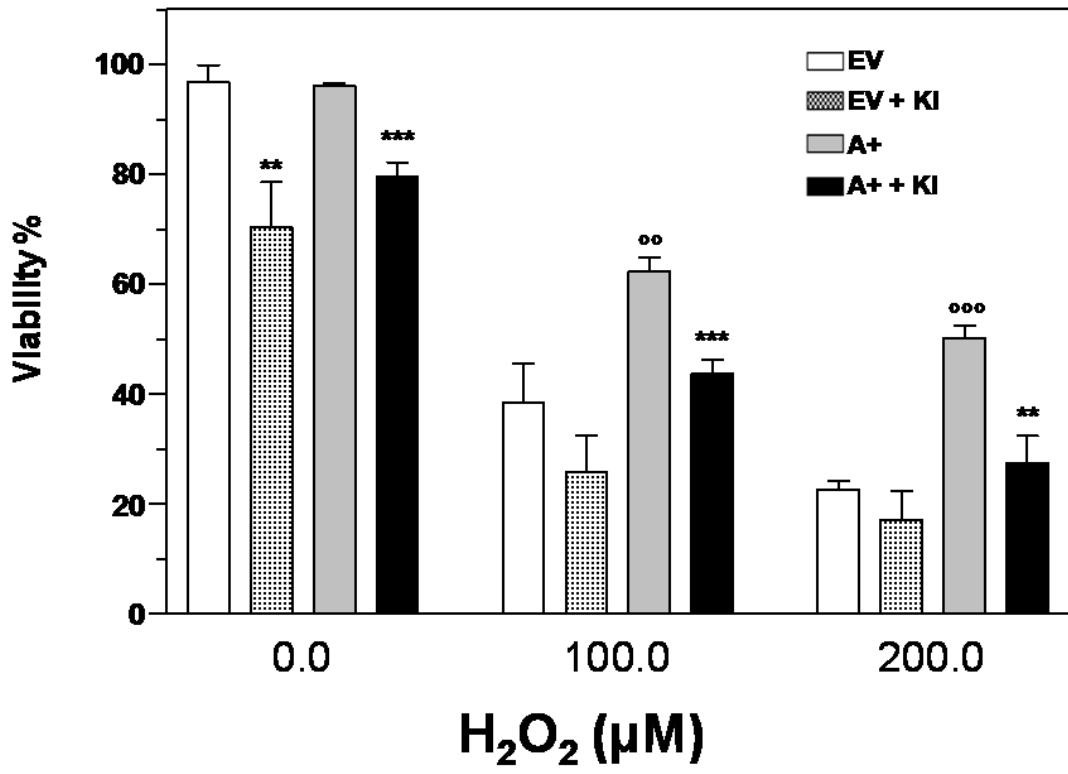


Fig. 6

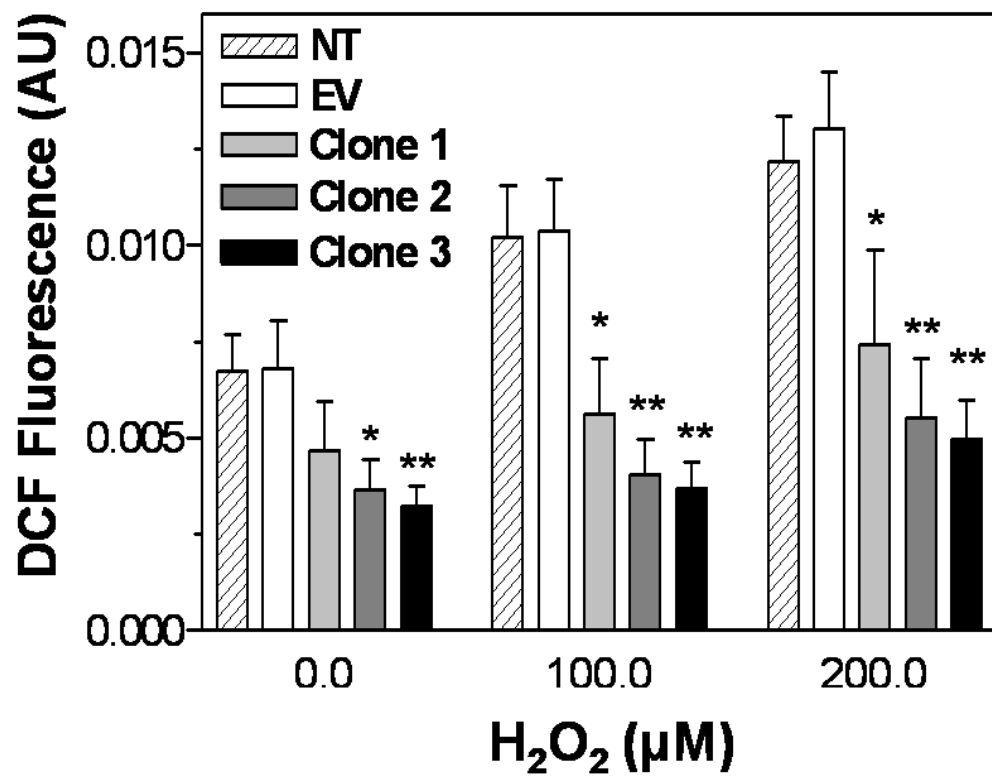


Fig. 7A

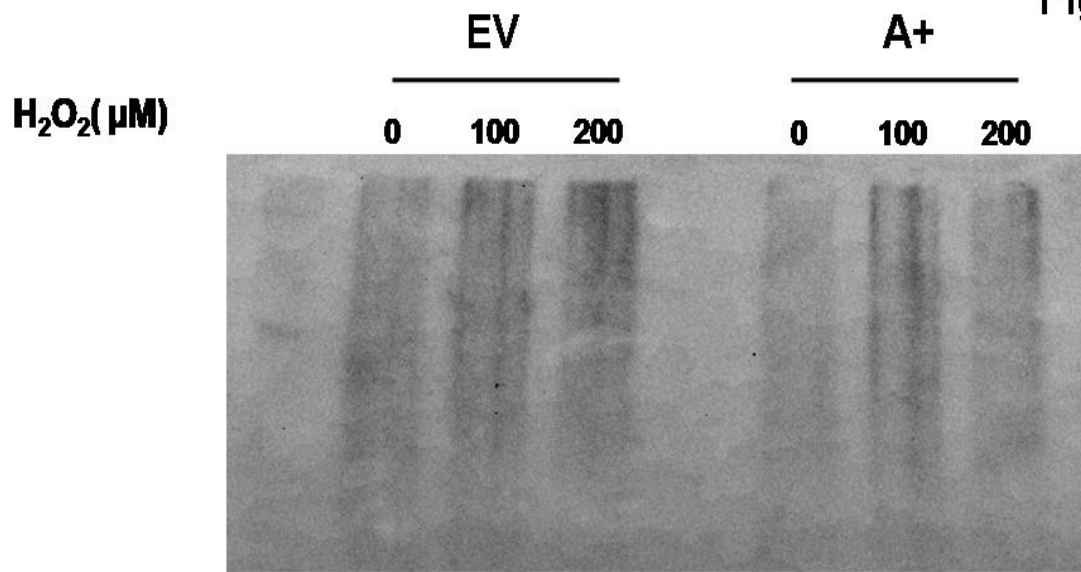


Fig. 7B

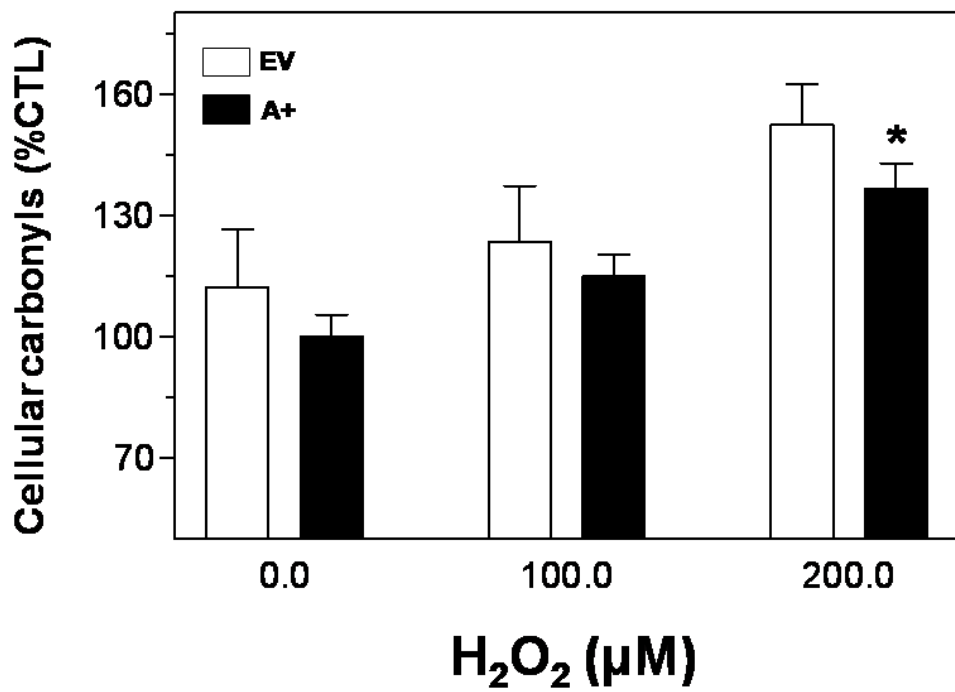


Fig. 8A

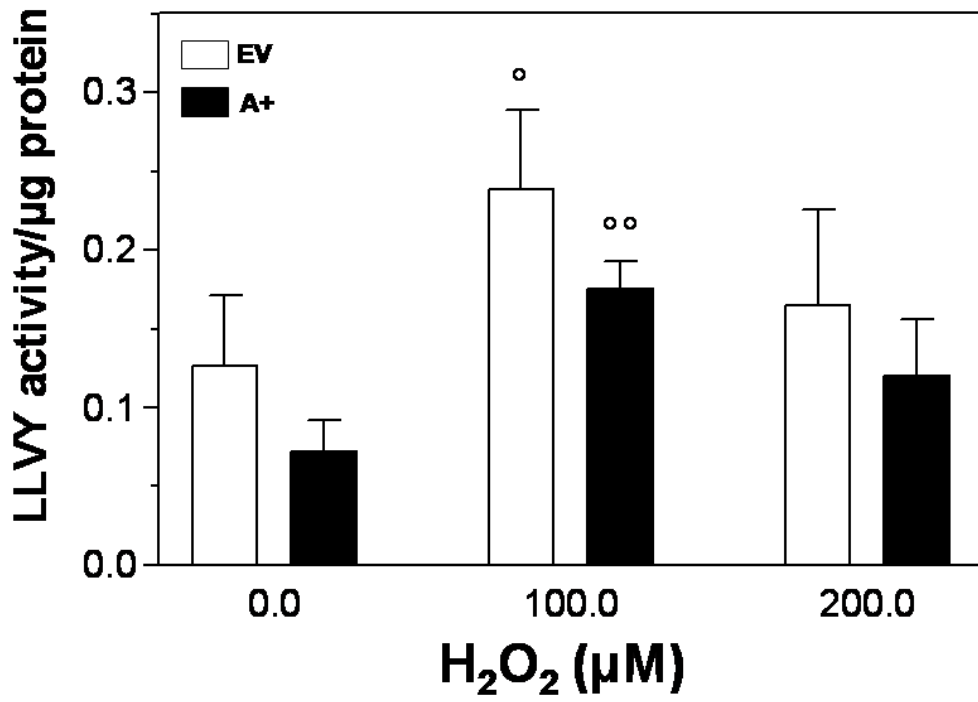


Fig. 8B

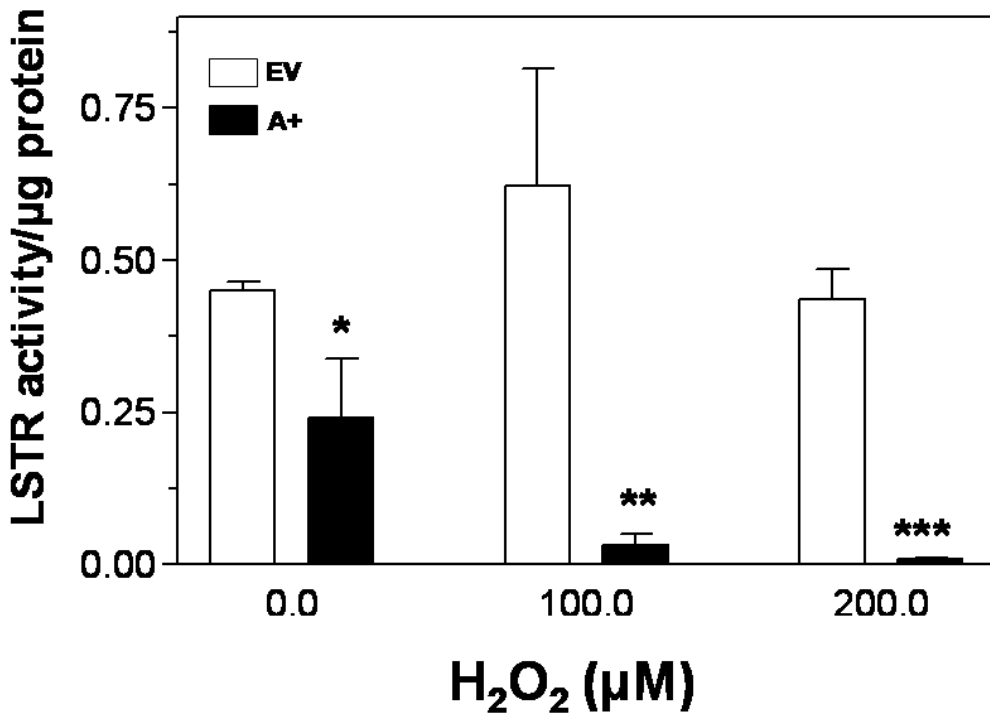


Fig. 9A

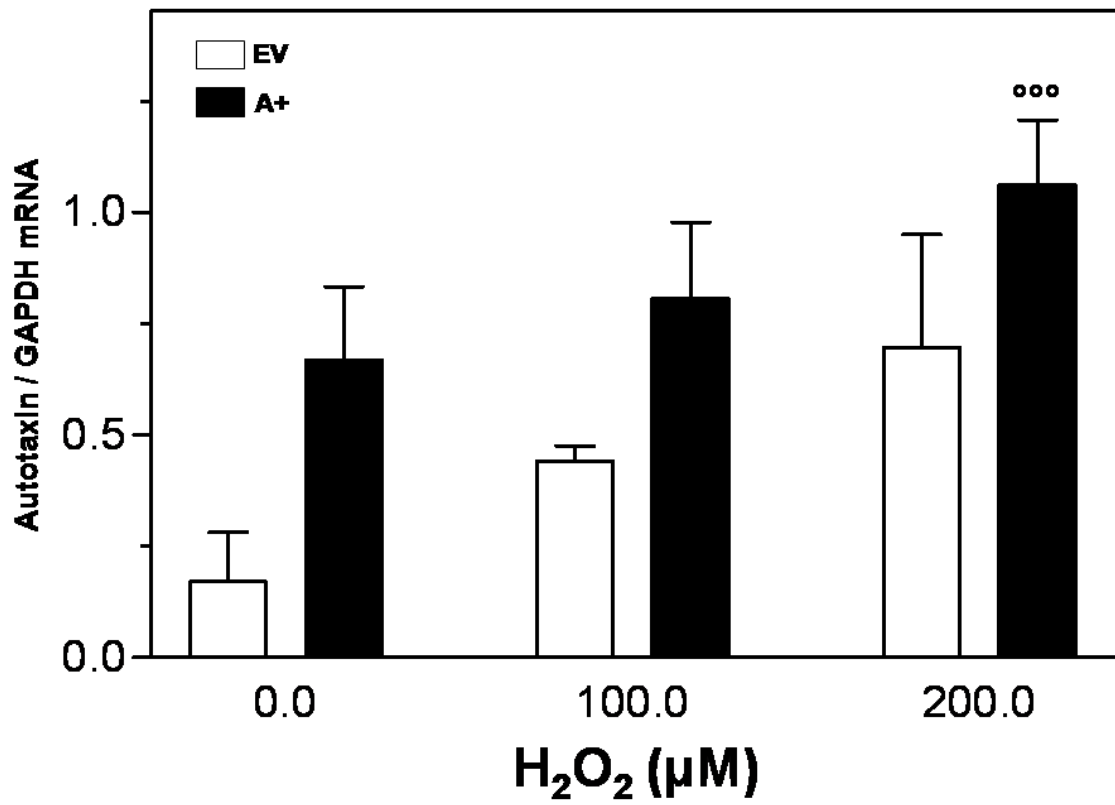


Fig. 9B

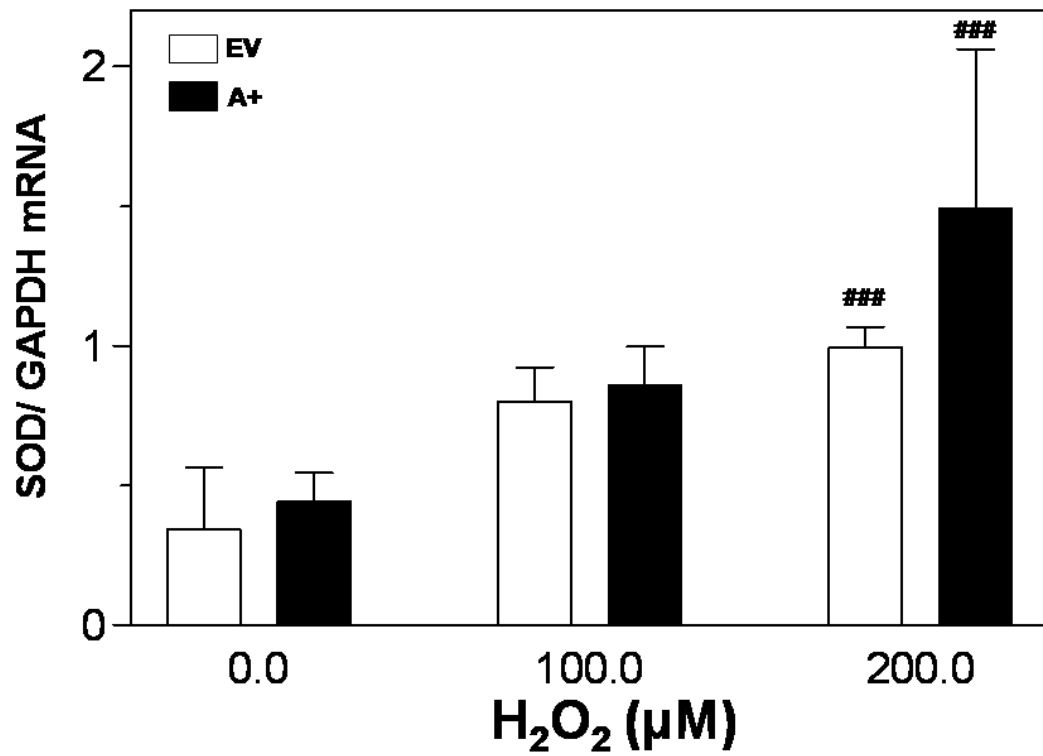


Fig. 9C

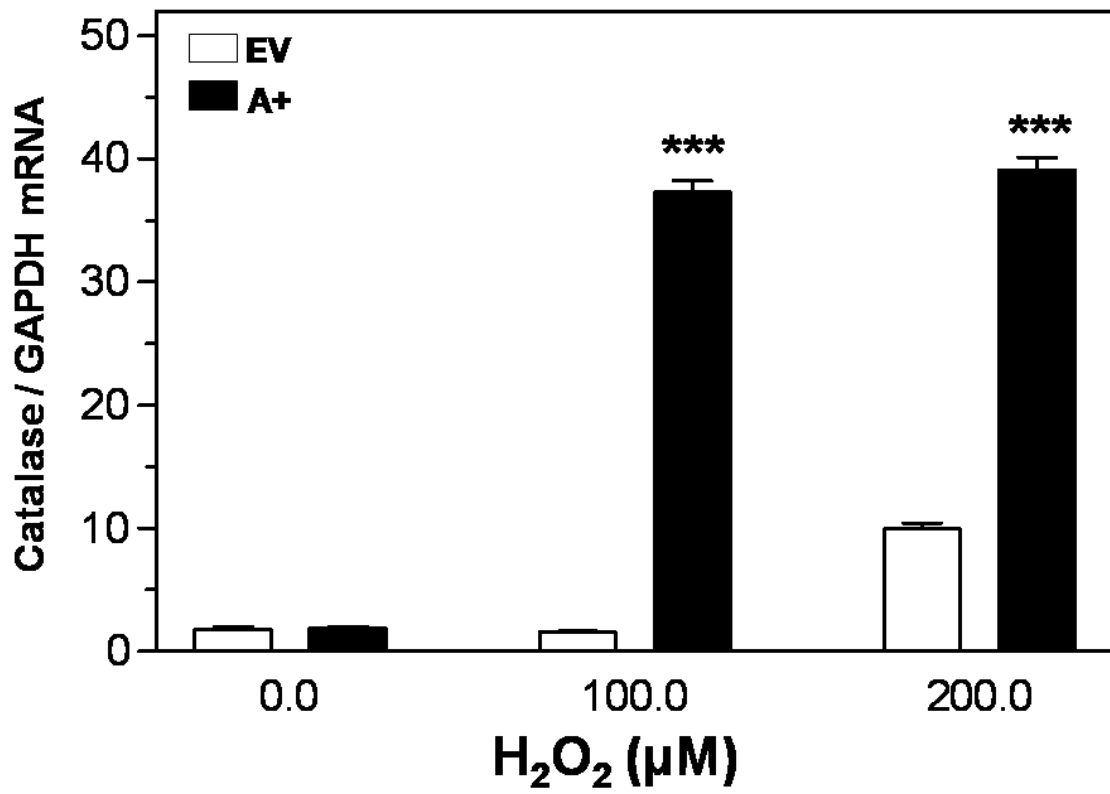
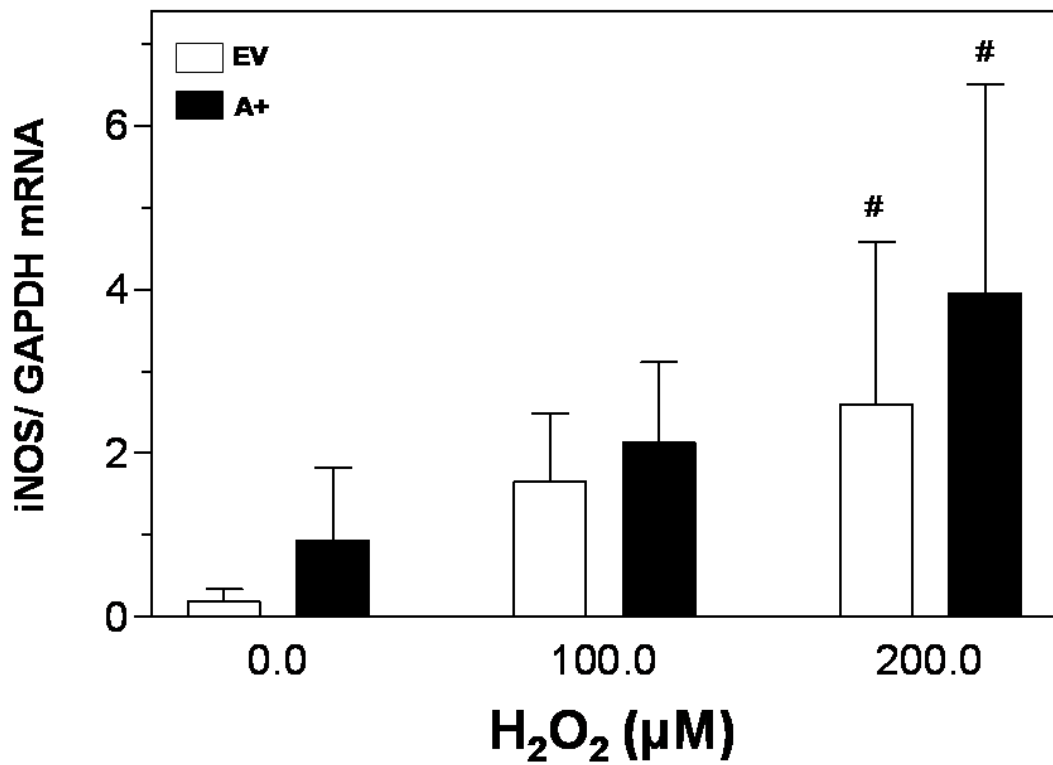


Fig. 9D



I.1. Méthodologie (Fig. M.1) :

- Culture cellulaire des lignées microgliales BV₂ et EOC
- Transfection stable des cellules BV₂ avec un vecteur témoin vide pCDNA3 ou contenant l'ADNc de l'ATX-m
- Stimulation des cellules avec du H₂O₂ à différentes concentrations pendant 24 heures
- Stimulation des cellules avec du LPA à 1μM et du Ki₁₆₄₂₅ à 20μM, un antagoniste du récepteur LPA1
- Etude de l'expression ARNm et protéine de l'ATX par RT-PCR quantitative et Western blot
- Etude de la production de LPA par un test radioenzymatique
- Analyse de l'expression des récepteurs membranaires CD11b par cytométrie en flux
- Etude de la cytotoxicité induite par H₂O₂ par coloration hématoxyline-éosine, bleu trypan (test de viabilité), MTT (test de prolifération) et LDH (test de mortalité)
- Détection des ROS intracellulaires par une technique de fluorescence DCFDA
- Détection des protéines carbonylées par ELISA et Western blot
- Mesure des activités enzymatiques du protéasome, chymotrypsin-like (LLVY-MCA) et trypsin-like (LSTR-MCA) en fluorescence
- Etude de l'expression ARNm des enzymes anti-oxidantes Q RT-PCR (SOD, catalase, iNOS)

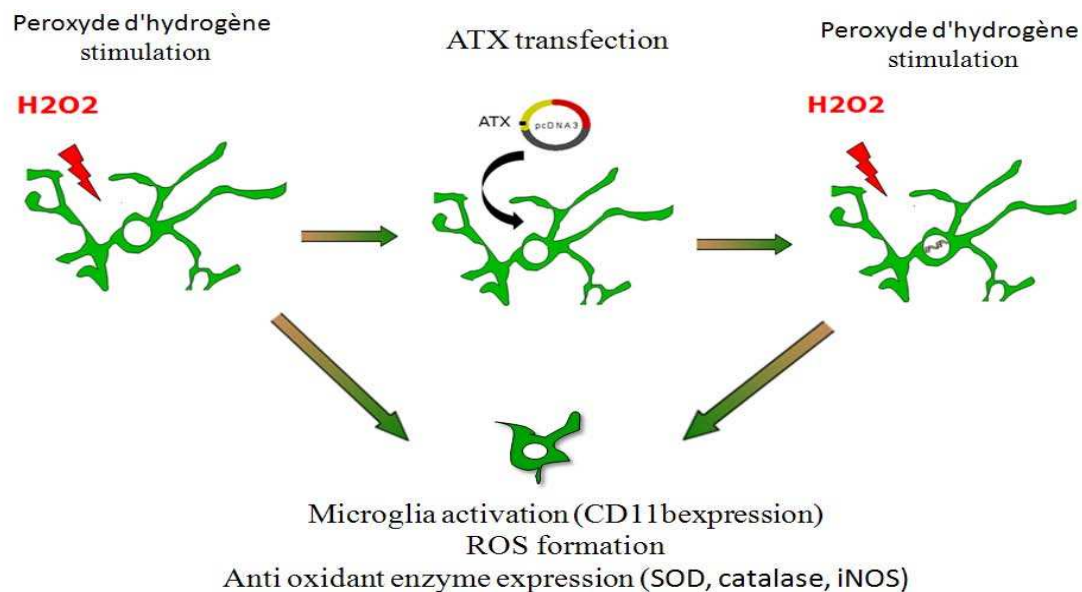


Figure M.1 : Méthodologie

I.2. Principaux résultats :

- H_2O_2 augmente l'expression de ATX dans les cellules microgliales
- le LPA induit un effet protecteur de ATX dans les cellules microgliales en diminuant la formation des ROS intracellulaires
- le Ki16425 bloque l'effet protecteur de ATX en augmentant la formation des ROS intracellulaires
- les cellules microgliales transfectées surexpriment ATX
- la surexpression d'ATX bloque l'induction de CD11b induite par H_2O_2 à la surface des microglies
- la surexpression d'ATX protège contre la cytotoxicité induite par H_2O_2 : changement de la morphologie cellulaire, augmentation de la prolifération et survie cellulaire, réduction de la mort cellulaire
- la surexpression d'ATX diminue la formation des ROS intracellulaires, l'accumulation des protéines carbonylées et l'activité trypsine-like du protéasome (LSTR)
- la surexpression d'ATX amplifie considérablement l'induction de la catalase par H_2O_2

I.3. Discussion :

Dans cette étude *in vitro*, nous avons regardé le rôle de l'ATX dans les interactions entre le stress oxydant et les cellules microgliales.

Dans le système nerveux central, les cellules microgliales jouent un rôle clé dans la réponse immune, assurant une protection contre les événements pathologiques [387]. L'activation des microglies est associée à l'inflammation et l'apoptose neuronale et est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives [388]. Les maladies neurodégénératives et le stress oxydatif sont étroitement interconnectés [389].

Les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle central dans la modulation de fonctions cellulaires, notamment la microglie. Si la production de ROS dépasse les capacités de défenses antioxydantes, un stress oxydatif apparaît, caractérisé par des dommages importants sur la structure et le métabolisme des microglies [390]. En fait, l'accumulation de grandes quantités de ROS dans le SNC est une caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives [391, 392].

L'Autotaxine est une lysophospholipase D sécrétée qui génère de nombreux effets biologiques principalement due à son activité enzymatique et à la synthèse de l'acide lysophosphatidique. L'Autotaxine est présente dans plusieurs tissus (cerveau, placenta, rein, pancréas, tissu adipeux) avec une expression plus importante dans le système nerveux central [160, 214], où elle pourrait être impliquée dans la neurogenèse et la myélinisation des oligodendrocytes [215].

Elle est surexprimée dans de nombreux cancers [189, 210, 211], dans l'inflammation [393] et dans la thrombose [394]. Dans le tissu adipeux, elle est sur-exprimée dans les adipocytes de souris génétiquement obèses et diabétiques [148]. Dans le SNC, elle est surexprimée dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de sclérose en plaques [154] et dans le cortex frontal de patients souffrant de démence de type Alzheimer [395]. Toutefois, son expression dans le SNC par des cellules microgliales soumis à un stress oxydatif n'a jamais été étudiée.

Dans un premier temps, nous avons soumis les cellules microgliales à un stress oxydatif avec du peroxyde d'hydrogène afin de mesurer l'impact du stress oxydant sur la sécrétion d'ATX par ces cellules. Nous avons observé une augmentation significative de l'expression d'ARNm ATX, de la production de LPA (Fig.1A et B) et de l'expression protéique de l'ATX en Western blot (Fig.R.I.1) dans les cellules traitées avec 100 μ M et 200 μ M d' H_2O_2 . Ces concentrations peuvent être physiologiquement pertinentes, et pourraient être rencontrées *in vivo* dans des conditions extrêmes [396].

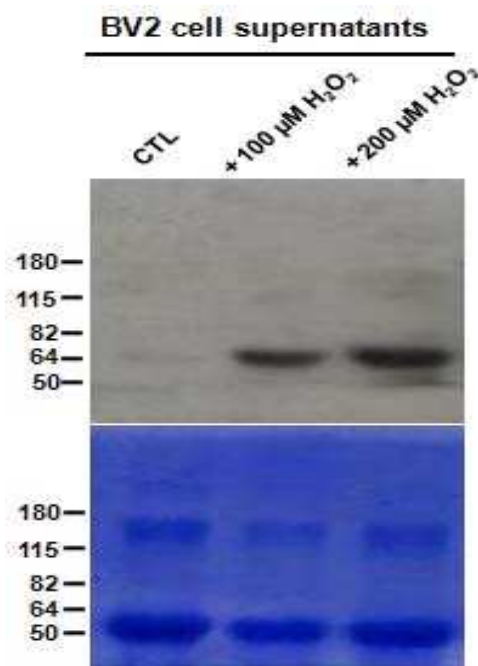


Figure R.I.1 : Western blot de l'expression de l'ATX dans le surnageant de cellules traitées. Ces résultats montrent clairement que le stress oxydant stimule la sécrétion d'ATX par les microglies, ce qui suggère un rôle bénéfique d'une surexpression d'ATX dans des microglies en présence d' H_2O_2 .

Ensuite, nous avons regardé la formation de ROS dans les cellules microgliales incubées avec H_2O_2 . Le niveau de ROS dans les cellules était significativement plus faible que lorsqu'elles sont traitées avec du LPA. Par contre, ce niveau augmentait significativement lorsqu'elles ont été traitées avec Ki_{16425} , un antagoniste du récepteur LPA1 (Fig.2A, B, C). Ces résultats montrent que le LPA induit un effet protecteur de l'ATX dans les cellules microgliales en diminuant la formation des ROS intracellulaires et que le Ki_{16425} bloque cet effet en augmentant la formation des ROS intracellulaires.

Dans un deuxième temps, nous avons transfecté les cellules microgliales avec un vecteur exprimant l'ATX. Nous avons contrôlé les niveaux de l'expression d'ARNm et protéique de l'ATX ainsi que de la production de LPA dans 3 clones sélectionnés. Nous avons observé également une augmentation significative de l'expression d'ARNm ATX et de la production de LPA dans ces 3 clones. (Fig.3A, B). L'augmentation de l'expression ATX est également détectée au niveau protéique dans le milieu et le lysat de cellules transfectées par l'ATX (A+) (Fig.R.I.2).

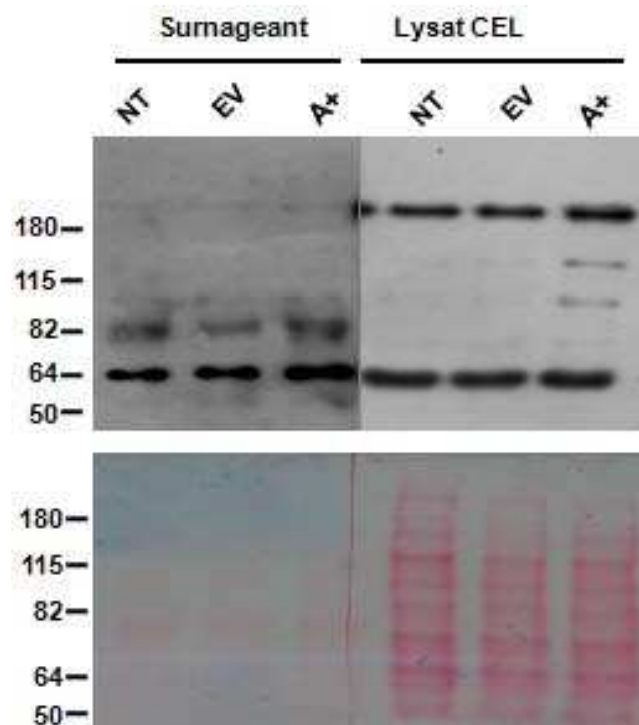


Figure R.I.2 : Western blot de l'expression de l'ATX dans le surnageant et le lysat de cellules transfectées

Ensuite, nous avons soumis les cellules transfectées au H_2O_2 afin d'évaluer le rôle de la surexpression d'ATX dans des microglies en présence de H_2O_2 .

Les travaux de Roy *et al.* (2008) ont montré que les ROS peuvent être des acteurs clés dans l'activation de la microglie en augmentant l'expression de CD11b, un marqueur d'activation microgliale, dans les cellules microgliales traitées avec du H_2O_2 [390]. Nos résultats sont concordants avec ces travaux, nous avons observé une augmentation de l'expression CD11b dans les cellules microgliales traitée avec du H_2O_2 . Cette expression a été significativement réduite dans la microglie surexprimant l'autotaxine (Fig. 4A, B).

Nous avons aussi observé une protection significative en terme de viabilité des cellules surexprimant l'ATX et traitées avec H_2O_2 (Fig. 5B). Le rôle bénéfique de l'ATX dans la réponse cellulaire au stress oxydatif est soutenu par une diminution de la formation des ROS intracellulaires (Fig.6) et de l'accumulation des protéines carbonylée observée dans les cellules surexprimant l'ATX traitées avec H_2O_2 (Fig. 7A, B). Ces résultats montrent que la surexpression d'ATX par les microglies protège de la cytotoxicité induite par le H_2O_2 .

Le protéasome est la principale voie de dégradation protéolytique de protéines oxydées [397]. Une amélioration de l'activité chymotrypsine du protéasome (LLVY-MCA) et trypsin-like (LSTR-MCA) a été observée dans les cellules incubées avec 100 μ M de H_2O_2 (Fig. 8A, B).

Nous avons également regardé l'activité enzymatique du LLE-NA postglutamylpeptidyl-peptide hydrolase (PGPH-like), sans que ces résultats atteignent une différence significative (Fig.R.I.3).

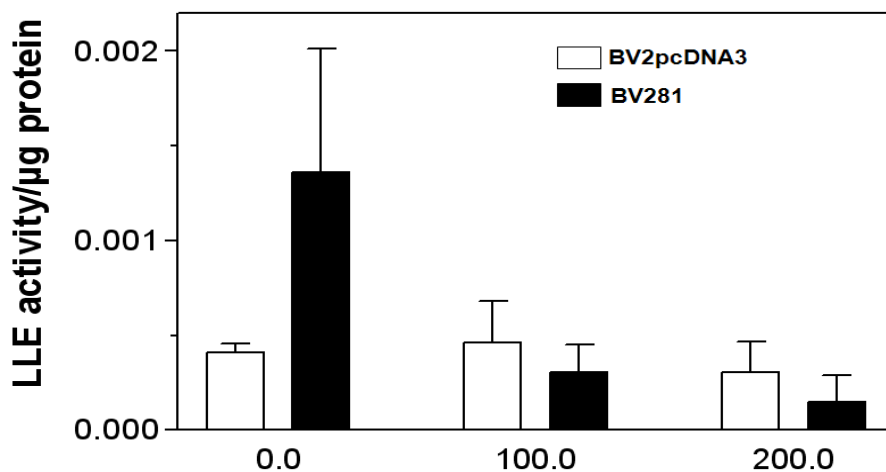
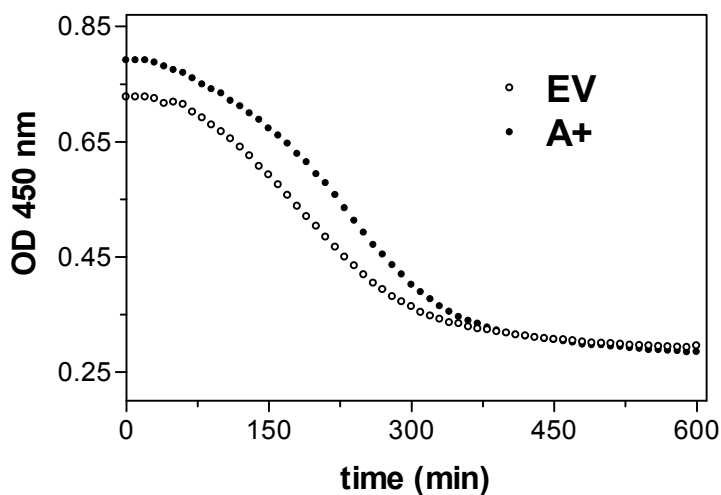


Figure R.I.3 : Activité enzymatique du PGPH-Like

Afin d'apporter quelques éléments sur les mécanismes impliqués dans l'effet protecteur de l'ATX, nous avons regardé avec le test d'hémolyse induite par les radicaux libres, l'effet des produits de sécrétion des cellules surexprimant l'ATX et nous avons comparé l'activité anti-oxydante renforcée dans le milieu de culture des cellules surexprimant l'ATX avec ceux de cellules controles. Les résultats présentés ci-dessous indiquent que l'effet protecteur de l'ATX pourrait être dû aux produits sécrétés (Fig.R.I.4).



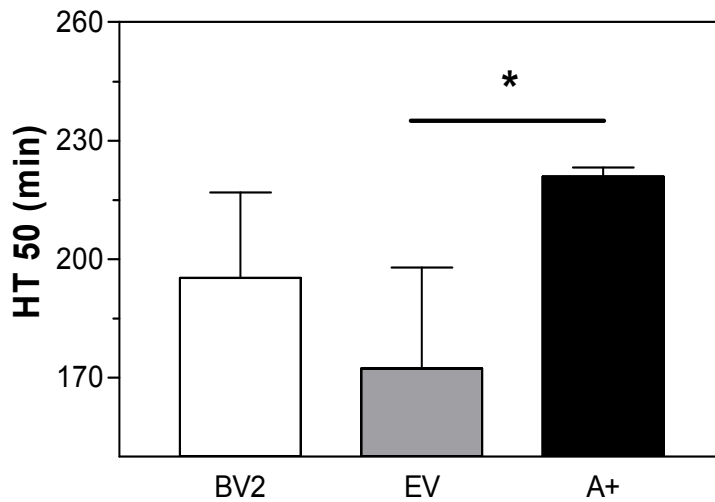


Figure R.I.4 : Test d'hémolyse

Actuellement, des questions importantes se posent sur le mécanisme d'action de l'ATX : L'induction d'ATX par H_2O_2 est-elle ROS dépendante? Est-elle LPA-dépendante? Par où peut passer l'effet antioxidant de l'ATX? Passe-t-il vraiment par le LPA? En effet, les données de la figure 2 montrent des effets faibles du Ki_{16425} et du LPA sur la production de ROS dans les microglies. Est-ce que les effets du Ki sont indépendants des LPAR?

La NADPH oxydase est-elle impliquée dans la production de ROS?

En effet, l'étude de Roy *et al.* (2008) montre l'implication de la NADPH oxydase dans la production de ROS puis de NO dans l'activation de microglies soumises à différents traitements (LPS, NAC, H_2O_2 et différents inhibiteurs ou activateurs de la NADPH oxydase ou de iNOS) [390]. Quel serait l'effet d'un inhibiteur de la NADPH oxydase sur l'expression CD11b de cellules surexprimant l'ATX?

Des travaux complémentaires semblent nécessaires afin de valider ces résultats et de répondre à toutes ces questions :

- Etude de l'influence de H_2O_2 sur l'activité de l'ATX (mesurer l'activité lysoPLD dans les milieux de culture)
- Etude de l'influence de Ki_{16425} sur la formation de ROS engendré par la surexpression de l'ATX ainsi que sur l'induction de la catalase par H_2O_2
- Etude de l'influence de la surexpression d'ATX sur d'autres protéines anti- ou pro-oxidantes (COX, NADPHox) ainsi que sur l'activité de NADPH oxydase

- Etude des mécanismes impliqués dans l'up-regulation de l'ATX par H₂O₂ : l'effet d'un antioxydant (NAC, N-Acetyl Cysteine) ou l'effet d'autres agents ou situations connues pour augmenter H₂O₂ sur l'ATX (glucose oxidase, LPS, autres ...)
- Etude de l'effet de l'ATX purifiée ou recombinante dans le test d'hémolyse
- Etude de l'hypothèse *in vivo* sur un modèle de stress oxydant : le modèle d'animaux soumis à des chocs d'hyperoxygènes

I.4. Conclusions :

Avec ces résultats nous montrons, pour la première fois, un rôle anti-oxydant de l'autotaxine au niveau du cerveau, notamment dans les microglies soumises à une attaque radicalaire.

En résumé, nos résultats montrent que la sécrétion de l'autotaxine par les cellules microgliales est stimulée par le stress oxydatif et que la surexpression de l'autotaxine protège les microglies contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène. Par ailleurs, l'autotaxine réduit fortement les espèces réactives de l'oxygène médiées par activation microgliale. Nous proposons par conséquent, que l'amélioration du stress oxydatif médié par la sécrétion d'autotaxine dans les cellules microgliales peut représenter un mécanisme pour atténuer les dommages ROS pendant la stimulation du métabolisme oxydatif dans le cerveau. Cette hypothèse, ainsi que l'importance de l'autotaxine dans le cerveau, justifie des recherches plus approfondies.

Original Research Communication

**IDENTIFICATION OF A NOVEL ROLE FOR AUTOTAXIN
IN INFLAMMATION INDUCED MICROGLIAL CELLS**

**Rana Awada¹, Sandra Grès², Jean Sébastien Saulnier-Blache²,
Emmanuel Bourdon¹, Jean G. Harry³, Christian Lefebvre d'Helencourt^{1*}**

¹ Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) EA 4516, Université de La Réunion, Faculté des Sciences 15 avenue R. Cassin, BP 7151, 97715, Saint Denis Cedex and

Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, BP 80 005, 97491 Sainte Clotilde Cedex, Reunion Island, France.

² *INSERM U1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC). 1 avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432 Toulouse, Cedex 4, France.*

³ *Neurotoxicology Group, Laboratory of Toxicology and Pharmacology (LTP), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health, Dept. of Health and Human Services, Research Triangle Parc, North Carolina, USA*

*** Corresponding author**

Keywords: Autotaxin, microglia, inflammation, trimethyltin

Running title: **Autotaxin \square anti-inflammatory effects on microglia**

ABSTRACT

Inflammation is essential in defence against infection or injury. However, overresponse can be detrimental, especially in immune-privileged organs such as the central nervous system, in which microglia are the major source of inflammatory factors. Autotaxin (ATX), a phospholipase D, converts lysophosphatidylcholine into lysophosphatidic acid (LPA) and is upregulated in several CNS injuries. LPA, a pleiotropic immunomodulatory factor, can induce multiple cellular processes, morphology, proliferation, death and survival. Here, we investigated ATX effects on the inflammatory response to two distinct inflammatory stimuli targeting microglia. Lipopolysaccharide (LPS) mimics gram negative infection, and

trimethyltin (TMT), induces hippocampal neurodegeneration via the tumor necrosis factor (TNF) pathway. Murine BV2 microglia and stable transfected, overexpressing ATX BV2 (A+) were treated with LPS (1 μ g) and TMT (10 μ M). ATX, TNF, interleukin (IL)-6, IL-10 levels were examined by qRT-PCR. LPA levels were determined. Microglial activation markers (CD11b, CD14, B7.1, B7.2) were quantified by flow cytometry. ATX expression was significantly enhanced in LPS or TMT treated BV2. LPS-induced CD11b, CD14, and B7.1 and B7.2 were reduced in A+ cells. TNF and IL-6 were inhibited in LPS or TMT treated A+ cells while IL-10 level was increased. In vivo, elevated ATX mRNA levels in the hippocampus were demonstrated in CD1 mice 5 days following an acute ip injection of TMT (2mg/kg bwt). With the pattern and timecourse of response, our results suggest an involvement of ATX in regulating microglia activation and neuroinflammation.

Introduction

Several central nervous system (CNS) pathologies are associated with an increased inflammation, including multiple sclerosis, Parkinson disease, Alzheimer disease, multiple sclerosis or ischemic stroke [1]. A controlled inflammatory response to an infection or an injury can be beneficial, but an over response could be detrimental. Microglia, the resident macrophage of the brain, are considered as an important source of inflammatory factors and activated microglia cells are present in some of the previously cited neurological diseases [2]. Microglia are very responsive to environmental or infectious stress, and by secreting inflammatory factors (cytokines, chemokines, free radicals), can be neurotoxic [3].

Their activation program is sequential and includes morphological, phenotypic and functional changes [4]. In addition to the production of inflammatory factors, these changes included the increases expression of specific integrin (CD11b), receptor and co receptor of lipopolysaccharide (LPS) (TLR4 and CD14), major histocompatibility complex (MHC) class I and II and costimulatory molecules (CD80 and CD86) [5,6].

Recently a growing interest has emerged for the potential involvement of LPA in inflammation. LPA is a bioactive phospholipid involved in numerous biological activities, including cell proliferation, differentiation, and migration acting via specific G-protein coupled receptors [7]. Until the recent discovery of autotaxin (ATX), it was unclear by which mechanism and through which enzymes bioactive LPA is produced. ATX, also known as Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase-2 (ENPP2), is a secreted enzyme with lysophospholipase D (lysoPLD) activity involved in hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC) into lysophosphatidic acid (LPA) [8]. ATX is an extracellular enzyme of 125 kDa, which was initially discovered in the culture medium of human melanoma cells [9].

Since then it has been shown that ATX is involved in many physiological process including cell motility, angiogenesis or adipogenesis [10-12]. ATX is up-regulated in many inflammatory conditions, including cancer, arthritis and multiple sclerosis [13-16].

The aim of the present study was to determine the potential regulatory role of autotaxin in the activation of microglia and in the release of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF, IL-6, and IL-10). We also investigated whether autotaxin exert its effect on microglia via the transcription factors NF κ B / AP-1. Finally, in a chemical-induced model of neurodegeneration we analyzed ATX expression in the injured region.

Materials and methods

Microglial culture

Murine microglial BV2 cell, line, were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biotech) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂ and 95% air. Confluent cultures were passaged by trypsinization.

BV2 cell transfection with pCDNA3 and 81 pCDNA-ATX

Cells were cultured in 6-well plate at a density of 1×10^5 cells/well with 3 mL of medium. After confluence, culture medium was replaced by fresh medium without penicillin/streptomycin. BV2 cells were transfected with 2 μ g of the empty vector pCDNA3 (EV) and the expression vector pCDNA3 containing the cDNA of murine ATX (A+) [10] using lipofectamine (LF2000; Invitrogen, France) as recommended by the furnisher. Briefly, Plasmid DNA and LF2000 were premixed for 15 min and then applied to the cells. 5h later, the medium was replaced by fresh medium with 700 μ g/mL geneticin and the cells were then incubated 48h longer. After incubation, the medium was removed and cells were washed once with phosphate buffer solution (PBS), and were passaged by trypsinization. Clones of ATX expressing cells were obtained by limit dilution in 96-well plate.

LPS and TMT treatment

BV2 cells, empty-vector transfected cells (EV) and ATX-overexpressing cells (A+) were cultured in 6-well plates. After the confluence, cells were exposed to normal culture medium or treated with Lipopolysaccharides from Escherichia coli K-235 (Sigma, France) (LPS, 10 ng/mL or 1 μ g/mL) or with Trimethyltin hydroxide (originally from Alpha Products, Danvers, MA, TMT, 5 μ M or 10 μ M) for the indicated period of time.

TMT Cytotoxicity

Cytotoxicity was estimated by the MTT assay as previously described [17]. Briefly, cells were cultured for 48 h in the presence of TMT at different concentrations (5 or 10 μ M). In the last 4 h of TMT exposure, 5 mg/ml of MTT was added to each well. At the 24-h time point, media was removed and the formazan crystals formed during the previous 4 h were dissolved in DMSO and quantified spectrophotometrically at 570 nm using an ELISA reader.

Haematoxylin-Eosin Staining

Cell nuclei were stained blue with Hematoxylin, and cytoplasm were counterstained red with eosin. BV-2 cells, empty-vector transfected cells (EV) and cells overexpressing autotaxin (A+), were seeded on glass cover slips in 4 well plates and treated with 1 µg/ml LPS or 10 µM TMT (control cells were untreated). After 24 h treatment, cells were fixed in pure acetone at -20°C for 5-10 min and stained with hematoxylin solution (Vector®). Cells were washed 10 times in 2% glacial acetic solution and incubated in bluing solution (1.5 mL NH₄OH 30% stock solution in 98.5 mL of 70% ethanol) for 1 min, rinsed with water and stained by incubation with eosin solution for 7 min. Cells were imaged using a Nikon eclipse microscope and NIS-Element software (Nikon).

Measurement of lysophospholipase D production

LPA was quantified using a radioenzymatic assay as previously described [18]. Briefly, lipids were extracted from conditioned media with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [14C]PA with recombinant LPA acyl-transferase in the presence of [14C]oleoyl-CoA. The products of the reaction were extracted, separated by one dimensional TLC and autoradiographed.

Western Blotting

Protein concentration was determined by bicinchoninic acid (BCA). Cell lysates containing 20 µg proteins were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) with 10% running gels and 4% stacking gels. Gels were run for 2 hours at 30 mA, and transferred to Nitrocellulose membrane and then blotted onto a nitrocellulose membrane (BIO-RAD) using a liquid transfer system. The membranes were soaked at night with blocking buffer (PBS / Tween 0,1% / BSA 1%) to block non-specific binding and washed 3

times for 10 min in PBS/Tween buffer. The membranes were incubated in blocking buffer with the primary antibody rabbit anti- mATX for 2 hours at room temperature) at a 1:1000 dilution in PBS/Tween 0.1%/BSA 1; Subsequently, the membranes were incubated with secondary antibody for one hour horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000);. After four 5min washes, development was completed with an enzymatic assay (ECL, Amersham Biosciences) and visualized with a Kodak 2000R Image station.

TNF α , IL-6 and IL-10 protein quantification

BV2 cells were plated in 6 wells-plates at a density of 1×10^5 cells/well. Four hours later, the culture media was collected and stored at -20°C until assayed. Samples were assayed for TNF α , IL-6 and IL-10 protein content with a protein specific ELISA kit, according to the manufacturer's protocol. Mouse TNF α , IL-6 ELISA kit were purchased from eBioscience (Cliniscience, France), IL-10 ELISA Kit was purchased from SouthernBiotech (Cliniscience, France).

Quantification of CD11b, CD14, CD80, and CD86 expression using flow cytometry

Cells were cultured in 6-well plate at a density of 1×10^5 cells/well with culture medium (Control) or treated with $1 \mu\text{g/mL}$ of LPS for 4h. The cells were then washed with PBS, detached and incubated with blocking buffer (PBS/BSA 1%) for 10 min to block non-specific binding. Cells were then incubated with a mouse monoclonal anti-CD11b, anti-CD14, anti-CD80, and anti-CD86 antibody (1: 200 dilution in PBS/BSA 1%; Bioscience), for 1h at 4°C . Cells were then washed again, incubated with PE-conjugated secondary IgG for 30 min at 4°C , and analyzed by flow cytometry using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

NF κ B and AP-1 activation

RAW-Blue \square cells (invivogen, France) are derived from RAW 264.7 macrophages. RAW-Blue \square have been stably transfected with a construct in which NF-kB and AP1 activation lead to the secretion of secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP). RAW-Blue \square Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 200 mg/ml G418 in a humidified incubator under 5% CO₂ and 95% air. Confluent cultures were passaged by trypsinization. Cells were resuspended in fresh growth medium and 180 μ l of cell suspension (100,000 cells) were added per well of 96-well plate. Cells were exposed to normal culture medium or treated with LPS (1 μ g/ml) or LPA (1 μ M) or supernatant (conditioned medium (CM)) from BV2 cells or autotaxin (A+) transfected. The plate was incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 24 h. After incubation, 1.10⁻³M of p-nitrophenyl-phosphate (PNPP, Sigma, France) (dissolved in 0.1 M glycine buffer containing 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 10.4) were added to each well at 37°C for 30 min.

PNPP+ H₂O in presence of SEAP are converted to para-nitrophenol (PNP) + Phosphate. PNP is yellow in alkaline medium and assayed to determine SEAP levels using a spectrophotometer at 460 nm

Animal model of hippocampus neuronal damage

To produce an acute focal damage in hippocampus, 21-day-old, pathogen-free, male CD-1 mice (Charles River Breeding Laboratories, Raleigh, NC, USA) received a single injection of trimethyltin hydroxide (TMT; 2 mg/kg body weight, i.p.). The age and dose were chosen based on our previous experiences on this model [19-22] . Mice were randomly assigned to experimental groups and administered a single dose of either or saline vehicle in a dosing volume of 2 ml/kg body weight. Less than 10% mortality has been observed after TMT treatment. Animals were individually housed in a dual corridor, semi-barrier animal facility at constant temperature (21 \pm 2C) and humidity (50 \pm 5%), and a 12 h light/dark cycle. Food (autoclaved NIH 31 rodent chow) and deionized, reverse osmotic treated water were available

ad libitum. At the time indicated, mice were lightly anesthetized with CO₂ and quickly decapitated. Brains were excised and the hippocampus was dissected and quickly frozen. All procedures were conducted in compliance with a NIEHS/NIH Animal Care and Use Committee approved protocol and with a CYROI animal ethic committee.

Quantification gene expression by RT-PCR

After treatment, total RNA was extracted from cell cultures or hippocampii using Trizol reagent (Invitrogen). 6 µg of RNA was reversed transcribed to cDNA using Random primers (Sigma) and Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV, Invitrogen). The cDNA was amplified by PCR, using the SYBR green master-mix (Eurogentec, Belgium) and specific murine primers purchased from Eurogentec. Primer sequences are listed in Table 1. Each PCR cycle was conducted for 15s at 95°C and 1min at 60°C. RNA amounts were calculated with relative standard curves for each mRNA of interest and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Normalization to GAPDH was conducted to account for variability in quality and concentration of total RNA, and RT efficiency. The results were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software.

Statistical analysis

Data was analyzed by either a Student's t-test for two group comparisons or by an ANOVA followed by a Dunnett's t-test for comparisons of multiple doses or times (JMP[®], SAS Institute Inc., Cary, NC). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM.

Results

TNF, IL-10, ATX and LPA induction in presence of LPS

BV2 microglial cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), a compound mimicking a gram negative bacterial infection. As expected, TNF α mRNA expression was significantly increased, with a peak at 4 hours following LPS stimulation and a return to basal level after 24 hours. This increase was dose dependant as TNF mRNA level was higher at 1 μ g/ml when compared to 10 ng/ml (Fig 1A). In contrast IL-10 mRNA level was decrease at 4 hours post LPS in a dose dependant manner (Fig 1B). Interestingly, ATX mRNA expression was also increased in a dose dependant manner and a higher level at 4 hours post LPS (Fig 1C). This ATX augmentation at the mRNA level was also observed at the protein level by western blot (Fig 1D). The product of ATX activity, LPA, was significantly augmented as measured by radioenzymatic assay (Fig2).

TMT toxicity

Another stimulus, the trymethyltin (TMT), has been used to induce an inflammatory response by microglia. The TMT is an organometal known for its neurotoxicity and to activate microglia. As measured by MTT, TMT decreased BV2 cells viability over the time reaching at 24 hours around 80% and 70% for 1 μ M and 10 μ M of TMT respectively (fig 3). Most of the following in vitro experiments using TMT have been performed with four hours incubation, when the viability is around 90 % at the highest TMT dose (10 μ M).

ATX over-expressing Clone

To evaluate ATX over expression, BV2 cell line has been transfected with the original plasmid (PCDNA3) or with a PCDNA-ATX plasmid. The characterization of the clones as

been described recently (Awada et al Manuscript submitted) and the following experiments have been done with a characterized over expressing ATX clone (A+ clone). In presence of LPS (1 µg/ml) for 24 hours the morphology of the cells (EV, A+) was not changed (Fig 4) nor the viability as checked by tripan blue counting (data not shown). The level of mRNA expression of the LPAR1 is increased in ATX overexpression microglial cells (Fig 5). In presence of TMT the morphology of the cells was changed with cells more flattened (Fig 4). Changes in microglia morphology have been previously described [23].

ATX expression in NV, EV and A+ clones in presence of LPS or TMT

Similarly to what we observed with non transfected BV2 cells, LPS induced a significant increase of ATX in EV and A+ cells (Fig 6A). In presence of 10µM TMT, ATX mRNA level was significantly augmented in BV2, EV and A+ cells (Fig 6B).

TNF, IL-6 and IL-10 expression in BV2, EV and A+ clones in presence of LPS or TMT

As expected, similar results were observed in the BV2 and EV stimulated with LPS or TMT with an increase in TNF and IL-6 and a decrease for IL-10 (Fig 7A-F). However A+ cells display a different response pattern. The over expression of ATX inhibit dramatically the TNF induced expression either by LPS or TMT with a RNA level lower than in the BV2 non stimulated cells (Fig 7A, D). IL-6 expression is also inhibited in the A+ clone but this inhibition seems to be less pronounced in presence of TMT (Fig 7B, E). In the A+ cells,

CD11b, CD14, CD80 and CD86 expression in BV2, EV and A+ clones in presence of LPS

Microglia activation was estimated by the level of expression of different CDs. In presence of LPS, CD11b, CD14, CD80 and CD86 were elevated (Fig 9). In cells over expressing ATX,

the basal expression of these CDs was significantly decreased as well as there LPS induced expressions (Fig 9).

NFkB and AP-1 activation in presence of LPA or conditioned media from A+

As ATX inhibited inflammatory cytokines production, NFkB activation was measured in the RAW-Blue \square cell line. RAW-Blue \square cells are derived from RAW 264.7 macrophages with chromosomal integration of a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter construct inducible by NF- κ B and AP-1. As shown in figure 9, LPA reduced the LPS induced NFkB activation as well as conditioned media from microglia cell overexpressing ATX.

ATX and TNF expression in TMT-induced hippocampal neurodegeneration

In vivo, a single intraperitoneal injection of TMT induced a peak of TNF mRNA increase at 24 hours (Fig 10A), consistently with previous results [20]. An increase in ATX was observed in TMT treated mice with a peak five days post TMT injection (Fig 10B).

Discussion

This study was undertaken to investigate the inflammation regulatory potential of ATX in the CNS. Our results clearly show that LPS or TMT induced ATX production by microglia. In vivo, in a model of neurodegeneration induced by a neurotoxic, the trimethyltin, ATX is produced 5 days post treatment. Furthermore, we showed that ATX over expression in microglia, inhibited very strongly LPS- and TMT-induced inflammation and activation.

Recently the role of microglia in the brain has been revisited. In the past, resting microglia were described as cells filling the space (glue) and as sentinel. It is known, now, that they participate in the normal physiology of the brain with a role in the maintenance of synaptic

integrity [24]. Similarly, the functions of microglia in response to injury have been updated. Firstly though uniquely as a major actor in neurotoxicity, it is now clear that activated microglia are involved in the reparation of the damaged brain [25,26]. Thus, microglia activation and production of inflammatory products may be beneficial, but an over response could be detrimental. Factors which can regulate the inflammatory response in the CNS are thus very interesting for potential therapeutic strategies.

Autotaxin is a phospholipase D and the main source of lysophosphatidic acid (LPA) , by converting lysophosphatidylcholine (LPC) in LPA [8,27]. LPA binding to its receptors leads to several different physiological activities including angiogenesis, adipocytes differentiation, myelinisation [10,12,28]. The role of ATX in inflammation is controversial. On the one hand, ATX and/or LPAR increases have been reported in inflammatory situations, including human rheumatoid arthritis (RA) [16], multiple sclerosis [13] and mammary gland inflammatory diseases [14,15]. On the other hand, LPA inhibits LPS induced inflammation in macrophages and in mice suggesting anti inflammatory properties [29].

Here we show for the first time that stimulation of microglia by LPS or TMT induced an increase in ATX production. Two stimuli were used with different signaling. There is no receptor known for TMT signaling, however we and other have demonstrated the importance of the microglia in vivo and the role of the TNF pathways in the TMT model of neurodegeneration [19,21]. Microglia expresses TLR4, the receptors for LPS recognition, and also a co receptor, CD14. These receptors are involved in the innate immunity function of microglia and LPS binding to them induces an inflammatory cytokines response as well as activation of the microglia in an antigen presenting cell (APC) [30].

Our results clearly show that ATX can prevent microglia activation and pro inflammatory secretion. The clone expressing ATX showed a dramatic low level for TNF α in presence of LPS or TMT. As the level of the anti inflammatory cytokine, IL-10, is high in this clone, it is possible that the inhibitory effect of ATX was at least partially due to this increased concentration of IL-10. The inhibition of NF κ B by conditioned medium from the clone overexpressing ATX could also be partially responsible for the inhibition of inflammatory cytokines. The effect of this conditioned medium is similar to LPA effect, suggesting that ATX production converted LPC to LPA.

Different markers were used to follow microglial activation. Integrin alpha M (CD11B) is a well known marker for microglia. It is present in resting and its expression augmented in activated microglia [31]. CD14 has a similar expression pattern. Interestingly, we found that the induced expression of the costimulatory molecules B7.1 and B7.2 were lowered in the A+ clone, indicating that not only the innate immunity of the microglia were down-regulated, but also their adaptive immune functions.

We confirmed that microglia expresses LPA1 [32-34] suggesting that ATX increase will lead to an increase of LPA which could bind to the microglia LPA1 and activates the corresponding signaling. LPA3 is expressed in rat microglia and this receptor has been shown to be increased after LPS stimulation in mice microglia, it is thus possible that LPA could affect microglia through LPA3 [32]. These LPA receptors are coupled with different G proteins leading to different signal transduction [35].

There are strong evidences that ATX is important in development, with an expression during the development starting at day 8.5 of embryogenesis (E8.5) [11]. Furthermore, ATX KO mice are lethal around E10 with aberrant neural tube formation.

TMT provokes a neuronal damage in the hippocampus, but also induces a neurogenesis [22,36]. Considering the timing of ATX expression following TMT induced

neurodegeneration in vivo and the involvement of ATX in the nervous system development, it is possible that ATX could play a role in the reparation of damage in the brain. It is also possible that ATX in vivo could play a role in microglia return to a resting state, as our results showed the capacity of ATX of down regulating microglial activation.

Our data are consistent with previous work showing that following a physical neurotrauma, an increase of ATX was observed in the brain [37]. The origin of ATX is not determined in our in vivo model. Our in vitro results demonstrate that microglia can produce ATX when stimulated with TMT, but that doesn't rule out that other cells could produce ATX in vivo. Other studies have shown that, in addition to ATX high expression in brain tumor cells [38], oligodendrocytes, astrocytes and leptomeningeal cells can produce ATX [28,37].

ATX effect on microglia is not limited to inhibition of activation and inflammation. In a recent work we clearly showed that ATX also have a protective role in oxidative stressed (Awada et al submitted).

The association between ATX and cancer as well as inflammation associated pathologies has lead to the development of ATX inhibitors in the perspective of therapeutic strategies [39,40]. On the opposite, our results in agreement with the work of others on macrophages [29], suggest a beneficial role of ATX in CNS injury, by protecting the microglia cells and down-regulating their activation. This may open new therapeutic perspectives for ATX.

Acknowledgements: This work was supported by the Intramural Research Program of NIEHS/NIH and by grants from "Conseil Régional de La Réunion", Europe and "Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche". RA is a recipient of fellowships for both teaching and research activities from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. SG and JSSB were supported by INSERM

(France), and by the Fondation de la Recherche Médicale (France) (grant #LRM20100618582).

References

- [1] Czlonkowska, A. and Kurkowska-Jastrzebska, I. (2011). Inflammation and gliosis in neurological diseases--clinical implications. *J Neuroimmunol* 231, 78-85.
- [2] Munoz-Fernandez, M.A. and Fresno, M. (1998). The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56, 307-40.
- [3] Rock, R.B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Cheeran, M., Lokensgard, J.R. and Peterson, P.K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 942-64, table of contents.
- [4] Ponomarev, E.D., Shriver, L.P. and Dittel, B.N. (2006). CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol* 176, 1402-10.
- [5] Mack, C.L., Vanderlugt-Castaneda, C.L., Neville, K.L. and Miller, S.D. (2003). Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144, 68-79.
- [6] Ponomarev, E.D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L.P. and Dittel, B.N. (2005). Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *J Immunol Methods* 300, 32-46.

- [7] Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. and Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73, 321-54.
- [8] Umezū-Goto, M. et al. (2002). Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158, 227-33.
- [9] Stracke, M.L., Krutzsch, H.C., Unsworth, E.J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E. and Liotta, L.A. (1992). Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267, 2524-9.
- [10] Ferry, G. et al. (2003). Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278, 18162-9.
- [11] Nakanaga, K., Hama, K. and Aoki, J. (2010). Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 148, 13-24.
- [12] van Meeteren, L.A. et al. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26, 5015-22.
- [13] Hammack, B.N., Fung, K.Y., Hunsucker, S.W., Duncan, M.W., Burgoon, M.P., Owens, G.P. and Gilden, D.H. (2004). Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 10, 245-60.
- [14] Liu, S., Murph, M., Panupinthu, N. and Mills, G.B. (2009). ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer. *Cell Cycle* 8, 3695-701.
- [15] Liu, S. et al. (2009). Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 15, 539-50.
- [16] Nochi, H. et al. (2008). Stimulatory role of lysophosphatidic acid in cyclooxygenase-2 induction by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in fibroblast-like synovial cells. *J Immunol* 181, 5111-9.
- [17] Ravanan, P., Harry, G.J., Awada, R., Hoareau, L., Tallet, F., Roche, R. and Lefebvre d'Hellencourt, C. (2011). Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue. *Cytokine* 53, 355-62.
- [18] Saulnier-Blache, J.S., Girard, A., Simon, M.F., Lafontan, M. and Valet, P. (2000). A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J Lipid Res* 41, 1947-51.
- [19] Harry, G.J., Bruccoleri, A. and Lefebvre d'Hellencourt, C. (2003). Differential modulation of hippocampal chemical-induced injury response by ebselen, pentoxifylline, and TNFalpha-, IL-1alpha-, and IL-6-neutralizing antibodies. *J Neurosci Res* 73, 526-36.
- [20] Harry, G.J. and Lefebvre d'Hellencourt, C. (2002) The neuroinflammatory components of the trimethyltin (TMT) model of hippocampal neurodegeneration. In *Neuroinflammation : Mechanisms and management* (P.L.Wood, ed.^eds), pp. 301-329. Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- [21] Harry, G.J., Lefebvre d'Hellencourt, C., McPherson, C.A., Funk, J.A., Aoyama, M. and Wine, R.N. (2008). Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons. *J Neurochem* 106, 281-98.
- [22] Lefebvre d'Hellencourt, C. and Harry, G.J. (2005). Molecular profiles of mRNA levels in laser capture microdissected murine hippocampal regions differentially responsive to TMT-induced cell death. *J Neurochem* 93, 206-220.
- [23] Harry, G.J., Tyler, K., d'Hellencourt, C.L., Tilson, H.A. and Maier, W.E. (2002). Morphological alterations and elevations in tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1alpha, and IL-6 in mixed glia cultures following exposure to trimethyltin: modulation by proinflammatory cytokine recombinant proteins and neutralizing antibodies. *Toxicol Appl Pharmacol* 180, 205-18.

- [24] Graeber, M.B. (2010). Changing face of microglia. *Science* 330, 783-8.
- [25] Czeh, M., Gressens, P. and Kaindl, A.M. (2011). The Yin and Yang of Microglia. *Dev Neurosci*
- [26] Zhang, H., Wang, F.W., Yao, L.L. and Hao, A.J. (2011). Microglia--friend or foe. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 869-83.
- [27] Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K. and Fukuzawa, K. (2002). Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277, 39436-42.
- [28] Fox, M.A., Colello, R.J., Macklin, W.B. and Fuss, B. (2003). Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci* 23, 507-19.
- [29] Fan, H., Zingarelli, B., Harris, V., Tempel, G.E., Halushka, P.V. and Cook, J.A. (2008). Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways. *Mol Med* 14, 422-8.
- [30] Olson, J.K. and Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-24.
- [31] Ladeby, R., Wirenfeltd, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I. and Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 196-206.
- [32] Tham, C.S., Lin, F.F., Rao, T.S., Yu, N. and Webb, M. (2003). Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *Int J Dev Neurosci* 21, 431-43.
- [33] Hoelzinger, D.B., Nakada, M., Demuth, T., Rosensteel, T., Reavie, L.B. and Berens, M.E. (2008). Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *J Neurooncol* 86, 297-309.
- [34] Moller, T., Contos, J.J., Musante, D.B., Chun, J. and Ransom, B.R. (2001). Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells. *J Biol Chem* 276, 25946-52.
- [35] Okudaira, S., Yukiura, H. and Aoki, J. (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92, 698-706.
- [36] Harry, G.J., McPherson, C.A., Wine, R.N., Atkinson, K. and Lefebvre d'Hellencourt, C. (2004). Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotox Res* 5, 623-7.
- [37] Savaskan, N.E. et al. (2007). Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci* 64, 230-43.
- [38] Kishi, Y. et al. (2006). Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281, 17492-500.
- [39] Federico, L., Pamuklar, Z., Smyth, S.S. and Morris, A.J. (2008). Therapeutic potential of autotaxin/lysophospholipase d inhibitors. *Curr Drug Targets* 9, 698-708.
- [40] Gierse, J. et al. (2010). A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 310-7.

Figure legends

Figure 1: TNF, IL-10 and ATX expression in LPS stimulated microglia.

BV2 cells were incubated for 4, 8, 16 and 24 hours in presence or not of LPS (10ng/ml or 1µg/ml). mRNA level were determined for TNF (A), IL-10 (B) and ATX (C). (D) western blot for ATX in supernatants of cells stimulated or not by LPS 1µg/ml.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 , significantly different from control values, as determined by Dunnett's t-test following a significant overall ANOVA.

Figure 2: LPA accumulation in LPS stimulated BV2

LPA accumulation were quantified after 24 h of culture in cell lysates or culture media from BV2 cells untreated or in presence of 1 µg/ml of LPS for 24 hours. Dunnett's one way ANOVA analysis is **P<0.01 compared to ctrl.

Figure 3: TMT toxicity.

Cell death induced by trimethyltin (TMT). Cells were cultured for 48 hours in the presence of various concentrations of TMT hydroxide with MTT added in the last 4 hours. The amount of formazan crystals was determined spectrometrically and data is presented as % relative to control; mean +/- SEM (n = 3).

Figure 4: Morphology of BV2 and clones with empty vector or over-expressing ATX in presence of LPS or TMT.

H&E staining of a 70 % confluence culture of BV2 or clones with empty vector or over-expressing ATX

Figure 5: LPS and high expression of ATX increased LPAR1 receptor expression.

BV2 cell, empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 4 h in the absence or presence of LPS (1 µg/ml). mRNA encoding LPAR1 were quantified by RT PCR as described in the Materials and Methods. Bars represent the mean ± S.D. (n=3). ** p<0.01, *** p<0.001, LPS treated cells significantly different from respective control, ## p<0.01, ### p<0.001, A+ ctrl and LPS treated cells significantly different from BV2 control or BV2 LPS, as determined by tuckey's following a significant overall ANOVA.

Figure 6: LPS and TMT increased ATX expression.

BV2 cell, empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 4 h in the

absence or presence of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) or TMT (5 μM or 10 μM). mRNA encoding ATX were quantified by RT PCR as described in the Materials and Methods. Bars represent the mean \pm S.D. (n=3). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, LPS or TMT treated cells significantly different from respective control values, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, A+ cells significantly different from BV2 control or BV2 LPS or BV2 TMT values, as determined by tuckey \square following a significant overall ANOVA.

Figure 7: Cytokines expression in presence of LPS or TMT.

BV2 cell, empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 4 h in the absence or presence of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) or TMT (5 μM or 10 μM). mRNA encoding TNF (A,D), IL-6 (B,E) and IL-10 (C,F), were quantified by RT PCR as described in the Materials and Methods. Bars represent the mean \pm S.D. (n=3). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, significantly different from control values, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, significantly different from BV2 ctrl or BV2 LPS or BV2 TMT values, as determined by tuckey \square following a significant overall ANOVA.

Figure 8: TNF and IL-6 proteins production in presence of LPS.

BV2 cell, empty vector (EV) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 4 h in the absence or presence of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). TNF (A) and IL-6 (B) protein level were determined by ELISA. Bars represent the mean \pm S.D. (n=3). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, significantly different from control values, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, significantly different from BV2 ctrl or BV2 LPS or BV2 TMT values, as determined by tuckey \square following a significant overall ANOVA.

Figure 9: Autotaxin and microglial activation.

Non-transfected cells (NT) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h with or without LPS. CD11b (A), CD14 (B), CD80 (C) and CD86 (F) expressions at the surface of cells were evaluated by FACS. Bars represent the mean \pm S.D. (n=3), P values were obtained using Student's t test for unpaired samples, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to respective control cells incubated in the absence of LPS. Exemple of scatter plot for CD11b, BV2 non transfected cells (D), autotoxin transfected cell in presence of LPS (1 μ g/ml) (E).

Figure 10: NFkB activation.

Non-transfected cells (NT) or autotaxin (A+) transfected cells were incubated for 24 h with or without LPS (1 μ g/ml). The supernatant (conditioned medium (CM)) from the different cell cultures were then added to RAW-Blue cell. NFkB activity is determined as described in material and methods. Data is presented as % control. *** p<0.001 significantly different from the corresponding LPS % control as determined by student t test.

Figure 11: TNF and ATX expression in TMT treated mice.

mRNA levels of TNFa (A) and ATX (B) in the hippocampus were determined at 6, 12, 24, 72, 120 and 192 hours post-injection of TMT (2.0 mg/kg body wt, i.p.). Data are represented as the mean percent of control \pm SEM (n=3-9). * p < 0.05, ** p<0,01 significant difference from control, as determined by tuckey's following a significant overall ANOVA.

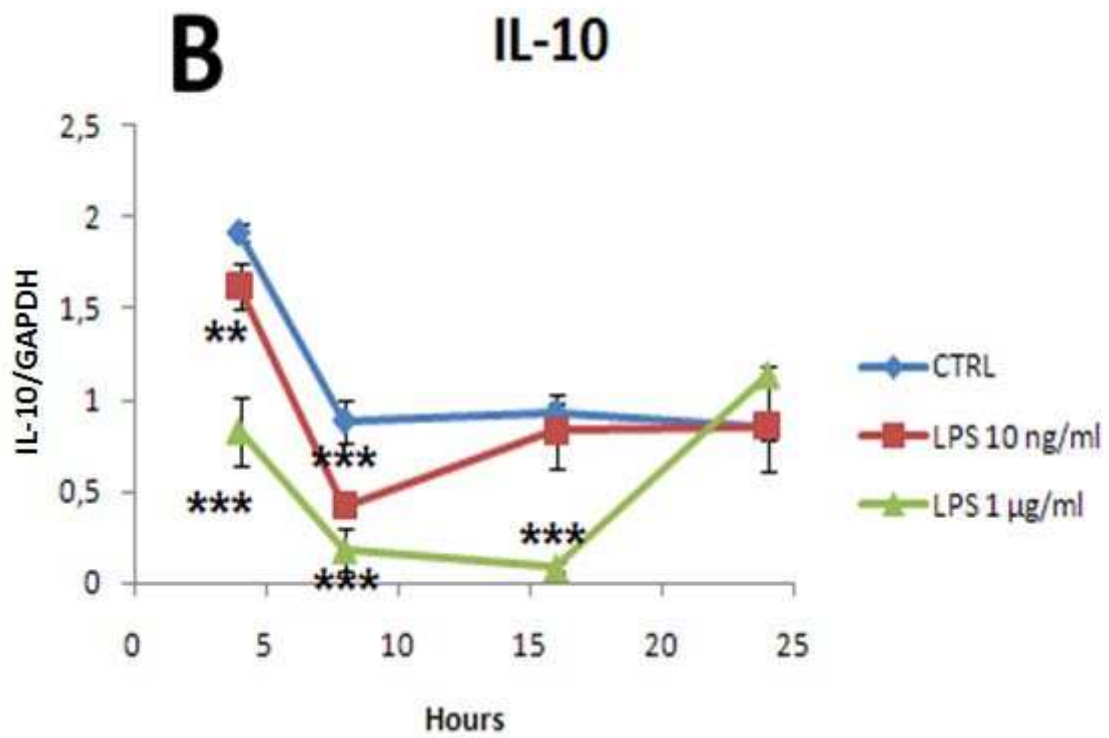
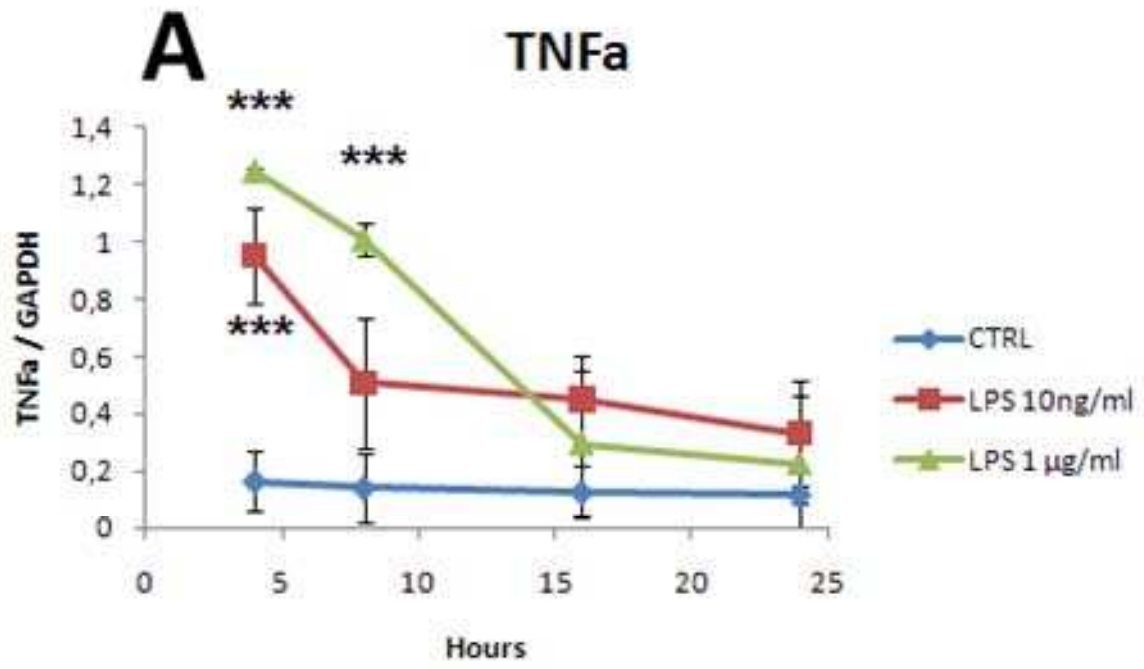
Table 1

Primers and probes for Real-Time Q-RT-PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer	ref
------	----------------	----------------	-----

GAPDH	5' TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5' GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	[17]
ATX	5' GACCCTAAAGCCATTATTGCTAA-3'	5' GGGGAAGGTGCTGTTTCATGT-3'	[12]
TNF α	5' TGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3'	5' GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGAAG-3'	[17]
IL-6	5' CAGAATTGCCATCGTACAACCTTTTCTCA-3'	5' AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	[17]
IL-10	5' ACCTCCTCCACTGCCTTGCT-3'	5' GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'	

Fig 1



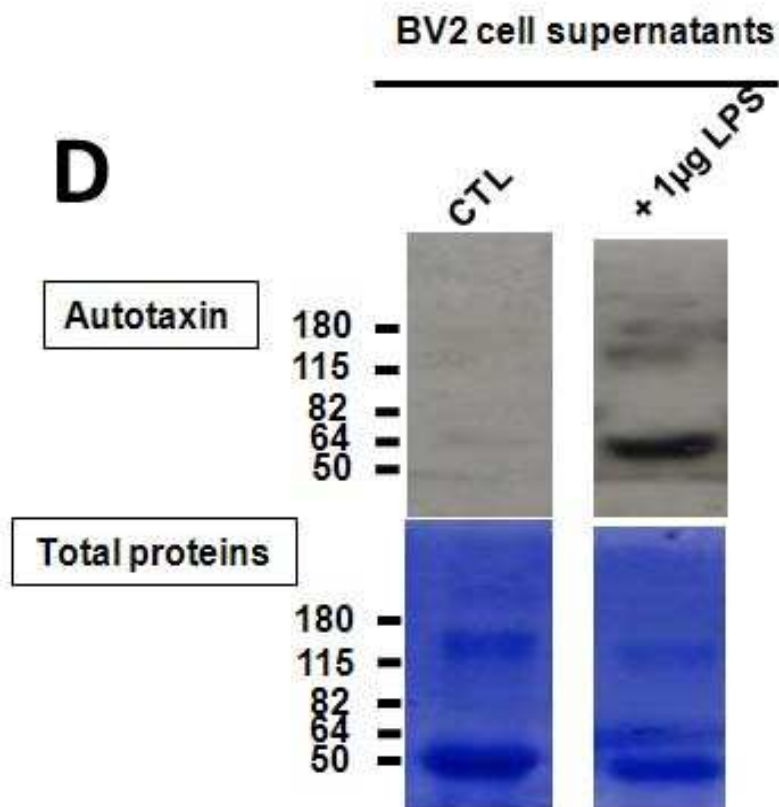
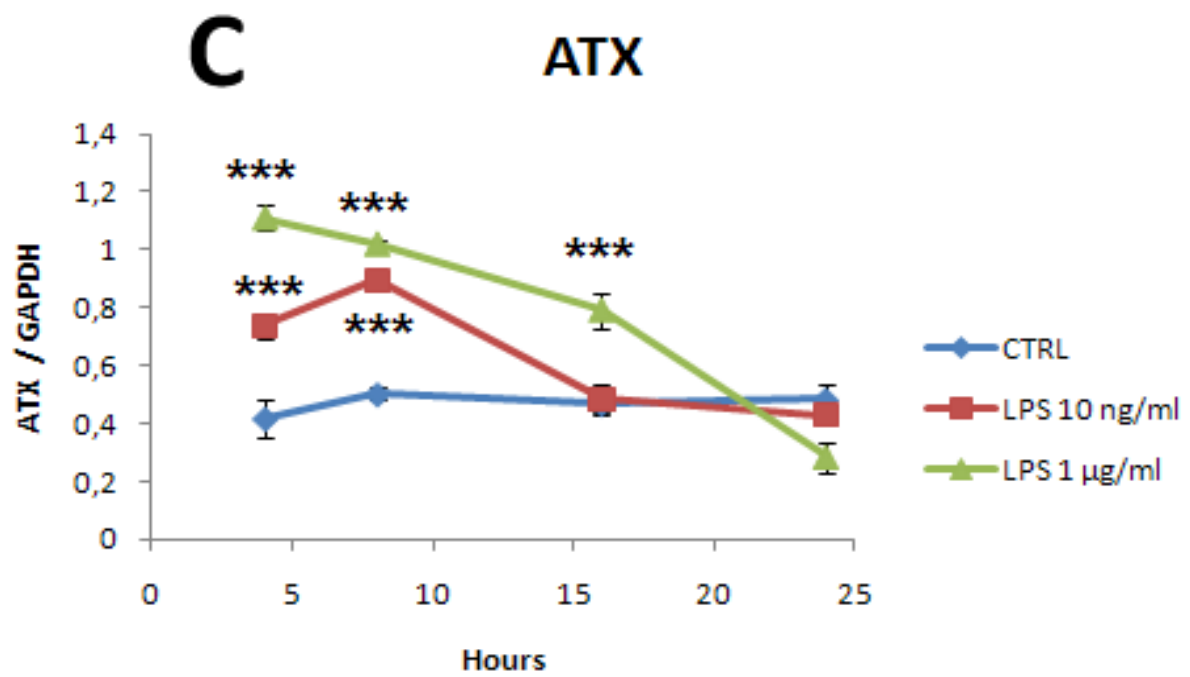


Fig 2

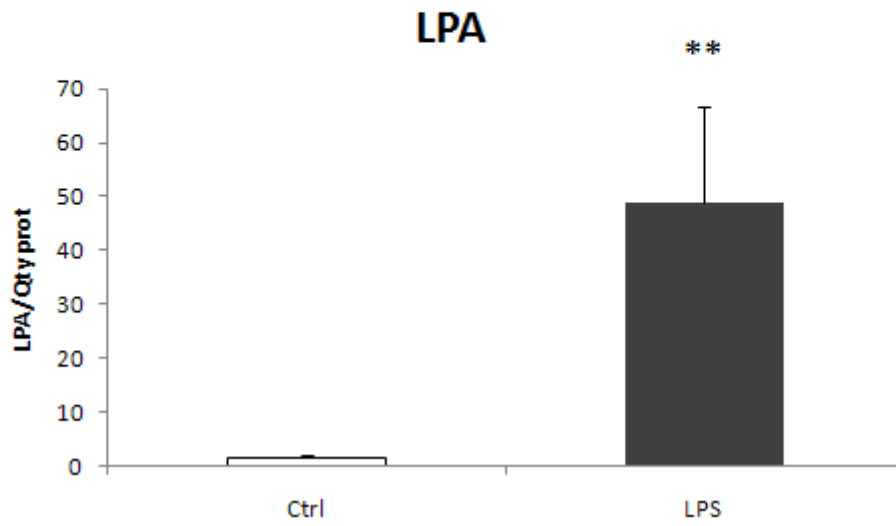


Fig 3

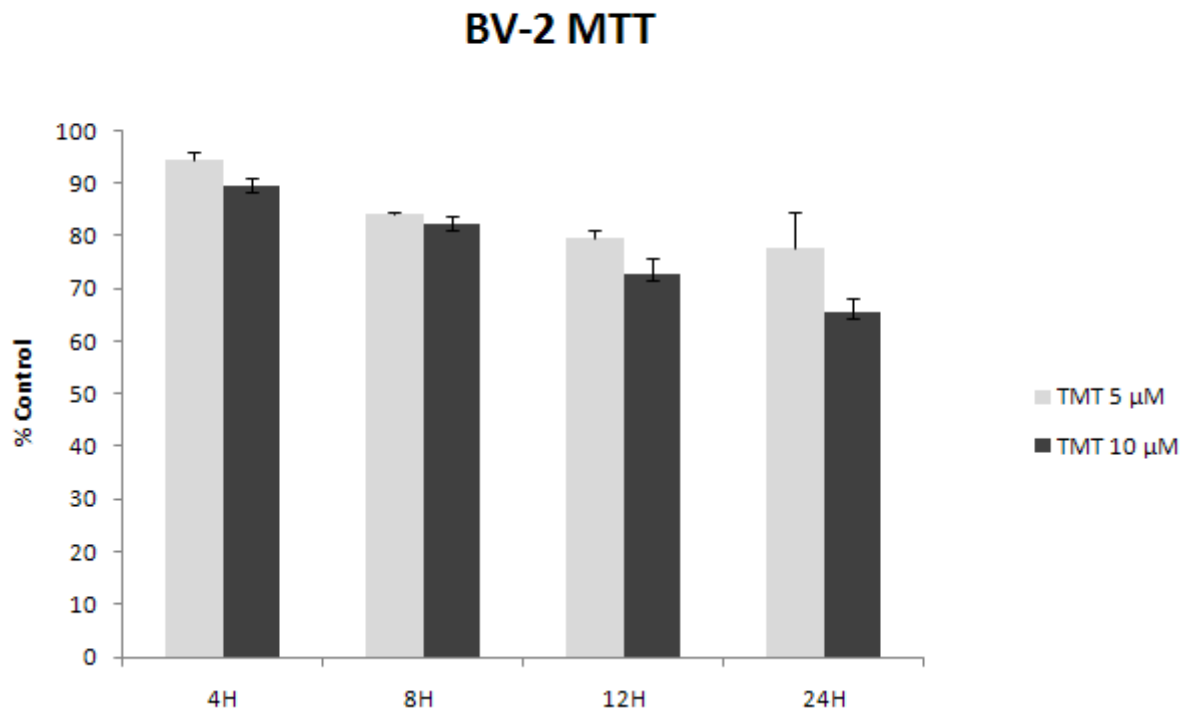


Fig 4

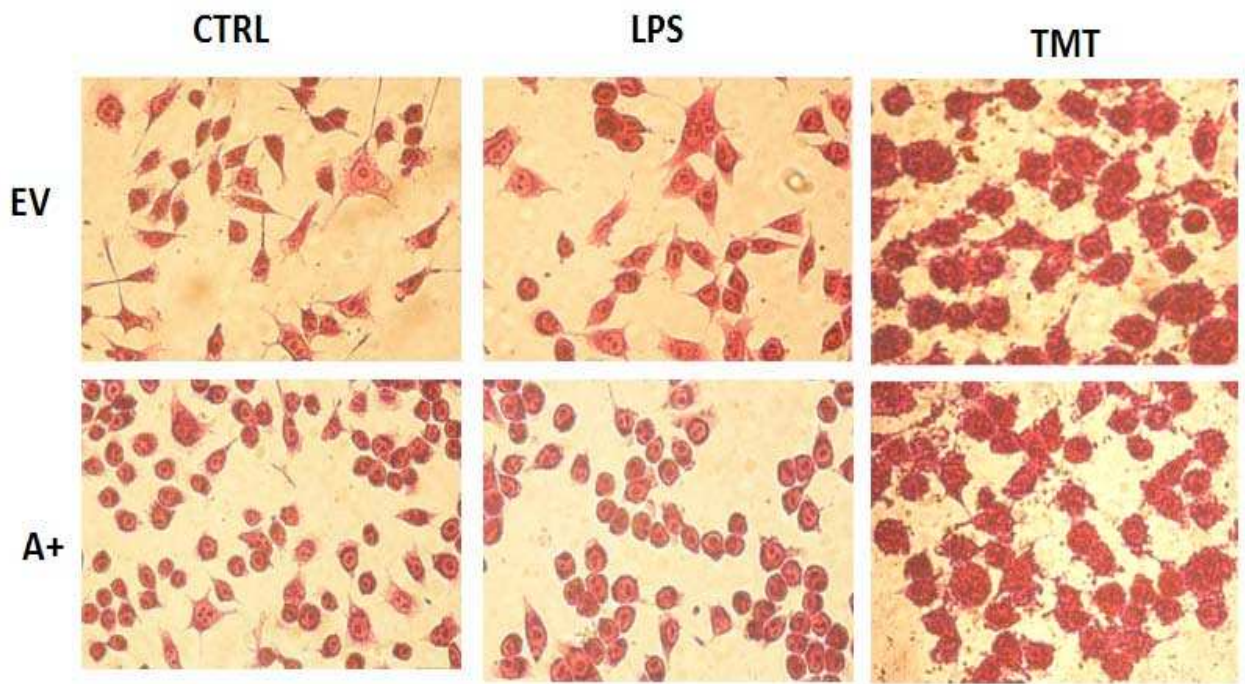


Fig 5

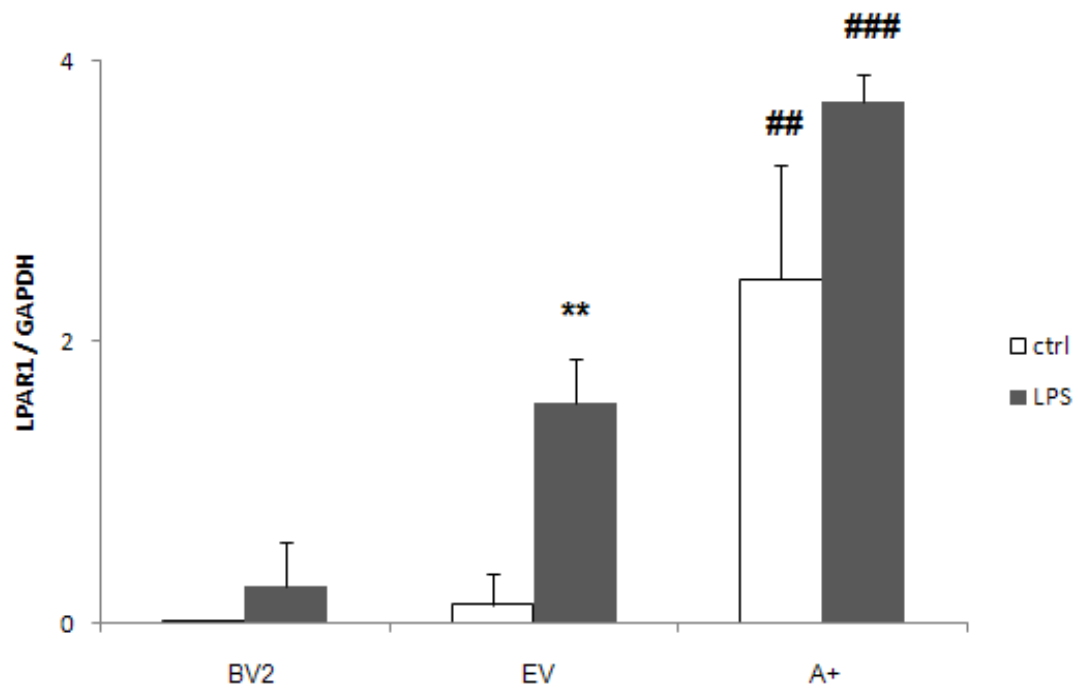


Fig 6

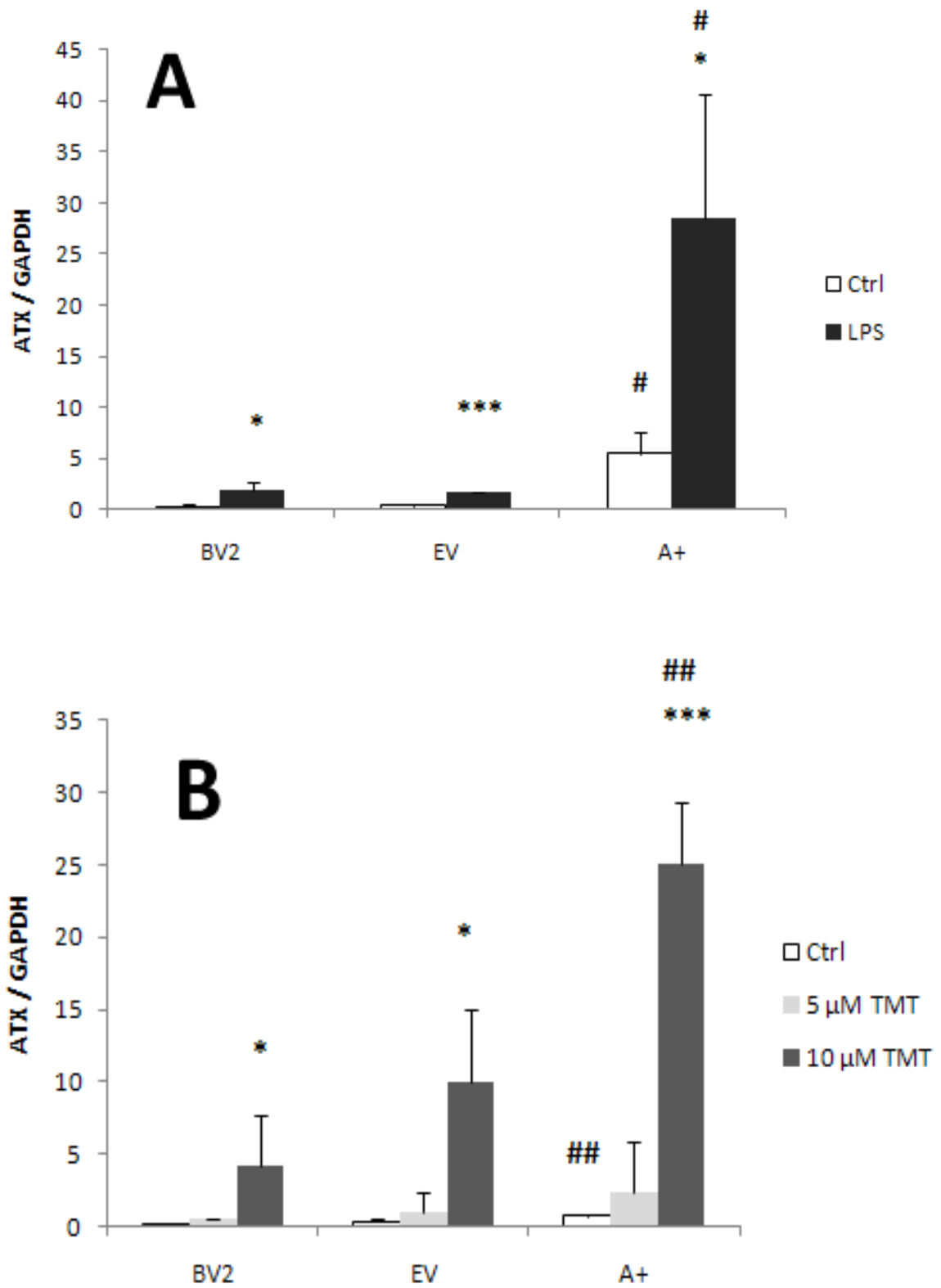
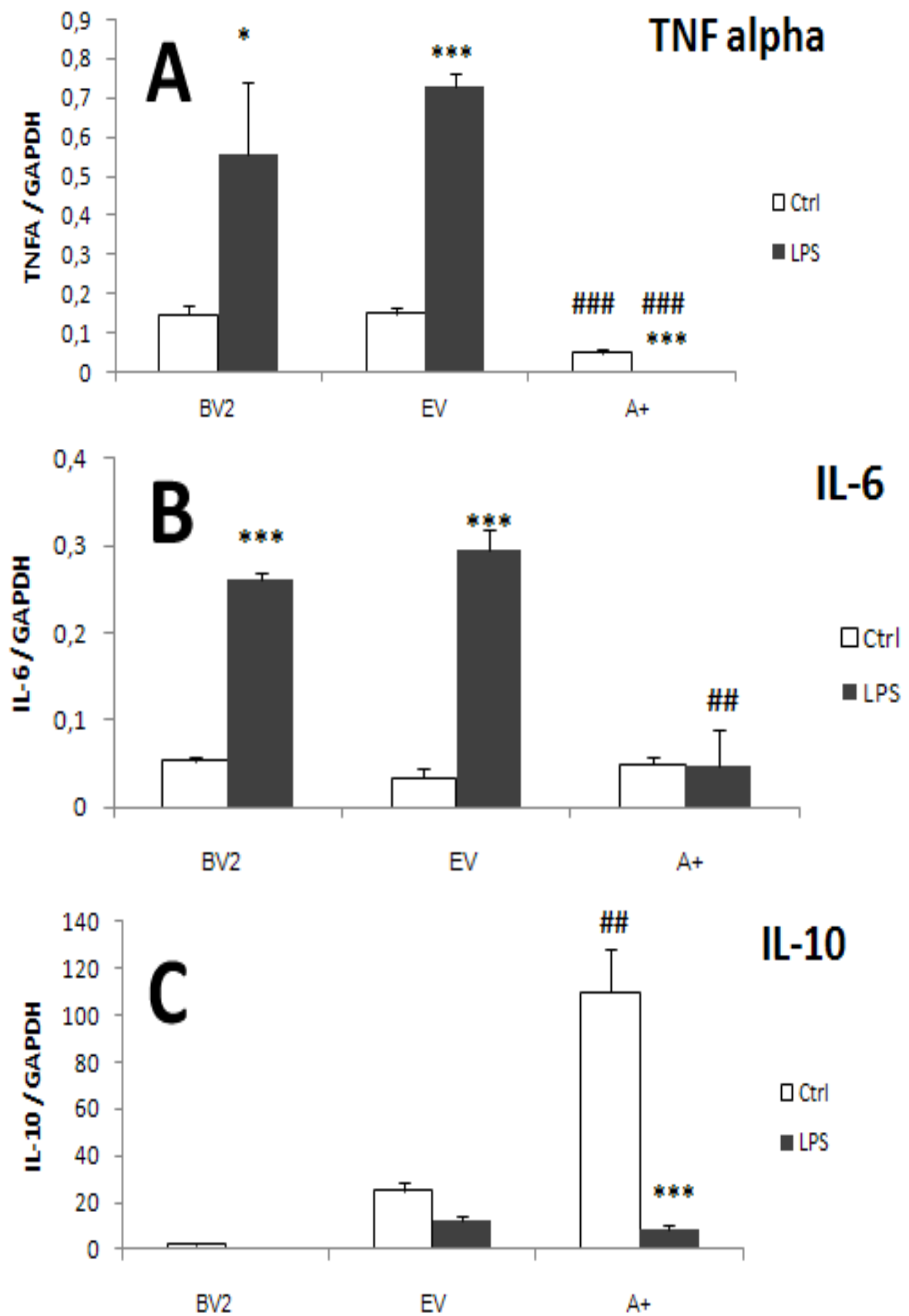


Fig 7



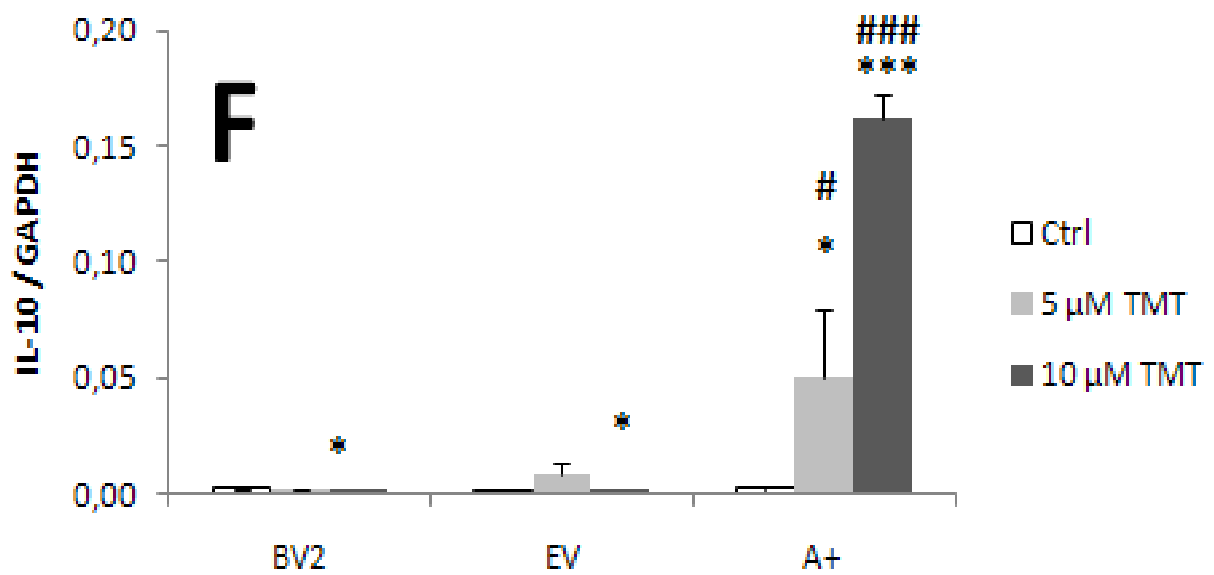
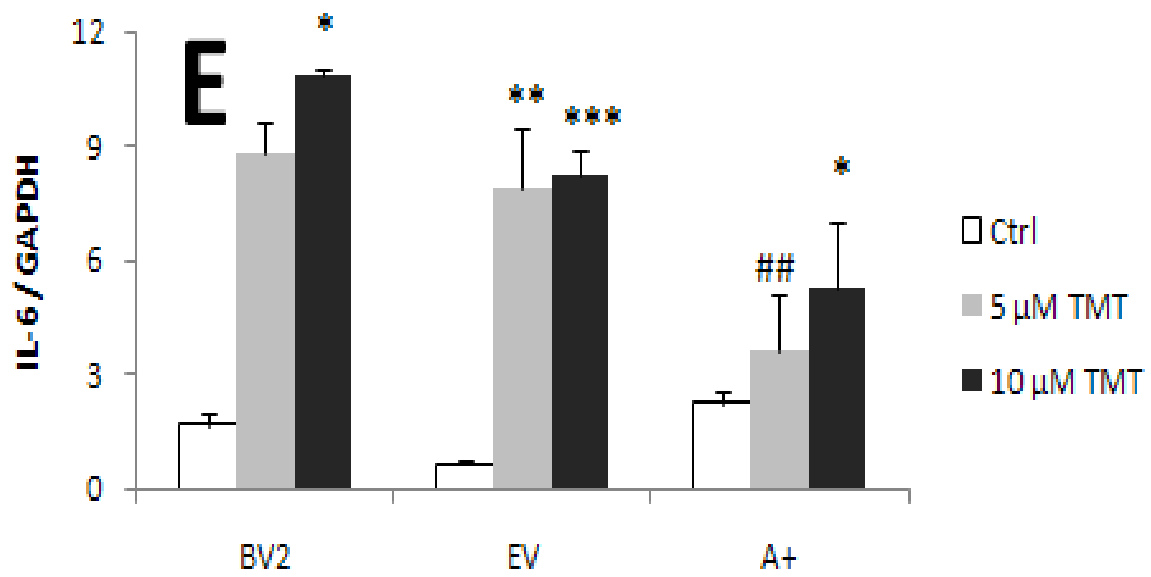
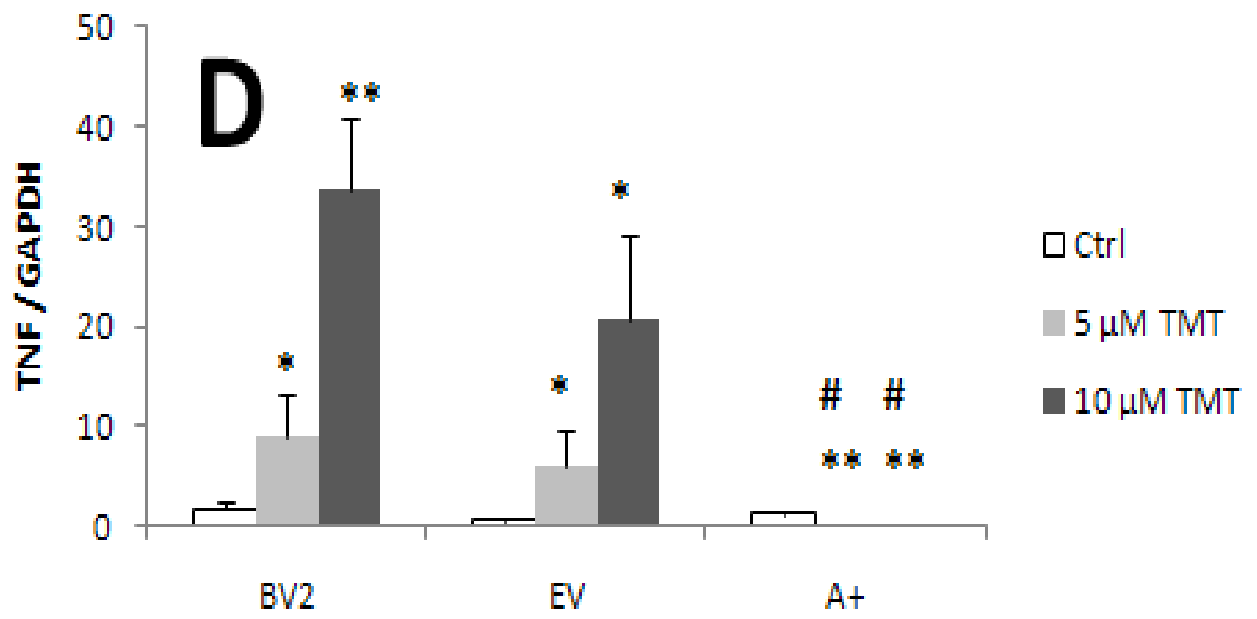


Fig 8

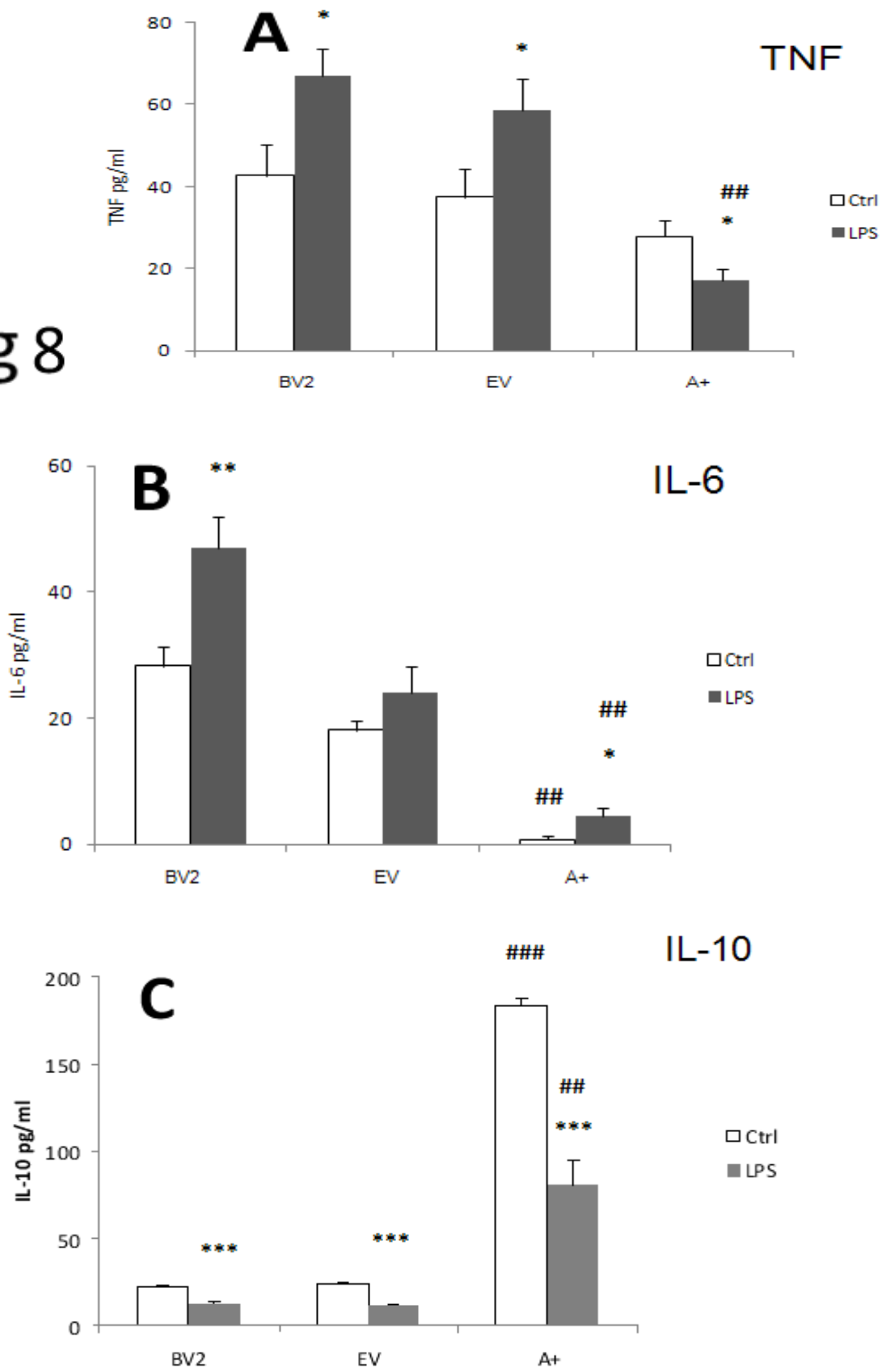
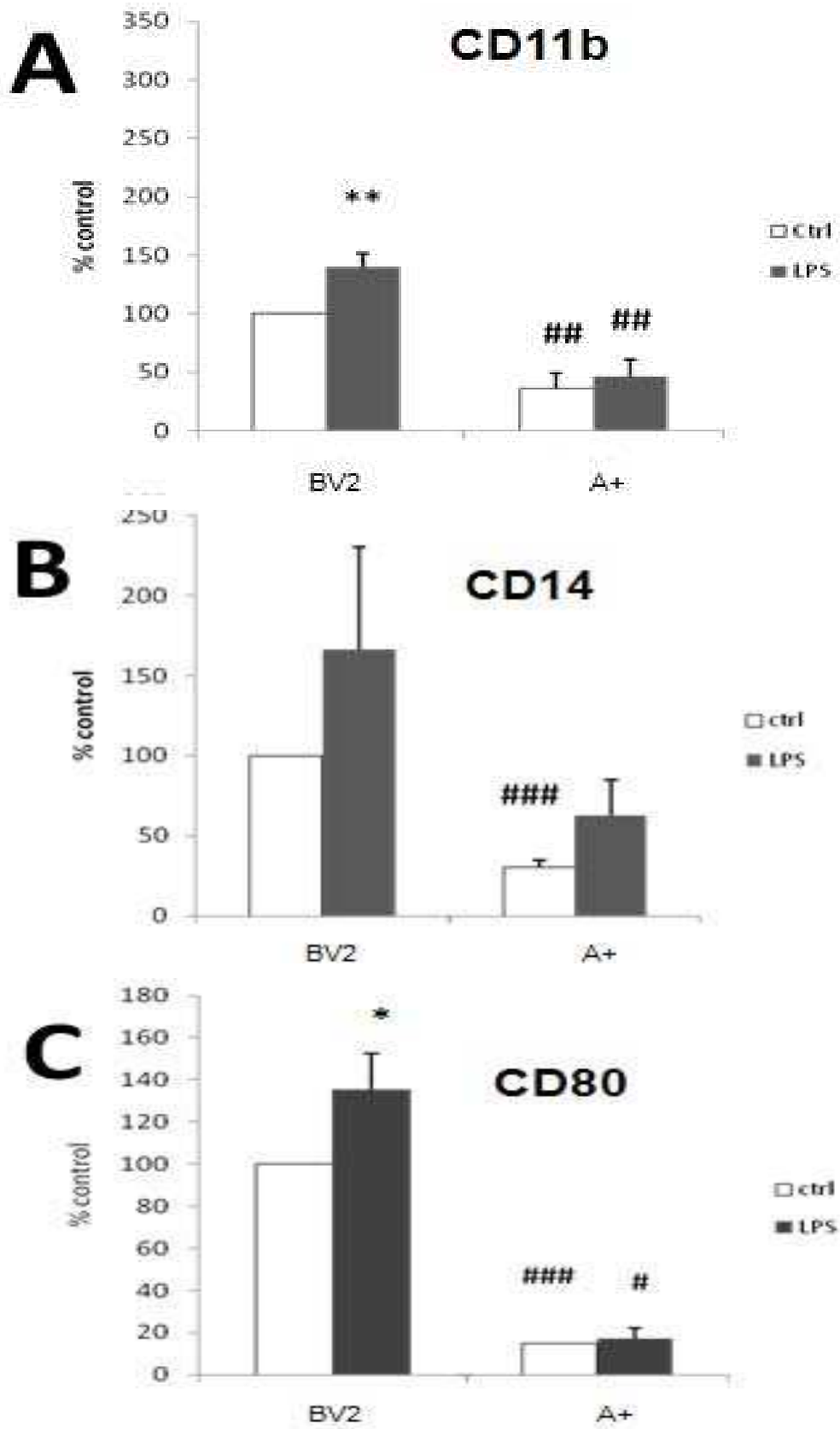


Fig 9



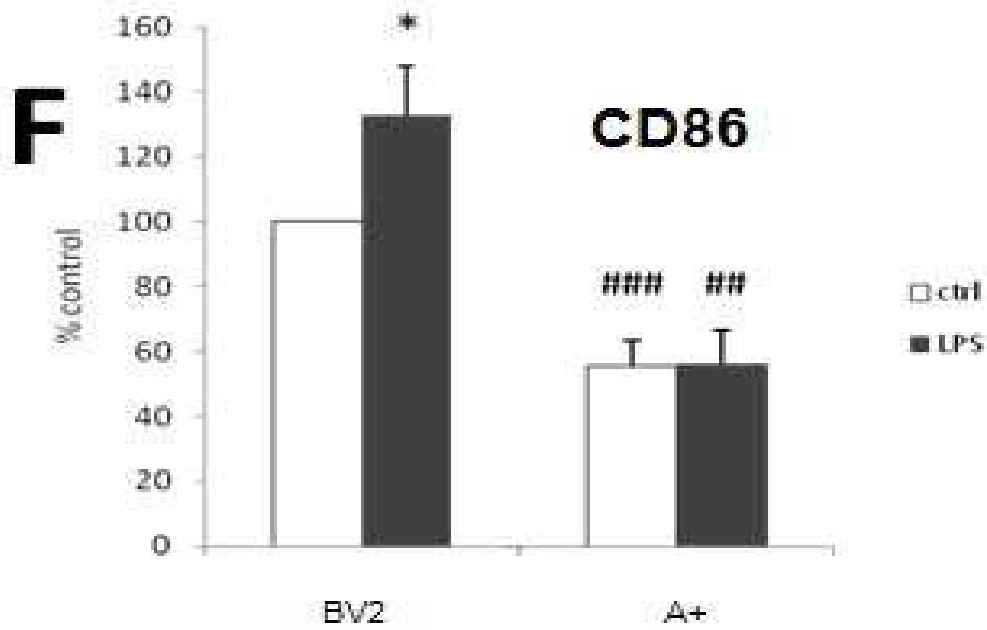
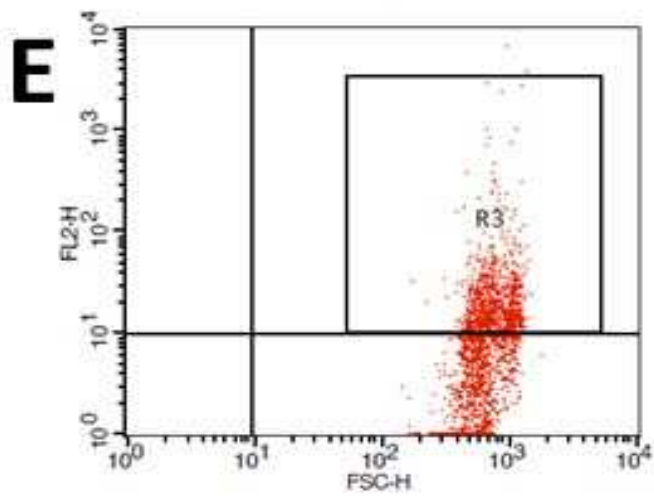
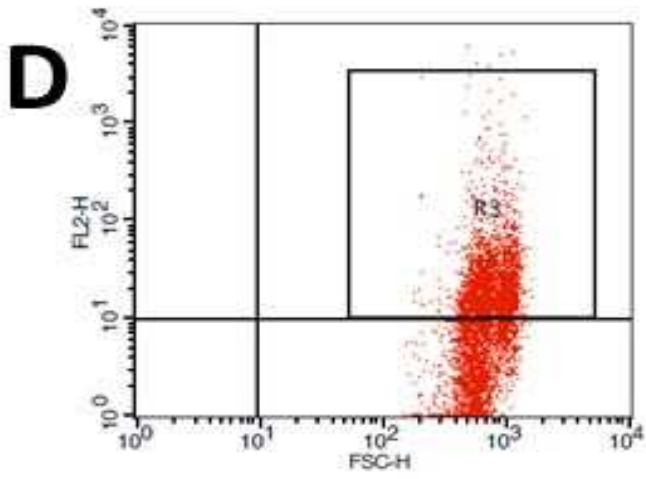


Fig 10

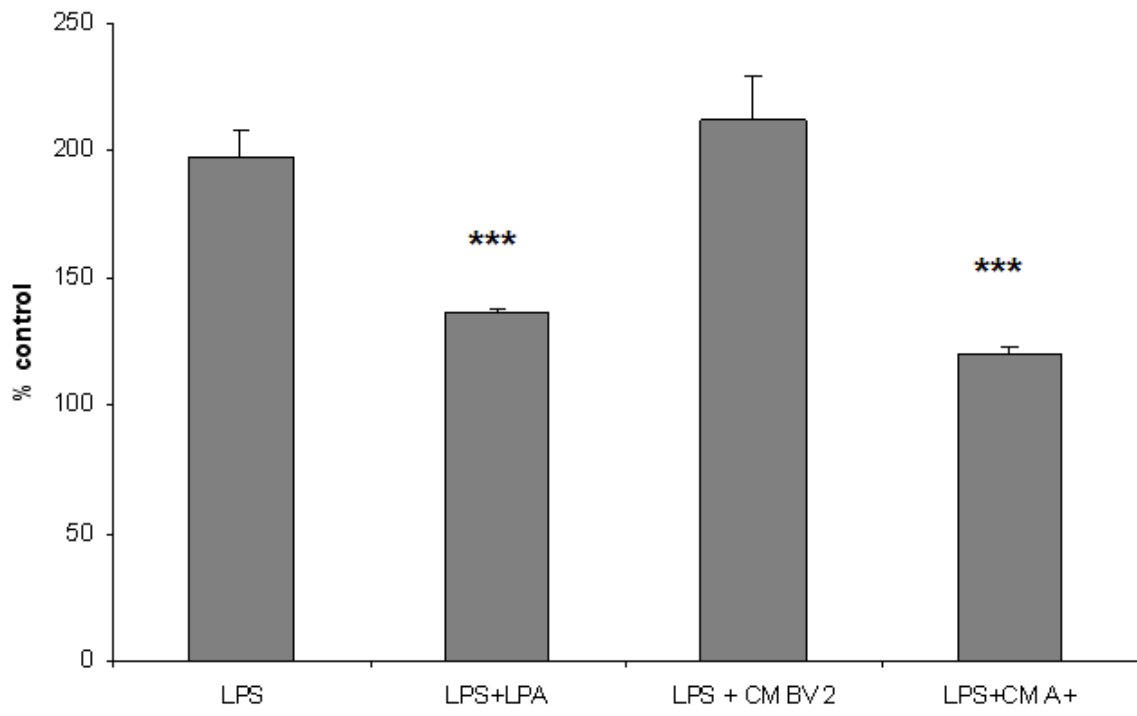
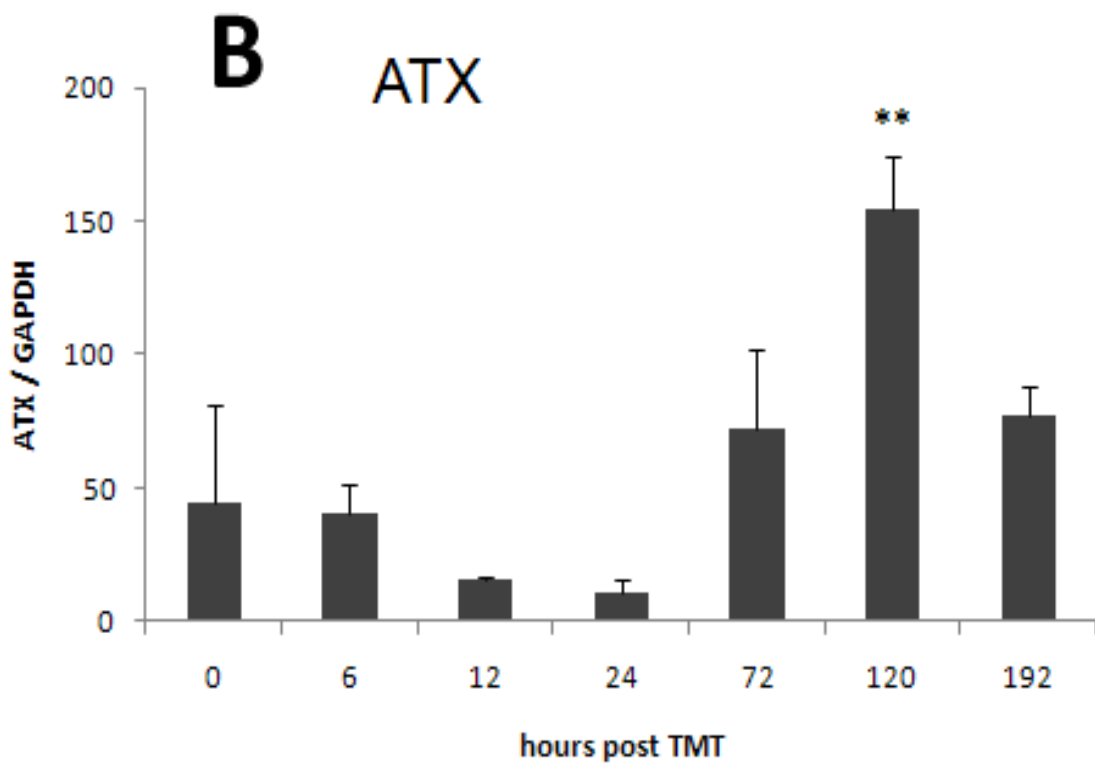
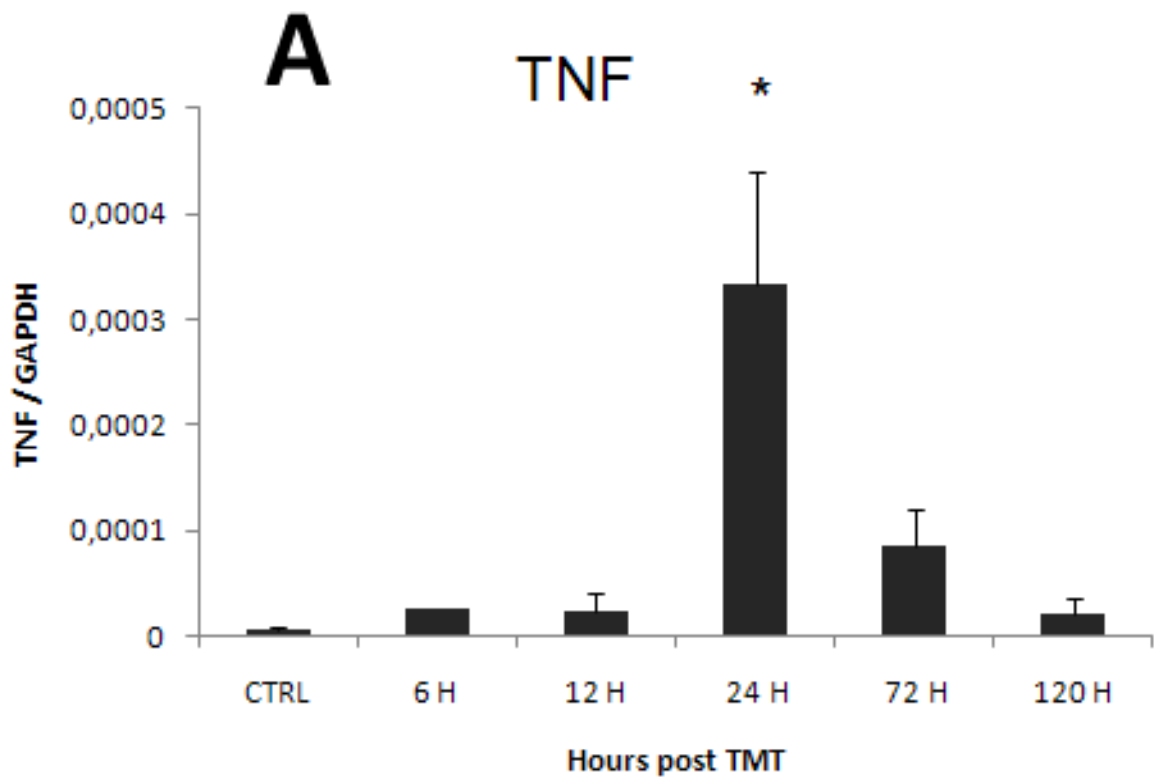


Fig 11



II.1. **Méthodologie** (Fig. M.2) :

- Culture cellulaire de la lignée microgliale BV₂
- Transfection stable des cellules BV₂ avec un vecteur témoin vide pCDNA3 ou contenant l'ADNc de l'ATX-m
- Stimulation des cellules avec du LPS (Lipopolysaccharide) à 10 ng/mL et 1 µg/mL et avec du TMT (Triméthyltin) à 5 µM et 10 µM pendant 4 heures
- Stimulation des cellules avec du LPA à 1 µM et du Ki₁₆₄₂₅ à 20 µM, un antagoniste du récepteur LPA₁
- Etude de l'expression ARNm et protéines des cytokines TNFα, IL-6 et IL-10 ainsi que de l'ATX par Q RT-PCR, ELISA ou Western blot
- Etude de la production de LPA par un test radioenzymatique
- Etude de cytotoxicité induite par le LPS et le TMT par coloration hématoxyline-éosine ou MTT
- Analyse de l'expression des récepteurs membranaires CD11b, CD14, CD80 et CD86 par cytométrie en flux
- Mesure l'activité NF-KB par un spectrophotomètre en utilisant de la PNPP (4-nitrophényl-phosphate) et de la culture cellulaire de RAW-Blue
- Etude cinétique par Q RT-PCR de l'expression ARNm de TNFα et de l'ATX dans l'hippocampe de souris CD1 traitées avec du TMT (2mg/kg bwt)

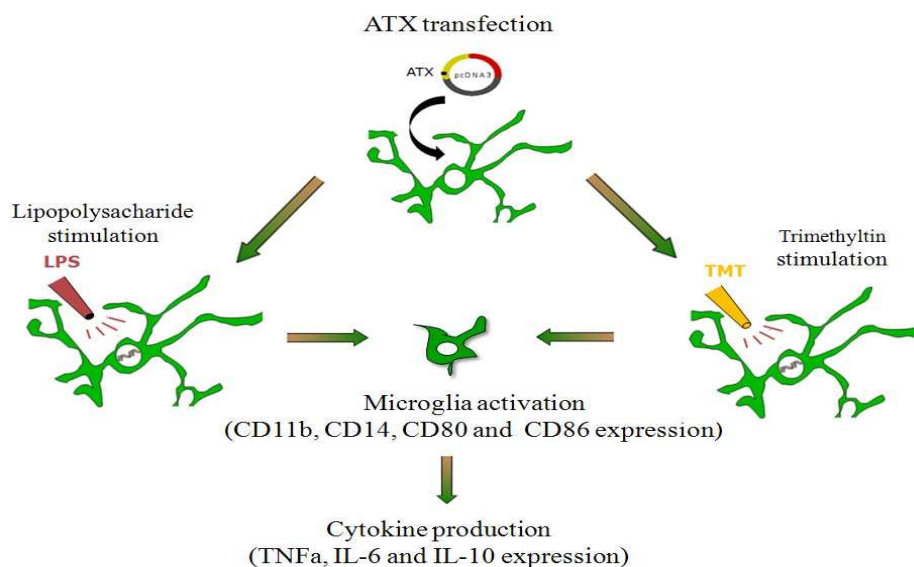


Figure M.2 : Méthodologie

II.2. Principaux résultats :

- le LPS et le TMT augmentent l'expression de l'ATX dans les cellules microgliales
- la surexpression d'ATX augmente l'expression d'ARNm de LPAR1, récepteur au LPA
- la surexpression d'ATX bloque l'induction de CD11b, CD14, CD80 et CD86 induite par le LPS à la surface des microglies
- la surexpression d'ATX diminue l'expression d'ARNm et des protéines de $TNF\alpha$, IL-6 et augmente l'expression d'IL-10 dans les cellules traitées avec du LPS
- l'ATX inhibe l'activation NF-kB induit par LPS
- l'expression de l'ATX en ARNm dans l'hippocampe de CD1 atteint son maximum après 5 jours de traitement avec du TMT.

II.3. Discussion :

Dans cette étude, nous avons regardé le rôle de l'ATX dans les interactions entre l'inflammation et les cellules microgliales du SNC.

Le SNC a longtemps été considéré comme un « site immunitaire privilégié » en raison de son isolement de la circulation périphérique par la BHE. Cependant, de nombreux arguments indiquent que, même à l'état physiologique, cette séparation est loin d'être absolue et que des éléments cellulaires constitutifs du SNC, ont la capacité d'initier une réaction d'ordre immunologique conduisant au processus de neuroinflammation.

La discipline fait une distinction fondamentale entre la neuroinflammation aiguë et la neuroinflammation chronique. La neuroinflammation aiguë comprend la réponse immédiate et précoce de cellules gliales, notamment de la microglie, à l'agression. Il s'agit avant tout d'une réaction défensive qui malgré tout prépare la réparation. La neuroinflammation chronique persiste lorsque le facteur déclenchant ou la stimulation persiste. Le concept est plus adapté dans le contexte de la compréhension des pathologies cérébrales qui impliquent un certain degré de chronicité.

La microglie, le macrophage résident du SNC, est la principale cellule effectrice de la réponse immunitaire à la suite des traumatismes du SNC. Par son immunocompétence et son activité phagocytaire, la microglie sert de sentinelle à la suite d'infection, de lésions, d'ischémie et de processus de neurodégénérescence [282]. Elle est impliquée dans l'élimination des débris cellulaires après un traumatisme et peut, en outre, produire des cytokines proinflammatoires et

plusieurs facteurs neurotrophiques [398]. Plusieurs données dans la littérature suggèrent un rôle bénéfique des microglies suite à une dégénérescence du SNC [398].

L'autotaxine est une lysophospholipase D sécrétée responsable de la synthèse de l'acide lysophosphatidique (LPA). L'ATX, par l'intermédiaire du LPA et du récepteur LPA1 présent à la surface de cellules microgliales [399, 400], pourrait participer à plusieurs activités physiologiques. Le rôle de l'ATX dans l'inflammation est controversé.

D'une part, l'augmentation ATX et/ou LPA a été signalée dans des situations inflammatoires, y compris l'arthrite rhumatoïde humaine (RA) [16], la sclérose en plaques [154] et les maladies des glandes mammaires inflammatoires [401, 402] et d'autre part, le LPA inhibe l'inflammation induite par le LPS dans les macrophages en suggérant des propriétés anti-inflammatoires chez la souris [403]. Toutefois, l'expression de l'ATX dans le SNC par des cellules microgliales soumises à une inflammation n'a jamais été étudiée.

Ici, nous avons utilisé deux stimuli de l'inflammation avec différentes voies de signalisation : le lipopolysaccharide (LPS) et le triméthylétain (TMT).

Le LPS stimule l'activité transcriptionnelle des gènes inflammatoires dans les cellules microgliales du parenchyme cérébral [404]. En effet, le LPS entraîne une forte augmentation de l'expression des récepteurs transmembranaires CD14 et TLR4 à la surface de ces cellules. Ces récepteurs forment un complexe avec le LPS et la protéine My88 qui amorce la signalisation NF- κ B et la transcription de gènes pro-inflammatoire dont le TNF α . [307].

Par contre, il n'y a pas de récepteur connu pour la signalisation du TMT, cependant, il a été démontré qu'il induit une réponse inflammatoire au niveau du SNC et provoque une lésion très localisée dans l'hippocampe de la souris. Les microglies et le TNF α sont impliqués dans les lésions induites par le TMT [405, 406] et nous avons regardé l'implication de l'ATX après une injection *i.p.* de TMT chez les souris CD1.

D'abord nous avons stimulé les cellules microgliales par le LPS avec deux concentrations différentes et nous avons regardé l'effet du LPS sur la sécrétion de TNF α , d'IL10 et d'ATX au cours du temps. Nous avons observé que le LPS augmente l'expression de TNF α et d'ATX et diminue l'expression d'IL10 (Fig 1A, B, C, D). Il augmente aussi la production du LPA (Fig.2). Nous avons observé aussi que le LPA induit un effet protecteur de l'ATX dans les cellules microgliales en diminuant l'expression d'ARNm de TNF α induite par le LPS et que le Ki16425 semble bloquer cet effet protecteur en augmentant l'expression de TNF α , sans que ces résultats atteignent une différence significative (fig.R.II.1).

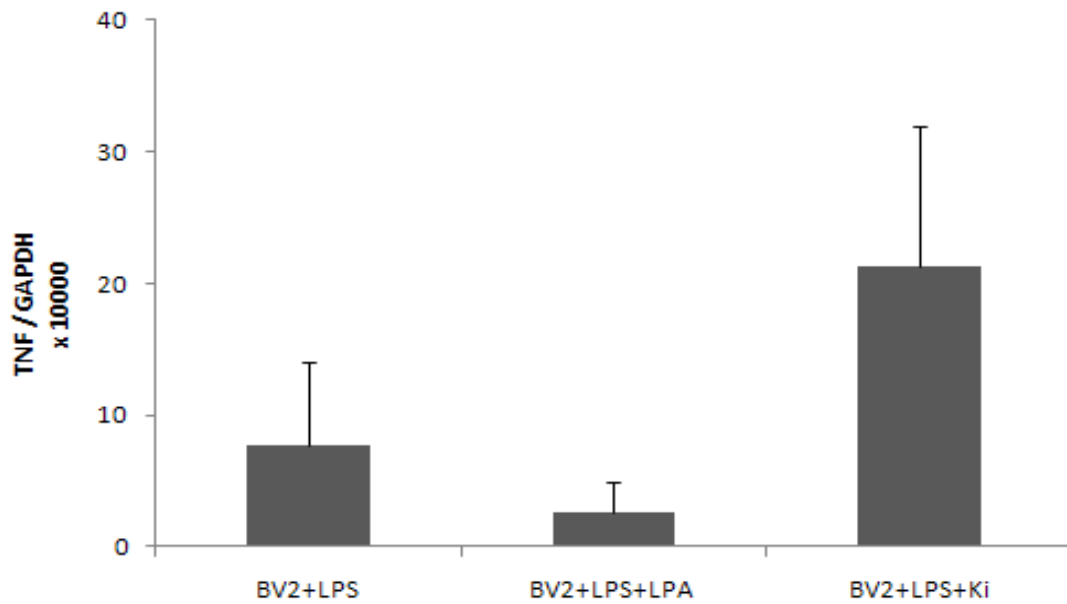


Figure R.II.1 : Effet de LPA et Ki16425 sur l'expression de TNF α

Nous avons ensuite transfecté les cellules microgliales avec un vecteur exprimant l'ATX. Les niveaux de l'expression d'ARNm et protéique de l'ATX ainsi que de la production de LPA a été contrôlé (Awada et al soumis).

Nous avons confirmé que les microglies expriment LPA1 et nous avons démontré que la surexpression de l'ATX augmente l'expression de ce récepteur (fig. 5) ce qui suggère que le LPA soit responsable de la plupart des effets biologiques engendrés par l'ATX *via* l'activation de récepteurs couplés aux protéines G [407].

Avec ces cellules, nous avons observé une augmentation significative de la production ATX après stimulation par le LPS ou TMT (Fig 6).

Nos données sont compatibles avec des travaux antérieurs montrant une augmentation de l'ATX dans le cerveau à la suite des traumatismes [408].

Nous avons observé aussi que l'ATX empêche l'activation des microglies et leur sécrétion pro-inflammatoire en diminuant l'expression d'ARNm et protéique de TNF α , en présence de LPS ou TMT dans les cellules surexprimant l'ATX (Fig 7A et 8A). Par contre le niveau d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, a été élevé dans ces cellules (Fig 7 F).

L'inhibition de NFκB pourrait être partiellement responsable de l'inhibition des cytokines inflammatoires, comme le montre l'effet de milieu conditionné de cellules surexprimant l'ATX. L'effet de ce milieu conditionné a été similaire à l'effet LPA en présence de LPS (Fig. 10). L'effet de ce milieu conditionné a également été étudié dans les cellules transfectées ou non en absence de LPS (Fig. R.II.2).

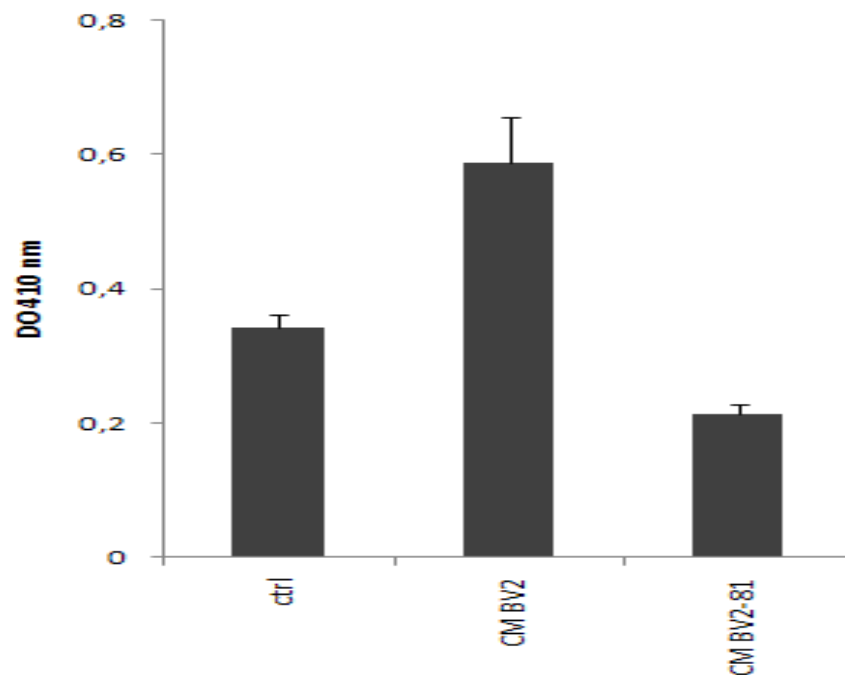


Figure R.II.2 : Effet de l'ATX sur l'activation NF-κB

Des marqueurs différents ont été utilisés pour suivre l'activation microgliale. CD11b, CD14 sont des marqueurs d'activation bien connus pour la microglie. B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) sont des molécules de costimulation de la famille des glycoprotéines et nous avons constaté que l'expression de ces molécules a été diminuée dans les cellules surexprimant l'ATX (Fig.9 A, B, C, D, E, F). Ce qui indique une régulation non seulement de l'immunité innée de la microglie, mais aussi de leurs fonctions immunitaires adaptatives.

In vivo, Nous avons observé que le TMT n'induit l'expression d'ATX dans l'hippocampe qu'après 5 jours d'exposition (Fig.11B). L'origine de l'ATX n'est pas déterminée dans notre modèle *in vivo*. *In vitro*, nous avons montré que la microglie peut produire l'ATX lorsqu'elle est stimulée avec le TMT, mais cela n'exclut pas que d'autres cellules pourraient produire l'ATX *in vivo*. D'autres études ont montré une expression forte de l'ATX dans les cellules tumorales du cerveau [409], les oligodendrocytes, les astrocytes [215].

II.4. Conclusions :

Avec ces résultats nous montrons, pour la première fois, un rôle anti-inflammatoire de l'autotaxine dans les microglies soumises à une inflammation.

En résumé, nous avons montré que le LPS ou le TMT induit la production de l'ATX par la microglie et que la surexpression de l'autotaxine inhibe l'inflammation induite par le LPS en inhibant l'activation NF-kB et en diminuant l'expression de TNF α et d'IL-6. L'ATX bloque aussi l'induction de CD11b, CD14, B7.1 et B7.2 induite par le LPS à la surface des microglies. *In vivo*, dans un modèle de neurodégénérescence induite par un neurotoxique, le triméthylétain, nous avons montré que l'ATX est produit cinq jours après le traitement.

Enfin, Nos résultats sont concordants avec les travaux de Fan *et al.*, (2008) sur les macrophages. Ce qui suggère un rôle bénéfique de l'ATX dans le système nerveux central, en protégeant les cellules microgliale contre l'inflammation. Cela pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour l'ATX.

Article 3

Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue stress

Ravanan P, Harry J, Awada R, Hoareau L, Tallet F, Roche R, Lefebvre d'Hellencourt C





Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue

Palaniyandi Ravanan^{a,1}, G. Jean Harry^b, Rana Awada^a, Laurence Hoareau^a, Frank Tallet^c, Régis Roche^a, Christian Lefebvre d'Hellencourt^{a,*}

^a Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Groupe d'Etude de l'Inflammation Chronique et de l'Obésité (GEICO), Université de La Réunion, Faculté des Sciences, 15 avenue R. Cassin and Plateforme CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, France

^b Neurotoxicology Group, Laboratory of Molecular Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Dept. of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC, USA

^c Laboratoire de Biochimie UF4130, Centre Hospitalier Régional Félix Guyon, La Réunion, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2009

Received in revised form 13 August 2010

Accepted 19 November 2010

Available online 30 December 2010

Keywords:

White adipose tissue

Adipocytes

Adipokines

Inflammation

Trimethyltin

ABSTRACT

Objective: White adipose tissue (WAT) is now considered a defined tissue capable of interactions with other organ systems. WAT role in elevating the level of systemic chronic inflammation suggests that alterations in this tissue as the result of disease or environmental factors may influence the development and progression of various obesity-related pathologies. This study investigated WAT cell-specific responses to an organometal compound, trimethyltin (TMT), to determine possible contribution to induced inflammation.

Methods: Human primary mature adipocytes and macrophage differentiated THP-1 cells were cultured in TMT presence and relative toxicities and different adipokine levels were determined. The inflammatory response was examined in TMT presence for primary cells from obese ob/ob mice WAT, and after TMT injection in ob/ob mice.

Results: Both adipocytes and macrophages were resistant to cell death induced by TMT. However, adipocytes cultured in TMT presence showed increased expression of TNF α and IL-6, and modified leptin levels. In macrophage cultures, TMT also increased TNF α and IL-6, while MCP-1 and MIP-1 α were decreased. *In vivo*, a single injection of TMT in ob/ob mice, elevated TNF α , MIP-1 α and adiponectin in WAT.

Conclusions: Elevation of the inflammatory related products can be induced by chemical exposure in adipocytes and macrophages, as well as murine WAT. These data suggest that numerous factors, including a systemic chemical exposure, can induce an inflammatory response from the WAT. Furthermore, when characterizing both chemical-induced toxicity and the progression of the chronic inflammation associated with elevated WAT content, such responses in this target tissue should be taken into consideration.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

White adipose tissue (WAT) has long been considered be able to store energy in the form of lipids. It is now well established that the physiological activity of WAT is greater than initially thought, with involvement in cross talk with other systems, such as the immune and central nervous systems. Adipocytes produce a variety of factors including inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin (IL)-6, as well as factors more specific to adipocytes, i.e., adipokines, such as leptin or

adiponectin [1]. Leptin is involved in food intake regulation, acting as a negative regulator of appetite control via the hypothalamus [2,3]. Within the brain, specific hypothalamic nuclei involved in homeostasis regulation express high levels of the leptin receptor. In response to food intake, serum levels of leptin become elevated and activation of receptors on the hypothalamic nuclei signal satiety to the body. Leptin receptor expression in the brain is not limited to the hypothalamus and may be involved with other nervous system functions. Additional target functions of the leptin receptor include reproduction, hematopoiesis, HPA-axis endocrinology, and angiogenesis [4]. *In vitro* studies have demonstrated that leptin induces the production of inflammatory cytokines [5] and, *in vivo*, leptin levels are elevated under inflammatory conditions. Adiponectin, an adipokine that may play a role in insulin resistance, is also involved in inflammation. However, adiponectin has been proposed to be classified as an anti-inflammatory factor based upon its inhibitory actions on the production of inflammatory cytokines by

* Corresponding author. Tel.: +33 262 262 938201; fax: +33 262 262 938237.

E-mail address: Christian.Lefebvre-d-Hellencourt@univ-reunion.fr (C. Lefebvre d'Hellencourt).

¹ Present address: Apoptosis and Cell Death Laboratory, Centre for BioMedical Research, School of Biosciences and Technology, Vellore Institute of Technology University, Vellore, Tamilnadu, India.

stimulated macrophages and the induction of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [6–8]. From these observations, the development and evolution of an inflammatory response in fat tissue could be a direct effect of the composition and induction of cytokines and adipokines in the WAT and may contribute to various disease states with chronic inflammation. The production of inflammatory factors increases proportionally with the accumulation of WAT and can contribute to a state of chronic systemic inflammation. Under these conditions, any additional endogenous or exogenous factor that modifies the WAT becomes critically important, possibly changing the overall homeostasis and contributing to an underlying pathological condition. WAT was also shown to accumulate toxic compounds, increasing the overall risk in obese subjects of adverse effects from endogenous environmental factors that could significantly contribute to a change in fat equilibrium. For example, it has been suggested that exposure to dioxin could affect adipose tissue and increase the development of type 2 diabetes [9]. With the exception of dioxin, very little is known about the capacity of environmental compounds to modulate the production of inflammatory factors by WAT. One would suspect that any lipid soluble chemical accumulating within WAT could produce a similar response; however, it is not known if any such effect would require accumulation within the fat or only an effect upon the inflammatory response of cells comprising the fat. We chose to study this direct aspect using a heavy metal compound known for its specific effects on the nervous system and limited involvement of the systemic immune system. Trimethyltin (TMT) is a tin derivative of limited use as a plastic stabilizer. Either experimental or accidental/occupational exposure is known to induce specific damage to the limbic system and pronounced hippocampal neurodegeneration [10,11]. In both *in vivo* and *in vitro* experimental models, TMT demonstrated direct effects on various cells of the nervous system [12,13]. The importance of the inflammatory response to the resulting damage has been demonstrated [12,14,15]; TNF α has been proposed as the primary pro-inflammatory cytokine involved in this type of neurodegeneration [13,14,16]. While TMT distributes throughout the body, including the fat tissue, it has not been demonstrated to accumulate within lipid-rich tissue [17,18]; thus, any effect that it might have upon fat tissue, regarding induction of an inflammatory response, could be related to an acute effect upon specific cells within the tissue.

Examination of the inflammatory response in adipocytes, macrophage cell lines, and *in vivo* WAT demonstrated that TMT could induce the production of inflammatory factors by WAT. This suggests that WAT may serve as a source of inflammatory factors that could potentially exacerbate other adverse health outcomes.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

M199, RPMI, DMEM, Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin, streptomycin, and amphotericin B were purchased from PAN Biotech (Aidenbach, Germany). Lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* strain K-235) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Collagenase (NB4) was purchased from SERVA (Germany). Insulin was purchased from Umuline Rapid (Lilly, France). Trimethyltin hydroxide (TMT) was obtained originally from Alpha Products (Danvers, MA).

2.2. Cell culture

2.2.1. Human cell lines

THP-1 (monocytic cell), Jurkat (T cell) and Kelly (neuron) were grown in RPMI with 10% FBS. SW872 (adipocytes) cells were

grown in DMEM with 10% FBS and differentiated after 4 days post-confluence, as previously described [19]. The THP-1 monocytic cells were differentiated into macrophages by the addition of PMA (10 nM) for 24 h. The cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ incubator for a period of 24 h prior to TMT treatment. TMT was administered when the media was refreshed.

2.3. Preparation of mature adipocytes from human tissue

Subcutaneous white fat tissue were obtained from normal-weight or slightly overweight human female subjects (without prescribed medication other than oral contraception) undergoing cosmetic liposuction, performed under general anesthesia. White adipose tissues were digested with 1.5 mg/ml collagenase in the presence of Ringer-Lactate buffer at 37 °C/30 min under constant agitation. The digested tissue was centrifuged for 1 min at 200g and the floating, mature adipocytes were collected and rinsed twice with Ringer-Lactated buffer. Mature adipocytes were resuspended in M199 supplemented with 10% FBS, pen/strep, amphotericin B, 2 g/L glucose, 66 nM insulin, and 0.1 μ g/ml transferrin and plated (30,000 cells/well) in 24-well tissue culture plates. Cells used for leptin determination were plated in media supplemented with 4 g/l of glucose.

For each individual patient sample, mature adipocytes were isolated from white adipose tissue as described above. The basal level of adipokines mRNA expression was determined at each time point for cells obtained from individual patients. Elevations following *in vitro* exposure to TMT were determined and data analyzed on the basis of % of basal control levels on an individual patient basis.

2.4. Cytotoxicity

Cytotoxicity was estimated by the MTT assay as previously described [20]. Briefly, cells were cultured for 48 h in the presence of TMT at different concentrations (0, 2.5, 5, 10, 25, 50, or 100 μ M). In the last 4 h of TMT exposure, 5 mg/ml of MTT was added to each well. At the 48-h time point, media was removed and the formazan crystals formed during the previous 4 h were dissolved in DMSO and quantified spectrophotometrically at 570 nm using an ELISA reader.

2.5. ELISA

Mature human adipocytes and differentiated THP-1 cells were plated in 24- and 96-well plates at a density of 30,000 and 12,000 cells/well, respectively. Twenty-four hours later, the media was changed, and new media containing a final concentration of 10 μ M TMT was added. The culture media was collected and stored at –20 °C until assayed. Samples were assayed for TNF α , IL-6, and leptin protein content with a protein specific ELISA kit, according to the manufacturer's protocol. Human TNF α and IL-6 ELISA kit were purchased from eBioscience (Cliniscience, France), and human leptin ELISA kits were purchased from Cayman (USA).

2.6. Collection of WAT from *ob/ob* mice

Ten-week-old male *ob/ob* mice (B6.V-Lep^{ob}/Lep^{ob}) were purchased from Jackson laboratory (Bar Harbour, ME, USA). These mice are deficient for the leptin gene, and by 10 weeks of age the mice are physically obese, with fat tissue accounting for approximately 50% of the total body mass. Mice were housed in a dual-barrier animal facility at a constant temperature (21 \pm 2 °C) and humidity (50 \pm 5%) on a 12-h light/dark cycle. Food (NIH 31) and de-ionized water were available *ad libitum*. According to our previous studies we choose a dose of 2.6 mg/kg bwt, i.p. [14,15]. Mice were randomly assigned to experimental groups

and administered a single dose of either TMT hydroxide (2.6 mg/kg bwt, i.p.) or saline vehicle in a dosing volume of 2 ml/kg body weight. Less than 10% mortality has been observed after TMT treatment. Twenty-four hours post-TMT injection, the animals were euthanized with CO₂ and the subcutaneous fat tissues was collected, flash-frozen and stored at –80 °C. All experiments were conducted in compliance with an animal protocol approved by the NIEHS/NIH Animal Care and Use Committee.

2.7. Preparation of stromal vascular fraction (SVF) and mature adipocytes from ob/ob tissue

SVF and mature adipocytes were prepared as previously described [21]. Briefly ob/ob subcutaneous fat tissues were washed in Hanks balanced salt solution (HBSS) with antibiotics. Tissues were digested with 1 mg/ml collagenase at 37 °C/30 min and filtered through a sterile 350 µm nylon mesh. Following a 1 min centrifugation at 500g the pelleted stromal vascular fraction was separated from the floating mature adipocytes fraction.

2.8. RNA extraction, RT reaction and Real-time quantitative PCR

Total RNA from the human and mouse mature adipocytes and mouse SVF were isolated with TRIzol™ (Invitrogen, France). From the brain of each ob/ob mouse, the hippocampus was quickly dissected and immediately frozen on dry ice. Total RNA was isolated with Trizol™ reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Two micrograms of total RNA was reverse-transcribed (RT) using Random hexamer primers (Eurogentec, Belgium) with Superscript™ II (Invitrogen). One microliter of RT product (1/20 dilution) was used for Real-time PCR (ABI Prism thermal 7000 cycler; Applied Biosystems, France) and Taqman™ or SYBR green™ master mixes (Eurogentec, Belgium) were used for the PCR reaction. Primer and probe sequences are listed in Table 1. RNA amounts were calculated with relative standard curves for each mRNA of interest and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Normalization to GAPDH was conducted to account for variability in quality and concentration of total RNA, and RT efficiency. The results were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software.

2.9. Statistical analysis

Data was analyzed by either a Student's *t*-test for two group comparisons (ELISA) or by an ANOVA followed by a Dunnett's *t*-test

for comparisons of multiple doses or times (JMP™, SAS Institute Inc., Cary, NC). Statistical significance was set at *p* < 0.05. Data are expressed as mean ± SEM.

3. Results

3.1. Toxicity and viability of human adipocytes and macrophages

TMT can have direct effects on individual cells in culture and the toxicity varies between individual cell types, with neurons and lymphocytes showing greater susceptibility than fibroblasts [22,23]. To determine the relative toxicity of TMT to differentiated THP-1 (macrophages) and SW872 (adipocytes), Jurkat (lymphocytes) and the Kelly (neurons) human cell lines were examined for comparison. Cell viability was determined using the MTT assay, within a 48-h exposure, a 5-µM dose level of TMT produces approximately 50% cell death in both lymphocytes and neurons. The cell viability continued to decline with increasing dose concentrations, resulting in approximately 75% cell death at 50 and 100 µM concentrations. Mature human adipocytes and THP-1 cells displayed less susceptibility and a concentration of 100 µM resulted in approximately 25% cell death (Fig. 1). Similar viabilities were observed 24 h post-TMT treatment, as determined by the MTT assay and trypan blue counting; therefore, 10 µM TMT was used for subsequent studies to ensure adequate cell viability.

3.2. Stannin mRNA levels

Toxicity of TMT has been related to the expression of the pro-tein stannin [24]. The constitutive level of stannin in THP-1 macrophages, Kelly, Jurkat, and SW872 cells displayed average CT values of 24 ± 0.4. The relative stannin mRNA level in Kelly cells was significantly lower than in SW872, but no other statistically significant differences were seen across the various cell lines (Fig. 2A). With exposure of differentiated THP-1 cells to TMT (10 µM), mRNA levels for stannin were significantly elevated by 8 h and remained elevated at 24 h (Fig. 2B). A similar level of induction was noted for mature adipocytes (data not shown). The functions of stannin are not fully known; however, a recent study proposed that stannin served as a sensor of mitochondrial damage and contributed to the cross talk between mitochondrial and nuclear compartments [24].

Table 1
Primers and probes for Real-Time Q-RT-PCR.

Human gene	Forward	Reverse	Detection
Stannin	TCCTTCGTATCACTGCAGAA	TAGCACAGTCCGTTTGAAGA	Sybrgreen
IL-6	TCACCTCTCAGAACGAATTGACA	AGTGCCTCTTTGCTGTTTACAC	FAM-TACATCCTCGACGGCATCTCAGCCC-TAMRA
Leptin	GTGGGCTGCATCTGGGATT	TACCCCTCTGCCCTCTCTGAA	FAM-TTGTCCTCTTGACCCATCTCCC-TAMRA
TNF α	AACATCCAACCTTCCAAACG	GACCCTAAGCCCCAATTCTC	FAM-CCCCCTCTTTCAGACACCTCAACC-TAMRA
MIP-1 a	TGCCACATCAAGGAGTATTCTAC	GCACACACTTGGCGGTTCT	Sybrgreen
MCP-1	GCTGTGATCTTCAAGACCATGTG	TGGAATCCTGAACCCACTCTG	Sybrgreen
Adiponectin	TCAGTTGGTGCATGGTAGAGAAGAAAGCC	ATGCTGTGCTGGGAGCTGTCTACTGC	FAM-CCAACTCCATCTCTAAGTGCCGAACCTATC-TAMRA
COX-2	TGGCCCTCGCTTATGATCTG	CCCAGGGCTCAAACATGATG	FAM-TTGCCAGCACTTCACGCATCAGTT-TAMRA
18s	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CAITCTTGGCAAATGCTTTC	FAM-ACCGCGCCAAAGACGGACCAGA-TAMRA
Mice gene			
Stannin	CGGGGCCGCGACAT	TCTTTGGTGAAAGCTCTTGGT	Sybrgreen
IL-6	CAGAATTGCCATCGTACAACCTTTTCTCA	AAAGTGCATCATCGTTGTTTACATA	Sybrgreen
Leptin	GCATTTACAGGGCACATTAGCAT	TTTCTTATTTTTACGACCCAGGTA	Sybrgreen
TNFα	TGGCTCCCTCTCATCAGTT	GCTTGTCACTCGAATTTTGAAGAAG	Sybrgreen
MIP-1α	ACATTCCTGCCACCTGCATAG	GAAAGTCCCTCGATGTGGCT	Sybrgreen
MCP-1	CCACTCACCTGCTGCTACTCAT	TGGTGTCTCTTGTAGCTCTCC	Sybrgreen
Adiponectin	TCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAAG	CAGCTCTGTCTTCCAACATC	Sybrgreen
COX-2	TTTGTGAGTCAITCACCAGACAGAT	CAGTATGAGGAGAACAGATGGGATT	Sybrgreen
GAPDH	TTACCACCATGGAGAAGGC	GCCATGGACTGTGGTCATGA	Sybrgreen

Taqman probe correspond to 5'FAM-primer-TAMRA 3'.

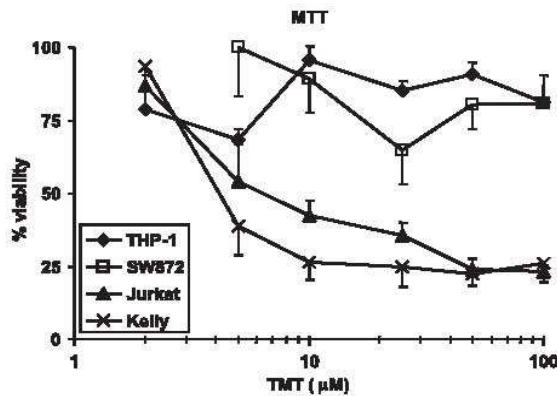


Fig. 1. Cell death induced by trimethyltin (TMT). Cells were cultured for 48 h in the presence of various concentrations of TMT hydroxide with MTT added in the last 4 h. The amount of formazan crystals was determined spectrometrically and data is presented as % relative to control; mean \pm SEM ($n = 4$).

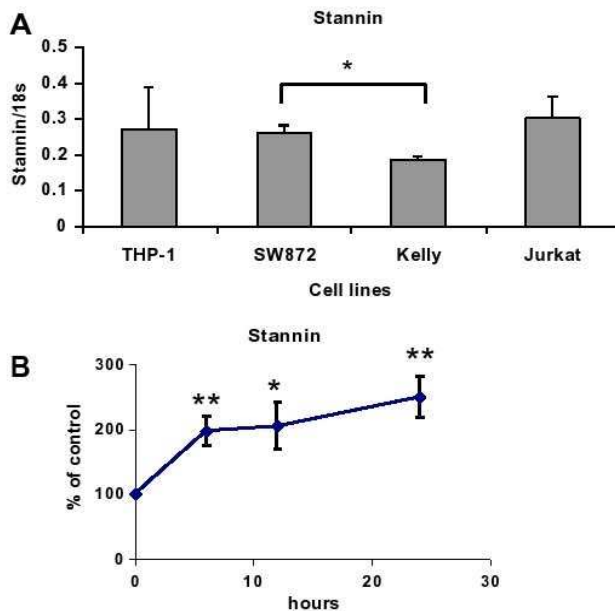


Fig. 2. Stannin mRNA expression. (A) Relative constitutive expression of stannin mRNA in THP-1, SW872, Kelly, and Jurkat cells as determined by q-RT-PCR and normalized to 18S RNA. Data represents the mean \pm SEM ($n = 3-6$). (B) mRNA levels for stannin in differentiated THP-1 cells. Cells were incubated in the presence of 10 μ M TMT for 6, 12, and 24 h and mRNA levels were determined by Q-RT-PCR. Data is presented as a percent of control with control values set at 100 and represents the mean \pm SEM of three different experiments. * $p < 0.05$, significantly different from control values, as determined by Dunnett's t -test following a significant overall ANOVA.

3.3. Production of inflammatory products by human macrophages and adipocytes

In order to study the inflammatory response of macrophages and adipocytes, we determined mRNA levels of inflammation-related genes produced by these cells. These included the two inflammatory cytokines, TNF α and IL-6; the chemokines, macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1), that are involved in recruiting peripheral immune cells to the site of inflammation; and

cyclooxygenase-2 (COX-2), an inflammatory-induced enzyme. For adipocytes, mRNA levels for leptin were determined.

3.4. Increased production of inflammatory cytokines and chemokines in differentiated THP-1 cells

Under normal conditions, mRNA levels of TNF α , IL-6, MIP-1 α , MCP-1, and COX-2 could be detected in differentiated THP-1 cells with CT values between 18 and 29. Differentiated THP-1 cells (macrophages) exposed to 10 μ M TMT, showed a significant increase in mRNA levels for TNF α at 6 h, returning to control levels by 24 h (Fig. 3A). This elevation in mRNA levels for TNF α translated into an elevation in protein levels (300 \pm 40% of control level) at 24 h. mRNA levels for IL-6 were significantly elevated at 24 h (Fig. 3B). mRNA levels for the chemokine MCP-1 were significantly decreased at 6–24 h (Fig. 3C) and levels for MIP-1 α showed a transient decrease at 6 h, returning to control levels at 24 h (Fig. 3D). COX-2 mRNA levels showed a slight increase over time; however, no statistically significant elevations over control levels were evident (Fig. 3E). Undifferentiated THP-1 cells (monocyte phenotype) showed no stimulation of TNF α with TMT exposure.

3.5. Adipokine production by human mature adipocytes

In cultured, mature, human adipocytes, the mRNA levels of adipokines may vary over time, however these changes did not reach statistical significance (data not shown). The untreated cells mRNA levels coefficient of variability range from 58% (IL-6) to 150% (COX-2). Exposure to 10 μ M TMT resulted in elevated mRNA levels for inflammatory factors. mRNA levels for TNF α showed a gradual increase, reaching statistical significance at 12 h post-TMT and returning to control levels at 24 h (Fig. 4A). mRNA levels for MCP-1 (Fig. 4C), MIP-1 α (Fig. 4D), and COX-2 (Fig. 4E) followed a similar pattern but failed to reach statistical significance at the 12-h time point. mRNA levels for IL-6 were significantly elevated by 12 h post-TMT treatment, increasing at 24 h, and returning to control levels at 48 h (Fig. 4B). mRNA levels for leptin showed a unique pattern; they significantly decreased at 3 h post-TMT, returned to control levels between 6 and 24 h, and again significantly increased at 48 h (Fig. 4F).

Under normal culture conditions, mature human adipocytes release a detectable level of leptin and IL-6 protein within 24 h, and TNF α within 12 h (Fig. 5). Levels of IL-6 and leptin protein within the media of control cells increased with additional time in culture, and at 48 h, levels were significantly elevated over those seen at 24 h. With exposure to 10 μ M TMT, IL-6 protein levels were significantly elevated over control at 24 but not 48 h (Fig. 5A). Protein levels for TNF α in control cells demonstrated a gradual decrease with time in culture (Fig. 5B). With exposure to 10 μ M TMT, TNF α protein levels were significantly increased over controls at all time points; however, a decline, similar to that seen in the control cells, occurred over time in culture (Fig. 5B). Protein levels of leptin were significantly decreased in cells exposed to TMT compared to controls at both 24 and 48 h (Fig. 5C). As mRNA levels showed a different pattern, it is possible that post transcriptional regulations occur which may decrease protein production.

3.6. Cytokines expression in SVF and mature adipocytes isolated from ob/ob subcutaneous fat tissues

From the ob/ob subcutaneous fat tissues, two cells populations were isolated, i.e. cell from the stromal vascular fraction and mature adipocytes. In presence of 10 μ M of TMT, a statistically significant increase of the mRNA level of TNF α was observed in the SVF cells (Fig. 6a) as well in the mature adipocytes (Fig. 6b). The expression of MIP-1 α , Inos and Cox-2 were not statistically

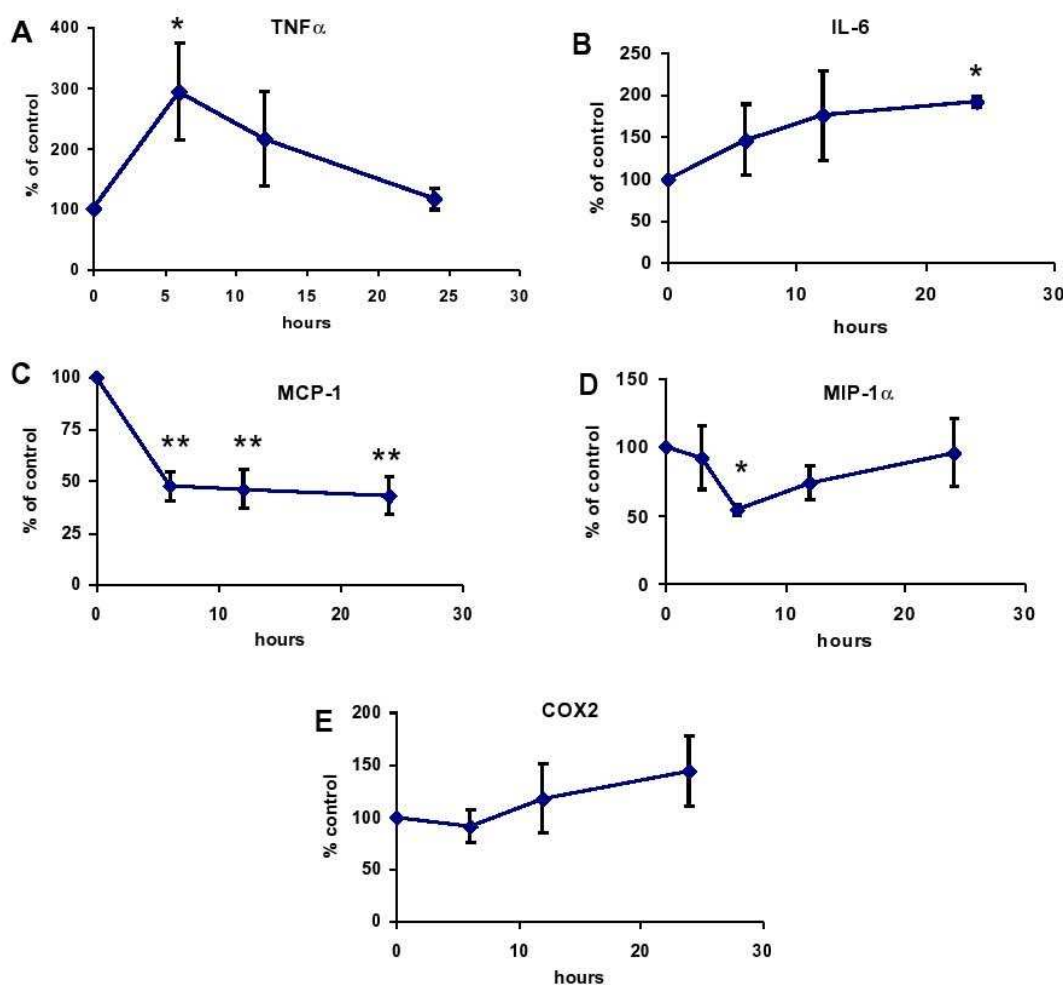


Fig. 3. Effect of TMT on inflammation factors expression by macrophages. mRNA levels for (A) TNF α , (B) IL-6, (C) MCP-1, (D) MIP-1 α , and (E) COX-2 in differentiated THP-1 cells. Cells were incubated in the presence of 10 μ M TMT for 6, 12, and 24 h and mRNA levels were determined by Q-RT-PCR. Data is presented as a percent of control with control values set at 100 and represents the mean \pm SEM of three different experiments. * p < 0.05, significantly different from control values, as determined by Dunnett's t -test following a significant overall ANOVA.

significantly changed in presence of TMT in both cells populations (Fig. 6a and b).

3.7. TNF α expression in *ob/ob* hippocampus

In mice, TMT is well known for its deleterious effects on the hippocampus [12] and TNF α plays a critical role in this damage. However, brain of *ob/ob* mice had never been studied after TMT injection. Here we found that TNF α was significantly increased in TMT injected *ob/ob* hippocampus as compared to saline injected mice (Fig. 7a).

3.8. TNF α , MIP-1 α , iNOS, COX-2 and adiponectin mRNA expression in *ob/ob* WAT

In order to examine the *in vivo* induction of inflammatory factors in fat tissue by TMT, obese mice (*ob/ob*) were treated with TMT and examined 24 h later. As described previously in other mice strains [25], 24 h after TMT injection a significant weight loss has been observed when compared to saline injected mice (49.92 ± 1.32 vs 46.44 ± 1.45). However, no significant changes in WAT histology were observed between control and TMT treated

mice (data not shown). Significant increases in TNF α , MIP-1 α and adiponectin mRNA levels were detected within 24 h of an i.p. injection of TMT (2.6 mg/kg of body weight) while no statistically significant changes in COX-2 and iNOS mRNA levels were found (Fig. 7B).

4. Discussion

It is currently accepted that inflammatory factors produced in fat tissue contribute to the chronic, low-grade inflammation associated with obesity, and that this inflammatory state significantly contributes to the subsequent development of insulin resistance [26,27]. In addition to diabetes, such an increase in systemic inflammation could influence the evolution of other disease pathologies, including asthma or rheumatoid arthritis. However, while the WAT can serve as a source of inflammatory factors, little is known about the various stimuli that initiate this process.

WAT is composed of different cell types including adipocytes, pre-adipocytes, fibroblasts, endothelial cells, and macrophages, most of which are capable of producing inflammatory molecules. Mature adipocytes are the most abundant cells in WAT [28], and these cells produce inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF α

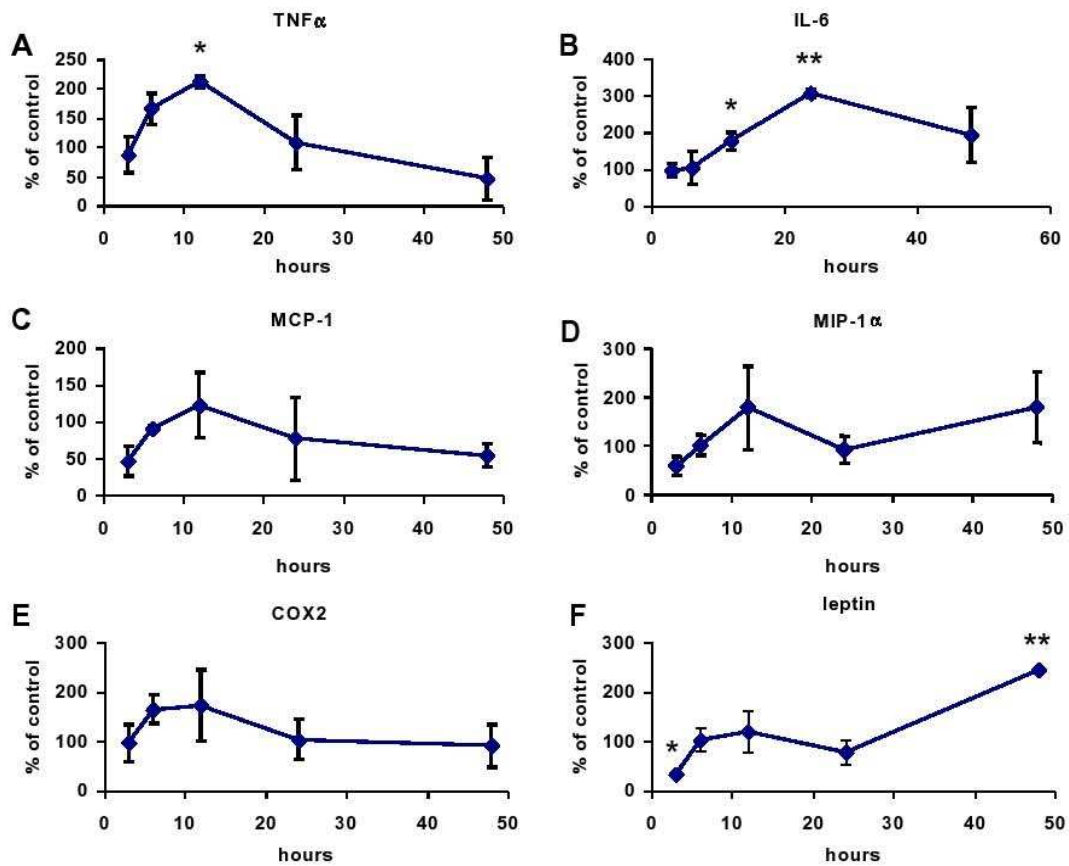


Fig. 4. Effect of TMT on inflammation factors expression by mature human adipocytes. mRNA levels of (A) TNF, (B) IL-6, (C) MCP-1, (D) MIP-1, (E) COX-2, and (F) leptin in mature human adipocytes. Cells were incubated for 3, 6, 12, 24, or 48 h with 10 M TMT. Levels were determined by q-RT-PCR and are presented as the mean % of controls \pm SEM ($n = 3$). *Indicates significantly different values from control, as determined by Dunnett's test following a significant overall ANOVA $^*p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$.

[29,30], as well as adipokines such as leptin and adiponectin [31,32]. Pre-adipocytes are also a source of inflammatory factors and chemokines, including MCP-1, that are often unique compared to those expressed by mature adipocytes [33]. Macrophages are a primary source of inflammatory cytokines in tissues, and in WAT, the number of infiltrating macrophages is related to the adipose tissue mass [34]. This relationship may be related to increased levels of the MCP-1 chemoattractant protein [35] and its receptor, CCR2 [36]. Similar to other tissues of the body, different macrophage subtypes, including the classic pro-inflammatory type M1 macrophage and the primary anti-inflammatory type M2 macrophage, have been described in WAT [37]. It has been proposed that the balance between M1 and M2 macrophages within a tissue influences the inflammatory response [38]. Thus, under a chronic low-level inflammatory state, the continued feedback between the WAT and the blood-borne macrophages could serve to maintain fat as a pool for pro-inflammatory cytokine production.

WAT has been shown to be a place of accumulation of lipid soluble compounds, including biologically based compounds and those introduced from the environment. Thus, it is possible that with the long-term bio-accumulation of toxic compounds, such as dioxin, polychlorinated biphenyls (PCB), and the polybrominated biphenyl flame retardant compounds, the WAT becomes, not only a sink for these compounds, but also a target site and source of pro-inflammatory cytokines, with continued exposure. Thus, the dramatic disproportion of WAT in obese subjects may represent an elevated risk factor for adverse effects of environmental chemical exposure that result in the production of pro-inflammatory cytokines. While concern is raised about chronic

inflammation, the impact of elevated cytokine production from WAT on acute toxicity is a significant consideration.

Environmental factors can disrupt the normal developmental and homeostatic controls over adipogenesis and energy balance [39,40]. Such factors have been named obesogens and some organotins have been included in this category. For instance tributyltin chloride induces the differentiation of adipocytes *in vitro* and increases adipose mass *in vivo* through the retinoid X receptor (RXR) and the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation [40]. For other organotins such as trimethyltin, the organo-compound we used in this study for which there is recent human exposure concerns [41,42], their effects on adipogenesis are not known. Here, for the first time, we demonstrated the capacity of this neurotoxic organometal compound to stimulate the production of the pro-inflammatory cytokine TNF α in WAT from ob/ob mice, in cultured human adipocytes, in the cultured THP-1 macrophage cell line, as well as in cultured mice SVF and mature adipocytes. This stimulation is not limited to ob/ob mice since agouti mice (B6.Cg-*A^y/J*) injected with TMT showed a similar TNF response in WAT (manuscript in preparation). This stimulation occurred in the absence of *in vitro* toxicity to the cells and at a similar dose level that stimulates TNF production in the CNS macrophage, the microglia. *In vivo*, no evidence of WAT damage was observed, while TMT injection induced the expected TNF α mRNA increase in the hippocampus. The difference in the inflammatory response level observed between our *in vitro* and *in vivo* results suggests regulation/interaction specific to the *in vivo* environment. WAT is a complex tissue composed of many different cell types capable of producing cytokines and chemokines. This includes

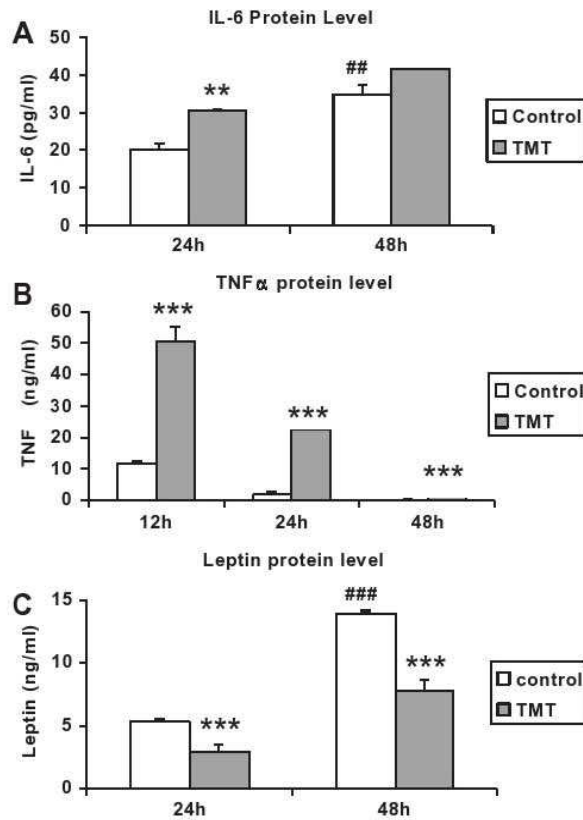


Fig. 5. Effect of TMT on TNF α , IL-6 and leptin production by mature human adipocytes, as determined by ELISA. The mean protein levels, determined by spectroscopy, were calculated and the data are represented as the mean protein level \pm SEM at each time point ($n=3-5$ for IL-6; $n=4$ for TNF α and leptin). *Indicates significant difference compared to corresponding control ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. #Indicates significant difference compared to the corresponding dose-group at 24 h. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

pre-adipocytes, mature adipocytes, and macrophages, as well as a contribution from fibroblasts, endothelial cells, haematopoietic progenitor cells, monocytes, and lymphocytes.

Our data show that there is not a differential response of the mature adipocyte cells and SVF cells to TMT with a similar contribution from each cell type to the inflammatory response. Recent works suggest that interactions between adipocytes, macrophages and other immune cells take place in the WAT [43,44]. Such interaction could serve not only in determining the actual level of the induction of TNF and MIP-1a but would serve to regulate the time-course of the response with the subsequent induction of anti-inflammatory factors. In mouse acute TMT intoxication, the hippocampus is the main affected brain region. However, after an acute dosing, tin is distributed relatively evenly in the brain [18] and it is possible that brain regions with no cellular damages could be affected and modify WAT inflammatory response. Reciprocally, we have proposed that WAT inflammation could affect CNS response to injury [45]. Resistance to TMT toxicity in various cell types has been linked to the level of stannin protein and the induction by TMT [46]. This protein is induced by TNF α in a protein kinase C- Σ (PKC- Σ)-dependent manner [47]. In this study, constitutive stannin mRNA levels were similar across all cell lines; yet, with TMT exposure, stannin mRNA levels were elevated in both the THP-1 macrophage cell and mature human adipocytes. Furthermore, both cell types showed differential vulnerability to TMT, compared to the other cell lines, that was consistent with

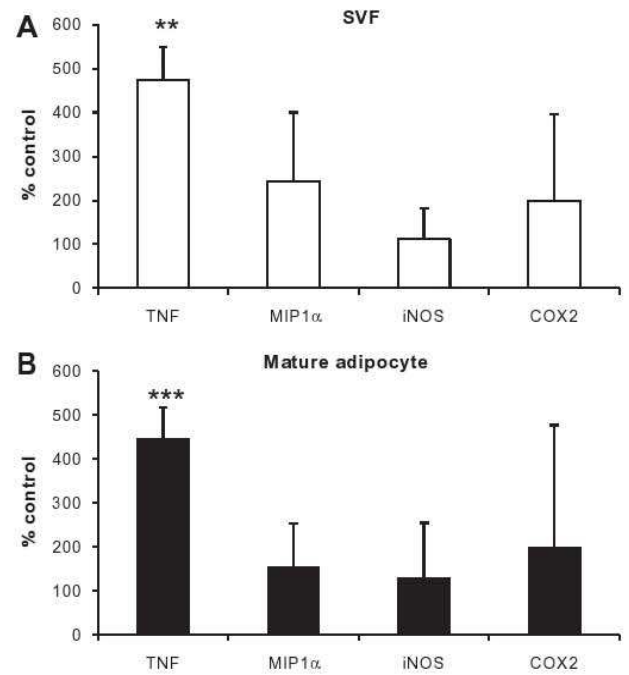


Fig. 6. mRNA levels of TNF α , MIP-1 α , Inos and COX-2 in ob/ob SVF (A) or ob/ob mature adipocytes (B). Cells were incubated for 24 h with 10 μ M TMT. Data are represented as the mean percent of control \pm SEM ($n=3-4$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ significant difference from control, as determined by Student's *t*-test.

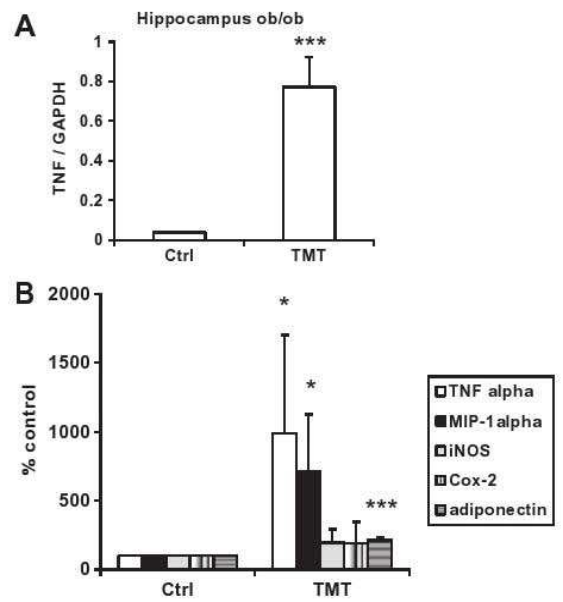


Fig. 7. *In vivo* effects of TMT on ob/ob mice. (A) In hippocampus. mRNA levels of TNF α in the hippocampus were determined in controls and at 24 h post-injection of TMT (2.6 mg/kg body wt, i.p.). (B) In WAT. mRNA levels of TNF α , MIP-1 α , Inos, adiponectin and COX-2 in WAT obtained from 10-week-old ob/ob male mice 24 h post-injection of TMT or saline. Data are represented as the mean percent of control \pm SEM ($n=3-4$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ significant difference from control, as determined by Student's *t*-test.

previous literature suggesting that stannin levels correlate with vulnerability [24].

Our data clearly demonstrate that an environmental heavy metal toxicant, known for its neurodegenerative and neuroinflammatory

effects, can also stimulate the inflammatory response of two cell types present in the adipose tissue. These results suggest that WAT can serve as a pool for inflammatory cytokine production, acutely responding to exposure to an environmental agent. Further examination is required to address the question of whether cytokine production from WAT is sufficient to influence the target organ toxicity of TMT or any other compound. However, given the number of compounds that accumulate within lipid-rich tissue, the possible induction of a prolonged, localized inflammatory response and the resulting chronic, low-level systemic inflammation raise significant concerns about health risks associated with obesity.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and the reconstructive surgery departments (CHR Félix Guyon, Saint-Denis) for the adipose tissue. We thank the Laboratoire de Biochimie (CHR Félix Guyon, Saint-Denis) for their technical assistance. This work was supported by the Intramural Research Program of NIEHS/NIH and by grants from 'Conseil Régional de La Réunion' and 'Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche'. P.R. has been funded by a fellowship from 'Conseil Régional de La Réunion'.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cyto.2010.11.015.

References

- Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 2006(Suppl. 5):242S–9S.
- Guzik TJ, Mangalat D, Korb R. Adipocytokines—novel link between inflammation and vascular function? *Ageing Res Rev* 2006;57:505–28.
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531–43.
- Harvey J. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J Neurochem* 2007;100:307–13.
- Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:437–46.
- Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004;109:2046–9. doi:10.1161/01.CIR.0000127953.98131.FD.
- Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta* 2007;380:24–30.
- Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:924–9.
- Fujiyoshi PT, Michalek JE, Matsumura F. Molecular epidemiologic evidence for diabetogenic effects of dioxin exposure in U.S. Air force veterans of the Vietnam war. *Environ Health Perspect* 2006;114:1677–83.
- Feldman RG, White RF, Eriator II. Trimethyltin encephalopathy. *Arch Neurol* 1993;50:1320–4.
- Rey C, Reinecke HJ, Besser R. Methyltin intoxication in six men; toxicologic and clinical aspects. *Vet Hum Toxicol* 1984;26:121–2.
- Harry GJ, Lefebvre d'Helencourt C. The neuroinflammatory components of the trimethyltin (TMT) model of hippocampal neurodegeneration. In: Wood PL, editor. *Neuroinflammation: mechanisms and management*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2002. p. 301–29.
- Harry GJ, Tyler K, d'Helencourt CL, Tilson HA, Maier WE. Morphological alterations and elevations in tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 α , and IL-6 in mixed glia cultures following exposure to trimethyltin: modulation by proinflammatory cytokine recombinant proteins and neutralizing antibodies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;180:205–18.
- Bruccoleri A, Brown H, Harry GJ. Cellular localization and temporal elevation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and transforming growth factor- β 1 mRNA in hippocampal injury response induced by trimethyltin. *J Neurochem* 1998;71:1577–87.
- Lefebvre d'Helencourt C, Harry GJ. Molecular profiles of mRNA levels in laser capture microdissected murine hippocampal regions differentially responsive to TMT-induced cell death. *J Neurochem* 2005;93:206–20.
- Harry GJ, Bruccoleri A, Lefebvre d'Helencourt C. Differential modulation of hippocampal chemical-induced injury response by ebelsen, pentoxifylline, and TNF α -, IL-1 α -, and IL-6-neutralizing antibodies. *J Neurosci Res* 2003;73:526–36.
- Doctor SV, Sultatos LG, Murphy SD. Distribution of trimethyltin in various tissues of the male mouse. *Toxicol Lett* 1983;17:43–8.
- Cook LL, Stine KE, Reiter LW. Tin distribution in adult rat tissues after exposure to trimethyltin and triethyltin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;76:344–8.
- Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn J. Synthesis and secretion of ApoC-I and ApoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *J Nutr* 2004;134:2935–41.
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 1990;131:165–72.
- Fried KF, Moustaid-Moussa N. Culture of adipose tissue and isolated adipocytes. In: Aihaud GA, editor. *Adipose tissue protocols*. Humana Press; 2001. p. 197–212.
- Cristofol RM, Gasso S, Vilchez D, Pertusa M, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C. Neurotoxic effects of trimethyltin and triethyltin on human fetal neuron and astrocyte cultures: a comparative study with rat neuronal cultures and human cell lines. *Toxicol Lett* 2004;152:35–46.
- Thompson T, Lewis J, Dejneka N, Severs W, Polavarapu R, Billingsley M. Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:1201–16.
- Billingsley ML, Yun J, Reese BE, Davidson CE, Buck-Koehntop BA, Veglia G. Functional and structural properties of stannin: roles in cellular growth, selective toxicity, and mitochondrial responses to injury. *J Cell Biochem* 2006;98:243–50.
- Ekuta JE, Hikal AH, Matthews JC. Toxicokinetics of trimethyltin in four inbred strains of mice. *Toxicol Lett* 1998;95:41–6.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–30. doi:10.1172/JCI20031945.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:4–12.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue. *Inflamm Immun* 2006;6:772–83.
- Hoareau L, Ravanan P, Gonthier MP, Delarue P, Goncalves J, Cesari M, et al. Effect of PEA on LPS inflammatory action in human adipocytes. *Cytokine* 2006;34:291–6.
- Sewter C, Digby J, Blows F, Prins J, O'Rahilly S. Regulation of tumour necrosis factor- α release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol* 1999;163:33–8. doi:10.1677/joe.0.1630033.
- Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, et al. Expression of ob gene in adipose cells. *J Biol Chem* 1996;271:2365–8. doi:10.1074/jbc.271.5.2365.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697–703. doi:10.1074/jbc.271.18.10697.
- Chung S, LaPoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, McIntosh MK. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology* 2006;147:5340–51. doi:10.1210/en.2006-0536.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808. doi:10.1172/JCI200319246.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K-i, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–505. doi:10.1172/JCI26498.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006;116:115–24. doi:10.1172/JCI24335.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677–86.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84.
- Grun F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 2006;147:S50–5.
- Grun F, Blumberg B. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:19–29.
- Furuhashi K, Ogawa M, Suzuki Y, Endo Y, Kim Y, Ichihara G. Methylation of dimethyltin in mice and rats. *Chem Res Toxicol* 2008;21:467–71.
- Yoo CI, Kim Y, Jeong KS, Sim CS, Choy N, Kim J, et al. A case of acute organotin poisoning. *J Occup Health* 2007;49:305–10.
- Caspar-Baugil S, Cousin B, Bour S, Castiella L, Penicaud L, Carpenne C. Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J Physiol Biochem* 2009;65:423–36.
- Xie L, Ortega MT, Mora S, Chapes SK. Interactive changes between macrophages and adipocytes. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:651–9.
- Ravanan P, Awada R, Harry GJ, Lefebvre d'Helencourt C. White fat tissue, obesity, and possible role in neurodegeneration. In: Harry GJ, Tilson HA, editors. *Neurotoxicology*. Informa; 2010. p. 156–75.
- Toggas S, Krady J, Billingsley M. Molecular neurotoxicology of trimethyltin: identification of stannin, a novel protein expressed in trimethyltin-sensitive cells. *Mol Pharmacol* 1992;42:44–56.
- Reese BE, Krüssinger D, Yun JK, Billingsley ML. Elucidation of stannin function using microarray analysis: implications for cell cycle control. *Gene Exp* 2006;13:41–52.

Article 3: «**Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue stress** »

III.1. Méthodologie :

- Culture cellulaire des lignées humaines monocytaires (THP-1), lymphocytaires T (Jurkat), neuronales (Kelly) et adipocytaire (SW872)
- Préparation des adipocytes matures à partir d'échantillons de tissus humains
- Stimulation des cellules avec du TMT à différentes concentrations pendant 48 heures
- Etude de la cytotoxicité induite par TMT par le test de prolifération (MTT)
- Etude de l'expression protéines des cytokines $TNF\alpha$, IL-6 et de la leptine par ELISA dans les adipocytes matures et les THP1 différenciés
- Collection de WAT de souris obèses ob/ob traités 24 heures avec du TMT (2,6 mg/kg bwt, ip) ou avec du solution saline (2 ml/kg bwt)
- Préparation de la fraction stroma vasculaire (SVF) et des adipocytes matures à partir de tissus ob / ob
- Etude par Q RT-PCR l'expression ARNm de Stannin, IL-6, leptine, $TNF\alpha$, MIP-1, MCP-1 Adiponectine, COX-2 dans les macrophages, les adipocytes humains et dans l'hippocampe de souris ob / ob traité avec le TMT

III.2. Principaux résultats :

- TMT n'induit pas l'apoptose des adipocytes matures humains ni des cellules THP-1 différenciés en macrophages même à forte concentration (100 μ M).
- TMT augmente l'expression des cytokines inflammatoires ($TNF\alpha$, IL-6) et diminue l'expression des chimiokines (MIP-1 α , MCP-1) dans les cellules THP-1 différenciés en macrophages.
- TMT augmente l'expression de $TNF\alpha$ et d'IL-6 et de la leptine dans les adipocytes matures humains.
- In vivo, les souris ob/ob injectées avec du TMT montre une forte expression de $TNF\alpha$ et de MCP-1 dans le tissu adipeux.

III.3. Discussion :

L'obésité est depuis peu considérée comme un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit et que cet état inflammatoire contribue de manière significative dans le développement des nombreuses pathologies qui lui sont associées comme l'athérosclérose, le diabète de type II, les attaques cérébrales et le cancer.

Classiquement, le foie et les organes lymphoïdes sont considérés comme les sources principales de production de facteurs inflammatoires. Cependant, une série de données récentes montre que le tissu adipeux blanc exprime également de nombreux facteurs inflammatoires et contribue à l'augmentation de leurs taux circulants chez l'obèse.

Ce tissu est composé de différents types cellulaires, dont les adipocytes matures et la fraction stroma-vasculaire (FSV). La FSV est composée de cellules pré-adipocytaires, endothéliales, de fibroblastes, de macrophages, de lymphocytes et de cellules nerveuses. Parmi ces cellules, les adipocytes matures sont les plus abondantes dans le tissu adipeux [100], et sont capables de produire des cytokines inflammatoires (IL-6, TNF α) [388, 389], des chimiokines (MIP-1 α , MCP-1), ainsi que des adipokines comme la leptine et l'adiponectine [80, 390]. Des travaux récents chez l'homme et chez l'animal suggèrent d'ailleurs que la sécrétion de molécules inflammatoires par les macrophages de la FSV puisse jouer un rôle particulièrement délétère chez l'obèse [65, 391]. Ils ont montré que le tissu adipeux blanc de sujets obèses est la cible d'une infiltration macrophagique et que cette infiltration est liée à l'hypertrophie adipocytaire [70, 392, 393]. Cette relation peut être liée à des niveaux accrus de la protéine chimiotactique MCP-1 [74].

Des ressemblances dans les profils d'expression génique entre macrophages et adipocytes ont aussi été rapportées. Il a été proposé que les adipocytes puissent exercer des propriétés macrophagiques dans un environnement inflammatoire, témoignant ainsi de la flexibilité de leur phénotype [48, 394]. Similaires à d'autres tissus de l'organisme, deux sous-types de macrophages, le type pro-inflammatoire M1 et le type anti-inflammatoire M2, ont été décrits dans le tissu adipeux [395]. Il a été proposé que l'équilibre entre les macrophages M1 et M2 dans un tissu influe sur la réponse inflammatoire [69].

Les facteurs environnementaux peuvent perturber l'équilibre énergétique et l'adipogénèse [396, 397]. Ces facteurs ont été nommés obésogènes et certains organoétains ont été inclus

dans cette catégorie. Par exemple le chlorure de tributylétain induit la différenciation des adipocytes *in vitro* et augmente la masse adipeuse *in vivo* par le récepteur au rétinol X.

Chez les sujets obèses, la disproportion importante de WAT peut les rendre plus sensibles aux effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques environnementaux.

Dans cette étude, nous avons utilisé le triméthylétain (TMT), un composé neurotoxique organométallique induisant une réponse inflammatoire au niveau du SNC. Son effet sur la réponse inflammatoire du TA n'est pas encore connu.

D'abord nous avons étudié la toxicité induite par TMT dans divers types de lignées cellulaires humaines monocytaires, lymphocytaires, neuronales, et adipocytaires. Après 48h de traitement à différentes concentrations de TMT, nous avons observé que la toxicité induite par le TMT varie d'un type cellulaire à l'autre. A 100 μ M, le TMT produit environ 75% de la mort cellulaire dans les lymphocytes et les neurones et environ 25% de la mort cellulaire dans les adipocytes matures humains et les monocytes après 48h de traitement (Fig.1). Cette variabilité de toxicité a été démontrée dans les neurones et les lymphocytes montrant une sensibilité plus grande que les fibroblastes [398, 399].

Comme la résistance des cellules à la toxicité induite par TMT est liée au niveau d'expression de la protéine stannine [400], nous avons étudié les niveaux d'expression des ARNm de la stannine dans toutes ces lignées. Nous avons observé que ces niveaux sont semblables dans ces lignées mais ils augmentent après traitement au TMT 10 μ M dans les macrophages (Fig.2) et les adipocytes matures humains.

Ensuite, nous avons démontré que le TMT induit une production de cytokines pro-inflammatoires dans des cultures humaines de macrophages (Fig. 3) et d'adipocytes (Fig. 4), dans des cultures murines de SVF et d'adipocytes matures (Fig. 6) ainsi que dans le tissu adipeux de souris obèses ob / ob (Fig. 7).

Même si la comparaison *in vitro* et *in vivo* peut être difficile, le niveau de la réponse inflammatoire *in vivo* semble être plus élevé qu'*in vitro*. Comme nous avons démontré la capacité des macrophages et des adipocytes à produire des cytokines inflammatoires en réponse au TMT *in vitro*, il est possible que la synergie se produise *in vivo* entre ces cellules.

Aucune étude sur l'effet de TMT sur l'inflammation produite par le tissu adipeux n'avait été faite *in vivo*. Or, le TMT induit une réponse inflammatoire au niveau du SNC en augmentant l'expression de TNF α dans l'hippocampe, la région la plus touchée du cerveau par le TMT

[401]. Enfin, nous proposons que l'inflammation produite par le TA en réponse au TMT puisse affecter la réponse inflammatoire du système nerveux central à un traumatisme aigu.

III.4. Conclusion :

Nos résultats démontrent clairement et pour la première fois que le composé organométallique TMT, connu pour ses effets neuro-dégénératifs et neuro-inflammatoires, peut aussi stimuler la réponse inflammatoire des deux types cellulaires présentes dans le tissu adipeux : les adipocytes et les macrophages. Ils sont capables de répondre à ce composé en modulant leur production d'adipokines et de cytokines. Ces résultats suggèrent que les facteurs exogènes liés à l'environnement pourraient moduler la production de facteurs inflammatoires par le tissu adipeux.

Chapitre 4

Effet des adipokines sur la réponse inflammatoire de cellules microgliales

Chapitre 4: « Effet des adipokines sur la réponse inflammatoire de cellules microgliales »

L'obésité est une hypertrophie du tissu adipeux. Celui-ci est composé majoritairement d'adipocytes qui sécrètent des adipokines, dont l'adiponectine et la résistine. L'adiponectine est une protéine de 244 acides aminés, elle agit sur les cellules *via* deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 qui font appel à la voie de signalisation des MAPs kinases [410]. Elle intervient dans les divers processus inflammatoires liés à l'obésité [411]. La résistine est une protéine appartenant à la famille des FIZZ (*Found in Inflammatory Zone*). Son récepteur est encore inconnu. Cette protéine est nommée ainsi car elle semble induire une résistance à l'insuline chez l'homme [126]. Ces adipokines ont des effets autocrine, paracrines et endocrines en participant à un grand nombre de processus physiologiques et physiopathologiques. Si le rôle de ces facteurs dans la régulation du métabolisme est bien établi, leurs effets sur d'autres organes ne sont pas toujours connus. Il est notamment intéressant d'étudier les effets d'adipokines dans le système nerveux central (SNC).

Les adipokines pourraient agir au niveau du SNC grâce à leur passage à travers la barrière hémato-encéphalique. En cas de traumatisme perméabilisant cette barrière, des cytokines sont susceptibles d'atteindre les cellules du SNC et donc d'agir sur elles. En outre, il est déjà prouvé que l'adiponectine modifie l'expression des cytokines des cellules endothéliales du cerveau [412]. Le SNC comprend également des cellules jouant un rôle de sentinelle, les microglies.

Les cellules microgliales sont considérées comme les cellules immunocompétentes du SNC et sont activées lors d'un traumatisme ou d'une agression de celui-ci. Elles subissent après activation des changements tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnelle.

En cas d'inflammation, les cellules microgliales deviennent une source importante de cytokines pro-inflammatoires qui pourront avoir des effets bénéfiques comme néfastes. L'IL-1 β par exemple, participe normalement à la régulation du sommeil, de l'alimentation ou à la transmission synaptique. Lors d'une inflammation, les cellules microgliales sont une source importante et très précoce de cette cytokine [334] qui provoque alors la production de médiateurs de l'inflammation tels que TNF α , IL-6 ou COX-2 [335], ce qui placerait l'IL-1 β en tête des cascades inflammatoires dans le système nerveux central [336]. Les cellules microgliales sont capables également de sécréter de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β généralement après avoir été activées [325, 326], ce qui contribue au statut immunitaire particulier du système nerveux central.

Le but de cette étude est d'étudier la modulation de la réponse inflammatoire des microglies en présence de l'adiponectine et la résistine. Pour cela, l'expression génique de deux récepteurs de l'adiponectine ainsi que de certaines cytokines inflammatoires sera mesurée en condition normale ou inflammatoire dans des lignées microgliales murines, les BV2 et les EOC. Ensuite, les ADNc de ces deux adipokines vont être sous clonées dans un vecteur d'expression eucaryotes. Après transfection, ces constructions permettront d'étudier les effets de ces facteurs sur les microglies du SNC.

IV.1. Méthodologie :

- Culture cellulaire de deux lignées microgliales murines : BV2 et EOC

Les EOC sont des cellules dérivées de précurseurs de cellules microgliales provenant des jeunes souris C3H/HeJ alors que les BV2 sont des cellules immortalisées. Ces deux lignées ont été mises en culture dans du milieu DMEM supplémenté par de la glutamine (2mM), de la pénicilline (10000 U/ml) et de la streptomycine (10 mg/ml), 10% de SVF. 20% de surnageant de LADMAC a été utilisé pour la culture des EOCs. Les cellules LADMAC correspondent à une lignée stromale de moelle osseuse murine qui produit constitutivement du CSF-1 («colony stimulating factor-1»). Les cellules ont été incubés ensuite à 37°C dans un incubateur en présence de 5% de CO₂ jusqu'à leur confluence.

- Stimulation des cellules avec du LPS (Lipopolysacharide) à 10 ng/mL et 1µg/mL pendant 24 heures
- Extraction d'ARN, la réaction RT et PCR quantitative en temps réel :

Les ARNs totaux de deux lignées microgliales murines BV2 et EOC ont été isolées avec de Trizol Reagent™ (Invitrogen). 6 µg d'ARN rétrotranscrits en utilisant des oligo (dT), un mélange de 25mM dNTPs, 0,1 M du dithiothreitol (DTT) et 0,2 U de transcriptase inverse du virus murin de la leucémie de Moloney (MMLV) (Invitrogen).

A l'aide d'ADNc provenant de BV2 et d'EOC dilués au 1/5ème, les gènes de GAPDH, d'IL1β, TGFβ, de l'adiponectine et de ses récepteurs ont été quantifiés dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 0,5 uM de chaque amorce sens « forward » et anti-sens « Reverse » (Tableau IV) et d'un mélange regroupant le SYBR Green™ master mix, les dNTPs et la Taq polymérase (Eurogentec). Le mélange a été incubé dans un thermocycleur

(ABI Prism 7000 cycleur thermique; Applied Biosystems) 2 minutes à 50°C, puis 10 minutes à 95°C et enfin à 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minutes à 60°C. Les résultats de la quantification sont ensuite visualisés et analysés à l'aide du logiciel 7000 system SDS.

Gènes	Amorce sens	Amorce anti-sens
GAPDH	5' TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5' GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
IL-1β	5' TGGTGTGTGACGTTCCATT-3'	5' CAGCACGACGAGGCTTTTTTGTG-3'
TGFβ	5' CCTGCAAGACCATCGACATG-3'	5' ACAGGATCTGGCCAGGGAT-3'
ADIPO	5' TCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAAG-3'	5' CAGCTCCTGTTCATTCCAACATC-3'
ADIPOR1	5' CCCCTTACCCCGTCCTTAC-3'	5' GGCGTGGCTTTGTTTGCCTA-3'
ADIPOR2	5' TGCGCACACGTTTCAGTCTCCT-3'	5' TTCTATGATCCCCAAAAGTGTGC-3'

Tableau IV: Liste des amorces utilisées

- Clonage Classique et GatewayTM des adipokines :

Les gènes d'intérêts codant pour l'adiponectine et la résistine sont insérés dans le vecteur image pT7T3-Pac (Invitrogen). La taille de l'adipokine est 744pb et celle de la résistine est 344pb.

Les différentes bactéries utilisées sont des souches bactériennes d'*Escherichia coli* (DH5 α , TOP 10, DB3.1), commercialisées par Invitrogen ainsi que les différents plasmides. Les enzymes de restriction sont commercialisées par New England Biolabs. Tous ces réactifs sont détaillés dans le tableau V.

Plasmide	Taille	Gène de résistance	Gènes spécifiques	Enzymes de restriction
pcDNA3.1(Zeo+)	5216 pb	Ampicilline	T7PROM	Eco RI-NotI
pDONR 221	4762 pb	Kanamycine	M13, attP, ccdB	Bam HI-Bsp HI-Eco RI
pDEST 27	8123 pb	Ampicilline	CMV, attR, ccdB	Eco RI-Bam HI

Tableau V: Caractéristiques des plasmides utilisés

Pour le **clonage classique**, différentes étapes ont été effectués (Fig. M.3)

1. Digestion enzymatique de chacun des plasmides pcDNA3.1 (Zeo+), pT7T3-adiponectine et pT7T3-résistine avec les deux enzymes de restriction NotI et EcoRI.

2. Déphosphorylation du pcDNA3.1 par l'alkaline phosphatase puis inactivation à 65°C.
3. Ligation des produits digérés pendant 72h à 16°C avec 0,4 U de T4 DNA ligase.
4. Transformation des bactéries par choc thermique :

Les bactéries chimiocompétentes d'*E.coli* (DH5 α) ont été préparées à l'aide du tampon RF1 (RbCl 100 mM, MnCl₂, 4H₂O 50 mM, Potassium acétate 1M (PH= 7,5) 30 mM, CaCl₂, 2H₂O 10 mM, Glycérol 15 %) et du tampon RF2 (RbCl 10 mM, MPOS 0,5 M (pH= 6,8) 10 mM, CaCl₂, 2H₂O 75 mM, Glycérol 15 %).

Ces cellules compétentes ont été mises en contact avec le milieu réactionnel de ligation en milieu froid, puis soumises à un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. Après avoir été placées dans du SOC pendant une heure à 37°C, les bactéries transformées sont finalement étalées sur une boîte de pétri et sont mises à pousser sur du LB agar en présence de l'antibiotique de sélection adéquat (Ampicilline) pendant une nuit dans un incubateur à 37°C.

5. Extraction de l'ADN par Miniprep et ensuite midiprep en utilisant les kits commerciaux « QIAprep spin Miniprep Kit, Qiagen » et « Hispeed Plasmid Purification, Qiagen ».

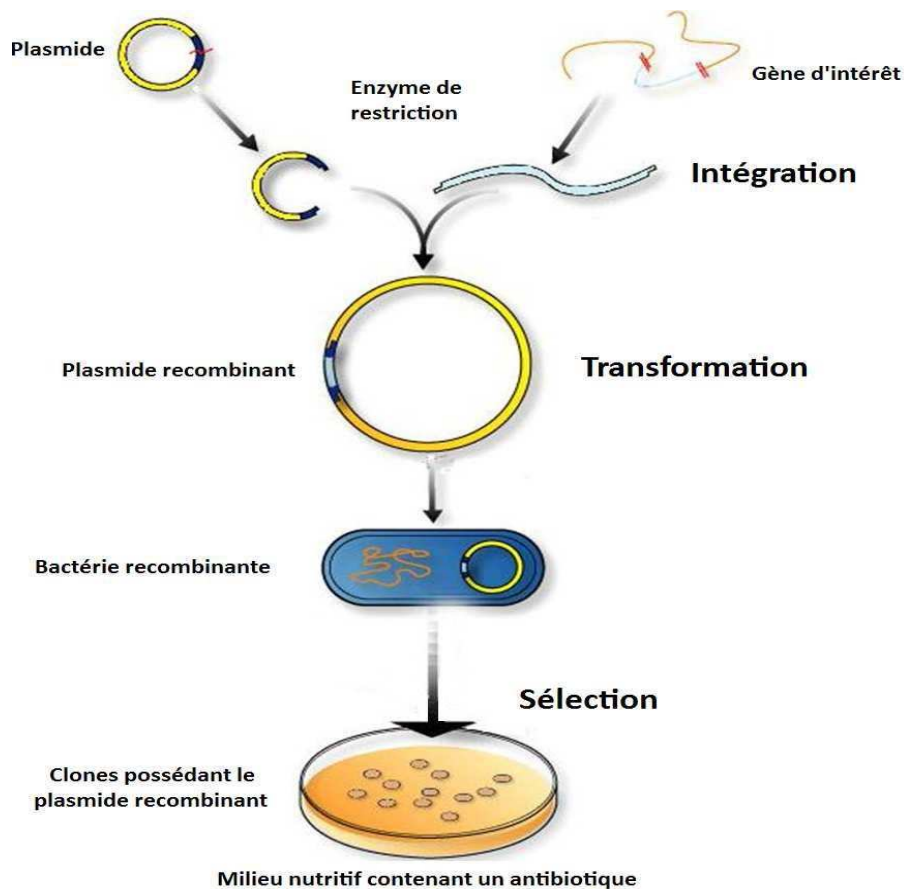


Figure M.3 : Clonage d'un plasmide

Le **Gateway**TM, une nouvelle méthode de clonage développé récemment et commercialisé par Invitrogen, basée sur un système de clonage par succession de recombinaisons. Cette technologie permet de mettre en jeu des transferts d'ADN grâce à des recombinaisons de sites spécifiques.

Ce système ne nécessite aucune analyse de restriction, de digestion, ni de ligation préalable des gènes cibles ou vecteurs plasmidiques avant le clonage, ce qui n'est pas le cas pour un clonage classique. De plus, cette technique nous permet au final d'obtenir plusieurs vecteurs d'expression à partir d'un seul vecteur d'entrée.

Le clonage GatewayTM est divisé en deux étapes (Fig. M.4) :

1. La BP Réaction :

Cette première réaction du système GatewayTM permet une recombinaison directionnelle d'un produit PCR, portant le gène d'intérêt (adiponectine ou résistine) et deux sites de recombinaison attB ajoutés grâce aux amorces de PCR, et d'un vecteur donneur (pDONR221), portant le gène ccdB et deux sites attP, grâce à un enzyme de clonase «BP» catalysant la recombinaison par une intégrase (Int) et par un facteur d'intégration (IHF). La reconnaissance des sites de recombinaison attB et attP va créer les sites attL et attR. En effet le gène d'intérêt qui était encadré par attB, va être intégré dans le vecteur donneur entre les sites attL et le produit de ce dernier, appelé vecteur d'entrée (pDONR221 recombiné). De même le gène ccdB du vecteur donneur qui était encadré par attP, va être intégré entre les sites attR et grâce à ce gène, un moyen de sélection rapide sera fait. En effet ce gène va empêcher les souches bactériennes ayant intégré le vecteur d'entrée de pousser et ainsi permettre d'obtenir uniquement les clones recombinés avec le gène d'intérêt.

2. La LR Réaction :

La deuxième réaction du GatewayTM est réalisée sur le même schéma que la BP réaction, les recombinaisons de sites spécifiques mais entre différents vecteurs.

Le vecteur d'entrée obtenue précédemment (portant le gène d'intérêt et deux sites attL), sert de matrice à une seconde recombinaison dite de «LR» avec un ou plusieurs vecteurs de destination (pDEST 27), portant le gène ccdB et deux sites de recombinaison attR, afin obtenir un vecteur d'expression (pDEST recombiné), portant le gène d'intérêt et deux sites attB. Ce vecteur va permettre l'expression de ce gène. Les clones pourront être sélectionnés grâce au gène ccdB qui inhibera la croissance des clones n'ayant pas intégrés le plasmide d'expression.

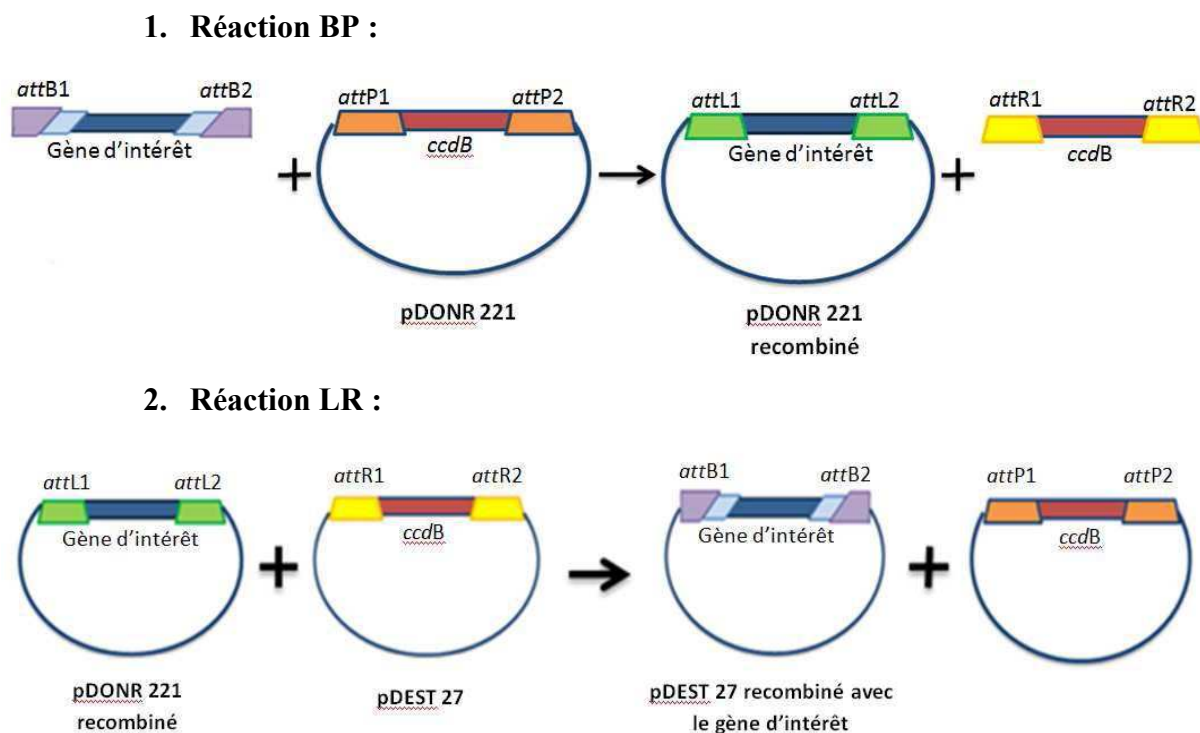


Figure M.4: Principe du clonage Gateway™

attP, attB, attR et attL : sites de recombinaison

ccdB : gène codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches bactériennes
(Inhibe l'activité ligase de la gyrase d'*E. Coli*)

Pour le **clonage Gateway™**, différentes étapes ont été effectués :

1. Amplification par PCR :

100 ng d'ADNc ont été amplifiés dans un volume réactionnel de 25 µl contenant du tampon Pfx polymérase 1x, 0,3 mM de dNTPs, 1 mM de MgSO₄, 0,3 µM de chaque amorce sens et anti sens (Tableau) et 1U de Taq Platinum Pfx DNA polymérase (Invitrogen). Ce mélange a été soumis 30 fois à 94°C pendant 15 secondes, à 55°C pendant 30 secondes et enfin à 68°C pendant 1 minute pour l'adiponectine et 30 secondes pour la résistine. La PCR se termine par une phase d'élongation de 10 minutes à 68°C. Les produits de PCR ont été ensuite visualisés sous lampe UV sur gel d'agarose à 0,8% contenant du Bromure d'Éthidium à 0,5 µg/ mL.

Une deuxième réaction de PCR a été réalisée avec les amorces spécifiques du Gateway™, les amorces attB1 et B2 (Tableau VI) dont les conditions de PCR sont les mêmes que la première réaction de PCR en changeant juste les conditions de la phase d'hybridation à 61°C pendant 1 minute.

Gènes	Amorce sens	Amorce anti-sens
Adiponectine	5'GGC TTC GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC ATG CTA CTG TTG CAA GCT CTC 3'	5'TTA GCT GTC CAT GTG TTG GCG TTC GAA TTT AGC AGC AGCGGT TTC TTT CTA C AGT TGG TAT CAT GGT AGA GAA 3'
Résistine	5'GGC TTC GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC ATG AAG AAC CTT TCA TTT CCC C 3'	5'TTA GCT GTC CAT GTG TTG GCG TTC GAA TTT AGC AGC AGC GGT TTC TTT CTA TCA GGA AGC GAC CTG CAG C 3'
attB	5'GGG GGG GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC 3'	5'GGG GGG GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TAT TAG CTG TCC ATG TGT TGG CGT TCG AA 3'

Tableau VI : Liste des amorces utilisées pour les PCR1 et PCR2

- Purification des fragments d'ADN à l'aide d'un Kit de purification commercial « QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit, Qiagen ».
- Recombinaison :
100 ng d'ADN à recombinaison, a été mélangé avec 100ng d'enzyme BP ou LR clonase. La solution a été incubée 5h à température ambiante pour que l'activité de l'enzyme soit optimale. La réaction a été arrêtée ensuite par l'ajout de protéinase K à 2 µg/µL avec une incubation de 10 minutes à 37°C sous une agitation de 250rpm.
- Transformation des bactéries d'*E. coli* (TOP 10, DB3.1) par choc thermique.
- Extraction de l'ADN par Miniprep à l'aide d'un Kit commercial « QIAprep spin Miniprep Kit, Qiagen ».

IV.2. Résultats et discussion :

- Variation de l'expression génique de cytokines inflammatoires, de l'adiponectine et de ses récepteurs dans les différentes lignées microgliales utilisées :

Les cellules BV2 et EOC sont mises en contact avec 10 ng et 1 μ g de LPS pendant 24h. Après extraction des ARN et rétrotranscription, les ADNc sont amplifiés par PCR en temps réel. La détection à chaque cycle se fait à l'aide du SYBR Green. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression du gène de ménage GAPDH.

En condition normale, les cellules microgliales expriment l'IL-1 β . Après 24h de traitement au LPS faible concentration, cette expression diminue chez les BV2 mais augmente fortement chez les EOC. Le même profil a été observé pour l'expression d'ARNm de TGF β dans ces deux lignées microgliales (Fig.R.IV.1).

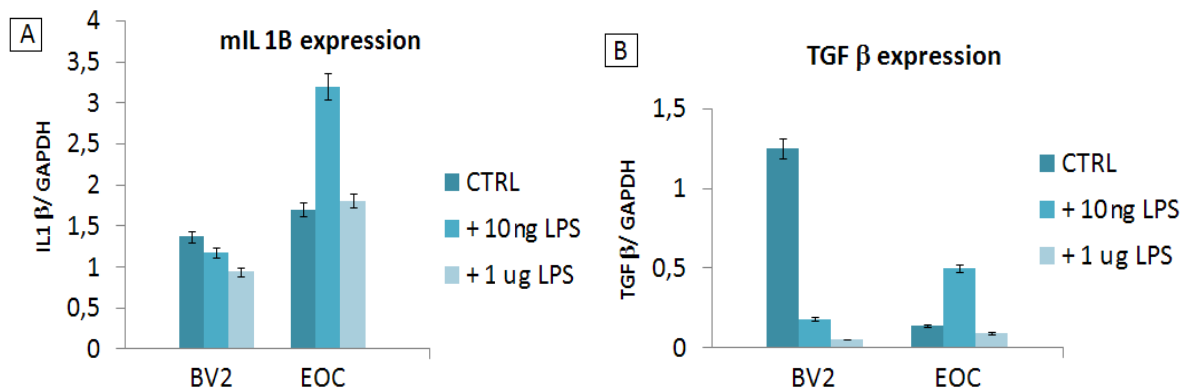


Figure R.IV.1 : Expression de l'ARN d'IL-1 β et de TGF β dans les deux lignées microgliales EOC et BV2 en condition normale ou inflammatoire (n=1)

Aucun récepteur à la résistine n'étant actuellement connu, seule l'expression des deux récepteurs de l'adiponectine (AdipoR1 et AdipoR2) a été observée.

Une forte diminution de l'expression AdipoR1 a été observée dans les cellules BV2 après traitement de 24h au LPS à faible et forte concentration. Alors que dans les cellules EOC, aucune variation de l'expression Adipo R1 n'a été observée que ce soit en condition normale ou après traitement avec du LPS.

Le LPS stimule l'expression de l'adiponectine et de son récepteur AdipoR2 dans les cellules EOC (Fig.R.IV.2).

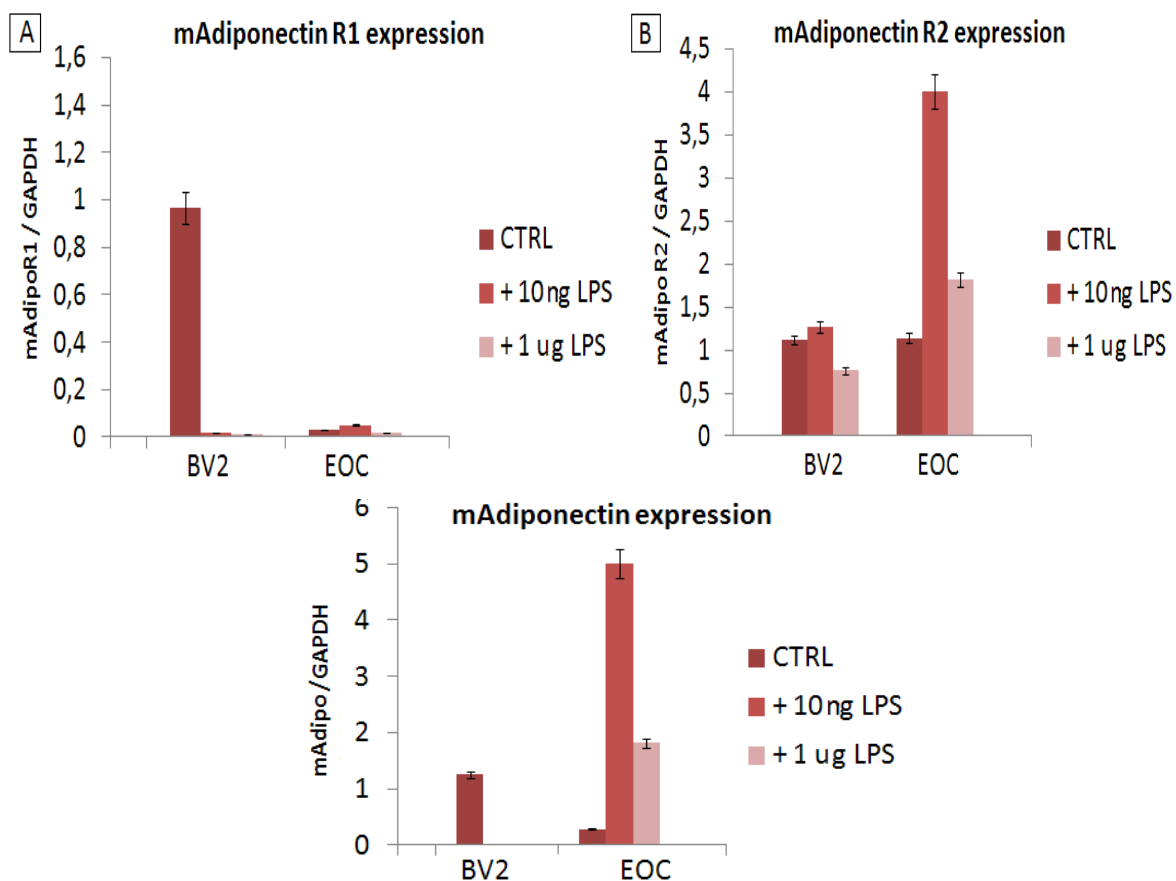


Figure R.IV.2 : Expression de l'ARN de l'adiponectine et de ses récepteurs dans les deux lignées microgliales EOC et BV2 en condition normale ou inflammatoire (n=3)

Le tableau VII résume les valeurs des Ct obtenus pour chacun des gènes étudiés :

Gènes		Ct		
		Ctrl	10ng LPS	1µg LPS
IL-1β	BV2	27,3	30	29,4
	EOC	31	29	28,2
TGFβ	BV2	19,8	24,1	25
	EOC	25,2	23,6	25,1
ADIPO	BV2	23,2	27,7	27,6
	EOC	30,7	24,3	22,5
ADIPOR1	BV2	24	29,1	29,5
	EOC	29,8	28,2	28,4
ADIPOR2	BV2	20	22	22,4
	EOC	26,1	19,2	19

Tableau VII : Les valeurs des Ct

- Clonage de l'adiponectine et de la résistine dans le vecteur pcDNA3.1 (Zeo+) :

Les plasmides pcDNA3.1 (Zeo+), pT7T3-adiponectine et pT7T3-résistine ont été digérés par NotI et EcoRI. Les produits de digestions ont été ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,8%. Après purification, les plasmides digérés sont mis en contact avec de T4 DNA ligase. Plusieurs clones bactériens de ce vecteur ont été obtenus après transformation de la souche DH5a d'*E.coli*. Six clones ont été amplifiés par des cultures bactériennes puis après extraction par miniprep, ils ont été contrôlés par digestion enzymatique (Fig. R.IV. 3). Les clones 2 et 4 de l'adiponectine (5 960 pb) et les clones 1 et 2 de la résistine (5 600 pb) ont été envoyés à séquencer (Genoscreen, Lille). Les résultats du séquençage montrent que l'adiponectine et la résistine ont été obtenue dans le pcDNA3.1 (Zeo+).

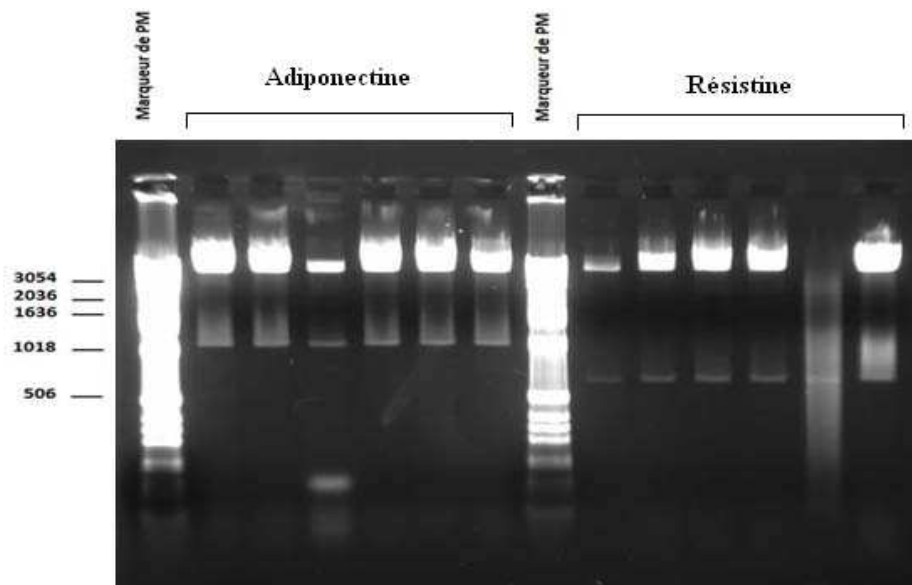


Figure R.IV. 3 : Photos du gel d'agarose du clonage

- Clonage GatewayTM de l'adiponectine et de la résistine :

Les ADNc de l'adiponectine et de la résistine murines ont été amplifiés par PCR. Un procédé à deux étapes de PCR a été utilisé. La PCR1 utilise des amorces spécifiques pour chacun des inserts (adiponectine, résistine). La PCR2 utilise des amorces spécifiques du Gateway, les amorces attB1 et B2.

Lors de la PCR1, la température d'hybridation utilisée est de 55°C et le temps d'élongation est de 1 min pour l'adiponectine (744 pb) et 30 sec pour la résistine (344 pb), ce qui est adapté

à la vitesse d'élongation de la Pfx correspondant à 1 min/ Kb. Une fois la réaction terminée, les différents produits ont été déposés sur un gel d'agarose 0,8% pour vérifier la taille des produits de PCR. Pratiquement, la taille des fragments obtenus a été estimée graphiquement par une courbe qui correspond à la taille des fragments du marqueur de taille 1Kb en fonction de la distance de migration. Théoriquement, la taille des bandes attendues correspond à la taille des inserts en ajoutant la taille des séquences nucléotidiques spécifiques pour les sites de recombinaison.

Les résultats du PCR1 obtenus correspondant aux prévisions, une deuxième réaction de PCR a été réalisée avec les amorces attB. De même que pour la PCR1, les produits de PCR2 ont été déposés sur un gel d'agarose (Figure R.IV.4). Le tableau VIII montre que les tailles des bandes estimées correspondent aux tailles des bandes attendues selon les séquences nucléotidiques des amorces attB1 et B2.

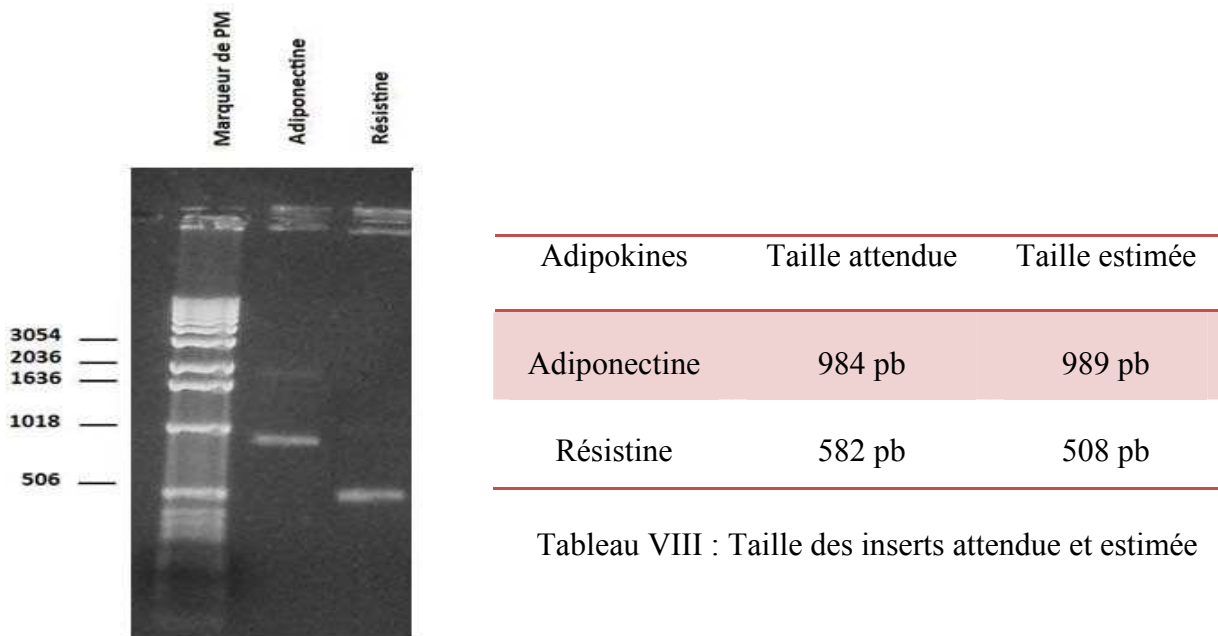


Tableau VIII : Taille des inserts attendue et estimée

Figure R.IV.4 : Photos du gel d'agarose des produits PCR2

Après vérification des produits de PCR2 sur gel, ceux-ci sont récupérés du gel pour être purifiés. La purification sert à éliminer l'excès d'amorces libres susceptibles de réagir dans l'étape de recombinaison. Les produits de PCR2 purifiés ont ensuite été contrôlés sur un gel d'agarose 0,8% afin de vérifier l'élimination des amorces puis envoyés à séquencer (Genoscreen, Lille). La vérification des séquences confirmant que les bons inserts ont été obtenus, ils seront ensuite utilisés pour la recombinaison spécifique avec le vecteur d'entrée (pDONR 221) contenant les sites de recombinaison attP et les gènes de sélection, ccdB (gène

de toxicité) et KanR (gène résistance au kanamycine). Des clones bactériens de ce vecteur ont été obtenus après transformation de la souche DB3 .1 d'*E.coli* qui est résistante à ce gène toxique. L'ADN a été extrait par miniprep puis contrôlés par digestion enzymatique.

L'ADN extrait des bactéries transformées avec le clone d'entrée pDONR221 et les produits de PCR purifiés des deux ADNc des adipokines ont été recombinés en présence de la BP clonase qui catalyse la recombinaison entre les sites attB et attP. Des clones de pDONR221 recombinés avec les deux ADNc d'intérêt ont été obtenus après transformation avec la souche Top10 d'*E.coli* et contrôlés par digestion. Le profil de bandes de digestion présenté dans la figure R.IV.5 et la taille des bandes estimées, avec ou sans digestion, présenté dans le tableau IX confirment la présence du vecteur attendu.

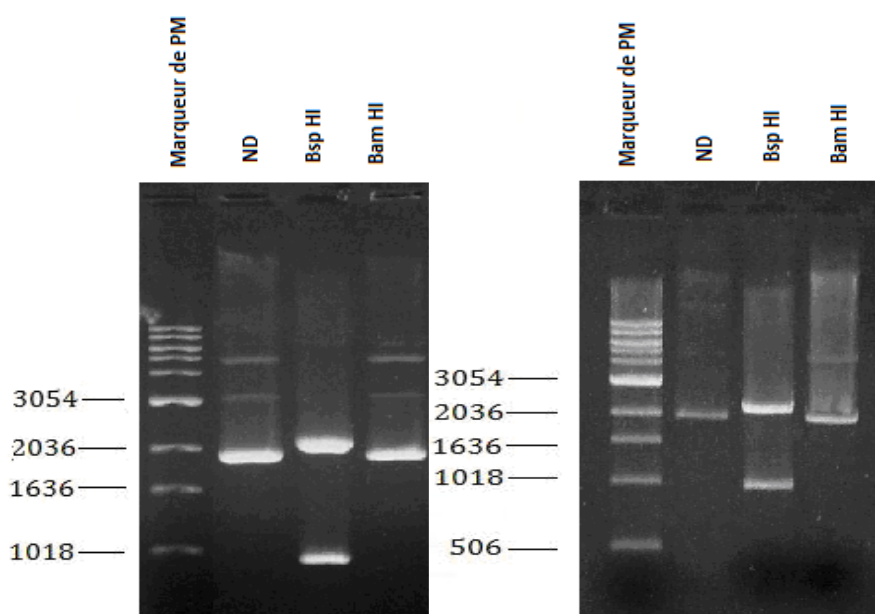


Figure R.IV.5 : Photos du gel d'agarose du pDONR 221 recombiné avec l'adiponectine (à gauche) et résistine (à droite)

Adipokines	pDONR 221 recombiné	Taille attendue	Taille estimée
Adiponectine	Non digéré	3331pb	3124 pb
	digéré avec Bsp HI	2404 pb-927 pb	2367 pb-998 pb
	digéré avec BamHI	3331 pb	3124 pb
Résistine	Non digéré	2929 pb	2086 pb
	digéré avec Bsp HI	2002 pb-927 pb	2110 pb-906 pb
	digéré avec BamHI	2929 pb	2064 pb

Tableau IX : Taille du pDONR 221 recombiné attendue et estimée

Un clone de vecteur de destination pDEST27 contenant des sites de recombinaison attR et les gènes de sélection, ccdB (gène de toxicité) et Amp^R (gène résistance à l'ampicilline), a été obtenu après la transformation avec la souche DB3.1 d'*E.coli*. Les ADN extraits des clones bactériens pDONR221 modifiés ont ensuite été incubés avec le vecteur de destination pDEST27 en présence de la LR clonase qui catalyse la recombinaison entre les sites attL et attR. Cette étape permet de transférer les séquences codantes des deux adipokines dans le vecteur d'expression eucaryote pDEST27. Plusieurs clones de pDEST27 recombinaison avec l'adiponectine et la résistine ont ainsi été obtenus après transformation avec la souche Top10 d'*E.coli*. Les ADN ont été extraits par miniprep et contrôlés par digestion enzymatique puis envoyés au Genoscreen afin de vérifier la présence, l'intégrité et la conversion de la phase de lecture de ces deux inserts par séquençage. Les résultats du séquençage montrent que la recombinaison n'a pas eu lieu.

IV.4. Conclusion :

Ce projet est en cours de réalisation. Jusqu'à présent, nous avons réalisé le sous clonage de l'adiponectine et de la résistine dans un vecteur d'expression eucaryote. A partir de ces vecteurs, les lignées microgliales pourront être transfectés. Après transfection, ces constructions permettront d'étudier les effets de la surexpression de l'adiponectine et de la résistine sur les microglies testés en condition normale et en condition inflammatoire. *In vivo*, Nous avons commencé à étudier l'effet du TMT sur l'adiponectine et nous avons observé que le TMT commence à induire l'expression de l'adiponectine à partir de 3 jours d'exposition et augmente de façon significative à 8 jours (Fig R.IV.6). Ceci suggère que l'adiponectine peut intervenir dans la réparation du SNC. Cette étude devrait permettre une meilleure compréhension de l'influence du tissu adipeux sur le SNC et donc de la relation entre l'obésité et les maladies neurodégénératives.

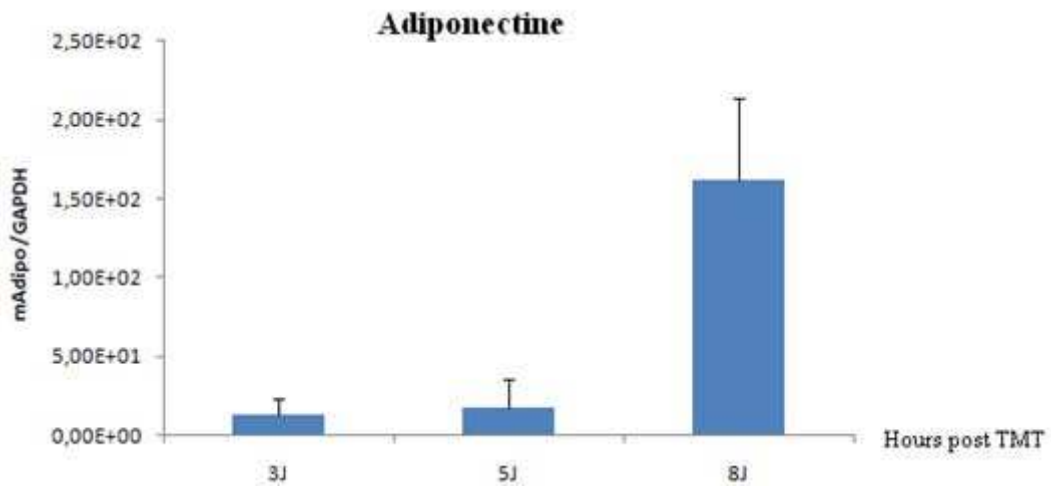


Figure R.IV.6 : Effet du TMT sur l'adiponectine chez la souris



*Conclusions et
Perspectives*

Reconnue comme une maladie par l'OMS, l'obésité représente le facteur de risque majeur dans l'apparition de nombreuses pathologies morbides, telle les maladies cardiaques, le diabète, les attaques cérébrales et le cancer. Il est maintenant reconnu que toutes ces pathologies prennent naissance après que l'inflammation chronique se soit déclarée au sein même du tissu adipeux. La relation entre obésité, inflammation chronique et pathologies a été démontrée pour certaines maladies. Cependant, il existe peu de données concernant les interactions entre le tissu adipeux et la susceptibilité CNS à des traumatismes.

Dans la première partie du manuscrit, nous avons apporté des nouveaux éléments sur le rôle de l'ATX au niveau du SNC, notamment dans les microglies. L'ATX est une lysophospholipase D sécrétée par le TA et impliquée de nombreux effets biologiques grâce à son activité enzymatique et à la synthèse de LPA. Nous avons démontré que l'ATX est impliqué d'une part dans la réponse microgliales à un stress oxydant, et d'autre part dans la réponse inflammatoire microgliales.

En ce qui concerne le rôle de l'ATX dans les cellules microgliales soumis à un stress oxydatif, nous avons montré que la surexpression de l'ATX protège les microglies contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elle bloque aussi l'augmentation de CD11b induite par H_2O_2 à la surface des microglies. Par ailleurs, l'ATX réduit fortement les ROS médiée par activation microgliale (Fig. V).

En ce qui concerne le rôle de l'ATX dans les cellules microgliales soumises à une inflammation, nous avons montré que la surexpression de l'ATX bloque l'induction de CD11b, CD14, CD80 et CD86 induits par le LPS à la surface des microglies. Elle inhibe l'activation NF-kB induite par le LPS et diminue l'expression de $TNF\alpha$ et d'IL-6 dans les microglies. Cette diminution a été également observée en utilisant une autre stimulation de l'inflammation, le TMT (Fig. V).

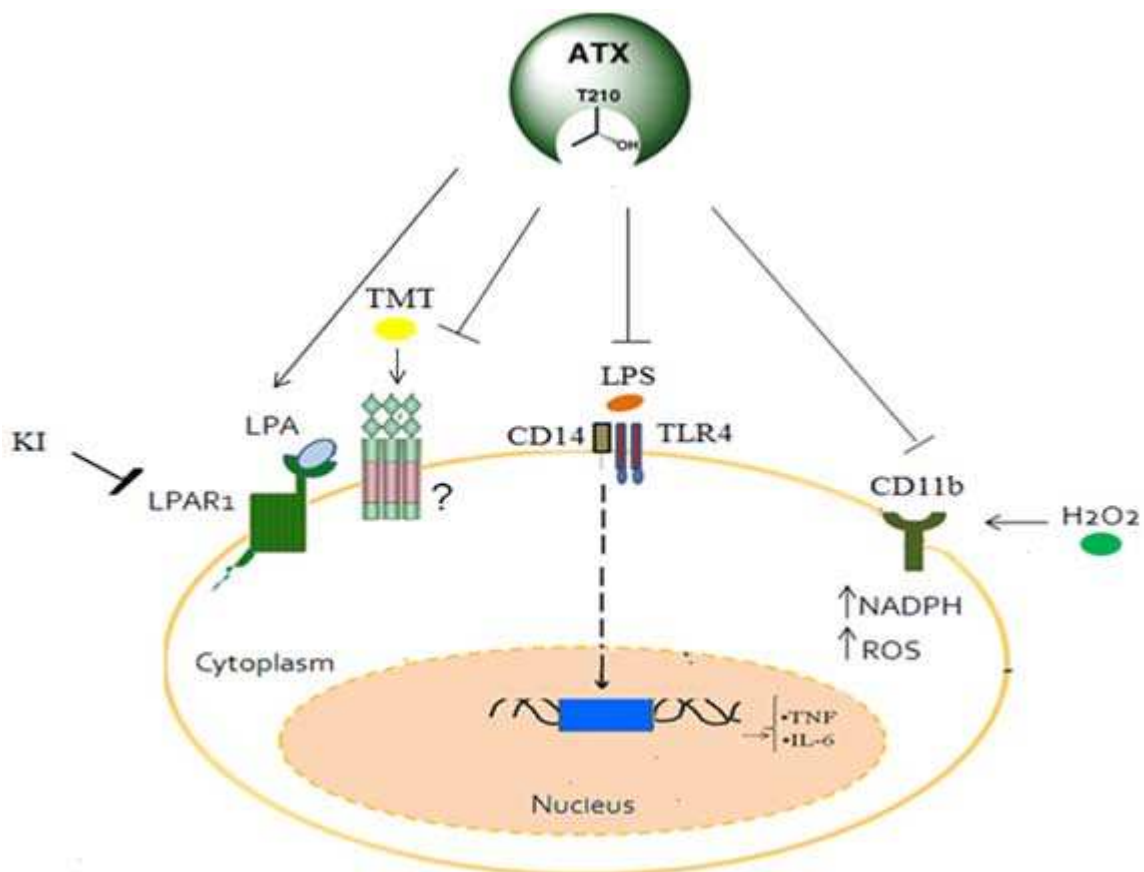


Figure V : Effet de l'ATX sur les microglies

Chez la souris, le TMT induit une réponse inflammatoire au niveau du SNC et provoque une lésion très localisée dans l'hippocampe. Les microglies et le TNF α sont impliqués dans les lésions induites par le TMT et nous avons regardé l'implication de l'ATX après une injection i.p. de TMT chez les souris CD1. Nous avons observé que le TMT induit l'expression d'ATX après 5 jours d'exposition. Ce qui suggère un rôle important de l'ATX dans la régulation de l'homéostasie du SNC ainsi que dans la neuroinflammation.

Nos résultats montrent clairement et pour la première fois un rôle anti-oxydant et anti-inflammatoire de l'ATX dans les microglies.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour l'ATX, dans le cadre d'une exploitation thérapeutique de la molécule, chez les sujets atteints d'une maladie neurodégénérative par exemple, en guise de prévention contre le stress oxydatif et l'inflammation. Mais avant d'envisager une telle destinée, il est primordial de clarifier les mécanismes d'action de l'ATX.

Il serait aussi intéressant d'investiguer l'effet de l'ATX dans des souris surexprimant l'ATX ou déficientes en ATX en présence de modèle de neurodégénérescence induite. La surexpression pourrait avoir un effet protecteur, alors que la déficiente pourrait induire une susceptibilité accrue. Les souris KO pour l'ATX étant létal à environ E10, on peut envisager de créer des souris déficientes conditionnelles ou tissus spécifiques. L'obtention de telles souris étant difficile, une autre approche pourrait consister à traiter les souris avec de l'ATX ou un inhibiteur de l'ATX par injection stéréotaxique.

Dans la deuxième partie du manuscrit, nous avons étudié l'effet des TMT sur le tissu adipeux aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Nos résultats montrent que le TMT induit une réponse inflammatoire dans deux types cellulaires du TA : adipocytes et macrophages ainsi que dans le TA de souris obèse ob/ob. Ce qui suggère un rôle du TA dans l'augmentation du niveau de l'inflammation en affectant la vulnérabilité du SNC à des traumatismes. Pour compléter ces études, il était intéressant de regarder la réponse microgliales aux adipokines. Les connaissances actuelles concernant la leptine nous indiquent qu'elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique du SNC et agir dans le contrôle de l'appétit et permettre une libération de cytokines pro-inflammatoires par l'activation de la voie NF- κ B dans les microglies. Quant à l'adiponectine et la résistine, leurs effets sur les microglies n'ont pas encore été étudiés. L'expression des récepteurs de l'adiponectine a été démontrée dans le cerveau, alors qu'aucune donnée n'est disponible pour le récepteur de la résistine qui reste inconnu. Pour cela, nous avons sous-cloné les ADNc de ces deux adipokines dans des vecteurs d'expression eucaryote.

Nos travaux dans ce projet se poursuivent afin de transfecter ces constructions dans les cellules microgliales et d'étudier les effets de la surexpression de ces deux adipokines sur les microglies en condition normale, en condition inflammatoire et de stress oxydatif.

Nous nous sommes concentrés dans ce travail sur les cellules microgliales. Les autres cellules gliales ont également une grande importance pour maintenir l'homéostasie au sein du SNC. Les constructions d'adipokines étant disponibles, il serait intéressant d'étudier la réponse des astrocytes et des oligodendrocytes à des stress dans des conditions de surexpression de ces adipokines.

Il serait aussi intéressant de regarder les effets des adipokines dans des cultures primaires de cellules gliales mixtes de cerveau de souris. En effet les résultats préliminaires sur la leptine en utilisant des cultures gliales murines suggèrent que la leptine pourrait avoir des effets opposés sur l'expression de facteurs inflammatoires.

Enfin, il serait intéressant d'appuyer cette hypothèse *in vivo* dans des souris obèses ob/ob en présence de modèle de neurodégénérescence induite.

Ce travail pourra nous permettre de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de la neurodégénérescence et de leur relation avec la réponse inflammatoire du tissu adipeux ainsi que de l'influence du tissu adipeux sur le SNC. Il contribuera à comprendre la relation entre l'obésité et les maladies neurodégénératives afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.



*Références
bibliographiques*

1. Bray, G.A., *Obesity--a disease of nutrient or energy balance?* Nutr Rev, 1987. **45**(2): p. 33-43.
2. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.* World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
3. Papavramidou, N.S., S.T. Papavramidis, and H. Christopoulou-Aletra, *Galen on obesity: etiology, effects, and treatment.* World J Surg, 2004. **28**(6): p. 631-5.
4. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome.* Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
5. Shen, W., et al., *Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification.* Obes Res, 2003. **11**(1): p. 5-16.
6. Prentice, A.M., *The emerging epidemic of obesity in developing countries.* Int J Epidemiol, 2006. **35**(1): p. 93-9.
7. Flegal, K.M., et al., *Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008.* JAMA. **303**(3): p. 235-41.
8. Charles, M.A., E. Eschwege, and A. Basdevant, *Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(9): p. 2182-6.
9. Favier, F., et al., *Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Reunion Island, the REDIA Study.* Diabetes Res Clin Pract, 2005. **67**(3): p. 234-42.
10. Wells, J.C., *The evolution of human fatness and susceptibility to obesity: an ethological approach.* Biol Rev Camb Philos Soc, 2006. **81**(2): p. 183-205.
11. Perusse, L., et al., *The human obesity gene map: the 1998 update.* Obes Res, 1999. **7**(1): p. 111-29.
12. Suh, J.M., et al., *Adipose is a conserved dosage-sensitive antiobesity gene.* Cell Metab, 2007. **6**(3): p. 195-207.
13. Frayling, T.M., et al., *A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity.* Science, 2007. **316**(5826): p. 889-94.
14. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
15. Chua, S.C., Jr., et al., *Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor.* Science, 1996. **271**(5251): p. 994-6.
16. Bouchard, C., *The biological predisposition to obesity: beyond the thrifty genotype scenario.* Int J Obes (Lond), 2007. **31**(9): p. 1337-9.
17. Ley, R.E., *Obesity and the human microbiome.* Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(1): p. 5-11.
18. Colmers, W.F., *What makes people fat? View from the chair.* Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 5**: p. 190S-191S.

19. Shrewsbury, V. and J. Wardle, *Socioeconomic status and adiposity in childhood: a systematic review of cross-sectional studies 1990-2005*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(2): p. 275-84.
20. Ravanan, et al., *Influence de l'obésité sur les phénomènes neurodégénératifs*. Vol. 3. 2008, Paris, FRANCE: Springer. 6.
21. Balkau, B., et al., *International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries*. Circulation, 2007. **116**(17): p. 1942-51.
22. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
23. Calle, E.E. and R. Kaaks, *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 579-91.
24. Reeves, G.K., et al., *Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study*. BMJ, 2007. **335**(7630): p. 1134.
25. Berrington de Gonzalez, A., et al., *Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults*. N Engl J Med, 2010. **363**(23): p. 2211-9.
26. Whitmer, R.A., *The epidemiology of adiposity and dementia*. Curr Alzheimer Res, 2007. **4**(2): p. 117-22.
27. Gustafson, D., et al., *An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease*. Arch Intern Med, 2003. **163**(13): p. 1524-8.
28. Kalmijn, S., *Fatty acid intake and the risk of dementia and cognitive decline: a review of clinical and epidemiological studies*. J Nutr Health Aging, 2000. **4**(4): p. 202-7.
29. Molteni, R., et al., *A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning*. Neuroscience, 2002. **112**(4): p. 803-14.
30. Zhang, X., et al., *High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex*. Exp Neurol, 2005. **191**(2): p. 318-25.
31. Qin, L., et al., *Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration*. Glia, 2007. **55**(5): p. 453-62.
32. Gustafson, D., et al., *A 24-year follow-up of body mass index and cerebral atrophy*. Neurology, 2004. **63**(10): p. 1876-81.
33. Gustafson, D.R., B. Steen, and I. Skoog, *Body mass index and white matter lesions in elderly women. An 18-year longitudinal study*. Int Psychogeriatr, 2004. **16**(3): p. 327-36.
34. Ward, M.A., et al., *The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study*. BMC Neurol, 2005. **5**: p. 23.
35. Pannacciulli, N., et al., *Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study*. Neuroimage, 2006. **31**(4): p. 1419-25.
36. Haltia, L.T., et al., *Brain white matter expansion in human obesity and the recovering effect of dieting*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(8): p. 3278-84.
37. DeBette, S., et al., *Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults*. Ann Neurol, 2010. **68**(2): p. 136-44.
38. Ho, A.J., et al., *A commonly carried allele of the obesity-related FTO gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(18): p. 8404-9.
39. Kurth, T., et al., *Body mass index and the risk of stroke in men*. Arch Intern Med, 2002. **162**(22): p. 2557-62.
40. Popa-Wagner, A., et al., *The response of the aged brain to stroke: too much, too soon?* Curr Neurovasc Res, 2007. **4**(3): p. 216-27.

41. Rexrode, K.M., et al., *A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women*. JAMA, 1997. **277**(19): p. 1539-45.
42. Brown, C.V., et al., *Obesity and traumatic brain injury*. J Trauma, 2006. **61**(3): p. 572-6.
43. Wang, G.J., et al., *Brain dopamine and obesity*. Lancet, 2001. **357**(9253): p. 354-7.
44. Ahima, R.S., *Adipose tissue as an endocrine organ*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 5**: p. 242S-249S.
45. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
46. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(2): p. E444-52.
47. van Marken Lichtenbelt, W.D., et al., *Cold-activated brown adipose tissue in healthy men*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1500-8.
48. Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9850-5.
49. Hauner, H., *Secretory factors from human adipose tissue and their functional role*. Proc Nutr Soc, 2005. **64**(2): p. 163-9.
50. Cho, C.H., et al., *Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. e47-57.
51. Bowers, R.R., et al., *Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(6): p. R1167-75.
52. Penicaud, L., et al., *The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 903-8.
53. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2000. **21**(6): p. 697-738.
54. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
55. Despres, J.P., et al., *Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(6): p. 1039-49.
56. Rodriguez, A.M., et al., *The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 125-8.
57. Boone, C., et al., *The adipose conversion process: regulation by extracellular and intracellular factors*. Reprod Nutr Dev, 2000. **40**(4): p. 325-58.
58. Casteilla, et al., *Plasticité et potentiel angiogénique des cellules des tissus adipeux : perspectives physiologiques et thérapeutiques*. Vol. 17. 2005, Montrouge, FRANCE: John Libbey Eurotext. 8.
59. Koutnikova, H. and J. Auwerx, *Regulation of adipocyte differentiation*. Ann Med, 2001. **33**(8): p. 556-61.
60. Ailhaud, G., *Adipose tissue as an endocrine organ*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 2**: p. S1-3.
61. Scherer, P.E., *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1537-45.
62. Aldhahi, W. and O. Hamdy, *Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes*. Curr Diab Rep, 2003. **3**(4): p. 293-8.
63. Rodbell, M., *METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 375-80.

64. Cook, K.S., et al., *A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(19): p. 6480-4.
65. Bouloumie, A., et al., *Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(4): p. 347-54.
66. Bourlier, V., et al., *Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages*. Circulation, 2008. **117**(6): p. 806-15.
67. Zeyda, M., et al., *Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(9): p. 1420-8.
68. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
69. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
70. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
71. Hevener, A.L., et al., *Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1658-69.
72. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1116-20.
73. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
74. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
75. Caspar-Bauguil, S., et al., *Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity*. FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3487-92.
76. Duffaut, C., et al., *Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1608-14.
77. Nishimura, S., et al., *CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 914-20.
78. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol. **11**(2): p. 85-97.
79. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 930-9.
80. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
81. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(2): p. 286-9.
82. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem, 1996. **120**(4): p. 803-12.
83. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
84. Shapiro, L. and P.E. Scherer, *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor*. Curr Biol, 1998. **8**(6): p. 335-8.

85. Pineiro, R., et al., *Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes*. FEBS Lett, 2005. **579**(23): p. 5163-9.
86. Whitehead, J.P., et al., *Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2006. **8**(3): p. 264-80.
87. Waki, H., et al., *Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 790-6.
88. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1784-92.
89. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
90. Matsuzawa, Y., *The metabolic syndrome and adipocytokines*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2917-21.
91. Fasshauer, M., et al., *Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(4): p. 1045-50.
92. Maeda, N., et al., *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 731-7.
93. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
94. Civitarese, A.E., et al., *Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 816-20.
95. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
96. Berg, A.H., T.P. Combs, and P.E. Scherer, *ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(2): p. 84-9.
97. Pajvani, U.B., et al., *Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12152-62.
98. Combs, T.P., et al., *A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity*. Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 367-83.
99. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. Circulation, 1999. **100**(25): p. 2473-6.
100. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 772-83.
101. Saijo, S., et al., *Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1180-3.
102. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
103. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
104. Fry, M., et al., *Area postrema neurons are modulated by the adipocyte hormone adiponectin*. J Neurosci, 2006. **26**(38): p. 9695-702.
105. Kos, K., et al., *Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1129-36.

106. Qi, Y., et al., *Adiponectin acts in the brain to decrease body weight*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 524-9.
107. Pellemounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
108. Weigle, D.S., et al., *Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 2065-70.
109. Maffei, M., et al., *Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6957-60.
110. La Cava, A. and G. Matarese, *The weight of leptin in immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 371-9.
111. Kalra, S.P., et al., *Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight*. Endocr Rev, 1999. **20**(1): p. 68-100.
112. Zigman, J.M. and J.K. Elmquist, *Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3749-56.
113. Elefteriou, et al., *Régulation de la masse osseuse par la leptine : un contrôle hypothalamique de la formation osseuse*. Vol. 52. 2004, Paris, FRANCE: Elsevier. 6.
114. Sarraf, P., et al., *Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 171-5.
115. Gainsford, T., et al., *Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14564-8.
116. Tian, Z., et al., *Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(3): p. 297-302.
117. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
118. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
119. Fantuzzi, G. and R. Faggioni, *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(4): p. 437-46.
120. Busso, N., et al., *Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 875-82.
121. Harvey, J., et al., *Leptin: a potential cognitive enhancer?* Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 1029-32.
122. Patel, S.D., et al., *Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1154-8.
123. Kusminski, C.M., P.G. McTernan, and S. Kumar, *Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(3): p. 243-56.
124. Gil, A., et al., *Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity*. Br J Nutr, 2007. **98 Suppl 1**: p. S121-6.
125. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 307-12.
126. Adeghate, E., *An update on the biology and physiology of resistin*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2485-96.
127. Lago, F., et al., *The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 313-25.
128. Nagaev, I., et al., *Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes*. PLoS One, 2006. **1**: p. e31.

129. Kaser, S., et al., *Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **309**(2): p. 286-90.
130. Lehrke, M., et al., *An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans*. *PLoS Med*, 2004. **1**(2): p. e45.
131. Bajaj, M., et al., *Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28**(6): p. 783-9.
132. Fain, J.N., S.W. Bahouth, and A.K. Madan, *TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28**(4): p. 616-22.
133. Kern, P.A., et al., *The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(5): p. 2111-9.
134. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 in biology and medicine*. *Adv Immunol*, 1993. **54**: p. 1-78.
135. Akira, S., et al., *Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6*. *Ciba Found Symp*, 1992. **167**: p. 47-62; discussion 62-7.
136. Fontana, L., et al., *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 1010-3.
137. Mohamed-Ali, V., et al., *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(12): p. 4196-200.
138. Bastard, J.P., et al., *Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(9): p. 3338-42.
139. Bastard, J.P., et al., *Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(5): p. 2084-9.
140. Wallenius, V., et al., *Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity*. *Nat Med*, 2002. **8**(1): p. 75-9.
141. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
142. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 263-74.
143. Glocker, E.O., et al., *Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(21): p. 2033-45.
144. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, *NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(10): p. 542-50.
145. Gijssbers, R., et al., *The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site*. *FEBS Lett*, 2003. **538**(1-3): p. 60-4.
146. Stracke, M.L., et al., *Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(4): p. 2524-9.
147. Mori, K., et al., *Submucosal connective tissue-type mast cells contribute to the production of lysophosphatidic acid (LPA) in the gastrointestinal tract through the secretion of autotaxin (ATX)/lysophospholipase D (lysoPLD)*. *Virchows Arch*, 2007. **451**(1): p. 47-56.
148. Ferry, G., et al., *Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18162-9.

149. Tokumura, A., et al., *Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39436-42.
150. Umezū-Goto, M., et al., *Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production*. J Cell Biol, 2002. **158**(2): p. 227-33.
151. Ohkawa, R., et al., *Lysophospholipase D activity exists in the urine to catalyse the formation of lysophosphatidic acid*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(12): p. 3612-3.
152. Tokumura, A., et al., *Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity*. Life Sci, 2007. **80**(18): p. 1641-9.
153. Sato, K., et al., *Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources*. J Neurochem, 2005. **92**(4): p. 904-14.
154. Hammack, B.N., et al., *Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid*. Mult Scler, 2004. **10**(3): p. 245-60.
155. Mazereeuw-Hautier, J., et al., *Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(3): p. 421-7.
156. Nishimasu, H., et al., *Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 205-12.
157. Goding, J.W., B. Grobbs, and H. Slegers, *Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(1): p. 1-19.
158. Koh, E., et al., *Site-directed mutations in the tumor-associated cytokine, autotaxin, eliminate nucleotide phosphodiesterase, lysophospholipase D, and motogenic activities*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2042-5.
159. Cimpean, A., et al., *Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 1): p. 71-7.
160. Lee, H.Y., et al., *Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(3): p. 714-9.
161. Murata, J., et al., *cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30479-84.
162. Fuss, B., et al., *Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function*. J Neurosci, 1997. **17**(23): p. 9095-103.
163. Kawagoe, H., et al., *Expression and transcriptional regulation of the PD-1alpha/autotaxin gene in neuroblastoma*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2516-21.
164. Tsuda, S., et al., *Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26081-8.
165. Clair, T., et al., *Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 996-1001.
166. Tokumura, A., et al., *Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma*. Biochim Biophys Acta, 1986. **875**(1): p. 31-8.
167. Clair, T., et al., *Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5446-53.

168. Saulnier-Blache, J.S., et al., *A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification*. J Lipid Res, 2000. **41**(12): p. 1947-51.
169. Bektas, M., et al., *A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells*. J Cell Biol, 2005. **169**(5): p. 801-11.
170. Nakajima, K., et al., *A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11329-35.
171. Tigyi, G. and R. Mileedi, *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21360-7.
172. Sugiura, T., et al., *Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2049-55.
173. Mettu, P.S., et al., *Role of lysophospholipid growth factors in the modulation of aqueous humor outflow facility*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(7): p. 2263-71.
174. Fourcade, O., et al., *Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells*. Cell, 1995. **80**(6): p. 919-27.
175. Aoki, J., et al., *Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48737-44.
176. Sano, T., et al., *Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21197-206.
177. Aoki, J., *Mechanisms of lysophosphatidic acid production*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(5): p. 477-89.
178. Croset, M., et al., *Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat*. Biochem J, 2000. **345 Pt 1**: p. 61-7.
179. van Meeteren, L.A., et al., *Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21155-61.
180. Albers, H.M., et al., *Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(16): p. 7257-62.
181. McIntyre, T.M., et al., *Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 131-6.
182. An, S., et al., *Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7906-10.
183. Bandoh, K., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27776-85.
184. Hecht, J.H., et al., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1071-83.
185. An, S., et al., *Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(3): p. 619-22.
186. Contos, J.J., et al., *Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2)*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(19): p. 6921-9.

187. Fitzgerald, L.R., et al., *Identification of an EDG7 variant, HOFNH30, a G-protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **273**(3): p. 805-10.
188. Contos, J.J. and J. Chun, *The mouse lp(A3)/Edg7 lysophosphatidic acid receptor gene: genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern*. *Gene*, 2001. **267**(2): p. 243-53.
189. Mills, G.B. and W.H. Moolenaar, *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(8): p. 582-91.
190. Anliker, B. and J. Chun, *Lysophospholipid G protein-coupled receptors*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(20): p. 20555-8.
191. Meyer zu Heringdorf, D. and K.H. Jakobs, *Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 923-40.
192. Gobeil, F., Jr., et al., *Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 38875-83.
193. Moughal, N.A., et al., *Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells*. *Cell Signal*, 2004. **16**(1): p. 127-36.
194. Contos, J.J., et al., *Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13384-9.
195. Ye, X., et al., *LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing*. *Nature*, 2005. **435**(7038): p. 104-8.
196. Harrison, S.M., et al., *LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease*. *Mol Cell Neurosci*, 2003. **24**(4): p. 1170-9.
197. Roberts, C., et al., *Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia*. *Neurochem Res*, 2005. **30**(3): p. 371-7.
198. Noguchi, K., S. Ishii, and T. Shimizu, *Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(28): p. 25600-6.
199. Lee, C.W., et al., *GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(33): p. 23589-97.
200. Kotarsky, K., et al., *Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **318**(2): p. 619-28.
201. Tabata, K., et al., *The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **363**(3): p. 861-6.
202. Murakami, M., et al., *Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **371**(4): p. 707-12.
203. Ishii, S., K. Noguchi, and K. Yanagida, *Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2009. **89**(3-4): p. 57-65.
204. Lynch, K.R., *Lysophospholipid receptor nomenclature*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1582**(1-3): p. 70-1.
205. Choi, J.W., et al., *LPA receptors: subtypes and biological actions*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. **50**: p. 157-86.
206. Yuan, X.B., et al., *Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(1): p. 38-45.

207. Chen, M. and K.L. O'Connor, *Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(32): p. 5125-30.
208. Song, J., et al., *Autotaxin (lysoPLD/NPP2) protects fibroblasts from apoptosis through its enzymatic product, lysophosphatidic acid, utilizing albumin-bound substrate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(3): p. 967-75.
209. Nam, S.W., et al., *Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells*. *Oncogene*, 2000. **19**(2): p. 241-7.
210. Yang, S.Y., et al., *Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2002. **19**(7): p. 603-8.
211. Zhao, H., et al., *Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues*. *J Cell Physiol*, 2007. **210**(1): p. 111-21.
212. Nam, S.W., et al., *Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6938-44.
213. Rogers, M.S., et al., *Genetic loci that control the angiogenic response to basic fibroblast growth factor*. *FASEB J*, 2004. **18**(10): p. 1050-9.
214. Kawagoe, H., et al., *Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2)*. *Genomics*, 1995. **30**(2): p. 380-4.
215. Fox, M.A., et al., *Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination*. *Mol Cell Neurosci*, 2003. **23**(3): p. 507-19.
216. Bachner, D., et al., *Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX)*. *Mech Dev*, 1999. **84**(1-2): p. 121-5.
217. van Meeteren, L.A., et al., *Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(13): p. 5015-22.
218. Tanaka, M., et al., *Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25822-30.
219. Boucher, J., et al., *Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression*. *Diabetologia*, 2005. **48**(3): p. 569-77.
220. Pages, C., et al., *Endothelial differentiation gene-2 receptor is involved in lysophosphatidic acid-dependent control of 3T3F442A preadipocyte proliferation and spreading*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 11599-605.
221. Simon, M.F., et al., *Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(15): p. 14656-62.
222. Fox, M.A., et al., *Phosphodiesterase-I alpha/autotaxin controls cytoskeletal organization and FAK phosphorylation during myelination*. *Mol Cell Neurosci*, 2004. **27**(2): p. 140-50.
223. Kehlen, A., et al., *Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(6): p. 833-8.
224. Santos, A.N., et al., *Treatment of fibroblast-like synoviocytes with IFN-gamma results in the down-regulation of autotaxin mRNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **229**(2): p. 419-24.
225. Bailey, S.L., et al., *Innate and adaptive immune responses of the central nervous system*. *Crit Rev Immunol*, 2006. **26**(2): p. 149-88.
226. Kaur, C., et al., *Origin of microglia*. *Microsc Res Tech*, 2001. **54**(1): p. 2-9.

227. Alliot, F., et al., *Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1541-5.
228. Walker, P.R., et al., *The brain parenchyma is permissive for full antitumor CTL effector function, even in the absence of CD4 T cells*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3128-35.
229. Kanzawa, T., et al., *Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines*. J Neurosci Res, 2000. **62**(3): p. 383-8.
230. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **117**(2): p. 145-52.
231. Paterson, J.A., et al., *Investigation of glial cells in semithin sections. 3. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after 3 H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats*. J Comp Neurol, 1973. **149**(1): p. 83-102.
232. Wolswijk, G., *Strongly GD3+ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage*. Glia, 1995. **13**(1): p. 13-26.
233. Fedoroff, S., R. Zhai, and J.P. Novak, *Microglia and astroglia have a common progenitor cell*. J Neurosci Res, 1997. **50**(3): p. 477-86.
234. Papavasiliou, A.K., et al., *Microglial lineage species are expressed in mammalian epidermal growth factor-generated embryonic neurospheres*. J Neurosci Res, 1996. **46**(1): p. 49-57.
235. Yokoyama, A., et al., *Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes*. Glia, 2004. **45**(1): p. 96-104.
236. Ting, J.P., et al., *Brain Ia antigens have a bone marrow origin*. Immunogenetics, 1983. **17**(3): p. 295-301.
237. Kennedy, D.W. and J.L. Abkowitz, *Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model*. Blood, 1997. **90**(3): p. 986-93.
238. Priller, J., et al., *Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1356-61.
239. Vallieres, L. and P.E. Sawchenko, *Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 5197-207.
240. Simard, A.R. and S. Rivest, *Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia*. FASEB J, 2004. **18**(9): p. 998-1000.
241. Bechmann, I., et al., *Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 647-9.
242. Hess, D.C., et al., *Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain*. Exp Neurol, 2004. **186**(2): p. 134-44.
243. Banati, R.B., et al., *A subpopulation of bone marrow-derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia*. J Neurosci Res, 1991. **30**(4): p. 593-600.
244. Servet-Delprat, C., et al., *Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia*. BMC Immunol, 2002. **3**: p. 15.

245. Davoust, N., et al., *Bone marrow CD34⁺/B220⁺ progenitors target the inflamed brain and display in vitro differentiation potential toward microglia*. *FASEB J*, 2006. **20**(12): p. 2081-92.
246. Takahashi, K., F. Yamamura, and M. Naito, *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study*. *J Leukoc Biol*, 1989. **45**(2): p. 87-96.
247. Flugel, A., et al., *Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy*. *J Neurosci Res*, 2001. **66**(1): p. 74-82.
248. Sievers, J., R. Parwaresch, and H.U. Wottge, *Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology*. *Glia*, 1994. **12**(4): p. 245-58.
249. Schmidt Mayer, J., et al., *Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents*. *Glia*, 1994. **12**(4): p. 259-67.
250. Leone, C., et al., *Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells*. *Glia*, 2006. **54**(3): p. 183-92.
251. Ransohoff, R.M. and A.E. Cardona, *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 253-62.
252. Ransohoff, R.M. and V.H. Perry, *Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 119-45.
253. Lawson, L.J., et al., *Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain*. *Neuroscience*, 1990. **39**(1): p. 151-70.
254. Mittelbronn, M., et al., *Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude*. *Acta Neuropathol*, 2001. **101**(3): p. 249-55.
255. Giulian, D. and T.J. Baker, *Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain*. *J Neurosci*, 1986. **6**(8): p. 2163-78.
256. Husemann, J., et al., *Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system*. *Glia*, 2002. **40**(2): p. 195-205.
257. Dalmau, I., et al., *Dynamics of microglia in the developing rat brain*. *J Comp Neurol*, 2003. **458**(2): p. 144-57.
258. Ferrer, I., et al., *Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes*. *Neuroscience*, 1990. **39**(2): p. 451-8.
259. Marin-Teva, J.L., et al., *Microglia promote the death of developing Purkinje cells*. *Neuron*, 2004. **41**(4): p. 535-47.
260. Rabchevsky, A.G. and W.J. Streit, *Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth*. *J Neurosci Res*, 1997. **47**(1): p. 34-48.
261. Pennell, N.A. and W.J. Streit, *Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization*. *Cell Transplant*, 1997. **6**(3): p. 221-30.
262. Floden, A.M. and C.K. Combs, *Beta-amyloid stimulates murine postnatal and adult microglia cultures in a unique manner*. *J Neurosci*, 2006. **26**(17): p. 4644-8.
263. Vilhardt, F., *Microglia: phagocyte and glia cell*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(1): p. 17-21.
264. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science*, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.

265. Ladeby, R., et al., *Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(2): p. 196-206.
266. Kato, H., A. Takahashi, and Y. Itoyama, *Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat*. Brain Res Bull, 2003. **60**(3): p. 215-21.
267. Ponomarev, E.D., L.P. Shriver, and B.N. Dittel, *CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1402-10.
268. Jack, C.S., et al., *TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4320-30.
269. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
270. Streit, W.J., *Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date?* Trends Neurosci, 2006. **29**(9): p. 506-10.
271. Streit, W.J., *Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis*. J Neurosci Res, 2004. **77**(1): p. 1-8.
272. Rock, R.B., et al., *Role of microglia in central nervous system infections*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(4): p. 942-64, table of contents.
273. Olson, J.K., A.M. Girvin, and S.D. Miller, *Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9780-9.
274. Stoll, G., S. Jander, and M. Schroeter, *Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions*. Prog Neurobiol, 1998. **56**(2): p. 149-71.
275. Giulian, D., *Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(1): p. 13-8.
276. Heppner, F.L., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 146-52.
277. Ponomarev, E.D., et al., *Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity*. J Neurosci Res, 2005. **81**(3): p. 374-89.
278. Minas, K. and J. Liversidge, *Is the CD200/CD200 receptor interaction more than just a myeloid cell inhibitory signal?* Crit Rev Immunol, 2006. **26**(3): p. 213-30.
279. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. **111**(7): p. 927-30.
280. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(1): p. 57-69.
281. Platt, N., et al., *Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12456-60.
282. El Khoury, J., et al., *Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1998. **19**(1 Suppl): p. S81-4.
283. Platt, N., R.P. da Silva, and S. Gordon, *Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells*. Immunol Lett, 1999. **65**(1-2): p. 15-9.
284. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, *Scavenger receptors in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 123-8.
285. Mukhopadhyay, S. and S. Gordon, *The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity*. Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 39-49.
286. Alarcon, R., et al., *Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30406-15.

287. El Khoury, J., et al., *Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 716-9.
288. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *The Toll receptor family and microbial recognition*. Trends Microbiol, 2000. **8**(10): p. 452-6.
289. Akira, S., *Mammalian Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(1): p. 5-11.
290. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and acquired immunity*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 23-6.
291. Muzio, M., et al., *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5998-6004.
292. Visintin, A., et al., *Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 249-55.
293. Hoshino, K., et al., *Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation*. Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1225-31.
294. Bellocchio, S., et al., *TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7406-15.
295. Mitsui, H., et al., *Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(1): p. 95-102.
296. Sabroe, I., S.K. Dower, and M.K. Whyte, *The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S421-6.
297. Sivori, S., et al., *Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(4): p. 961-7.
298. Sobek, V., et al., *Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(5): p. R433-46.
299. Caron, G., et al., *Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1551-7.
300. Dasari, P., et al., *Expression of toll-like receptors on B lymphocytes*. Cell Immunol, 2005. **236**(1-2): p. 140-5.
301. Peng, S.L., *Signaling in B cells via Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 230-6.
302. Bes-Houtmann, S., et al., *Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(2): p. 131-7.
303. Prehaud, C., et al., *Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12893-904.
304. Ma, Y., et al., *Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis*. J Cell Biol, 2006. **175**(2): p. 209-15.
305. Wadachi, R. and K.M. Hargreaves, *Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection*. J Dent Res, 2006. **85**(1): p. 49-53.
306. McKimmie, C.S. and J.K. Fazakerley, *In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression*. J Neuroimmunol, 2005. **169**(1-2): p. 116-25.
307. Olson, J.K. and S.D. Miller, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3916-24.
308. Janssens, S. and R. Beyaert, *A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(9): p. 474-82.

309. Dalpke, A.H., et al., *Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4854-63.
310. Oda, K. and H. Kitano, *A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network*. Mol Syst Biol, 2006. **2**: p. 2006 0015.
311. Trudler, D., D. Farfara, and D. Frenkel, *Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application*. Mediators Inflamm. **2010**.
312. Kato, H., et al., *Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat*. Brain Res, 1996. **734**(1-2): p. 203-12.
313. Rotshenker, S., *Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease*. J Mol Neurosci, 2003. **21**(1): p. 65-72.
314. Ehlers, M.R., *CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 289-94.
315. Gasque, P., et al., *Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS*. Immunopharmacology, 2000. **49**(1-2): p. 171-86.
316. Aloisi, F., et al., *Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1705-12.
317. Fischer, H.G., et al., *Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function*. J Neuroimmunol, 1993. **42**(1): p. 87-95.
318. Re, F., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2264-73.
319. Hooper, C., D.L. Taylor, and J.M. Pocock, *Pure albumin is a potent trigger of calcium signalling and proliferation in microglia but not macrophages or astrocytes*. J Neurochem, 2005. **92**(6): p. 1363-76.
320. Inoue, K., *Microglial activation by purines and pyrimidines*. Glia, 2002. **40**(2): p. 156-63.
321. Noda, M., et al., *AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia*. J Neurosci, 2000. **20**(1): p. 251-8.
322. Charles, K.J., et al., *GABA B receptor subunit expression in glia*. Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(1): p. 214-23.
323. Farber, K., U. Pannasch, and H. Kettenmann, *Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells*. Mol Cell Neurosci, 2005. **29**(1): p. 128-38.
324. Broderick, C., et al., *Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis*. Am J Pathol, 2002. **161**(5): p. 1669-77.
325. Chao, C.C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures*. Clin Immunol Immunopathol, 1995. **77**(3): p. 358-65.
326. da Cunha, A., et al., *Transforming growth factor-beta1 in adult human microglia and its stimulated production by interleukin-1*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(11): p. 655-64.
327. Jander, S., et al., *Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system*. Am J Pathol, 1998. **152**(4): p. 975-82.

328. Aloisi, F., et al., *Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities*. J Neurosci Res, 1999. **56**(6): p. 571-80.
329. Lefebvre d'Hellencourt, C., et al., *Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line*. J Neurosci Res, 2003. **71**(4): p. 575-82.
330. Neveu, I., et al., *Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by rat brain macrophages in vitro*. J Neurosci Res, 1994. **38**(2): p. 214-20.
331. Neveu, I., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes*. Neuroreport, 1994. **6**(1): p. 124-6.
332. Neveu, I., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **24**(1-4): p. 70-6.
333. Naveilhan, P., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor*. Neuroreport, 1996. **7**(13): p. 2171-5.
334. Davies, C.A., et al., *The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 1999. **19**(1): p. 87-98.
335. Basu, A., et al., *Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized*. Glia, 2002. **40**(1): p. 109-20.
336. Basu, A., J.K. Krady, and S.W. Levison, *Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation*. J Neurosci Res, 2004. **78**(2): p. 151-6.
337. Kuno, R., et al., *Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha*. J Neuroimmunol, 2005. **162**(1-2): p. 89-96.
338. Cacci, E., J.H. Claasen, and Z. Kokaia, *Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro*. J Neurosci Res, 2005. **80**(6): p. 789-97.
339. Bruce, A.J., et al., *Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors*. Nat Med, 1996. **2**(7): p. 788-94.
340. Nicholas, R.S., et al., *Microglia-derived IGF-2 prevents TNFalpha induced death of mature oligodendrocytes in vitro*. J Neuroimmunol, 2002. **124**(1-2): p. 36-44.
341. Aloisi, F., et al., *IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1604-12.
342. Li, J., et al., *Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia*. J Neurol Sci, 2003. **215**(1-2): p. 95-103.
343. Sonobe, Y., et al., *Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations*. Brain Res, 2005. **1040**(1-2): p. 202-7.
344. Li, Y., et al., *Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia*. Brain, 2007. **130**(Pt 2): p. 490-501.
345. Li, J., et al., *IL-27 subunits and its receptor (WSX-1) mRNAs are markedly up-regulated in inflammatory cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurol Sci, 2005. **232**(1-2): p. 3-9.
346. Becher, B., B.G. Durell, and R.J. Noelle, *IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1186-91.
347. Krakowski, M.L. and T. Owens, *The central nervous system environment controls effector CD4+ T cell cytokine profile in experimental allergic encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 2840-7.

348. Tang, C.H., et al., *Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 pathway in microglia*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1292-302.
349. Pinteaux, E., et al., *Leptin induces interleukin-1beta release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism*. J Neurochem, 2007. **102**(3): p. 826-33.
350. Gerschman, R., et al., *Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common*. 1954. Nutrition, 2001. **17**(2): p. 162.
351. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
352. Chen, Y.Y., et al., *Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35265-72.
353. Dawson, T.M. and S.H. Snyder, *Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain*. J Neurosci, 1994. **14**(9): p. 5147-59.
354. Brown, R.H., Jr. and W. Robberecht, *Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis*. Semin Neurol, 2001. **21**(2): p. 131-9.
355. Massaad, C.A., et al., *Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13576-81.
356. Sorolla, M.A., et al., *Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 667-78.
357. Yao, D., et al., *Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10810-4.
358. Nordberg, J. and E.S. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1287-312.
359. Darley-Usmar, V. and B. Halliwell, *Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system*. Pharm Res, 1996. **13**(5): p. 649-62.
360. Poon, H.F., et al., *Free radicals and brain aging*. Clin Geriatr Med, 2004. **20**(2): p. 329-59.
361. Harris, E.D., *Regulation of antioxidant enzymes*. FASEB J, 1992. **6**(9): p. 2675-83.
362. Poon, H.F., et al., *Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(5): p. 478-93.
363. Schrader, M. and H.D. Fahimi, *Peroxisomes and oxidative stress*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(12): p. 1755-66.
364. Gorg, B., et al., *Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 567-79.
365. Halliwell, B. and O.I. Aruoma, *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*. FEBS Lett, 1991. **281**(1-2): p. 9-19.
366. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
367. Yeo, W.S., et al., *Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance*. BMB Rep, 2008. **41**(3): p. 194-203.
368. Nakamura, T. and S.A. Lipton, *Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases*. Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 455-68.
369. Crow, J.P., et al., *On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(3): p. 331-8.

370. Yun, H.Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Nitric oxide in health and disease of the nervous system*. Mol Psychiatry, 1997. **2**(4): p. 300-10.
371. Moro, M.A., et al., *Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(2): p. 445-56.
372. Murphy, S., et al., *Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells*. Trends Neurosci, 1993. **16**(8): p. 323-8.
373. Kugler, P. and D. Drenckhahn, *Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I*. Glia, 1996. **16**(2): p. 165-73.
374. Stewart, V.C. and S.J. Heales, *Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(3): p. 287-303.
375. Lipton, S.A., et al., *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds*. Nature, 1993. **364**(6438): p. 626-32.
376. Kohen, R. and A. Nyska, *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol Pathol, 2002. **30**(6): p. 620-50.
377. Inoue, M., et al., *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life*. Curr Med Chem, 2003. **10**(23): p. 2495-505.
378. Wolff, S.P., Z.Y. Jiang, and J.V. Hunt, *Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(5): p. 339-52.
379. Dworakowski, R., et al., *Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 960-4.
380. Orient, A., et al., *Novel sources of reactive oxygen species in the human body*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(5): p. 1281-8.
381. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1428-59.
382. Harraz, M.M., et al., *SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 659-70.
383. Li, J., et al., *Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9936-41.
384. Boillee, S. and D.W. Cleveland, *Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 474-8.
385. Tamm, C., B. Zhivotovsky, and S. Ceccatelli, *Caspase-2 activation in neural stem cells undergoing oxidative stress-induced apoptosis*. Apoptosis, 2008. **13**(3): p. 354-63.
386. Lefebvre d'Hellencourt, C. and G.J. Harry, *Molecular profiles of mRNA levels in laser capture microdissected murine hippocampal regions differentially responsive to TMT-induced cell death*. J Neurochem, 2005. **93**(1): p. 206-20.
387. Graeber, M.B., *Changing face of microglia*. Science, 2010. **330**(6005): p. 783-8.
388. Gonzalez-Scarano, F. and G. Baltuch, *Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 219-40.
389. Emerit, J., M. Edeas, and F. Bricaire, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(1): p. 39-46.
390. Roy, A., et al., *Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 686-99.
391. Stolzing, A., et al., *Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(6): p. 1017-27.

392. Liu, R., et al., *Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8526-31.
393. Kanda, H., et al., *Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 415-23.
394. Pamuklar, Z., et al., *Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(11): p. 7385-94.
395. Umemura, K., et al., *Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients*. Neurosci Lett, 2006. **400**(1-2): p. 97-100.
396. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
397. Friguet, B., *Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2910-6.
398. Neumann, J., et al., *Microglia provide neuroprotection after ischemia*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 714-6.
399. Tham, C.S., et al., *Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression*. Int J Dev Neurosci, 2003. **21**(8): p. 431-43.
400. Grun, F. and B. Blumberg, *Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling*. Endocrinology, 2006. **147**(6 Suppl): p. S50-5.
401. Liu, S., et al., *ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer*. Cell Cycle, 2009. **8**(22): p. 3695-701.
402. Liu, S., et al., *Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases*. Cancer Cell, 2009. **15**(6): p. 539-50.
403. Fan, H., et al., *Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways*. Mol Med, 2008. **14**(7-8): p. 422-8.
404. Nadeau, S. and S. Rivest, *Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia*. J Neurosci, 2000. **20**(9): p. 3456-68.
405. Jean Harry, G., A. Bruccoleri, and C. Lefebvre d'Hellencourt, *Differential modulation of hippocampal chemical-induced injury response by ebselen, pentoxifylline, and TNFalpha-, IL-1alpha-, and IL-6-neutralizing antibodies*. J Neurosci Res, 2003. **73**(4): p. 526-36.
406. Harry, G.J., et al., *Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons*. J Neurochem, 2008. **106**(1): p. 281-98.
407. Okudaira, S., H. Yukiura, and J. Aoki, *Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 698-706.
408. Savaskan, N.E., et al., *Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(2): p. 230-43.
409. Kishi, Y., et al., *Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 2006. **281**(25): p. 17492-500.
410. Lafontan, M. and N. Viguerie, *Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(6): p. 580-5.

411. Ouchi, N. and K. Walsh, *Adiponectin as an anti-inflammatory factor*. Clin Chim Acta, 2007. **380**(1-2): p. 24-30.
412. Spranger, J., et al., *Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 141-7.

Abstract

In the last years, Obesity has been considered a major health issue with around 10% of the world population affected. The causes of this pandemic are multiple, but include bad alimentary habits and an increasing settle way of life. The recent discovery that chronic inflammation during obesity was associated with this disease physiopathology and others complications is the center of many investigations. Adipose tissue (AT), in addition to its metabolic activity, has an intense secretory activity and is a main player in this inflammatory syndrome. Autotaxin (ATX), adiponectin and resistin are such mediators secreted by AT. These factors functions in metabolism regulation are well described, but their effects on others organs are not always known. As it has been shown that some of these factors receptors are present in the central nervous system (CNS), it is interesting to study their effects in this organ.

In this context, we initially studied the effect of ATX on the oxidative stress generated by H₂O₂ (hydrogen peroxide) and inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) or trimethyltin (TMT) in murine microglial cells, resident immune cells of the CNS. Our results show for the first time, the anti-oxidant and anti-inflammatory effects of ATX in microglial cells. In mice, TMT affects hippocampal region of CNS and we showed that ATX RNA is up regulated in the hippocampus 5 days post TMT treatment. Our results suggest that ATX could be involved in the regulation of microglia homeostasis and in neuroinflammation.

The effect of TMT on the inflammation produced by the AT has also been studied and the results show that TMT induces an inflammatory response in two cell types of AT: adipocytes and macrophages and in fat tissue from ob/ob mice.

We then subcloned the cDNA of adiponectin and resistin in eukaryotic expression vectors to study their effects on microglial cells under normal or inflammatory conditions. This study should lead to better understanding of adipose tissue influence on the CNS and therefore the

relationship between obesity and neurodegenerative diseases to develop new therapeutic approaches.

Keywords: Adipose tissue, autotaxin, inflammation, central nervous system

Résumé

L'obésité est depuis quelques années reconnue comme un des fléaux du XXI^e siècle en affectant environ 10% de la population adulte mondiale. Le passage de l'obésité au stade de pandémie est le résultat de multiples facteurs dont une mauvaise hygiène alimentaire et une sédentarité croissante. La découverte récente de l'existence d'un état inflammatoire chronique au cours de l'obésité pouvant intervenir dans la physiopathologie de la maladie et de ses nombreuses complications fait aujourd'hui l'objet d'intenses investigations. Or, le tissu adipeux (TA) qui, parallèlement à son activité métabolique, possède également une activité sécrétoire intense, est un acteur majeur de ce syndrome inflammatoire. L'autotaxine (ATX), l'adiponectine et la résistine sont les médiateurs de l'inflammation sécrétés par le TA. Si le rôle de ces facteurs dans la régulation du métabolisme est bien établi, leurs effets sur d'autres organes ne sont pas toujours connus. Il est notamment intéressant d'étudier leurs effets dans le système nerveux central (SNC), les récepteurs de certains y étant présent.

Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps étudié l'effet de l'ATX sur le stress oxydant généré par le H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) et sur l'inflammation induit par le lipopolysaccharide (LPS) ou le triméthylétain (TMT) dans les cellules microgliales murines, cellules immunitaires résidentes du SNC. Nos résultats montrent pour la première fois, l'effet anti-oxydant et anti-inflammatoire de l'ATX sur les cellules microgliales. Chez la souris, le TMT affecte la région hippocampique du SNC et nous avons montré qu'il induit la production d'ATX après 5 jours d'une injection *i.p.* de TMT. Ce qui suggère un rôle important de l'ATX dans la régulation de l'homéostasie des microglies et du SNC ainsi que dans la neuroinflammation.

L'effet du TMT sur l'inflammation produite par le TA a également été étudié et les résultats montrent que le TMT induit une réponse inflammatoire dans deux types cellulaires du TA : adipocytes et macrophages ainsi que dans le TA de souris obèse ob/ob.

Ensuite, nous avons sous-cloné les ADNc de l'adiponectine et de la résistine dans des vecteurs d'expression eucaryote afin d'étudier leurs effets sur les cellules microgliales dans des conditions normales ou inflammatoires. Cette étude devrait permettre une meilleure compréhension de l'influence du TA sur le SNC et donc la relation entre l'obésité les maladies neurodégénérative afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

Mots clés : Tissu adipeux, autotaxine, inflammation, système nerveux central