



**HAL**  
open science

## Rôle de la prokinéticine-2 dans le tissu adipeux

Cécilia Szatkowski

► **To cite this version:**

Cécilia Szatkowski. Rôle de la prokinéticine-2 dans le tissu adipeux. Endocrinologie et métabolisme. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ136 . tel-01124058

**HAL Id: tel-01124058**

**<https://theses.hal.science/tel-01124058>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



École Doctorale  
des Sciences  
de la Vie  
et de la Santé  
STRASBOURG

**ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé**  
**UMR 7242 Biotechnologie et Signalisation cellulaire**

**THÈSE** présentée par :

**Cécilia Szatkowski**

soutenue le **26 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Science du Vivant

Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

**Rôle de la prokinéticine-2 dans le tissu  
adipeux**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme Canan NEBIGIL-DESAUBRY** Docteur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. Philippe VALET**

Professeur, Université de Toulouse

**M. Zhihong YANG**

Professeur, Université de Fribourg

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. Philippe BOUCHER**

Professeur, Université de Strasbourg

# REMERCIEMENTS

---

Je remercie Madame le Docteur Canan Nebigil-Désaubry, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir permise de faire cette thèse grâce au financement qu'elle m'a attribué. Je remercie, par la même occasion, mes soutiens financiers, la Région Alsace et le CNRS.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Philippe Boucher, Monsieur le Professeur Philippe Valet et Monsieur le Docteur Zhihong Yang, d'avoir accepté de prendre de leur temps pour juger mon travail de thèse.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Jocelyn Céraline. Tu m'as initié à la recherche lors de mon stage de master 2. Merci pour ta patience et ta générosité. Tu m'as beaucoup soutenu et conseillé pendant ces 3 années de thèse et je t'en remercie. Merci aussi de m'avoir conviée aux repas de Noël du labo. Merci pour tout.

Je remercie tous les membres du laboratoire, Kyoji, Célia, Mounia, Mojdeh, Jean-Philippe et Valérie, ainsi que tous les étudiants en master qui sont passés par notre laboratoire durant ces 3 années. Un mot en particulier pour Mounia et Mojdeh, nous avons partagé la grande aventure de la thèse en même temps, nous avons été dans la même galère, mais nous avons su nous soutenir et nous serrer les coudes. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite. Un grand merci à Valérie et JP pour vos conseils et votre aide précieuse pendant ma rédaction.

Je remercie également tous les membres des autres équipes de l'UMR 7242 que j'ai côtoyé de près ou de loin pendant ces 3 années. Un merci en particulier à Fanny, Gregory, Patrick et JP pour toutes les pauses déjeuners que nous avons partagés, nos pauses café à faire les mots fléchés du 20 minutes vont me manquer. Merci aussi à Christian, pour ton soutien et toutes les nombreuses discussions que nous avons eu depuis le master.

Je remercie tous les membres du bureau de l'Association des doctorants et docteurs d'Alsace. J'ai adoré travailler avec vous durant ces deux années. J'espère avoir été une responsable conviv et une présidente à la hauteur de vos espérances. Vous avez été une équipe géniale et travailler à vos cotés a été un réel plaisir. Je remercie Elise qui m'a donné l'envie de rejoindre l'Addal, et merci aussi à Kenneth, Lionel, Olivier et Simon (mon poussin) pour votre écoute et votre réconfort, sans vous le goût du thé ne sera plus jamais le même. Un grand merci aussi à Daniel et Orphée (ma fleur) pour nos barbecues et nos délires autour d'une bouteille de rosé. Un mot en particulier pour ma fleur, merci, merci, merci, tu m'as soutenu et encouragé comme personne durant toute ma rédaction.

Un doctorat c'est 3 ans de travail, mais c'est aussi beaucoup de moment de détente. Alors merci à toute la Canito Team de les avoir partagés avec moi. Je ne peux plus compter le nombre de soirées jeux, d'anniversaire, de nouvel an, d'apéro, et surtout de gueule de bois. Je remercie particulièrement Emmanuelle, depuis 7 ans qu'on se connait, on en a vécu des choses ensemble, la liste est bien trop longue pour la citer, mais chaque moment était mémorable, notamment notre voyage aux Etats Unis, qui restera un souvenir inoubliable. Un grand merci à Gaëlle, on s'est connu

alors qu'on était en CE2. Notre amitié a évolué et grandi en même temps que nous, il y a parfois eu des disputes, des larmes, mais surtout des grands éclats de rire. On s'est parfois éloigné mais jamais assez pour que notre amitié ne puisse tenir le coup. On a réussi à prouver que SEGA c'est plus fort que toi. Je te remercie aussi de m'avoir fait la plus belle preuve d'amitié qui soit, en me demandant d'être témoin à ton mariage. Je remercie également Romain d'avoir souvent sécher mes larmes lors de ma première année de thèse et de m'avoir écouté me plaindre longuement. Philippe, merci, pour nos apéros et nos parties de Wii, qui m'ont souvent bien détendu après une longue journée de travail. Un merci aussi à Laura (ma cacahuète caramélisée), pour ton écoute et ton soutien dans les moments où j'en avais le plus besoin.

Merci aussi à tous ce que j'ai oublié de citer.

Un grand merci à mon EeePC. On s'est souvent moqué de toi, on a dit de toi que tu étais trop petit, trop lent, peu performant, trop fragile... mais tu as fait un joli pied de nez face à tous ces médisants. Il est vrai que tu as parfois ramé, que tu m'as parfois fait des frayeurs, mais tu ne m'as jamais lâché et ensemble on y est arrivé.

Et enfin, un énorme merci à mes parents. Quand j'étais petite vous me disiez que je devais bien travailler à l'école pour avoir un bon métier. Je ne sais pas si j'aurais un bon métier, en tous cas, j'espère vous avoir fait honneur en réalisant cette thèse. Je sais que vous avez beaucoup donné pour moi et pour me permettre de faire des études. Il est donc normal qu'aujourd'hui je vous dédie ce manuscrit. Il n'est pas parfait, certes, il est un peu comme moi, mais vous savez ce qu'il m'en a coûté pour arriver jusque là. J'espère donc qu'au bout de ces 3 ans, vous êtes fiers du chemin parcouru et de l'adulte que je suis devenue.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>RESUME</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>13</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>20</b>
<b>I. L'OBESITE</b> .....	<b>21</b>
A. Généralités .....	21
1) Définition.....	21
2) Epidémiologie.....	22
3) Conséquences .....	23
B. Les origines du développement de l'obésité.....	24
1) La balance énergétique .....	25
a) Les apports énergétiques.....	26
b) Les dépenses énergétiques.....	26
2) Le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire .....	28
C. Le tissu adipeux, acteur de l'obésité.....	31
1) La distribution.....	32
2) Les types cellulaires.....	34
a) L'adipocyte .....	34
b) Le préadipocyte .....	35
c) La cellule endothéliale .....	35
d) Le macrophage .....	36
3) L'adipogenèse.....	36
a) La détermination .....	37
b) La différenciation .....	37
c) La différenciation adipocytaire brune.....	41
4) Le métabolisme lipidique.....	42
a) La lipogenèse .....	42
b) La lipolyse .....	44
5) La fonction sécrétrice.....	45
a) La leptine .....	45
b) L'adiponectine .....	47
c) La résistine.....	48
d) L'apeline.....	49
e) Le TNF $\alpha$ .....	50
f) L'interleukine-6.....	50
g) Le MCP-1 .....	51
6) La contribution du tissu adipeux dans l'obésité.....	52

a) La plasticité.....	52
b) L'inflammation.....	54
c) L'hypoxie.....	55
D. Une conséquence de l'obésité : la résistance à l'insuline.....	57
1) L'homéostasie glucidique.....	57
2) L'insulino-résistance.....	61
3) La contribution du tissu adipeux dans l'insulino-résistance.....	62
a) L'hypothèse portale.....	62
b) La lipotoxicité.....	63
<b>II. Les prokinétines.....</b>	<b>65</b>
A. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	65
1) La structure.....	65
2) La classification.....	68
a) La famille A : rhodopsin-like.....	68
b) La famille B : secretin-like.....	69
c) La famille C : metabotrope-glutamate/pheromone.....	69
d) La famille D.....	69
e) La famille E.....	69
f) La famille F.....	70
3) Transduction du signal.....	70
a) Les protéines G.....	70
b) Les effecteurs.....	72
B. Les prokinétines et leurs récepteurs.....	74
1) Leur structure.....	75
a) Les prokinétines.....	75
b) Les récepteurs des prokinétines.....	75
2) Leurs fonctions.....	76
a) La motilité gastro-intestinal.....	76
b) La réponse immunitaire.....	77
c) L'angiogenèse et le système cardiovasculaire.....	77
d) La nociception.....	80
e) La neurogenèse.....	80
f) La régulation du cycle circadien.....	81
g) La régulation de la prise alimentaire.....	82
<b>OBJECTIFS DU PROJET.....</b>	<b>84</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>88</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>96</b>
<b>I. Caractérisation des souris PKR1<sup>-/-</sup>.....</b>	<b>96</b>
A. Problématiques et stratégies.....	96
B. Résultats.....	98

1) Caractérisation du tissu adipeux des souris PKR1 <sup>-/-</sup> .....	98
2) Etude de la balance énergétique des souris PKR1 <sup>-/-</sup> .....	104
3) Etude des conséquences métaboliques de l'obésité des souris PKR1 <sup>-/-</sup> .....	108
a) Etude à l'âge de 40 semaines .....	108
b) Etude à l'âge de 15 semaines .....	112
<b>II. Caractérisation des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>115</b>
A. Introduction .....	115
B. Résultats .....	116
1) Etude des souris aP2-PKR1 <sup>-/-</sup> à l'âge de 24 semaines .....	116
<b>III. Effet de la prokinéticine-2 sur l'adipogenèse in vitro .....</b>	<b>123</b>
A. Introduction .....	123
B. Résultats .....	124
1) Effet de la prokinéticine-2 sur la différenciation des préadipocytes in vitro .....	124
2) Rôle la prokinéticine-2 sur la prolifération des préadipocytes in vitro .....	127
<b><i>DISCUSSION</i>.....</b>	<b>133</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i>.....</b>	<b>143</b>

# RESUME

---

L'obésité est un enjeu majeur de santé publique, car ces dernières décennies, la prévalence de l'obésité a doublé. De ce fait, on dénombre actuellement 500 millions de personnes obèses à travers le monde. L'évolution du nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter dans de nombreux pays. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que d'ici 2015 plus de 700 millions de personnes seront obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses maladies telles que les affections cardiaques, les cancers et le diabète de type 2. De plus, les conséquences du surpoids sont responsables d'une augmentation significative de la mortalité, avec 3 millions de décès par an, et représentent une fraction importante du coût de santé.

Le tissu adipeux a été longtemps considéré comme un simple site de stockage des acides gras, sans activité métabolique. Aujourd'hui, il est considéré comme un organe à part entière ayant une activité endocrine, lui permettant de jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique, dans le contrôle de la prise alimentaire et dans l'inflammation. D'après l'OMS, l'obésité est définie comme un excès anormal de masse adipeuse qui a des effets néfastes sur la santé. Cet excès de masse adipeuse est la conséquence d'un déséquilibre de la balance énergétique. En réponse à ce déséquilibre, l'adipocyte, cellule sphérique dont 95% du cytoplasme est occupé par une grosse vacuole lipidique, est capable d'augmenter considérablement son volume. Ce phénomène est appelé hypertrophie des adipocytes. Toutefois, l'adipocyte ayant un volume maximal, l'augmentation de la masse grasse se fait alors par l'augmentation du nombre d'adipocytes. Ce mécanisme, appelé hyperplasie, implique la prolifération et la différenciation de préadipocytes au sein du tissu adipeux. De plus, ce tissu est richement vascularisé pour assurer les fonctions de stockage énergétique et endocriniennes. Sa plasticité implique donc une forte plasticité du réseau vasculaire, qui doit s'étendre en fonction de l'expansion de la masse adipeuse.

Les prokinétines sont une famille de protéines sécrétées et classées en deux types : la prokinétine-1 (PK1) et la prokinétine-2 (PK2). Les prokinétines exercent leurs fonctions biologiques en se liant à deux récepteurs couplés aux protéines G : PKR1 et PKR2. Les prokinétines présentent des affinités différentes pour leurs récepteurs ; une affinité plus forte pour PK2 a été observée par rapport à PK1. Le système PKs/PKR est largement exprimé chez les mammifères et on les retrouve dans le cerveau, le tractus gastro-intestinal, les ovaires, les testicules, les glandes surrénales, la prostate, le pancréas et le système cardiovasculaire. PKR2 est principalement exprimé dans le système nerveux central alors que PKR1 l'est dans certains organes

du système nerveux périphérique. Cette large distribution témoigne de l'implication des prokinétines dans des fonctions biologiques diverses et variées telles que l'hématopoïèse, la motilité gastro-intestinale, la neurogenèse, l'angiogenèse, le contrôle du rythme circadien et de la douleur.

Récemment, la prokinétine 2 a été décrite comme un facteur anorexigène impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique *via* l'activation du récepteur PKR2. En effet, en 2009, l'équipe du Dr. Gardiner montre que l'administration périphérique de PK2 réduit l'appétit chez des souris et que ce phénomène est accompagné d'une perte de poids chez les souris minces et obèses. Ces résultats confirment ceux du Dr. Jethwa en 2008 qui a montré que l'inactivation de PKR2 induit des accès de torpeur accompagnés d'une réponse physiologique similaire à une réponse énergétique négative.

Par l'intermédiaire des facteurs qu'il sécrète, le tissu adipeux est au centre du mécanisme de régulation de la balance énergétique. D'une part les adipocytes sécrètent des facteurs qui vont agir au niveau du système nerveux central pour réguler l'appétit. D'autre part, ils vont agir au niveau de l'angiogenèse afin de maintenir un niveau de vascularisation adéquat en fonction de son expansion. Si cette vascularisation n'est pas maintenue, il va se produire un stress hypoxique qui contribuera au développement de complications métaboliques.

Bien que l'équipe du Dr. Masuda en 2002 ait montré que les adipocytes expriment PKR1, le rôle fonctionnel de PK2 dans le tissu adipeux n'a jamais été étudié. Nous émettons donc l'hypothèse que la prokinétine-2, *via* son récepteur PKR1, pourrait être impliquée dans l'adipogenèse, et aurait des conséquences sur l'obésité et ses complications métaboliques.

Nous avons débuté ce projet par l'étude du phénotype du tissu adipeux de souris PKR1<sup>-/-</sup> dans lesquelles le gène du récepteur PKR1 est totalement inactivé. A l'âge de 40 semaines, ces souris PKR1<sup>-/-</sup> présentent une augmentation significative de leur masse corporelle comparée aux souris WT (*wild type*). Cette dernière est due à une forte croissance de la masse grasse des souris PKR1<sup>-/-</sup>. Ceci ne semble pas être la conséquence d'un apport énergétique excessif, puisque que les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> mangent la même quantité de nourriture. Le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> est caractérisé par une hyperplasie comme le montre l'augmentation du nombre d'adipocytes au sein du tissu, qui est due à la prolifération des préadipocytes chez les souris PKR1<sup>-/-</sup>.

Le tissu adipeux étant richement vascularisé et la prokinétine-2 jouant un rôle dans l'angiogenèse, nous avons étudié la vascularisation de ce tissu dans les souris PKR1<sup>-/-</sup>. Il apparaît que l'expansion de la masse grasse de ces souris n'est pas compensée par une augmentation de la

vascularisation. Un défaut d'angiogenèse est corrélé au développement de conditions hypoxiques. L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale des adipocytes a donc été mesurée, et semble diminuée dans le tissu adipeux des souris  $PKR1^{-/-}$ . Ce résultat est confirmé par l'augmentation de l'expression du facteur induit par l'hypoxie HIF-1 $\alpha$  dans le tissu adipeux de ces souris. Ce défaut d'angiogenèse et cette hypoxie ont pour conséquence la nécrose de certains adipocytes chez les souris  $PKR1^{-/-}$ .

L'obésité étant un facteur de risque du diabète de type 2, nous nous sommes intéressés aux conséquences de la prise de poids des souris  $PKR1^{-/-}$  sur le métabolisme glucidique des souris. Des tests de tolérance au glucose et de tolérance à l'insuline nous révèlent que ces souris présentent une forte intolérance au glucose due à une forte insensibilité à l'insuline. Avec un régime alimentaire riche en matière grasse, les souris WT et  $PKR1^{-/-}$  présentent alors la même masse corporelle due au fait que la masse du tissu adipeux des souris WT a augmenté pour atteindre celle des souris  $PKR1^{-/-}$ . Les souris WT montrent alors une forte tendance à l'insulinorésistance qui conduit à une intolérance au glucose, comparable à ce qui avait été observé chez les souris  $PKR1^{-/-}$  nourries avec une alimentation équilibrée.

Dans les souris  $PKR1^{-/-}$ , le gène *Pkr1* étant totalement inactivé, nous ne pouvions pas exclure que le phénotype observé pouvait être une conséquence indirecte du défaut d'angiogenèse. De même, l'inactivation du gène *Pkr1* peut affecter le fonctionnement d'autres organes, tel que le foie ou le pancréas, ce qui peut avoir des conséquences indirectes sur les fonctions du tissu adipeux. Nous avons donc étudié le phénotype du tissu adipeux des souris aP2-  $PKR1^{-/-}$  dans lesquelles l'expression du récepteur PKR1 est spécifiquement inactivée dans le tissu adipeux. A l'âge de 24 semaines, ces souris présentent une légère augmentation du tissu adipeux comparé aux souris WT. Le tissu adipeux des souris aP2-  $PKR1^{-/-}$  est caractérisé par une hyperplasie. Nous avons pu constater une infiltration de macrophages au sein de ce tissu dont l'organisation est alors modifiée.

L'expansion de la masse grasse des souris aP2- $PKR1^{-/-}$  est compensée par une augmentation de la vascularisation, bien que l'activité respiratoire mitochondriale semble légèrement diminuée dans le tissu adipeux des souris aP2- $PKR1^{-/-}$ .

L'expansion de la masse adipeuse ne semble pas provoquer de troubles métaboliques, car les souris aP2- $PKR1^{-/-}$  présentent le même profil métabolique que les souris WT lors des tests de tolérance au glucose et à l'insuline.

Le rôle de la prokinéticine sur l'adipogenèse a été étudié *in vitro* sur une lignée de préadipocytes murins, les cellules 3T3-L1, capables de se différencier en adipocytes après stimulation par un traitement pro-adipogénique. En présence de la PK2, l'adipogenèse de ces

cellules est inhibée. Ce résultat est confirmé par une diminution de l'expression des marqueurs adipogéniques, l'adiponectine et la résistine, ainsi que par la diminution de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse, PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ .

*In vivo*, l'adipogenèse étant précédée par une phase d'expansion clonale mitotique des préadipocytes, nous avons analysé le rôle de la PK2 sur la prolifération des cellules 3T3-L1. La PK2 est capable d'inhiber la prolifération des préadipocytes, comme le confirme la diminution de l'expression des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire : Cdk2, c-Myc, les cyclines D1 et E1.

L'ensemble des résultats de cette étude montrent que la PK2 est capable d'inhiber l'adipogenèse en inhibant la prolifération des préadipocytes. Lorsque le gène *Pkr1* est inactivé *in vivo*, le défaut d'action de la PK2 se traduit par une hyperplasie du tissu adipeux due à une prolifération des préadipocytes.

Il serait maintenant important de s'intéresser aux mécanismes moléculaires par lesquels la PK2 agit au sein des préadipocytes. Au niveau du système cardiovasculaire, l'activation de PKR1 stimule la voie de signalisation MEK/ERK. Il a été montré que l'activation de la voie MEK/ERK par des facteurs de croissance conduit à une inactivation de l'adipogenèse. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse que la PK2, *via* PKR1, inhibe l'adipogenèse par l'intermédiaire de la voie MEK/ERK.

A l'heure actuelle, l'identification d'une cible thérapeutique permettant de réduire l'obésité est primordiale. Les récepteurs couplés aux protéines G étant les cibles médicamenteuses les plus répandues, les récepteurs des prokinétines constituent donc une cible d'intérêt dans l'étude de l'obésité. On pourrait ainsi imaginer qu'un défaut d'expression de PKR1 et/ou de PK2 pourrait être un facteur pronostic de développement de l'obésité hyperplasique et l'utilisation de PK2 recombinante pourrait être envisagée comme traitement.

# ABSTRACT

---

Obesity is a risk factor for various disorders such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Obesity is characterized by expansion of adipose tissue mass that results from increased fat cell number (hyperplasia) and/or increased fat cell size (hypertrophy). An increased number of adipocytes are caused by enhanced differentiation of preadipocytes to adipocytes. An increased size of adipocytes is due to lipid accumulation. Identification of factors involved in adipocyte hyperplasia and adipogenesis is important for elucidating the pathophysiology of obesity and adipocyte hyperplasia could be an effective target for treating or preventing the development of obesity.

The prokineticins, prokineticin-1 and prokineticin-2 bind two similar G protein-coupled receptors, PKR1 and PKR2. Prokineticin-2 is the most potent agonist of both receptors. Prokineticins have been shown to be widely distributed in mammalian tissues and involved in many divergent effects. Prokineticin-2 is a potent angiogenic factor that induces angiogenesis and neovascularization in the heart. Prokineticin-2 is also an anorexigenic hormone that plays a role in appetite regulation and energy metabolism. Its anorectic effect is mediated by PKR2 signaling via a direct hypothalamic mechanism. Since adipocytes express mainly PKR1, we investigated the role of PKR1 in adipocyte functions.

At the age of 40 weeks, PKR1-null mutant mice exhibit increased body weight that is due to an increased visceral fat mass. Mutant adipose tissue is characterized by adipocyte hyperplasia due to an increase in number of proliferating preadipocyte. Impaired angiogenesis in mutant adipose tissue leads to hypoxia and mutant adipocytes exhibit downregulation of insulin signaling that is associated with glucose and insulin tolerance. High-fat diet blunts differences between mutant and wild-type mice due to rise in body weight and diabetes-like rise in glucose and insulin tolerance in wild-type mice.

At the age of 24 weeks, adipocyte-specific aP2-PKR1 knockout mice present also an increased visceral adipose tissue that lead to a slight increased body weight. Fat mass is also characterized by an hyperplasia and an increased preadipocyte proliferation. Expansion of fat mass is accompanied by capillary expansion. We observe macrophage infiltration in adipose tissue from aP2-PKR1 null mice. This mice present slight metabolic changes.

Utilizing 3T3-L1 murine preadipocytes, our study reveals that prokineticin-2 exerts an anti-adipogenic function in murine cells as determined by intracellular lipid accumulation assay and

quantitative analysis of adipocyte marker gene expression. Inhibition of adipogenesis mediated by prokineticin-2 is abolished by knock-down of PKR1 expression, indicating PKR1 involvement. Prokineticin-2 also inhibits proliferation of preadipocytes that was confirmed by quantitative analysis of cell cycle-regulating proteins gene expression.

These results suggest that prokineticin-2 via PKR1 signaling plays a crucial role in adipogenesis and adipose tissue hyperplasia. Our obesity model is an ideal tool for research on the pathogenesis and therapy of obesity.

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Corpulence d'un individu en fonction de l'IMC.....	21
Figure 2 : Accumulation de tissu adipeux et risques associés.....	22
Figure 3 : La régulation énergétique.....	25
Figure 4 : Le réseau neuronal du noyau arqué.....	29
Figure 5 : La régulation de la prise alimentaire.....	31
Figure 6 : Répartition du tissu adipeux chez l'Homme.....	33
Figure 7 : Représentation schématique d'un adipocyte blanc et d'un adipocyte brun.....	35
Figure 8 : L'adipogenèse.....	39
Figure 9 : La lipogenèse.....	43
Figure 10 : Processus d'expansion du tissu adipeux.....	52
Figure 11 : Mécanisme de régulation de l'angiogenèse par le tissu adipeux.....	56
Figure 12 : Les voies de signalisation du récepteur à l'insuline.....	58
Figure 13 : Translocation du transporteur au glucose GLUT4.....	58
Figure 14 : Régulation de la glycémie.....	60
Figure 15 : Lipotoxicité et hyperglycémie.....	64
Figure 16 : Structure des RCPG.....	66
Figure 17 : Sites de fixation des ligands sur les RCPG.....	67
Figure 18 : Cycle de régulation des protéines G.....	72
Figure 19 : La voie de signalisation des prokinétines et leurs effets biologiques.....	83
Figure 20 : Masse corporelle et poids des organes des souris $PKR1^{-/-}$ .....	98
Figure 21 : Hyperplasie du tissu adipeux des souris $PKR1^{-/-}$ .....	99
Figure 22 : Prolifération des préadipocytes dans le tissu adipeux des souris $PKR1^{-/-}$ .....	100
Figure 23 : Vascularisation du tissu adipeux des souris $PKR1^{-/-}$ .....	101
Figure 24 : Activité mitochondriale des adipocytes du tissu adipeux $PKR1^{-/-}$ .....	102
Figure 25 : Expression du facteur HIF-1 au sein du tissu adipeux $PKR1^{-/-}$ .....	103
Figure 26 : Adipocytes nécrotiques du tissu adipeux $PKR1^{-/-}$ .....	103
Figure 27 : Etude en cage métabolique des souris WT et $PKR1^{-/-}$ .....	105
Figure 28 : Absorption des lipides par l'intestin des souris $PKR1^{-/-}$ .....	106
Figure 29 : Lipides contenus dans les fèces des souris $PKR1^{-/-}$ .....	107
Figure 30 : Effet de l'inactivation de $PKR1$ sur la thermogenèse induite par le froid.....	107
Figure 31 : Métabolisme des souris $PKR1^{-/-}$ à 40 semaines.....	109
Figure 32 : Effet de la nourriture HFD sur le poids et le métabolisme des souris $PKR1^{-/-}$ à 40 semaines.....	109
Figure 33 : Poids des souris WT et $PKR1^{-/-}$ en fonction de la nourriture à 40 semaines.....	110
Figure 34 : Métabolisme des souris WT et $PKR1^{-/-}$ en fonction de la nourriture à 40 semaines.....	111
Figure 38 : Poids et métabolisme des souris $PKR1^{-/-}$ à 15 semaines.....	112
Figure 39 : Effet de la nourriture HFD sur le poids et le métabolisme des souris $PKR1^{-/-}$ à 15 semaines.....	113
Figure 40 : Métabolisme des souris WT et $PKR1^{-/-}$ en fonction de la nourriture à 15 semaines.....	114
Figure 41 : Masse corporelle et du tissu adipeux des souris $aP2-PKR1^{-/-}$ .....	116
Figure 42 ; Hyperplasie du tissu adipeux des souris $aP2-PKR1^{-/-}$ .....	117

<i>Figure 43 : Prolifération des préadipocytes du tissu adipeux <math>\alpha</math>P2-PKR1<sup>-/-</sup>.</i>	118
<i>Figure 44 : Infiltration de macrophages dans le tissu adipeux des souris <math>\alpha</math>P2-PKR1<sup>-/-</sup>.</i>	119
<i>Figure 45 : Vascularisation du tissu adipeux des souris <math>\alpha</math>P2-PKR1<sup>-/-</sup>.</i>	120
<i>Figure 46 : Activité mitochondriale des adipocytes du tissu adipeux des souris <math>\alpha</math>P2-PKR1<sup>-/-</sup>.</i>	121
<i>Figure 47 : Métabolisme des souris <math>\alpha</math>P2-PKR1<sup>-/-</sup>.</i>	122
<i>Figure 48 : Effet de la PK2 sur l'adipogenèse des cellules 3T3-L1.</i>	125
<i>Figure 49 : Effet de la PK2 sur l'expression des adipokines et des facteurs adipogéniques.</i>	126
<i>Figure 50 : Expression de Pref-1 en présence de la PK2.</i>	127
<i>Figure 51 : Comptage de la prolifération des cellules 3T3-L1 en présence de la PK2.</i>	128
<i>Figure 52 : Effet de la PK2 sur la prolifération des cellules 3T3-L1.</i>	129
<i>Figure 53 : Effet de la PK2 sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire.</i>	130
<i>Figure 54 : Apoptose des cellules 3T3-L1 en présence de la PK2.</i>	131
<i>Figure 55 : Rôle de la voie PK2/PKR1 dans l'adipogenèse.</i>	140

# ABBREVIATIONS

---

AC : adénylate-cyclase

ACC : acétyl-CoA carboxylase

acétyl-CoA: acétyl-coenzyme A

Acrp30: adipocyte complement-related protein of 30kDa

acyl-CoA: acyl-coenzyme A

ADD-1/SREBP-1 : adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

ADRP: adipocyte differentiation related protein

AG : acide gras

AGNE : acide gras non estérifié

AGPT : acylglycerol phosphate acyltransferase

AgRP : agouti-related peptide

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

aP2 : adipocyte protein 2

apM1: adipose most abundant gene transcript 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATCC : American Type Culture Collection

ATGL : adipose triglyceride lipase

ATP : adénosine triphosphate

BAN : 4-bromoanisol

BMP4 : bone morphogenetic protein 4

BV : capillaire sanguine

Bv8 : Bombina variegata 8

C/EBP $\beta$  : CAAT/enhancer binding protein-beta

C/EBP $\delta$  : CAAT/enhancer binding protein-delta

CA : cocktail adipogénique

CAP : c-Cbl-associated protein

CART: cocaine and amphetamine-regulated transcript

Cbl : casitas B-lineage lymphoma

CCK :cholécystokinine

Cdk: cyclin-dependant kinase

CMV : cytomégalo­virus  
CRF : corticotropin-releasing factor  
Crk : CT10 regulator of kinase  
Ctl : contrôle  
DAG : diacylglycérol  
DEPC : diéthylpyrocarbonate  
DGAT : diacylglycerol acyltransferase  
DHAP : dihydroxyacetone phosphate  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DTT : dithiothreitol  
EG: epidermal growth factor  
EGF : epidermal growth factor  
EG-VEGF : endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor  
EPDC : epicardium-derived progenitor cells  
ETA : effet thermique des aliments  
FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucleotide  
FAS : fatty acid synthase  
FAT : fatty acid translocase  
FATP4: fatty acid translocase protein 4  
FCS : foetal calf serum  
FGF : fibroblast growth factor  
FOXC2 : forkhead box C2  
FSH : follicle-stimulating hormone  
FSV: fraction stroma-vasculaire  
G3-P : glycérol-3-phosphate  
G3PDH : glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase  
GABA : gamma-aminobutyric acid  
GBP-28 :gelatin-binding protein 28  
GDNF :glial cell line-derived neurotrophic factor  
GDP : guanosine diphosphate  
GEF : guanine exchange factor  
GHRH : growth hormone releasing hormone  
GHSR1 :growth hormone secretagogue receptor 1  
GIP : gastric inhibitory polypeptide  
GIRK : G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels

GLUT4 : glucose transporter 4  
GOAT: ghrelin O-acyl transferase  
GPAT: glycerol phosphate acyltransferase  
GRAFS : Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/taste2 et Sécrétine  
GTP : guanosine triphosphate  
GTT : test de tolérance au glucose  
HDL : high density lipoprotein  
HFD : high fat diet  
HIF-1 : hypoxia inducible factor  
Hyp Lat : hypothalamus latéral  
IFABP: intestinal fatty acid binding protein  
IL-6 : interleukine-6  
IMC : indice de masse corporelle  
IMG: indice de masse grasse  
IP : gouttelette lipidique  
IP3: inositol 1,4,5 triphosphate  
IR : insulin receptor  
IRS : insulin receptor substrates  
ITT : test de tolérance à l'insuline  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : dihydrogénophosphate de potassium  
LDL : low density lipoprotein  
LHS : lipase hormono-sensible  
LP : gouttelette lipidique  
LPA : acide lysophosphatidique  
LPL : lipoprotéine lipase  
MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MC4R : melanocortin 4 receptor  
MCH: melanin-concentrating hormone  
MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1  
MEK : MAPK/ERK kinase  
MGL : monoglycéride lipase  
MIT-1 : mamba intestinal toxin  
MTC : mitochondrie  
Myf5 : myogenic factor 5  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : dihydrogénophosphate de sodium

NADH : nicotinamide adénine dinucleotide  
NC : noyau  
NFD : normal fat diet  
NPY : neuropeptide Y  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ORX : orexine  
PA: acide phosphatidique  
PACAP : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide  
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1  
PAP : phosphatidic acid phosphohydrolase  
PBS : phosphate buffer saline  
PCR : polymerase chain reaction  
PDK1 : phosphoinositide dependant kinase-1  
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1  
PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase  
PI-3K: phosphoinositide 3,4,5-triphosphate kinase  
PI3Kinase : phosphatidyl inositol triphosphate kinase  
PIP2: phosphatidylinositol 4,5-diphosphate  
PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate  
PK1: prokinéticine 1  
PK2: prokinéticine-2  
PKA :protéine kinase A  
PKB: protéine kinase B  
PKC : protéine kinase C  
PKR : prokineticin receptor  
PLC $\beta$  : phospholipase C  $\beta$   
POMC: proopiomélanocortine  
PPAR $\alpha$  : peroxisomal proliferator activated receptor alpha  
PPAR $\gamma$  : peroxisomal proliferator activated receptor gamma  
PRDM16 : PR domain zinc finger protein 16  
Pref-1: preadipocyte factor-1  
PTP1B : protein-tyrosine phosphatase 1B  
PVN :noyau paraventriculaire  
PYY<sub>3-36</sub> : peptide YY<sub>3-36</sub>  
RAIG : retinoic acid-inducible orphan GPCR

Rb: rétinoblastome  
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G  
RGS: regulator of G-protein signaling  
SDH : succinate déshydrogénase  
siRNA : small interfering ribonucleic acid  
SOCS-3 : suppressor of cytokine signaling 3  
SOS : son of sevenless  
Tam : tamoxifène  
TG : triglycérides  
TGF $\beta$  : tumoral growth factor beta  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
TRH: thyrotropin-releasing hormone  
TRPV1 : transient receptor potential vanilloid 1  
TUNEL : terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling  
UCP-1 : uncoupling protein-1  
VEGF : vascular endothelial growth  
VEGFR2 : vascular endothelial growth factor receptor 2  
VIP : vasoactive intestinal polypeptide  
VLDL: very low density lipoprotein  
WT : wild type  
 $\alpha$ -MSH : alpha-melanocyte stimulating hormone

# INTRODUCTION

---

# I. L'OBESITE

## A. Généralités

### 1) Définition

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le surpoids et l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé. Cet excès de masse grasse est dû à un déséquilibre de la balance énergétique en faveur des apports et/ou en défaveur des dépenses (WHO, 2000).

Pour estimer le degré de surpoids et d'obésité chez l'adulte, l'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure simple du poids par rapport à la taille de l'individu. L'échelle est la même quels que soient le sexe et l'âge du sujet, bien qu'il ne corresponde pas forcément au même degré d'adiposité d'un individu à l'autre. L'IMC correspond au poids divisé par le carré de la taille et est exprimé en  $\text{kg}/\text{m}^2$ . Un IMC entre 18 et  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  correspond à une charge pondérale normale, entre 25 et  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  l'individu est considéré en surpoids, puis obèse quand l'IMC est supérieur à  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  (Figure 1).

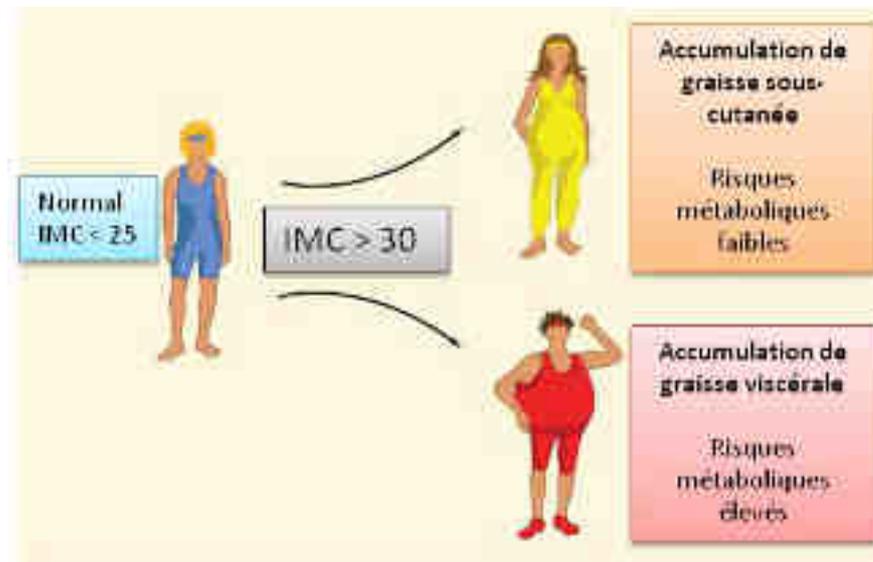


**Figure 1 : Corpulence d'un individu en fonction de l'IMC.**

Au dessus d'un IMC de  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ , l'individu est considéré comme obèse.

En complément, l'indice de masse grasse (IMG) permet de juger de la proportion de masse adipeuse en mesurant le pourcentage de tissu adipeux de l'organisme par rapport à la masse musculaire (Peltz *et al.*, 2010). La mesure de l'IMG est possible grâce à des balances à impédance-mètre. L'IMG doit prendre en compte le sexe et l'âge de l'individu. Par exemple, entre 20 et 50 ans, un IMG dit normal est de 20 à 30% chez la femme et de 10 à 20% chez l'homme.

Toutefois, il a été montré que l'accumulation de tissu adipeux viscéral est fortement corrélée avec le développement de pathologies métaboliques telles que le syndrome métabolique, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Dhaliwal and Welborn, 2009). Cette propriété a été prise en compte pour la mesure de l'obésité. Ainsi, la mesure du tour de taille divisé par le tour de hanches est utilisée pour évaluer les risques cardiométaboliques d'un individu. Cet indice doit être inférieur à 0,85 chez la femme et inférieur à 1 chez l'homme (Figure 2).



**Figure 2 : Accumulation de tissu adipeux et risques associés.**

L'accumulation de masse grasse au niveau viscéral contribue au développement de troubles métaboliques. D'après (Gesta et al., 2007).

## 2) Epidémiologie

A l'échelle mondiale, le nombre de personnes souffrants d'obésité a doublé depuis 1980. En 2008, l'OMS estimait que plus d'1,4 milliard d'individus âgés de plus de 20 ans étaient en surpoids. Parmi eux, plus de 200 millions d'hommes et près de 300 millions de femmes étaient obèses. Aujourd'hui, l'OMS estime que d'ici 2015 plus de 700 millions de personnes seront obèses.

Le surpoids touche également les enfants, avec 40 millions d'enfants en surcharge pondérale en 2010, ce qui laisse présager une forte augmentation des maladies métaboliques dans les années à venir. L'obésité a été longtemps considérée comme une pathologie des pays industrialisés, pourtant elle semble toucher aussi les pays en voie de développement. Ces derniers comptent 35 millions d'enfants obèses, âgés de moins de 5 ans, contre 8 millions dans les pays industrialisés. Les enfants consomment des aliments riches en graisses, en sucre et en sel, très caloriques mais pauvres en micronutriments, qui sont habituellement moins chers. Ce régime alimentaire, associé à la

sédentarité, entraîne une augmentation marquée de l'obésité chez l'enfant alors que les problèmes de malnutrition ne sont toujours pas résolus (Redinger, 2008).

### 3) Conséquences

L'obésité entraîne un bon nombre de complications au niveau de la santé, quelles soient métaboliques, physiologiques ou psychologiques. L'une des plus importantes conséquences de l'obésité est le développement du syndrome métabolique. Ce dernier n'est pas considéré comme une maladie en soi, mais comme un problème métabolique général. Il est caractérisé par différents paramètres tels qu'une hypertriglycéridémie et une dyslipidémie, c'est-à-dire une augmentation de la concentration du mauvais cholestérol (*low density lipoprotein*, LDL) associée à une diminution du taux de bon cholestérol (*high density lipoprotein*, HDL). Il est également associé à une obésité abdominale, une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose et une augmentation de la pression artérielle. La présence de trois de ces caractéristiques suffit à poser le diagnostic. Le syndrome métabolique constitue un stade précoce de plusieurs maladies comme le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Wilborn *et al.*, 2005).

Il est clairement établi que l'augmentation de l'IMC induit une augmentation du risque de développement du diabète de type 2 et que ce risque diminue avec la perte de poids (Williams and Kelley, 2000). Pour une femme obèse, le risque de développer un diabète de type 2 est multiplié par dix et par huit pour l'homme obèse. Ainsi, il est estimé que 75% des personnes diabétiques sont obèses.

Les maladies cardiovasculaires sont responsables d'une part importante de la mortalité mondiale. L'apparition des risques cardiovasculaires est fortement corrélée avec l'augmentation de l'adiposité viscérale (Buchholz and Bugaresti, 2005). Il existe donc un lien étroit entre obésité et complications cardiaques. De plus, l'obésité s'accompagne d'une augmentation du volume sanguin, qui a alors une répercussion sur la structure et la fonction cardiaque. Les affections les plus courantes sont l'arythmie, l'hypertension, la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose et la thrombose (Ageno *et al.*, 2006).

L'obésité entraîne d'autres complications telles que des problèmes respiratoires. Les personnes obèses peuvent aussi présenter des problèmes articulaires tels que l'arthrite du fait de la surcharge pondérale qui augmente les contraintes mécaniques au niveau des articulations. L'obésité est aussi un facteur de risque très important pour le développement de stéatose hépatique et pour les

cancers colorectaux, de la prostate, du rein, du sein, du col de l'utérus et des ovaires. Elle est également à l'origine de troubles de sécrétions hormonales, responsables de troubles de la fertilité (Wilborn *et al.*, 2005).

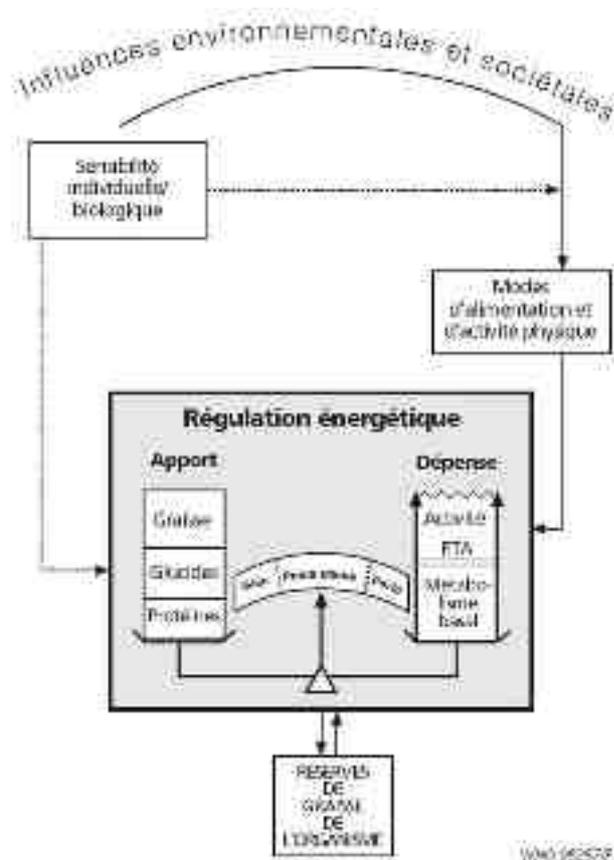
Le surpoids et ses comorbidités sont responsables d'une augmentation de la mortalité des individus obèses. Dès 1999, il avait été établi, qu'aux Etats-Unis, le surpoids et l'obésité étaient responsables de 280 000 morts par an (Allison *et al.*, 1999). Lorsque l'IMC d'un sujet est supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>, le risque de mortalité précoce est multiplié par 2. En effet, les personnes obèses présentent une espérance de vie diminuée de 5 à 20 ans (Hensrud and Klein, 2006). Avec 2,8 millions de décès par an, le surpoids est devenu le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial.

Ils représentent également une fraction importante du coût de santé, puisque 44% de la charge du diabète, 23% de la charge des cardiopathies ischémiques et 7% à 41% de la charge de certains cancers sont attribuables au surpoids et à l'obésité.

Du fait de l'image de minceur et de perfection véhiculée par les médias dans notre société, l'obésité conduit à l'exclusion et à l'isolement des personnes obèses. Ces personnes souffrent alors de complications psychologiques telles que la dépression, l'anxiété, la phobie sociale et les troubles obsessionnels compulsifs (Rosik, 2005).

## **B. Les origines du développement de l'obésité**

L'obésité est causée par une interaction complexe entre la prédisposition génétique, l'environnement et le comportement social. Cependant, la contribution de chaque facteur est encore mal définie. La prédisposition génétique joue un rôle clé dans le développement de l'obésité, tandis que les facteurs environnementaux influencent fortement cette prédisposition en renforçant ou en diluant le terrain génétique (Cheung and Mao, 2012).



**Figure 3 : La régulation énergétique.**

Ce diagramme montre les principes fondamentaux de l'équilibre et de la régulation énergétique. Le poids est régulé par une série de processus physiologiques qui ont la capacité de le maintenir dans des limites relativement étroites (poids stable). Toutefois, des forces sociétales et environnementales importantes influent sur l'apport et la dépense énergétique. La sensibilité des individus à ces forces est fonction de facteurs génétiques et biologiques tels que le sexe, l'âge et l'activité hormonale, sur lesquels on a peu ou pas d'action. On estime que les facteurs diététiques et l'activité physique sont les facteurs intermédiaires modifiables à travers lesquels les forces favorisant la prise de poids s'exercent. ETA : Effet Thermique des Aliments. (WHO, 2000).

### 1) La balance énergétique

La survenue de l'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique dû à un excès d'apport énergétique ou à une diminution des dépenses. Ce déséquilibre peut avoir des origines multiples, qu'elles soient génétiques, environnementales ou sociales. De nombreux facteurs complexes et très divers peuvent donner naissance à un bilan énergétique positif. Ce dernier serait causé par l'interaction entre un certain nombre de ces facteurs, et non par l'influence de l'un ou l'autre facteur en particulier (WHO, 2000) (Figure 3)

Du fait de l'évolution des comportements sociaux et du travail des femmes, la composition des repas a changé. Des repas essentiellement composé de céréales et de légumineuses ont laissé la place à des plats cuisinés plus riche en sucre et en graisse animale. Bien que la taille des portions ait diminué, ce type de repas apporte de plus grande quantité d'énergie (James, 2008). Toutefois, il est incontestable que de nombreux cas d'obésité soient dus à une prise alimentaire excessive. De plus, la robotisation et la mécanisation ont diminué les dépenses énergétiques domestiques et professionnelles (Brownson *et al.*, 2005).

#### *a) Les apports énergétiques*

Ils correspondent aux glucides, lipides et protéines apportés par la boisson et la nourriture. Chaque nutriment est caractérisé par une valeur énergétique. Les glucides et les protéines apportent 4 kcal/g, tandis que les lipides apportent 9 kcal/g. La teneur énergétique des fibres est de l'ordre de 1,5 kcal/g. Elles subissent une dégradation bactérienne dans le gros intestin libérant des acides gras volatils qui sont ensuite absorbés et utilisés sous forme d'énergie.

#### *b) Les dépenses énergétiques*

La dépense énergétique totale, seconde variable qui permet le calcul du bilan énergétique, renferme les trois principaux éléments suivants : le métabolisme de base, la thermogénèse post-prandiale (production thermique induite par les repas) et l'activité physique.

Le métabolisme de base correspond à la dépense énergétique d'une personne au repos à la neutralité thermique. Il ne faut pas le confondre avec le métabolisme minimal qui a lieu au cours du sommeil durant lequel le tonus musculaire est au plus bas. Cette dépense énergétique correspond à la consommation d'énergie nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme. Elle est due en grande partie à l'activité du foie, du cerveau, du cœur, des reins et des muscles. Elle varie principalement en fonction de la masse musculaire, ce qui explique les variations de métabolisme basal dues au sexe et à l'âge (Johnstone *et al.*, 2005). Ainsi, le métabolisme de base pour un homme de 20 ans, mesurant 1,80 m et pesant 70 kg est d'environ 1500 kcals. Celui d'une femme de 20 ans, mesurant 1,65 m et pesant 60 kg est d'environ 1300 kcals.

La thermogénèse adaptative correspond à l'énergie dissipée sous forme de chaleur en réponse à la prise alimentaire, au froid et au stress physiologique.

Lors de la prise alimentaire, la thermogénèse post-prandiale obligatoire est due à la transformation des nutriments et à leur stockage. Il existerait une thermogénèse post-prandiale facultative qui aurait lieu en réponse à une suralimentation afin de dissiper cet excès d'énergie. Elle est essentiellement observée chez la souris qui est capable d'augmenter sa thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun lors d'un régime hypercalorique.

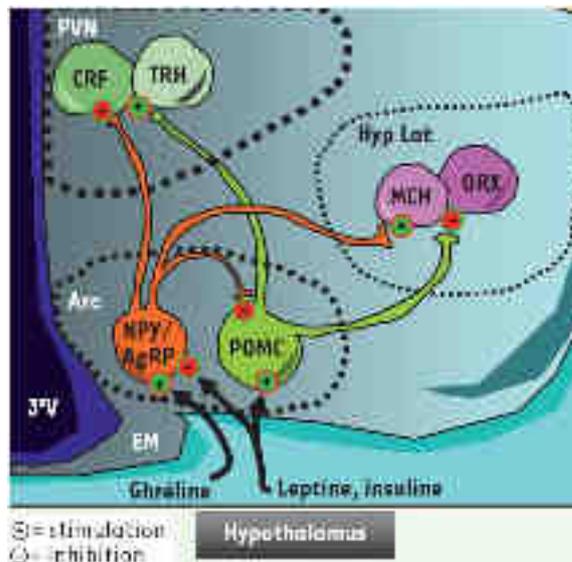
La thermogénèse liée au froid se fait au niveau du tissu adipeux brun chez la souris par l'action de la protéine découplante UCP-1 (*uncoupling protein-1*) localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. La principale fonction des mitochondries est d'assurer la phosphorylation oxydative qui permet la production d'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) grâce à un gradient protonique. La  $\beta$ -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs conduisent à la production de coenzymes réduits, le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>). La phosphorylation oxydative de ces coenzymes va libérer des électrons qui vont être transférés à l'oxygène en passant par la chaîne respiratoire. Ce flux d'électrons conduit à un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui crée un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne. La production d'ATP se produit lors du retour des protons dans la matrice en passant par l'ATP synthase. L'adipocyte brun possède une seconde voie de retour des protons vers la matrice à travers UCP-1, ce qui produit de la chaleur. Cette voie court-circuite celle de l'ATP synthase et il n'y a plus de production d'ATP (Cannon and Nedergaard, 2004). Chez l'Homme, cette thermogénèse se fait au niveau du muscle grâce aux frissons car le tissu adipeux brun est peu représenté à l'âge adulte. Cependant, l'absence de tissu adipeux brun chez l'Homme adulte est sujette à discussion. En effet, l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'UCP-1 peut être détecté dans le tissu adipeux blanc humain (Digby *et al.*, 1998). De ce fait, il est estimé qu'un adipocyte brun est présent pour cent adipocytes blancs au niveau du tissu adipeux viscéral, ce qui sous-entend un rôle du tissu adipeux brun dans la régulation de la balance énergétique, même si son rôle exact reste inconnu (Cinti, 2006).

La mesure dans laquelle chaque élément contribue à la dépense énergétique totale varie en fonction de la régularité et de l'intensité de l'activité physique. Chez l'adulte sédentaire, le métabolisme basal représente près de 60% de la dépense énergétique totale, la réponse thermogène environ 10% et l'activité physique les 30% restants. Chez les personnes exerçant un travail manuel difficile, la dépense énergétique totale augmente et la proportion de la dépense due à l'activité physique peut atteindre 50%. La thermogénèse post-prandiale semble rester constante à 10%, laissant au métabolisme basal 40% de la dépense énergétique totale. Si le métabolisme basal peut présenter des variations intrinsèques d'un individu à l'autre pour un même poids (de l'ordre de  $\pm$

25%), il est strictement contrôlé chez chaque personne. Chez un individu, la variable clé de la dépense énergétique est donc le degré d'activité physique (WHO, 2000). Au cours des dernières décennies, l'activité physique a diminué du fait de la mécanisation domestique et industrielle. Il semble que les dépenses énergétiques aient diminué de 600 kcal entre 1920 et 1990, ce qui concorde avec une augmentation de la prévalence de l'obésité (Prentice and Jebb, 1995). Toutefois, la pratique d'une activité physique régulière est primordiale pour prévenir l'apparition de l'obésité et de ses comorbidités (Warburton *et al.*, 2006).

## 2) Le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire

L'hypothalamus, par l'intermédiaire de la voie leptine/mélanocortine, est au centre de la régulation de l'appétit. La leptine, libérée par le tissu adipeux, va agir sur ses récepteurs situés au niveau de deux populations neuronales dites de « premier ordre ». Ils sont localisés dans le noyau arqué de l'hypothalamus, région impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire. A ce niveau, la leptine stimule l'activité des neurones anorexigènes à proopiomélanocortine (POMC) et à *cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART). Elle agit négativement sur les neurones oréxigènes qui fabriquent le neuropeptide Y (NPY) et l'agouti-related peptide (AgRP). Elle induit la conversion de POMC en *alpha melanocyte stimulating hormone* ( $\alpha$ MSH), qui va alors se lier à son récepteur à la mélanocortine de type 4 (MC4R), un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), afin d'inhiber la prise alimentaire. NPY et AgRP ont pour rôle d'activer la prise alimentaire. L'AgRP est un antagoniste du récepteur MC4R et s'oppose donc à l'action de l' $\alpha$ MSH, tandis que le NPY va agir au niveau du récepteur NPY-Y1R couplé aux protéines G. Ces récepteurs sont exprimés au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) et de l'hypothalamus latéral (Hyp Lat). Dans ces structures se trouvent les neurones dits de « second ordre », constitué des neurones à *corticotropin-releasing factor* (CRF), *thyrotropin-releasing hormone* (TRH), les neurones orexines A et B et *melanin-concentrating hormone* (MCH). Ces neurones sont alors chargés d'intégrer et de distribuer les signaux oréxigènes et anorexigènes vers des structures tertiaires (Luquet, 2008) (Figure 4).



**Figure 4 : Le réseau neuronal du noyau arqué.**

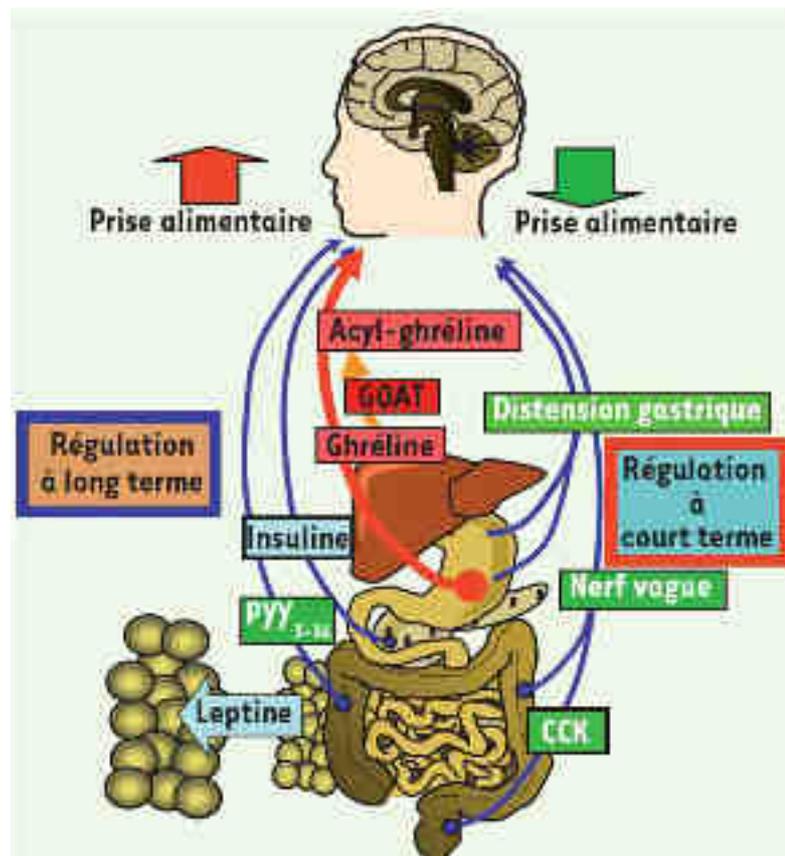
Les neurones orexigènes fabriquent le Neuropeptide Y (NPY) et l'*agouti-related protein* (AgRP), et les neurones anorexigènes à pro- opiomélanocortine (POMC) fabriquent notamment l'*α-melanocyte stimulating hormone* ( $\alpha$ -MSH). Ces deux populations neuronales interagissent entre elles de manière antagoniste et projettent des afférences vers les neurones de « second ordre » dans d'autres régions de l'hypothalamus, comprenant le noyau paraventriculaire (PVN) ou le noyau de l'hypothalamus latéral (Hyp Lat). Au sein de ces structures les neurones NPY/AgRP et POMC exercent une action opposée sur d'autres populations neuronales clés dans la régulation de la balance énergétique comme les neurones à *corticotropin-releasing factor* (CRF) et *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) du PVN, ou les neurones orexines A et B (ORX) et *melanin-concentrating hormone* (MCH) de l'Hyp Lat (Luquet, 2008).

Une dérégulation au niveau de cette voie de contrôle peut donc conduire à une dérégulation de la prise alimentaire, ce qui peut avoir des répercussions sur le développement du tissu adipeux. Les études sur les souris transgéniques ont permis de découvrir de nombreux gènes de prédisposition pour l'obésité, impliqués dans la régulation de l'appétit et de l'homéostasie énergétique *via* la voie leptine/mélanocortine. Par exemple, les souris, dans lesquelles le gène codant pour la leptine (souris *ob/ob*) ou celui pour son récepteur (souris *db/db*) est inactivé, présentent une hyperphagie et une obésité sévère (Forbes *et al.*, 2001). De plus, chez l'Homme, quelques mutations du gène pour la leptine et pour son récepteur ont été identifiées. Les patients porteurs d'une mutation homozygote sur le gène de la leptine sont caractérisés par une hyperphagie, conduisant à l'obésité. Le traitement de ces patients avec de la leptine recombinante permet de normaliser la prise alimentaire (Farooqi *et al.*, 2002). Chez la souris, l'inactivation du gène codant pour MC4R induit une hyperphagie, ainsi qu'une hyperinsulinémie associée à une hyperglycémie (Huszar *et al.*, 1997). Chez l'Homme, une obésité sévère a été associée à des mutations au niveau du gène du récepteur MC4R (Dubern *et al.*, 2001). De plus, une déficience au niveau du neuropeptide POMC, le ligand de MC4R, est aussi associée au développement de l'obésité (Krude *et*

*al.*, 2003). Une mutation du gène humain codant pour CART a été identifiée et associée à une dépense énergétique réduite, conduisant à un phénotype d'obésité (del Giudice *et al.*, 2001). Chez la souris, l'expression ubiquitaire de AgRP induit une obésité (Ollmann *et al.*, 1997), tandis que chez l'Homme, des mutations dominantes du gène codant pour Agouti ont été identifiées dans des syndromes d'obésité (Moussa and Claycombe, 1999). De même, un polymorphisme sur le promoteur du gène AgRP humain serait impliqué dans le développement de l'obésité (Mayfield *et al.*, 2001).

Ce système de régulation au niveau central est très complexe, car il interagit en permanence avec de nombreux organes en périphérie, tels que le tissu adipeux, l'estomac, l'intestin, le pancréas, mais aussi avec l'environnement extérieur. En effet, l'hypothalamus reçoit des signaux provenant du tractus digestif et du tissu adipeux en réponse à la prise alimentaire. Ces signaux, qui peuvent être neuraux ou hormonaux, sont alors intégrés à d'autres signaux centraux ou périphériques afin de réguler l'appétit et la satiété. Par exemple, avant les repas, l'estomac sécrète la ghréline. Après fixation sur son RCPG, *growth hormone secretagogue receptor 1* (GHSR1), elle agit sur la motilité gastrique, la sécrétion d'insuline au niveau du pancréas et la prise alimentaire. La ghréline joue le rôle d'hormone oréxigène capable d'activer la prise alimentaire en activant les neurones NPY. Au niveau de l'intestin, la cholécystokinine (CCK) est capable d'inhiber la prise alimentaire tout en facilitant la digestion des triglycérides en agissant sur l'estomac, le pancréas et la vésicule biliaire (Cummings and Overduin, 2007). Le peptide YY<sub>3-36</sub> (PYY<sub>3-36</sub>) est, lui aussi, sécrété par l'intestin lors de la période postprandiale afin d'induire une sensation de satiété. De plus, les nutriments circulants dans le sang peuvent, eux même, réguler la voie leptine/mélanocortine. En effet, le glucose et les acides gras à longue chaîne peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique afin d'agir sur l'hypothalamus et réguler ainsi la prise alimentaire (Obici and Rossetti, 2003) (Figure 5).

Toutefois, s'il est possible que les effets d'un gène unique ou de gènes multiples puissent être directement à l'origine d'un surpoids ou d'une obésité, ce qui est effectivement le cas chez certains sujets, cela ne semble pas l'être dans la majorité des cas. On estime plutôt actuellement que les gènes impliqués dans la prise de poids augmentent le risque ou la prédisposition d'un sujet à l'obésité lorsqu'il est exposé à un environnement défavorable. Il n'y a que dans le cas de certains troubles génétiques qu'il existe des effets particuliers des gènes nécessaires à l'expression de l'obésité (WHO, 2000).



**Figure 5 : La régulation de la prise alimentaire.**

Le tronc cérébral (TC) est un relais viscérosensitif qui intègre des signaux périphériques de nature nerveuse, comme la distension gastrique issue des mécanorécepteurs de la poche gastrique ou les afférences vagales qui relaient les signaux anorexigènes de la cholécystokinine (CCK) par exemple. L'hypothalamus (Hyp) est un relais métabolique qui intègre des signaux circulants anorexigènes comme la leptine qui circule de manière proportionnelle à la masse adipeuse, l'insuline ou le peptide YY<sub>3-36</sub>. La ghreline, produite par l'estomac, représente à ce jour la seule hormone circulante orexigène, l'acylation de la ghreline est nécessaire à son activité et implique la *ghrelin O-acyl transferase* (GOAT). L'intégration de ces signaux nerveux et hormonaux représente la majeure partie de la régulation à court et long terme de la prise alimentaire (Luquet, 2008).

## C. Le tissu adipeux, acteur de l'obésité

Il existe deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux brun est à l'origine de la formation de chaleur sans frisson. La masse adipeuse blanche est la plus abondante chez l'Homme. Le tissu adipeux blanc a été longtemps considéré comme un simple site de stockage des acides gras, sans activité métabolique. Aujourd'hui, il est vu comme un organe à part entière ayant une activité endocrine, lui permettant de jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique, dans l'appétit et dans l'inflammation.

## 1) La distribution

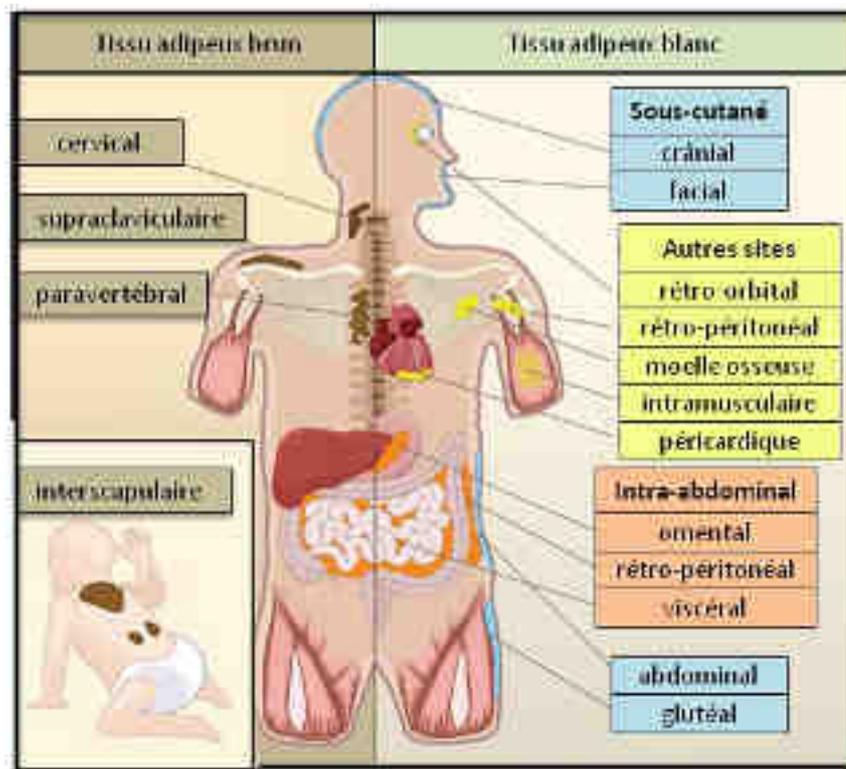
Chez l'Homme, la masse grasse blanche se divise en deux types, le tissu adipeux de support et celui de stockage énergétique.

Le tissu adipeux de support est constitué de tissu conjonctif lâche caractérisé par une abondante matrice extracellulaire. Il est localisé au niveau des orbites, de la plante des pieds et de la paume de la main. Il sert donc de tissu de soutien et de protection.

Le tissu adipeux de stockage correspond donc au site de réserve énergétique dont le développement est fonction de la balance énergétique. Il est lui-même divisé en deux types selon sa localisation : le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral (Figure 6).

La masse grasse sous-cutanée, comme son nom l'indique, est localisée entre les muscles et la peau. Elle est davantage présente chez la femme que chez l'homme. Malgré une répartition commune au niveau de la face par exemple, il présente une distribution anatomique différente selon le sexe et l'âge des individus. Chez l'homme, le tissu adipeux sous-cutané prédomine au niveau de la nuque et des épaules, ainsi qu'au niveau de la région lombaire. Chez la femme, on le retrouve au niveau de la poitrine, des hanches et de la zone glutéo-fémorale.

Le tissu adipeux viscéral est un tissu profond qui va entourer les viscères. Il sert, entre autres, de protection aux contraintes mécaniques auxquelles les organes sont soumis. Ce tissu adipeux est deux fois plus abondant chez l'homme que chez la femme, puisqu'il constitue 10 à 20% de la masse grasse totale chez l'homme et 5 à 10% chez la femme. Toutefois, ce chiffre tend à augmenter chez la femme après la ménopause (Lafontan and Girard, 2008). Il est retrouvé dans la cavité péritonéale au niveau mésentérique, omental et ombilical, dans l'espace rétropéritonéal au niveau aortique et rénal, ainsi que dans l'espace intrapelvien au niveau gonadique et urogénital. L'accumulation de tissu adipeux viscéral est fortement corrélée avec le développement de pathologies métaboliques telles que le syndrome métabolique, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Dhaliwal and Welborn, 2009). De plus, il existe un autre tissu adipeux profond mais non viscéral qu'on retrouve au niveau intramusculaire et du cœur. Ce tissu adipeux est de plus en plus étudié car il pourrait être impliqué dans le développement de certaines maladies associées à l'obésité.



**Figure 6 : Répartition du tissu adipeux chez l'Homme.**

Le tissu adipeux blanc est retrouvé au niveau sous-cutané et au niveau viscéral. (D'après Gesta *et al.*, 2007).

Chez le rongeur, le tissu adipeux blanc est également divisé en tissu adipeux sous-cutané et viscéral. Le tissu sous-cutané est localisé au niveau inguinal, entre la peau et le péritoine, ainsi qu'au niveau des pattes postérieures. La masse grasse viscérale est essentiellement concentrée au niveau des gonades, mais on retrouve aussi des dépôts omentaux, mésentériques et périrénaux (Cinti, 2005).

Le tissu adipeux brun se retrouve principalement chez les animaux hibernants tels que les rongeurs, du fait de son activité de production de chaleur. Il est peu représenté chez l'Homme, sauf chez le fœtus et le nouveau-né, où il est présent au niveau des gros vaisseaux, des reins, du cœur et dans la région interscapulaire. Cette différence de proportion de tissu adipeux brun s'explique par le fait que la dispersion thermique chez l'Homme est plus faible que celle de la souris et qu'il nécessite donc moins de tissu adipeux brun. Cependant, chez environ 10% de la population adulte, du tissu adipeux brun est retrouvé au niveau cervical, supraclaviculaire, paravertébral, médiastinal, paraaortique et suprarrénal (Nedergaard *et al.*, 2007) (Figure 6).

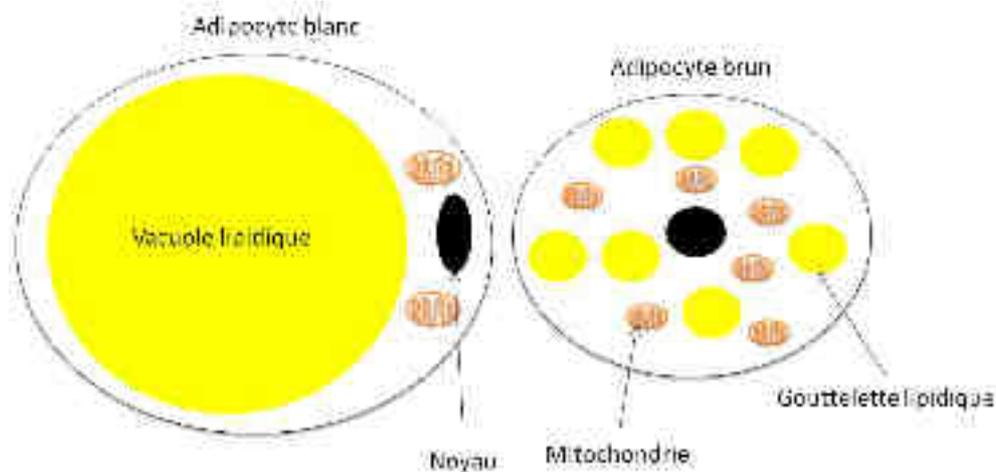
## 2) Les types cellulaires

Le tissu adipeux blanc est composé principalement d'adipocytes, regroupés en petits lobules, séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibrilles de collagène, des fibroblastes, des macrophages et des mastocytes. Entre les adipocytes se trouvent également des préadipocytes à différents stades de différenciation. Les cellules sont séparées les unes des autres par des fibres de réticuline, un grand nombre de capillaires sanguins et par des fibres nerveuses amyéliniques représentant des fibres sympathiques noradrénergiques. On distingue ainsi deux grandes populations, les adipocytes matures et la fraction non-adipocytaire ou fraction stroma-vasculaire (FSV). Il est possible de séparer les adipocytes matures des cellules contenues dans la FSV, après digestion du tissu adipeux avec de la collagénase (Rodbell, 1964).

### a) *L'adipocyte*

L'adipocyte mature est la principale cellule qui compose le tissu adipeux. Cette cellule sphérique est remplie d'une volumineuse vacuole lipidique qui peut représenter jusqu'à 95% du cytoplasme et qui repousse ce dernier contre la membrane plasmique. Dans cette mince couche cytoplasmique se trouve un noyau aplati, ainsi que l'ensemble des autres organelles. L'adipocyte a donc pour fonction de stocker les réserves énergétiques sous forme de triglycérides afin de les restituer aux autres cellules de l'organisme en période de jeûne. Ainsi, selon les besoins en stockage ou en dépense énergétique, la taille de cette cellule est capable de varier de 20 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cette variation de taille de l'adipocyte serait à l'origine de la sécrétion de facteurs capables d'influencer le développement du tissu adipeux. En effet, la vacuole lipidique est recouverte de périlipines, associées à une grande variété de protéines, qui pourraient participer à l'évaluation du stock de triglycérides au sein de l'adipocyte (Blouin *et al.*, 2006). En fonction de la réserve en lipides, l'adipocyte sécrète alors des facteurs influençant le métabolisme énergétique (Skurk *et al.*, 2007) (Figure 7).

Contrairement à l'adipocyte blanc, l'adipocyte brun ne contient pas une grande vacuole lipidique mais de nombreuses petites, réparties dans le cytoplasme qui contient également de nombreuses mitochondries. Le noyau de la cellule est donc en position centrale et la taille de la cellule n'excède pas 60  $\mu\text{m}$ . La couleur de l'adipocyte provient des mitochondries qui contiennent des cytochromes oxydases.



**Figure 7 : Représentation schématique d'un adipocyte blanc et d'un adipocyte brun.**

L'adipocyte blanc contient une grosse vacuole de lipide et peu de mitochondrie. L'adipocyte brun, lui, contient plusieurs gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries.

### *b) Le préadipocyte*

Les adipocytes proviennent de la différenciation des préadipocytes, dite adipogenèse. Le préadipocyte est un type cellulaire relativement immature qui est capable de se différencier en adipocyte en réponse à une stimulation proadipogénique. Le préadipocyte est caractérisé par l'expression du *preadipocyte factor-1* (Pref-1), qui est fortement exprimé dans les préadipocytes et dont l'expression diminue au fur et à mesure de la différenciation, jusqu'à ne plus être exprimé dans les adipocytes matures. Pref-1 appartient à la famille protéique Notch/Delta/Serrate et possède des répétitions similaires à ceux du facteur de croissance épidermale (EGF, *epidermal growth factor*). Pref-1 est synthétisé sous la forme d'une protéine transmembranaire, puis il est clivé en une forme soluble capable d'inhiber l'adipogenèse. Ainsi, les souris n'exprimant plus Pref-1 sont caractérisées par une masse grasse abondante, tandis que les souris surexprimant la forme soluble de Pref-1 présentent une réduction du tissu adipeux (Villena *et al.*, 2002). *In vitro*, la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes peut être inhibée par la surexpression de Pref-1 ou augmentée lorsque l'expression de Pref-1 est abolie par un *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) (Wang *et al.*, 2006).

### *c) La cellule endothéliale*

Les cellules endothéliales sont caractérisées par l'expression du marqueur CD31 ou *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1). Le tissu adipeux est un des tissus les plus

vascularisés puisque chaque adipocyte est entouré par des capillaires. Cette grande vascularisation est nécessaire pour assurer les fonctions de stockage énergétique et endocriniennes. La vascularisation du tissu adipeux joue donc un rôle important dans le développement et le maintien du tissu adipeux. En effet, des analyses en cytométrie de flux montrent que le pourcentage de cellules endothéliales dans la FSV est proportionnel à l'augmentation du volume du tissu adipeux (Miranville *et al.*, 2004). Des expériences d'implantations sous-cutanées réalisées chez la souris montrent que l'implantation de préadipocytes transfectés par une forme dominante négative de *peroxisomal proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), inhibant l'adipogenèse, induit une inhibition de l'angiogenèse. Tandis que l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-*vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) pour inhiber l'angiogenèse conduit à une inhibition de l'adipogenèse (Fukumura *et al.*, 2003).

#### d) *Le macrophage*

Le tissu adipeux contient un grand nombre de macrophages. Il est caractérisé par l'expression du marqueur CD68 (Di Gregorio *et al.*, 2005). Ce nombre augmente proportionnellement à la quantité de masse grasse. L'origine de ces macrophages au sein du tissu adipeux a été longtemps discutée. Des expériences laissent penser que les macrophages peuvent provenir de la différenciation de préadipocytes. En effet, les préadipocytes et les macrophages présentent tous deux une activité de phagocytose (Saillan-Barreau *et al.*, 2003). Toutefois, les expériences de transplantation de moelle osseuse suggèrent que les macrophages du tissu adipeux proviennent de monocytes sanguins circulants (Weisberg *et al.*, 2003) De plus, le tissu adipeux produit un grand nombre de chimiokines, telles que la *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), capable de participer à l'attraction des monocytes (Bouloumie *et al.*, 2005). Le rôle du macrophage au sein du tissu adipeux est encore peu connu. Son activité de production de cytokines lui permet de participer à la régulation de l'adipogenèse et du métabolisme énergétique.

### 3) L'adipogenèse

Les adipocytes proviennent d'une cellule souche mésenchymateuse multipotente, qui est à l'origine des ostéoblastes, des myoblastes et des adipoblastes. Les adipoblastes se différencient ensuite en préadipocytes qui se différencieront en adipocytes (Gesta *et al.*, 2007) (Figure 8).

### a) La détermination

La détermination, ou l'engagement de la cellule souche mésenchymateuse dans l'une ou l'autre de ces lignées, est dépendante d'une stimulation appropriée. Lors de cette phase, la cellule souche s'engagera dans la lignée adipocytaire et perdra son potentiel de différenciation en d'autres lignées cellulaires. Le processus de détermination n'est pas encore très bien compris pour le moment. En effet, la majorité des études sur l'adipogenèse se font sur des lignées cellulaires immortalisées, telles que les fibroblastes embryonnaires de souris 3T3-L1 et 3T3-F442A, qui sont déjà engagés dans la lignée adipocytaire. Ces cellules ne permettent donc pas d'étudier les mécanismes moléculaires de la détermination. Toutefois, des études sur la lignée de cellules souches multipotentes C3H-10T1/2 ont permis de montrer que la *bone morphogenetic protein 4* (BMP4), membre de la superfamille du *tumoral growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), serait responsable de la détermination des cellules souches en adipocytes. En effet, l'inactivation de ce facteur dans les cellules souches ne permet plus l'expression des marqueurs adipocytaires (Tang *et al.*, 2004).

### b) La différenciation

La différenciation des adipocytes est composée de 4 étapes : un arrêt de la phase de croissance des adipoblastes, une expansion clonale mitotique des préadipocytes, une phase de différenciation précoce, suivi d'une différenciation terminale. Au cours de l'adipogenèse, le préadipocyte va acquérir les caractéristiques de l'adipocyte mature, tels que l'expression des protéines impliquées dans le transport et la synthèse des lipides, le développement de la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'adipokines. La succession de ces étapes est orchestrée par une cascade d'évènements transcriptionnels bien connue.

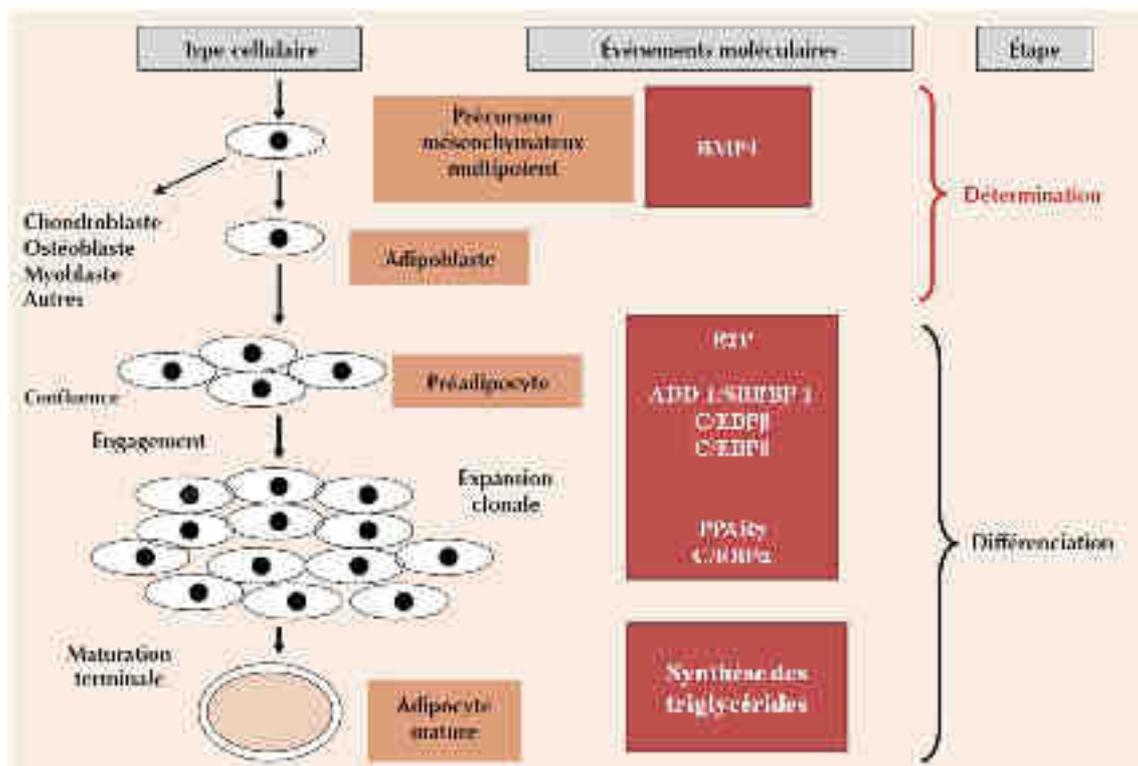
La différenciation des adipoblastes en préadipocytes *in vivo* nécessite un arrêt de la phase de croissance exponentielle par inhibition de contact lorsque les cellules arrivent à confluence (Gregoire *et al.*, 1998).

Au stade de préadipocyte, l'initiation de la différenciation en adipocyte est caractérisée par une phase d'expansion clonale mitotique. Cette phase est essentielle à la poursuite de l'adipogenèse car le blocage de l'expansion mitotique conduit à une inhibition de la différenciation des préadipocytes (Tang *et al.*, 2003). Elle est marquée par l'expression de régulateurs du cycle cellulaire et de marqueurs adipogéniques précoces tels que la lipoprotéine lipase (LPL), la protéine associée à la différenciation adipocytaire ADRP (*adipocyte differentiation related protein*), le

facteur de détermination et différenciation adipocytaire ADD-1/SREBP-1 (*adipocyte determination and differentiation-dependent factor-1/sterol regulatory element binding protein-1*), et les facteurs de transcription CAAT/enhancer binding proteins beta (C/EBP $\beta$ ) et CAAT/enhancer binding proteins delta (C/EBP $\delta$ ) (Rosen *et al.*, 2000).

Ces derniers facteurs sont très importants pour l'initiation de l'adipogenèse et sont activés par les inducteurs de la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et les glucocorticoïdes (Yeh *et al.*, 1995). Des souris, dans lesquelles C/EBP $\beta$  et  $\delta$  sont inactivés, présentent une masse adipeuse réduite et les fibroblastes issus de ces souris mutantes sont incapables de se différencier *in vitro*. Ces deux facteurs ont pour rôle de bloquer la prolifération des préadipocytes en activant la protéine p21. En effet, lors de l'initiation de l'expansion mitotique, les *cyclin-dependant kinase* (Cdk) vont phosphoryler le gène suppresseur de tumeur Rb (*rétinoblastome*) afin de le rendre inactif. A l'état actif, Rb a pour rôle de séquestrer le facteur de transcription E2F. Une fois Rb inactif, E2F est alors libéré et actif, permettant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Lors de la fin de l'expansion clonale, les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et  $\delta$  vont induire l'expression de p21, qui va inhiber les Cdk. Sans ces derniers, Rb va être dans un état hypophosphorylé qui va le rendre actif. Ce changement d'état de Rb va permettre la séquestration de E2F et le blocage du cycle cellulaire (Camp *et al.*, 2002).

Le facteur pro-adipogénique ADD-1/SREBP-1 semble également impliqué dans cette étape de l'adipogenèse. En effet, son inactivation au sein des cellules 3T3-L1 prévient la différenciation terminale. Il participerait à l'induction de l'adipogenèse en induisant l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  (Kim and Spiegelman, 1996). Il régule l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du métabolisme et la synthèse des acides gras. L'expression de ce facteur ne semble pas être sous la dépendance de C/EBP $\beta$  et  $\delta$  car il agirait en amont (Farmer, 2006).



**Figure 8 : L'adipogenèse.**

La détermination des cellules souches mésenchymateuse vers la lignée adipocytaire implique l'expression de la *bone morphogenetic protein 4* (BMP4). L'initiation de l'adipogenèse débute par une phase de prolifération dont l'engagement dans le cycle cellulaire dépend de l'activité de E2F. Puis, les facteurs *adipocyte determination and differentiation-dependent factor-1/sterol regulatory element binding protein-1* (ADD-1/SREBP-1), *CAAT/enhancer binding proteins beta* (C/EBPβ) et *CAAT/enhancer binding proteins delta* (C/EBPδ) sont exprimés afin de mettre fin à la prolifération des cellules et pour initier l'expression du *peroxisomal proliferator activated receptor gamma* (PPARγ) et *CAAT/enhancer binding proteins alpha* (C/EBPα). Ces derniers seront à l'origine de l'expression de facteurs impliqués dans la synthèse et l'accumulation des triglycérides. (D'après Fève and Mercier, 2007).

Une fois l'arrêt de l'expansion clonale mitotique, la différenciation terminale des adipocytes est caractérisée par une progressive accumulation de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme, qui vont fusionner pour finalement créer une vacuole unique. Ce phénomène est dû au développement d'une capacité lipogénique du fait de l'expression d'enzymes spécifiques telles que la *glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase* (G3PDH), la *fatty acid translocase* (FAT), l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) et la LPL, mais aussi à l'expression du transporteur 4 du glucose (GLUT4, *glucose transporter 4*) et des récepteurs à l'insuline (IR, *insulin receptor*). En parallèle, se met en place la voie lipolytique par l'intermédiaire de l'enzyme spécifique, la lipase hormono-sensible (LHS), ainsi que par l'expression de la protéine de transport des acides gras aP2 (*adipocyte protein 2*), dont le rôle est de prévenir un éventuel effet cytotoxique des acides gras libres. Enfin,

l'adipocyte développe sa capacité à sécréter des facteurs qui agiront de façon autocrine, paracrine et endocrine. Cette phase de l'adipogenèse est caractérisée par l'expression des facteurs de transcription PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ . Leur expression serait induite par C/EBP $\beta$  et  $\delta$ , puisque les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour C/EBP $\beta$  et  $\delta$  n'expriment plus ces facteurs (Tanaka *et al.*, 1997). Il a été montré que l'expression de C/EBP $\alpha$  augmente directement après celle de PPAR $\gamma$  (Rosen and MacDougald, 2006). Toutefois, il a également été montré que l'expression de PPAR $\gamma$  dans des cellules fibroblastiques déficientes en C/EBP $\alpha$  induit l'adipogenèse, mais l'inverse n'est pas vrai, ce qui sous-entend que C/EBP $\alpha$  induirait l'expression de PPAR $\gamma$  (Farmer, 2006). Ces résultats divergeant laissent donc penser que PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  contrôleraient réciproquement leur expression, mais que PPAR $\gamma$  serait le facteur dominant.

PPAR $\gamma$  est exprimé tout au long de la vie de l'adipocyte et est le facteur clé de l'adipogenèse. Son expression est nécessaire et suffisante pour induire la différenciation des préadipocytes, puisque cette dernière est inhibée en l'absence de PPAR $\gamma$  et qu'à l'inverse son expression suffit à induire l'adipogenèse. Il existe deux isoformes de PPAR $\gamma$  dû à un promoteur alternatif, PPAR $\gamma$ -1 et PPAR $\gamma$ -2. Bien que les deux isoformes soient exprimées dans le tissu adipeux, seul PPAR $\gamma$ -2 est considéré comme un marqueur spécifique de l'adipocyte. Toutefois, les souris déficientes en PPAR $\gamma$ -2 possèdent encore du tissu adipeux, suggérant que PPAR $\gamma$ -1 peut compenser légèrement la perte de PPAR $\gamma$ -2 (Gesta *et al.*, 2007). PPAR $\gamma$  participe à la fois aux processus d'adipogenèse, au maintien du métabolisme lipidique et aux fonctions endocrines de l'adipocyte mature. En effet, PPAR $\gamma$  est responsable de l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques des adipocytes tels que la protéine de transport des acide gras aP2, la *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) et la LPL (Chawla *et al.*, 1994). PPAR $\gamma$  jouerait également le rôle de capteur sensoriel de la réserve lipidique de l'adipocyte par interaction avec des acides gras libres, qui peuvent ainsi modifier son activité (Grimaldi, 2001). Dans la famille des PPARs, il existe aussi PPAR $\alpha$  et PPAR $\delta$ , qui sont également exprimés par l'adipocyte. Ils joueraient un rôle moindre dans l'adipogenèse mais seraient essentiellement impliqués dans le métabolisme des lipides.

C/EBP $\alpha$  est, lui aussi, exprimé tout au long de la vie de l'adipocyte et est impliqué dans l'adipogenèse. Son rôle prédominant est d'induire l'expression de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline, et plus particulièrement le transporteur du glucose GLUT-4. En effet, l'inactivation de C/EBP $\alpha$  dans les adipocytes conduit à une insensibilité à l'insuline de ces cellules, mais sa réexpression rétablit ce phénomène (Wu *et al.*, 1999).

### c) La différenciation adipocytaire brune

Bien que les étapes de l'adipogenèse soient bien documentées à l'heure actuelle, le mécanisme transcriptionnel régissant la différenciation vers un phénotype d'adipocyte blanc ou brun est mal connu. Il semble que l'innervation sympathique jouerait un rôle dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes bruns. L'existence d'un précurseur commun n'est pas encore clairement définie. Il existe des facteurs de transcription communs à la différenciation blanche et brune, tel que PPAR $\gamma$ , par exemple. Il semble que C/EBP $\beta$  soit aussi impliqué dans la différenciation des adipocytes bruns (Karamanlidis *et al.*, 2007). PPAR $\alpha$  est principalement exprimé dans le tissu adipeux brun comparé au tissu adipeux blanc. Il semble intervenir dans la différenciation des adipocytes bruns en induisant l'expression de gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation (Kamijo *et al.*, 2007). Le déterminisme de l'adipogenèse vers un phénotype d'adipocyte brun dépendrait du facteur de transcription *PR domain zinc finger protein 16* (PRDM16), puisque la surexpression de ce facteur au sein de préadipocytes induit l'expression de marqueurs spécifiques de l'adipocyte brun et supprime celle des gènes spécifiques de l'adipocyte blanc (Seale *et al.*, 2007). Il apparaît également que le facteur de transcription *forkhead box C2* (FOXC2) soit impliqué dans la différenciation des adipocytes bruns. En effet, les souris déficientes pour son gène sont maigres. Elles ont un tissu adipeux qui ressemble à du tissu adipeux brun et leurs adipocytes blancs possèdent une activité thermogénique (Davis *et al.*, 2004).

Certaines études ont pu montrer des points communs entre le tissu adipeux brun et le tissu musculaire. En effet, ils contiennent tous deux de nombreuses mitochondries, capables d'utiliser la phosphorylation oxydative pour consommer de l'énergie et la thermogenèse adaptative pour produire de la chaleur. De plus, le tissu adipeux brun et le tissu musculaire auraient en commun une cellule progénitrice qui exprimerait le facteur de transcription *myogenic factor 5* (Myf5). Au sein de ce progéniteur, l'expression du facteur de transcription PRDM16 induit une différenciation en adipocyte brun, alors que l'inactivation de ce facteur conduit à un développement vers un phénotype musculaire. De même, des myoblastes surexprimant PRDM16 sont capables de se différencier en adipocytes bruns (Seale *et al.*, 2008).

#### 4) Le métabolisme lipidique

##### a) *La lipogenèse*

La principale fonction du tissu adipeux est de stocker les acides gras sous forme de triglycérides lors d'un apport énergétique. Ces derniers sont synthétisés par un mécanisme appelé la lipogenèse. Elle fait intervenir des acides gras et du glycérol-3-phosphate (G3-P).

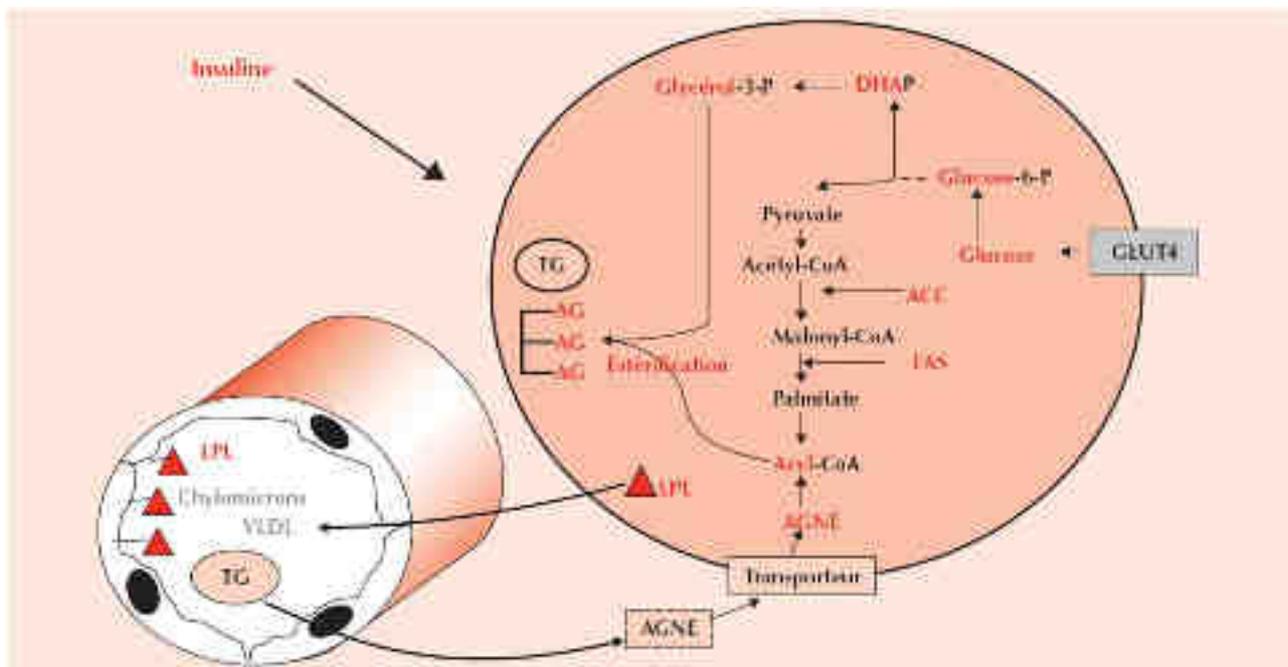
Les acides gras proviennent de la circulation sanguine et sont donc, en partie, issus des lipides alimentaires. Au niveau de l'estomac, les triglycérides de l'alimentation commencent à être dégradés par les lipases gastriques. La dégradation se poursuit au niveau de l'intestin par l'intermédiaire des enzymes pancréatiques et des sels biliaires. On aboutit à la formation de molécules d'acides gras et de monoglycérides, peu solubles dans l'eau, qui vont s'associer avec les sels biliaires pour former un mélange de micelles. Les acides gras à courte chaîne, parviennent à entrer directement dans la circulation sanguine où ils seront transportés par l'albumine sérique. Les micelles, elles, vont être dissoutes au niveau des microvillosités des entérocytes grâce à un gradient de pH créé par des pompes à protons. Les acides gras libérés peuvent franchir les membranes des entérocytes et être ainsi absorbés par diffusion passive ou par l'intermédiaire de transporteurs tels que la protéine de liaison des acides gras intestinaux (IFABP, *intestinal fatty acid binding protein*), la *fatty acid translocase protein 4* (FATP4) ou CD36 (Tso *et al.*, 2004). Une fois dans la cellule épithéliale intestinale, les acides gras sont activés par l'acyl-CoA synthase pour former des acyl-coenzyme A (acyl-CoA). Dans le réticulum endoplasmique, un monoglycéride, associé à deux molécules d'acyl-CoA, va être ré-estérifié par la monoglycéride acyltransférase pour former un triglycéride. Ce dernier va s'associer à des lipoprotéines de type ApoA et ApoB48 pour rejoindre la circulation sanguine sous forme de chylomicrons (Niot *et al.*, 2009).

Les acides gras de la circulation sanguine peuvent aussi avoir une origine endogène et provenir de la lipogenèse *de novo* du foie. Cette dernière permet la formation d'acides gras à partir du glucose. Ces acides gras vont alors former des triglycérides par association avec du glycérol. Ils vont alors se lier à des apolipoprotéines pour former des lipoprotéines de très basse densité (VLDL, *very low density lipoprotein*).

La synthèse des triglycérides adipocytaires utilise donc, soit les acides gras liés à l'albumine circulant dans le sang, soit les triglycérides présents dans la circulation sous forme de lipoprotéines de type chylomicrons et VLDL. A la surface des cellules endothéliales est localisée la LPL synthétisée par les adipocytes, qui hydrolyse les triglycérides en glycérol et acides gras non

estérifiés. Ces derniers vont alors diffuser dans l'adipocyte où ils vont être activés en acyl-CoA (Thompson *et al.*, 2009). Le glycérol va, soit être redirigé vers le foie où il sera métabolisé, soit pénétrer dans l'adipocyte où il sera transformé en G-3P par la glycérol kinase (Figure 9).

Toutefois, les acides gras présents dans l'adipocyte peuvent aussi provenir d'une synthèse endogène d'acides gras à partir du glucose. Le glucose pénètre dans la cellule par l'intermédiaire du transporteur GLUT4, dont la translocation à la membrane est contrôlée par l'insuline. La réaction de glycolyse transforme alors le glucose en pyruvate. Il entre dans la mitochondrie où il sera converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Celui-ci est transformé en citrate afin de sortir de la mitochondrie. Dans le cytoplasme, le citrate est converti en acétyl-CoA. Ce dernier est alors transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase. La réaction s'achève par la formation d'acyl-CoA par la *fatty acid synthase* (FAS). De plus, la réaction de glycolyse du glucose fournit le G-3P nécessaire à la formation des triglycérides (Figure 9).



**Figure 9. : La lipogenèse.**

Le principal rôle du tissu adipeux est de stocker les réserves énergétiques sous forme de triglycérides (TG). Ces derniers proviennent de la circulation sanguine. Avant leur entrée dans l'adipocyte, les *very low density protein* (VLDL) sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) afin de former des acides gras non estérifiés (AGNE). Ceux-ci vont être convertis en acide gras (AG). Le glucose entre dans l'adipocyte par l'intermédiaire du transporteur de glucose GLUT4. Il est transformé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) puis en glycérol-3P, nécessaire à la synthèse de TG. La synthèse d'AG peut aussi provenir de la transformation du glucose en AG grâce à l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et à la *fatty acid synthase* (FAS) (Fève and Mercier, 2007).

La synthèse des triglycérides à partir de G-3P et d'acides gras au sein de l'adipocyte débute par la conversion du G-3P en acide lysophosphatidique (LPA) par la glycerol phosphate acyltransferase (GPAT). Le LPA formé va ensuite être transformé en acide phosphatidique (PA) par l'acylglycerol phosphate acyltransferase (AGPAT). La phosphatase de l'acide phosphatidique (PAP) va déphosphorylé l'acide phosphatidique pour former du diacylglycérol (DAG). Ce dernier va alors être transformé en triacylglycérol, ou triglycérides, par la diacylglycerol acyltransferase (DGAT).

Ce mécanisme est régulé par les catécholamines et par l'insuline. Les cathécholamines exercent une action anti-lipogénique du fait de la production d'AMPc. L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est inhibée par la protéine kinase A (PKA), tandis que l'insuline s'oppose à cet effet en augmentant la translocation du transporteur au glucose GLUT4.

### *b) La lipolyse*

Lorsque les cellules de l'organisme ont besoin d'énergie, celui-ci doit être capable de mobiliser les graisses de réserve pour que les organes puissent en disposer. La lipolyse est le phénomène par lequel les triglycérides sont hydrolysés en acides gras et glycérol. Elle fait intervenir trois enzymes différentes : la lipase hormono-sensible, l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL) et la monoglycéride lipase (MGL). La LHS est capable d'hydrolyser les triglycérides et les diglycérides. Sous sa forme inactive, elle est localisée dans le cytoplasme. Une fois activée par phosphorylation, elle migre à la surface de la vacuole lipidique (Egan *et al.*, 1992). L'activation de cette enzyme est stimulée par les catécholamines. L'ATGL est capable d'hydrolyser uniquement la première fonction ester des triglycérides. Son existence a été suspectée après la génération de souris déficientes en LHS qui présentaient une lipolyse de base conservée et une accumulation de diglycérides au niveau des adipocytes (Haemmerle *et al.*, 2002). Enfin, a MGL hydrolyse la dernière fonction ester des monoglycérides.

La lipolyse aboutit donc à la formation d'acides gras et de glycérol. Le glycérol est libéré dans la circulation sanguine et redirigé vers le foie afin d'être métabolisé en glucose lors de la néoglucogénèse. Les acides gras sont eux aussi libérés dans le sang, sous forme non estérifiés, et transportés par l'albumine jusqu'aux organes cibles tels que le foie et le muscle. La protéine de transport des acides gras, aP2, favorise l'exportation des acides gras vers l'extérieur de l'adipocyte. Elle est capable de lier la LHS pour prévenir l'accumulation des acides gras issus de la lipolyse au niveau du cytoplasme (Baar *et al.*, 2005).

Au niveau des cellules cibles, l'oxydation des acides gras au sein des mitochondries va permettre la synthèse d'énergie sous forme d'ATP. La  $\beta$ -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs conduisent à la production des coenzymes réduits NADH et FADH<sub>2</sub>. La phosphorylation oxydative de ces coenzymes va libérer des électrons qui vont être transférés à l'oxygène en passant par la chaîne respiratoire. Ce flux d'électrons crée un gradient électrochimique dû à un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le retour des protons dans la matrice en passant par l'ATP synthase entraîne la production d'ATP.

Toutefois, une partie des acides gras libérés par l'adipocyte va être recapturée par les adipocytes et réestérifiée pour former des triglycérides. Il semble donc que la quantité d'acides gras libérés dans la circulation est due à un équilibre entre la lipolyse et la réestérification (Zimmermann *et al.*, 2003).

Les catécholamines sont les effecteurs essentiels de la lipolyse. Leur action lipolytique est relayée par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine Gs de type stimulateur et à l'adénylyl-cyclase. A l'inverse, les récepteurs  $\alpha_{2A}$ -adrénergiques présentent un effet antilipolytique, du fait de leur couplage à une protéine Gi à activité inhibitrice de l'adénylyl cyclase (Langin *et al.*, 2000).

## 5) La fonction sécrétrice

Le tissu adipeux est capable de sécréter un grand nombre de molécules bioactives d'origine lipidiques mais surtout protéiques. Ces molécules peuvent être produites par les adipocytes, mais aussi par les cellules de la FSV. Les adipokines regroupent une cinquantaine de molécules différentes et peuvent avoir des actions endocrines, paracrines et autocrines. Elles contrôlent le métabolisme, l'homéostasie énergétique, mais aussi l'état inflammatoire du tissu adipeux (Trayhurn and Wood, 2004). Nous allons résumer le rôle des principales adipokines et citer leurs implications dans l'obésité.

### a) *La leptine*

La leptine est le produit du gène *Ob*, dont la séquence est relativement bien conservée entre les espèces (80% entre l'Homme, la souris et le rat). Elle est produite dans différents organes tels que le muscle, le foie, l'estomac, la glande mammaire et le tissu adipeux brun. Cependant le tissu adipeux blanc, par ses adipocytes, reste la principale source de leptine. Sa concentration

plasmatique dépend donc de la masse adipeuse de l'individu (Trayhurn and Beattie, 2001). La production de leptine est contrôlée par la composition et l'apport calorique des repas. Toutefois, ce contrôle se voit plus clairement chez la souris, puisqu'après un repas, le taux de leptine augmente, alors que chez l'Homme, il faut appliquer un régime hypercalorique pendant plusieurs jours pour observer une augmentation de ce taux (Korbonits *et al.*, 1997). Ce contrôle serait dû à l'insuline, car une augmentation du taux plasmatique de leptine est observée après injection d'insuline chez la souris (Saladin *et al.*, 1995). D'autres facteurs sont capables de stimuler la production de leptine, tel que le glucose, les glucocorticoïdes, les œstrogènes, le *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ) et l'interleukine-1. En revanche, sa production peut être inhibée en réponse au jeûne ou au froid, ainsi que par le système nerveux sympathique, les acides gras libres et les PPARs.

La leptine agit au niveau de son récepteur, ObR, codé par le gène *Db*. Il est exprimé dans l'ensemble des tissus périphériques, ce qui suggère des actions diverses et variées afin de contrôler le métabolisme lipidique. Au niveau du système nerveux central, la leptine est une hormone de la satiété qui exerce un rétrocontrôle hypothalamique selon la masse adipeuse. Comme expliqué précédemment (Chapitre I.B.2), elle agit au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus, région impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire. Elle stimule également la dépense énergétique en agissant sur le système nerveux sympathique et favorise l'utilisation des lipides par rapport aux glucides, afin d'aboutir à un bilan énergétique négatif (Reidy and Weber, 2000). De ce fait, l'injection de leptine chez le rat entraîne une augmentation des dépenses énergétiques et une diminution de l'appétit, conduisant à une réduction de la masse adipeuse et du poids corporel (Rajala and Scherer, 2003). Au niveau périphérique, elle peut inhiber l'expression de ADD-1/SERBP-1 dans le tissu adipeux et d'autres tissus tels que le foie et le pancréas, afin d'inhiber la lipogenèse (Kakuma *et al.*, 2000). Elle augmente la lipolyse au niveau des adipocytes (Martinez *et al.*, 2000). Elle stimule l'oxydation des acides gras dans le muscle, mais aussi le transport du glucose dans le muscle et contrôle sa sensibilité à l'insuline. Elle peut également agir au niveau des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas afin d'inhiber la sécrétion d'insuline (Lau *et al.*, 2001) (Minokoshi *et al.*, 2002). Enfin, la leptine est capable de stimuler l'angiogenèse nécessaire à l'expansion de la masse grasse (Bouloumie *et al.*, 1998).

Dans le cas de l'obésité, la concentration en leptine est augmentée et semble caractéristique de l'hypertrophie adipocytaire (Friedman, 2002). Par ses effets sur la régulation de la prise alimentaire et sur le métabolisme énergétique, la leptine pourrait être utilisée dans les traitements contre l'obésité. En effet, l'utilisation de leptine recombinante chez des patients, sujets à une déficience en leptine, est efficace contre l'obésité (Gordon, 1997). Toutefois, l'une des caractéristiques de l'obésité est le développement d'une résistance centrale à la leptine à partir

d'une certaine concentration plasmatique. Les raisons de l'apparition de cette résistance ne sont pas encore entièrement élucidées. Elle pourrait provenir d'un défaut de transport de la leptine, d'une diminution de l'expression de ses récepteurs ou d'un défaut de la voie de signalisation du récepteur (Banks *et al.*, 1999).

La leptine semble jouer un rôle dans l'état inflammatoire du tissu adipeux au cours de l'obésité. Elle stimule l'inflammation par l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire au niveau des macrophages (Fantuzzi and Faggioni, 2000).

### *b) L'adiponectine*

L'adiponectine est connue sous différents noms, du fait de sa découverte simultanée par différentes équipes ; elle porte donc les noms d'*adipocyte complement-related protein of 30kDa* (Acrp30) ou d'AdipoQ chez la souris et de *gelatin-binding protein 28* (GBP-28) ou d'*adipose most abundant gene transcript 1* (apM1) chez l'Homme. Elle est produite au niveau du tissu adipeux et représente 0,01% des protéines plasmatiques totales. Toutefois, elle semble être plus exprimée dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu viscéral (Lihn *et al.*, 2004). L'adiponectine est sécrétée uniquement par les adipocytes différenciés, même s'il a été observé une sécrétion d'adiponectine par les cellules de la FSV. En effet, les cellules de la FSV semblent capables de la capter puis de la libérer ultérieurement (Fain, 2006).

L'adiponectine agit au niveau de ses récepteurs AdipoR-1 et 2. Dans le foie et le muscle, l'adiponectine est capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline, de stimuler l'utilisation du glucose, d'augmenter le transport et l'oxydation des acides gras du muscle et de réduire la production de glucose par le foie (Fruebis *et al.*, 2001) ; (Combs *et al.*, 2001).

Il existe une corrélation inverse entre le taux d'adiponectine et le degré d'obésité, puisque le taux d'adiponectine est plus faible chez les sujets et les souris obèses (Arita *et al.*, 1999). L'apparition du diabète de type 2 serait précédé par une diminution du taux d'adiponectine. Ce résultat suggère que la baisse de l'adiponectinémie ne serait pas la conséquence mais la cause du développement de la résistance à l'insuline (Lindsay *et al.*, 2002). L'injection d'adiponectine recombinante chez des souris insulino-résistantes est capable de rétablir les anomalies métaboliques (Yamauchi *et al.*, 2001). De même, l'utilisation des thiazolidinediones dans le traitement de l'insulino-résistance conduit à une augmentation du taux d'adiponectine (Kershaw and Flier, 2004). Il semble que les glucocorticoïdes et les agonistes  $\beta$ -adrénergiques, connus pour être impliqués dans

le mécanisme de résistance à l'insuline, participent à l'inhibition de l'expression d'adiponectine (Fasshauer *et al.*, 2001) ; (Fasshauer *et al.*, 2002).

L'adiponectine semble jouer un rôle dans la modulation de l'inflammation de la masse adipeuse en expansion. Elle induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, tout en inhibant l'expression de cytokines pro-inflammatoires. De plus, elle peut réduire l'expression des molécules d'adhésion de l'endothélium afin d'inhiber le recrutement des monocytes (Tilg and Moschen, 2006).

### *c) La résistine*

La résistine est principalement sécrétée au niveau du tissu adipeux, mais elle l'est aussi au niveau du cerveau, du muscle squelettique, des îlots pancréatiques, du tractus digestif et des glandes surrénales. Dans la masse adipeuse de souris, l'adipocyte est responsable de la sécrétion de résistine (Steppan *et al.*, 2001). Chez l'Homme, certaines études montrent qu'elle proviendrait des macrophages du tissu adipeux (Curat *et al.*, 2006). Tandis que d'autres observent une sécrétion au niveau des adipocytes (Pagano *et al.*, 2005). Une augmentation de l'expression de la résistine est observée au cours de l'adipogenèse. La résistine régule le métabolisme glucidique en modulant la sensibilité à l'insuline du foie et du muscle squelettique.(Steppan *et al.*, 2001)

Son rôle métabolique serait à l'origine du développement d'une insensibilité à l'insuline. Chez des souris obèses, le taux plasmatique de résistine est augmenté. Elle réduit la capture des acides gras dans le muscle, ainsi que leur métabolisme. Cet effet serait alors responsable d'une insulino-résistance au niveau du foie (Sato *et al.*, 2005). L'utilisation d'anticorps neutralisants la résistine permet l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Rajala and Scherer, 2003). A l'inverse, l'injection de résistine recombinante chez la souris provoque une production accrue de glucose au niveau du foie, ce qui induit alors une insulino-résistance hépatique (Rangwala *et al.*, 2004). *In vitro*, la résistine est capable de perturber la voie de signalisation de l'insuline, ce qui entraîne une insensibilité à l'insuline des cellules 3T3-L1.

La résistine joue un rôle dans l'inflammation associée à l'obésité. Elle augmente l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium afin d'accroître l'infiltration de macrophages (Tilg and Moschen, 2006). Elle joue aussi un rôle direct sur ces macrophages en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'interleukine-6 (IL-6) (Silsal *et al.*, 2005).

#### d) L'apeline

L'apeline est retrouvée dans le système nerveux central, ainsi que dans divers organes au niveau périphérique tels que le cœur, les reins, l'intestin, les poumons, les ovaires, la glande mammaire en lactation, les testicules et le tissu adipeux. En niveau du tissu adipeux, elle est principalement sécrétée par les adipocytes, mais l'est aussi par les cellules de la FSV. Elle est le ligand du récepteur APJ. Ce dernier est localisé dans le système nerveux central, la rate, le thymus, le colon, le système cardiovasculaire, les ovaires, les testicules et le tissu adipeux (Kawamata *et al.*, 2001). La large répartition de l'apeline et de son récepteur au sein de l'organisme témoigne de leur implication dans divers phénomènes biologiques. Ils jouent, par exemple, un rôle dans le système cardiovasculaire où ils régulent la pression artérielle et la fréquence cardiaque (Castan-Laurell *et al.*, 2005).

Au niveau du métabolisme énergétique, l'apeline semble jouer un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire (Taheri *et al.*, 2002). Il semble exister une régulation réciproque de l'expression de l'apeline et de l'insuline. L'expression de l'apeline est, en partie, sous la dépendance de l'insuline et son taux plasmatique varie en fonction de celui de l'insuline. En effet, la destruction des îlots de Langerhans du pancréas producteur d'insuline induit une baisse de l'expression d'apeline au niveau des adipocytes (Boucher *et al.*, 2005). D'autre part, l'apeline semble inhiber la sécrétion d'insuline au niveau du pancréas après une injection de glucose chez la souris (Sorhede Winzell *et al.*, 2005). De plus, elle améliore l'action de l'insuline au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux. Ce mécanisme induit l'augmentation du stockage du glucose au sein des tissus (Dray *et al.*, 2008).

Au cours de l'obésité, la masse grasse et le taux d'insuline augmentant, le taux d'apeline plasmatique augmente. Toutefois, la régulation de l'expression de l'apeline et de son récepteur par l'insuline semble modifiée au cours du développement de l'insulino-résistance, et ce de façon différente selon le tissu. Dans le muscle, l'expression d'APJ est diminuée chez les souris insulino-résistantes et diabétiques, alors que celle de l'apeline diminue seulement chez les souris diabétiques. L'expression d'APJ et de son ligand sont augmentés dans le tissu adipeux de souris présentant une insensibilité à l'insuline due à un régime hyperlipidique, mais pas chez la souris diabétique. Ces résultats laissent penser que l'expression de l'apeline devient moins sensible à l'insuline au cours du développement du diabète (Dray *et al.*, 2010). De plus, son expression est régulée par le TNF $\alpha$ , qui est connu comme un acteur important dans la mise en place de l'insulino-résistance (Daviaud *et al.*, 2006).

#### e) *Le TNF $\alpha$*

Le TNF $\alpha$  soluble est obtenu après clivage de sa forme membranaire. Il est défini comme une cytokine pro-inflammatoire et est principalement sécrétée par les cellules du système immunitaire. Au sein du tissu adipeux, il est produit par les cellules de la FSV et particulièrement par les macrophages (Fain, 2006). Il est également nommé cachectine ou cachexine, pour son rôle dans la cachexie (état se caractérisant par la faiblesse et la malnutrition) et est impliqué dans le métabolisme lipidique. *In vitro*, le TNF $\alpha$  est exprimé dans les préadipocytes et son expression est peu augmentée au cours de l'adipogenèse (Hube *et al.*, 1999). Il inhibe l'adipogenèse en modulant l'activité de PPAR $\gamma$  et de certains médiateurs anti-adipogéniques tels que GATA2 et GATA3 (Cawthorn *et al.*, 2007). Il est aussi impliqué dans la dédifférenciation des adipocytes. Au niveau du tissu adipeux, il est capable d'inhiber l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse et dans le stockage des acides gras, tout en activant ceux impliqués dans la lipolyse. Dans le foie, il inhibe la capture du glucose et l'oxydation des acides gras, mais active la synthèse d'acides gras (Sethi and Hotamisligil, 1999). Il permet ainsi de limiter l'expansion du tissu adipeux en augmentant le taux d'acides gras circulants.

Au cours de l'obésité, l'augmentation de masse grasse conduit à l'augmentation de l'expression du TNF $\alpha$ . Son rôle physiologique normal est alors exacerbé et participe à l'établissement de l'insulino-résistance, du fait de l'accumulation d'acides gras libres. De plus, le TNF $\alpha$ , est capable de moduler la sensibilité à l'insuline. Il inhibe la voie de signalisation de l'insuline en déphosphorylant le récepteur à l'insuline (Lang *et al.*, 1992) et diminue ainsi la translocation du récepteur au glucose (Ruan *et al.*, 2002). En effet, les souris obèses insulino-résistantes présentent un fort taux plasmatique en TNF $\alpha$ . A l'inverse, les souris obèses, dans lesquelles le gène codant pour le TNF $\alpha$  ou pour son récepteur est inactivé, sont caractérisées par une meilleure tolérance au glucose due à l'amélioration de leur sensibilité à l'insuline (Kershaw and Flier, 2004).

Au niveau de l'inflammation, il induit l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 (Langin and Arner, 2006).

#### f) *L'interleukine-6*

L'IL-6 joue un rôle dans l'inflammation et la régulation des cellules T et B. Elle est entre autre sécrétée au niveau du tissu adipeux, par les cellules de la FSV et par les adipocytes. Il a été observé une différence de sécrétion d'IL-6 selon la localisation du tissu adipeux. Le tissu adipeux

sous-cutané serait le site principal d'expression d'IL-6 sauf dans les cas de forte obésité où la sécrétion du tissu viscéral devient plus importante (Fain, 2006). Elle possède les mêmes propriétés physiologiques que le TNF $\alpha$ . Elle joue un rôle inhibiteur sur l'adipogenèse, *via* une action paracrine des adipocytes sur les préadipocytes (Sopasakis *et al.*, 2004). Elle active la lipolyse du tissu adipeux et inhibe la lipogenèse, augmentant ainsi les taux d'acides gras circulants. Son expression est induite par le TNF $\alpha$ , les glucocorticoides, les cathécholamines mais aussi par les PPARs (Klimcakova *et al.*, 2007). En plus de son rôle périphérique, elle semble agir dans la régulation du métabolisme énergétique au niveau du système nerveux central (Wallenius *et al.*, 2002).

Par son action stimulatrice de la lipolyse et par l'augmentation de sa concentration plasmatique chez le sujet obèse, l'IL-6 participerait au développement de la résistance à l'insuline. Tout comme le TNF $\alpha$ , elle diminue la sensibilité à l'insuline en modulant la voie de signalisation de l'insuline et en augmentant l'expression du *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3) (Senn *et al.*, 2003). Toutefois, au niveau du muscle son rôle semble différent. En effet, le muscle en exercice sécrète de l'IL-6 et sa sensibilité à l'insuline est augmentée (Ruderman *et al.*, 2006).

#### g) *Le MCP-1*

MCP-1 est une chimiokine produite et sécrétée, entre autre, au niveau du tissu adipeux. Les macrophages la sécrète afin d'induire le recrutement de nouveaux monocytes. Elle augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages dont elle stimule le recrutement (Shoelson *et al.*, 2006).

Son expression est augmentée dans les modèles d'obésité. Elle participe activement à l'inflammation du tissu adipeux obèse. Dans ce dernier, elle inhibe la différenciation des préadipocytes en réprimant l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse. Son rôle physiologique dans le tissu adipeux l'implique dans la mise en place de l'insulino-résistance. En effet, elle jouerait aussi un rôle dans la sensibilité à l'insuline en modifiant la voie de signalisation de l'insuline et la translocation de GLUT4 (Sartipy and Loskutoff, 2003).

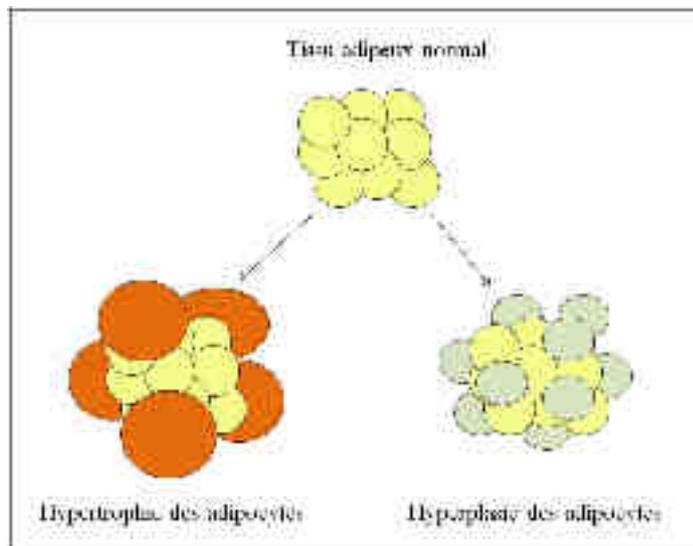
MCP-1 est aussi sécrétée par le tissu adipeux périvasculaire et pourrait donc jouer un rôle dans le développement des maladies cardiovasculaires.

## 6) La contribution du tissu adipeux dans l'obésité

### a) *La plasticité*

L'obésité est une expansion du tissu adipeux qui a lieu en réponse à un apport calorique excessif. Pour faire face à ce besoin de stockage énergétique, le tissu adipeux peut mettre en place deux mécanismes différents. D'une part, l'adipocyte est capable d'augmenter considérablement son volume par hypertrophie adipocytaire. D'autre part, l'hyperplasie est le phénomène par lequel le nombre d'adipocytes augmente. L'hyperplasie est considérée comme un mécanisme normal d'expansion du tissu adipeux qui a lieu au cours du développement lors de la phase fœtale, post-natale et à l'adolescence. Elle fait intervenir l'adipogenèse, qui résulte de la prolifération puis de la différenciation des préadipocytes pour donner de nouveaux adipocytes matures. L'hypertrophie, elle, est considérée comme un processus pathologique d'expansion de la masse grasse en réponse à un excès d'apport calorique (Figure 10).

Toutefois, hypertrophie et hyperplasie semblent associées dans le développement de l'obésité, mais bon nombre d'études apportent des résultats contradictoires et controversés.



**Figure 10 : Processus d'expansion du tissu adipeux.**

La croissance du tissu adipeux peut se faire par hypertrophie et/ou hyperplasie des adipocytes.

En 1971, des expériences sur l'Homme ont permis de montrer que, suite à un régime hypercalorique, l'expansion du tissu adipeux était accompagnée par une augmentation uniforme de

la taille des adipocytes mais pas du nombre d'adipocytes. Il en est de même lors de la perte de poids, où le volume des adipocytes diminue mais pas leur nombre (Salans *et al.*, 1971).

Une autre étude chez l'Homme adulte, prenant en compte l'âge de survenu de l'obésité, a permis de découvrir deux profils d'obésité. Le premier est une obésité hypertrophique caractérisée par une survenue de l'obésité à l'âge adulte. Le second est une obésité hyperplasique due à un développement de l'obésité au cours de l'adolescence (Salans *et al.*, 1973).

Bien que l'hypercellularité du tissu adipeux soit caractéristique des obésités survenues à l'adolescence, l'hyperplasie a commencé à être prise en compte dans le processus pathologique de l'obésité. En effet, le tissu adipeux de sujets obèses, dont l'obésité est survenue à l'âge adulte, peuvent présenter une hyperplasie. La théorie de la taille critique des adipocytes a alors vu le jour. Les adipocytes seraient caractérisés génétiquement par un volume maximal qu'ils ne pourraient pas dépasser. Lorsque la capacité maximale de stockage des adipocytes est atteinte, mais que la consommation calorique reste élevée, l'hyperplasie se met en place pour aider à stocker les acides gras (Hirsch and Batchelor, 1976). La prolifération et l'adipogenèse des préadipocytes du tissu adipeux seraient stimulées par des facteurs autocrines et paracrines sécrétés par les adipocytes hypertrophiés (Marques *et al.*, 1998), mais aussi par des facteurs circulants et par des stimulations neurales (Hausman *et al.*, 2001). De plus, *in vitro*, les acides gras saturés et insaturés à longues chaînes jouent un rôle pro-adipogénique, en augmentant l'expansion clonale mitotique des préadipocytes et l'expression des gènes spécifiques de l'adipogenèse. Cette approche permettrait d'expliquer le mécanisme observé *in vivo* qui lie l'augmentation des taux d'acides gras circulants lors de régime alimentaire riche en graisse et le développement d'une obésité hyperplasique (Amri *et al.*, 1994).

Toutefois, il semble que l'utilisation d'un régime riche en graisse induise plutôt une obésité hypertrophique (Imai *et al.*, 2001). Plus récemment, une étude a remis en cause la théorie de Hirsch en remettant au goût du jour celle de Salans. L'étude de l'intégration du carbone 14 dans le tissu adipeux de patients obèses a mis en évidence que le nombre d'adipocytes changeait à l'enfance et à l'adolescence, mais reste constant à l'âge adulte chez les patients minces et obèses. De plus, une perte de poids de ces patients résulte en une diminution du volume des adipocytes mais pas de leur nombre (Spalding *et al.*, 2008).

En résumé, la contribution de l'hypertrophie et de l'hyperplasie dans le développement de l'obésité est encore mal connue à l'heure actuelle. Il semble que la tendance à l'hypertrophie et à l'hyperplasie varie selon la localisation des dépôts adipeux (DiGirolamo *et al.*, 1998).

## *b) L'inflammation*

Comme tous les tissus, le tissu adipeux est infiltré par des macrophages chargés de surveiller l'intégrité cellulaire. Bien que leur rôle n'ait pas encore été clairement défini, il a été observé que le nombre de macrophages augmente proportionnellement à l'IMC et à la taille des adipocytes (Cancello *et al.*, 2005). Lorsque l'adipocyte augmente de volume, sa fonction sécrétrice est perturbée. Une augmentation de la sécrétion de MCP-1 et de TNF $\alpha$  a alors lieu, ce qui crée un environnement pro-inflammatoire. MCP-1 va induire la migration de nouveaux macrophages, qui peuvent alors constituer plus de 50% de la population cellulaire du tissu adipeux. Les macrophages vont eux aussi sécréter du TNF $\alpha$ , ce qui va exacerber le phénomène inflammatoire, puisque le TNF $\alpha$  est capable d'induire la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-6. D'après le rôle néfaste du TNF $\alpha$  dans le métabolisme lipidique décrit précédemment et comme nous allons le voir ultérieurement, cet état pro-inflammatoire du tissu adipeux semble jouer un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance associée à l'obésité (Guilherme *et al.*, 2008). Toutefois, il existerait deux populations différentes de macrophages au sein du tissu adipeux, une dite pro-inflammatoire M1 et l'autre dite anti-inflammatoire M2. Chez la souris, l'utilisation d'une alimentation riche en graisse induit le développement de l'insulino-résistance et une transformation des macrophages anti-inflammatoires M2 en macrophages pro-inflammatoires M1 (Lumeng *et al.*, 2007). Par contre, chez l'Homme, l'obésité s'accompagne plutôt d'une augmentation de la population de macrophages anti-inflammatoires. Ce résultat indique donc que la transformation des macrophages M2 en M1 serait une conséquence de l'insulino-résistance plutôt qu'une cause de son développement (Bourlier *et al.*, 2008).

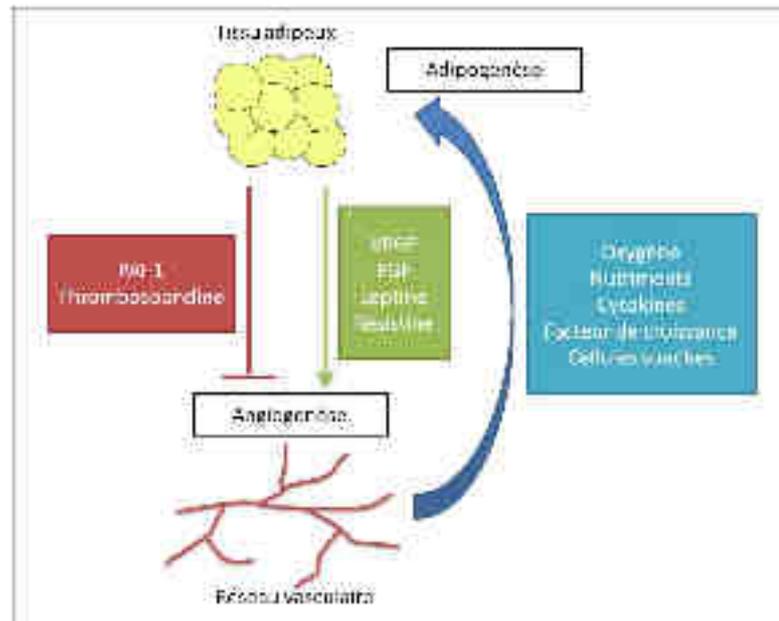
Un autre rôle des macrophages dans la plasticité du tissu adipeux a été décrit. Il semble que l'augmentation de la mort cellulaire des adipocytes soit fonction de leur volume. Ainsi, il a été montré que PPAR $\gamma$  jouerait un rôle pro-apoptotique sur les adipocytes hypertrophiés dont la capacité de stockage est limitée (Okuno *et al.*, 1998). Les macrophages pourraient alors participer au recyclage de ces adipocytes. En effet, chez l'Homme et la souris, les macrophages sont préférentiellement localisés à proximité des adipocytes nécrotiques. Ils fusionnent afin de former une cellule géante multinucléée capable de séquestrer et de recycler les gouttelettes lipidiques résiduelles des adipocytes (Cinti *et al.*, 2005). Par conséquent, la présence des cellules géantes seraient un marqueur de l'inflammation chronique associée à l'obésité. Toutefois, ce résultat est remis en cause par une étude qui montre que la proportion d'adipocytes nécrotiques ne varie pas entre les tissus adipeux de sujets minces et obèses (Spalding *et al.*, 2008).

### c) L'hypoxie

Le tissu adipeux est probablement l'organe le plus vascularisé de l'organisme puisque chaque adipocyte est entouré par des capillaires. L'expansion de la masse grasse au cours de l'obésité nécessite donc l'expansion de son réseau vasculaire. Ce dernier joue un rôle important dans le développement et la fonction du tissu adipeux. Pour cela, il existe une interaction réciproque entre les cellules endothéliales et les adipocytes *via* les sécrétions de différents facteurs (Cao, 2010). Ainsi, un remodelage du réseau vasculaire peut modifier le flux sanguin, qui contrôle alors le nombre et la taille des adipocytes, ce qui module son expansion ou sa réduction. De même, une modification de la masse grasse modifie la fonction sécrétoire de l'adipocyte, ce qui a des répercussions sur l'angiogenèse.

En effet, les adipocytes, les cellules de la FSV et les cellules immunitaires sécrètent des facteurs pro-angiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le *fibroblast growth factor* (FGF) qui vont stimuler la formation de nouveaux vaisseaux. Des adipokines sécrétées par les adipocytes, comme la leptine et la résistine, peuvent aussi stimuler l'angiogenèse et moduler la survie vasculaire (Cao *et al.*, 2001). De plus, la leptine est capable d'augmenter l'expression de VEGF, pour agir ainsi en synergie (Aleffi *et al.*, 2005). Le tissu adipeux sécrète également des facteurs qui inhibent l'angiogenèse, tels que le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) et la thrombospondine. Le rôle de l'adiponectine est plus controversé puisqu'elle a été décrite à la fois comme un facteur angiogénique (Ouchi *et al.*, 2004) et un facteur inhibant l'angiogenèse (Brakenhielm *et al.*, 2004). Les propriétés angiogéniques opposées des facteurs sécrétés par le tissu adipeux implique donc une régulation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques et une inhibition de l'expression des facteurs anti-angiogéniques lors de l'expansion de la masse graisseuse. En effet, chez la souris, l'induction de l'angiogenèse du tissu adipeux stimulée par le froid induit une augmentation de l'expression de VEGF et une inhibition de la thrombospondine (Xue *et al.*, 2009).

Réciproquement, le réseau vasculaire contribue à l'adipogenèse. Son principal rôle est d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement de l'organe. Le plasma sanguin contient des facteurs de croissance et des cytokines qui permettent la croissance et la survie des adipocytes. Le sang transporte également des cellules souches dérivées de la moelle osseuse qui peuvent se différencier en préadipocytes, en adipocytes ou en cellules endothéliales (Tang *et al.*, 2008). De plus, les cellules endothéliales des vaisseaux en formation produisent une variété de facteurs de croissance et de cytokines qui agissent de manière paracrine sur les adipocytes pour promouvoir leur croissance et leur expansion (Cao, 2007) (Figure 11).



**Figure 11 : Mécanisme de régulation de l'angiogenèse par le tissu adipeux.**

Le tissu adipeux sécrète des facteurs qui vont stimuler l'angiogenèse afin d'assurer le transport de l'oxygène et des nutriments dont le tissu adipeux a besoin. Les cellules endothéliales sécrètent également des facteurs influençant l'expansion de la masse grasse. VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) et PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*). D'après (Cao, 2007).

Lorsque le tissu adipeux croît mais que l'angiogenèse ne suit pas, il se développe un environnement hypoxique caractérisé par l'expression du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1, *hypoxia-induced factor 1*). Ce dernier est le plus important régulateur de l'hypoxie et de l'homéostasie de l'oxygène. C'est un facteur de transcription hétérodimérique constitué d'une sous-unité  $\alpha$ , dont la dégradation est contrôlée par la teneur en oxygène, et d'une sous-unité  $\beta$  (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Il induit l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF. Il a été observé que l'expression d'adipokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques, telles que la leptine, l'IL-6, PAI-1 et VEGF, est augmentée en condition hypoxique (Lolmede *et al.*, 2003). Toutefois, des expériences *in vivo* ont permis d'identifier un nouveau rôle d'HIF-1. La suractivation de la sous-unité  $\alpha$  de HIF-1 chez la souris induit, non pas l'expression des facteurs angiogéniques, mais une réponse fibrotique, caractérisée par l'expression de l'élastine, des collagènes I et III, de l'inhibiteur de la métalloprotéinase I et des facteurs de croissance du tissu conjonctif. L'induction de cette fibrose stimule l'infiltration de macrophages et l'état inflammatoire du tissu adipeux (Halberg *et al.*, 2009).

Du fait de son rôle sur la genèse et la fonction du tissu adipeux, ainsi que dans l'inflammation, un défaut de l'angiogenèse et du réseau vasculaire, en général, peut contribuer à l'apparition du phénomène d'insulino-résistance.

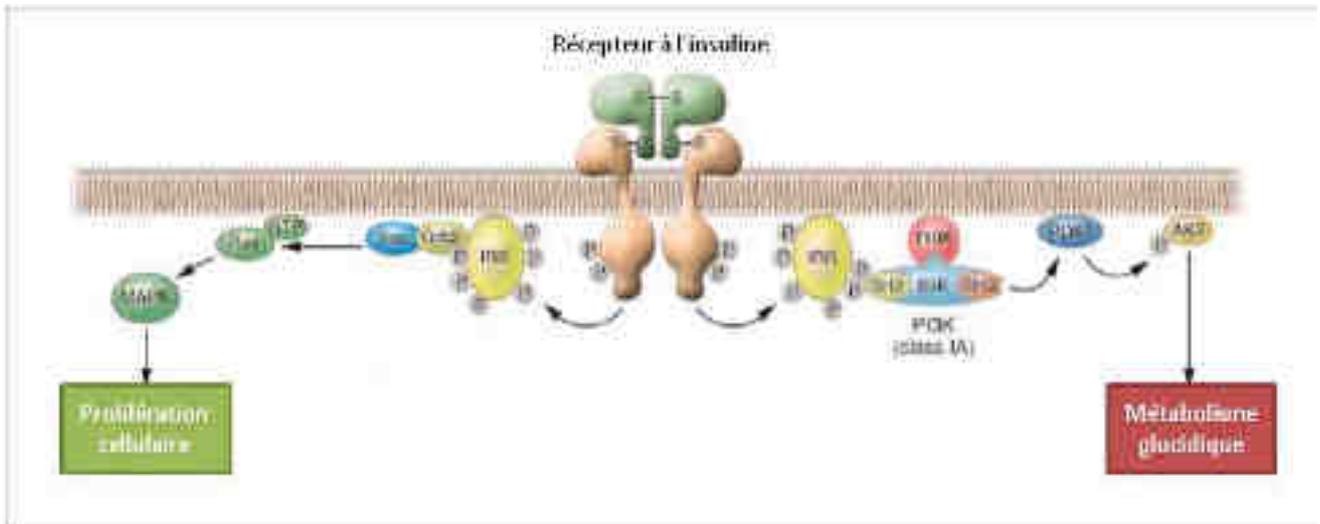
## **D. Une conséquence de l'obésité : la résistance à l'insuline**

### 1) L'homéostasie glucidique

L'homéostasie glucidique fait intervenir différents mécanismes afin de maintenir un taux de glucose sanguin à l'équilibre. L'organisme doit ainsi gérer les changements de flux glucidique, que ce soit lors des repas ou en période de jeûne. D'une part, il doit détecter l'entrée de glucose lors des repas et transmettre les signaux nécessaires à son utilisation aux organes cibles. D'autre part, il doit stimuler les organes producteurs de glucose en période d'apport nul de glucose. Le maintien de l'équilibre glycémique est sous le contrôle de l'insuline et du glucagon.

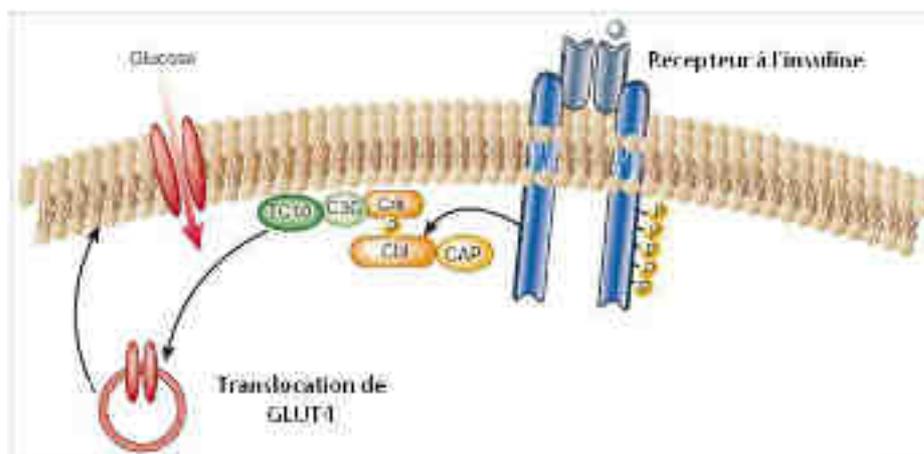
L'insuline est une hormone hypoglycémiante sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas lorsque la glycémie sanguine augmente. Elle favorise la clairance du glucose par son utilisation ou son stockage en agissant au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux. Elle se fixe au niveau de son récepteur IR qui appartient à la famille des récepteurs tyrosine-kinase, ce qui déclenche son autophosphorylation. Cette activation du récepteur IR active trois voies de signalisation. Les deux premières impliquent l'activité tyrosine-kinase de l'IR, qui induit la phosphorylation des effecteurs *insulin receptor substrates* (IRS). Dans la première voie, IRS phosphoryle et active la *phosphatidylinositol triphosphate kinase* (PI-3K), qui va à son tour phosphoryler la *phosphoinositide dependant kinase-1* (PDK1). La PDK1 va alors activer la protéine kinase B (Akt/PKB), qui va alors phosphoryler des enzymes du métabolisme glucidique. La seconde induit la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de l'interaction d'IRS avec la protéine d'adaptation Grb2 et la protéine *son of sevenless* (SOS), ce qui induit l'activation de Ras et des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Figure 12). La troisième voie, elle, implique la fixation d'un proto-oncogène, le *casitas B-lineage lymphoma* (Cbl) à l'IR via sa protéine associée (CAP, *c-Cbl-associated protein*). Il y a alors phosphorylation du complexe CAP-Cbl, qui va alors se transloquer à la membrane pour interagir avec la protéine *CT10 regulator of kinase* (Crk) au niveau

du complexe Crk-C3G-TC10. TC10 va alors induire la translocation à la membrane de vésicules contenant le transporteur au glucose GLUT4 (Saltiel and Kahn, 2001) (Figure 13).



**Figure 12 : Les voies de signalisation du récepteur à l'insuline.**

Par l'intermédiaire de l'*insulin receptor substrates* (IRS), l'activation du récepteur à l'insuline (IR) induit l'activation de la voie de Ras/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) afin de stimuler la prolifération cellulaire. L'IRS peut également activer la *phosphatidylinositol triphosphate kinase* (PI3K), qui va à son tour activer la voie Akt. Cette dernière va alors phosphoryler des enzymes du métabolisme glucidique. (SOS : *son of sevenless* ; GTP : *guanosine triphosphate* ; SH : *Src homology* ; PDK1 : *phosphoinositide dependant kinase-1*). D'après (Kasuga, 2006)



**Figure 13 : Translocation du transporteur au glucose GLUT4.**

L'activation du récepteur à l'insuline induit la translocation du transporteur du glucose GLUT4. Pour cela, il interagit avec le proto-oncogène *casitas B-lineage lymphoma* (Cbl) via sa protéine associée (CAP, *c-Cbl-associated protein*). Il y a alors phosphorylation du complexe CAP-Cbl, qui va alors interagir avec la protéine *CT10 regulator of kinase* (Crk). Ce dernier fait partie du complexe Crk-C3G-TC10, qui va induire la translocation du transporteur au glucose GLUT4. Mettre abréviations D'après (Saltiel and Kahn, 2001)

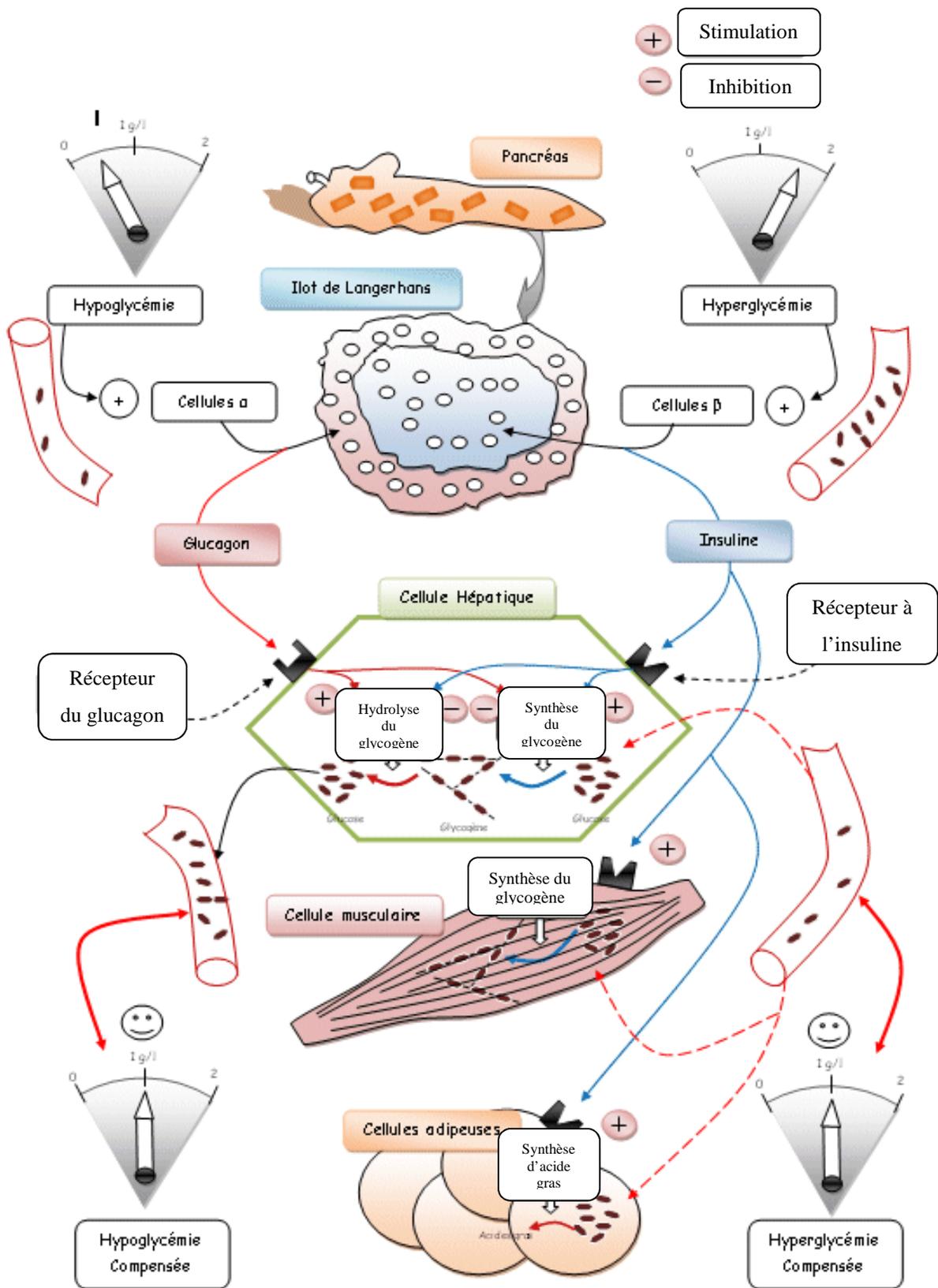
Au niveau du muscle, l'insuline va induire l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du glycogène, la glycolyse et l'oxydation mitochondriale. En parallèle, la translocation du transporteur GLUT4 est induite pour favoriser l'entrée de glucose. Ce dernier va être métabolisé soit dans la glycogénogenèse pour produire du glycogène, soit dans la glycolyse pour former du pyruvate, ainsi que du NADH<sub>2</sub> et du FADH<sub>2</sub>. Ce pyruvate va être utilisé dans le cycle de Krebs, tandis que le NADH<sub>2</sub> et le FADH<sub>2</sub> sont oxydés dans la chaîne respiratoire pour former de l'ATP (Thirone *et al.*, 2006).

Dans les cellules du foie, l'insuline a une double action, puisqu'elle est capable d'inhiber la production de glucose par la glycogénolyse et la néoglucogenèse, tout en activant l'utilisation et le stockage du glucose. Tout comme dans le muscle, elle active des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse du glycogène, la glycolyse et l'oxydation mitochondriale, afin de produire du glycogène et de l'ATP. Elle stimule également la lipogenèse *de novo* qui permet la production d'acides gras à partir du glucose.

Dans les adipocytes, l'insuline induit l'entrée de glucose par l'augmentation de la translocation du transporteur GLUT4. Le glucose va soit, servir à produire du G3-P pour la synthèse de triglycéride, soit être utilisé dans la glycolyse puis dans la lipogenèse *de novo* pour former des acides gras. Ces acides gras vont se coupler au G3-P pour former des triglycérides. Tout comme dans le foie, elle stimule la lipogenèse *de novo* en activant l'expression de gènes lipogéniques tel que SREBP-1, qui va activer l'expression de la FAS (Large *et al.*, 2004).

Le glucagon est une hormone hyperglycémiant sécrétée par les cellules  $\alpha$  du pancréas lorsque les taux de glucose sont bas, en période de jeûne par exemple. Il agit au niveau du foie pour stimuler la production de glucose en activant la glycogénolyse et la néoglucogenèse, tout en inhibant la glycogénogenèse et la glycolyse (Quesada *et al.*, 2008).

L'insuline et le glucagon sont donc au centre de l'homéostasie glucidique (Figure 14). Cette dernière est étroitement liée à l'homéostasie lipidique, du fait du rôle prépondérant du glucose dans la lipogenèse au niveau du tissu adipeux et du foie. L'insuline est également capable d'agir directement sur la lipolyse et la lipogenèse. Elle stimule l'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux et inhibe la triglycéride lipase impliquée dans la lipolyse hépatique. Notons également que l'insuline stimule l'expression de PPAR $\gamma$  qui est impliqué dans le maintien du métabolisme lipidique et des fonctions endocrines de l'adipocyte mature (Rieusset *et al.*, 1999). Une dérégulation de l'activité de l'insuline conduit donc à une dérégulation du contrôle de la glycémie, ce qui peut avoir des répercussions graves sur la sensibilité des organes. Un défaut de sécrétion ou d'action de l'insuline provoque une mauvaise utilisation du glucose et une dérégulation de la synthèse des acides gras.



**Figure 14 : Régulation de la glycémie.**

Les variations de la glycémie sont détectées par les cellules des îlots de Langerhans du pancréas. Les cellules  $\alpha$  sécrètent le glucagon afin d'augmenter la glycémie. Les cellules  $\beta$  sécrètent l'insuline qui favorise le stockage du glucose afin de faire baisser la glycémie.

## 2) L'insulino-résistance

La résistance à l'insuline est caractérisée par le fait que les organes cibles de l'insuline ne répondent plus correctement face à la stimulation de cette hormone. Cette résistance peut être plus ou moins sévère selon le stade de développement. Elle touche principalement le foie, le muscle et le tissu adipeux. Elle aboutit à une hyperglycémie due à un défaut de capture du glucose par le muscle, à une production accrue de glucose par le foie, ainsi qu'à une augmentation du taux d'acides gras circulants due à une lipolyse accrue du tissu adipeux (Guilherme *et al.*, 2008).

L'insulino-résistance est un facteur de risque majeur de développement du diabète de type 2. La mise en place du phénomène de résistance à l'insuline est un phénomène progressif et longtemps asymptomatique, qui succède en général à l'obésité. Toutefois, tous les obèses ne deviennent pas diabétiques car l'organisme est programmé pour faire face à ce type de dérèglements. Cependant, dans certaines conditions physiologiques et pathologiques, la voie de signalisation de l'insuline peut être altérée. Au niveau des organes cibles, l'absence de réponse à l'insuline se manifeste par un défaut de translocation du transporteur GLUT4 stimulée par l'insuline. Il en résulte une diminution de la capture et de la métabolisation du glucose, ce qui augmente le taux de glucose sanguin (Cline *et al.*, 1999). De plus, l'effet inhibiteur de l'insuline sur la glycogénolyse et la néoglucogenèse ne peut plus compenser l'augmentation de la glycémie, qui est alors exacerbée. Pour faire face à cette hyperglycémie et pour compenser cette insulino-résistance, les cellules  $\beta$  du pancréas vont produire plus d'insuline. Nous sommes donc face à un stade d'hyperinsulinémie qui maintient le taux de glucose sanguin à la normale. Cette sécrétion accrue d'insuline va finir par épuiser les cellules  $\beta$ . La diminution de l'insulinosécrétion va alors conduire à une intolérance au glucose. Cette hyperglycémie est alors responsable d'une glucotoxicité qui va participer à la destruction des cellules  $\beta$  (Weir and Bonner-Weir, 2004).

Tout comme l'obésité, il semble qu'une prédisposition à l'insulino-résistance existe puisque pour un individu, les risques de développer une résistance à l'insuline augmentent lorsque les parents en sont atteints. La résistance à l'insuline est due à une altération au niveau de la sécrétion de l'insuline ou de sa voie de signalisation. Toutefois, l'étude de différents gènes candidats n'a pas permis de détecter de gène de prédisposition, même si certaines mutations monogéniques ont pu être identifiées. Le mécanisme d'insulino-résistance peut, par exemple, découler d'un défaut d'internalisation et de recyclage du récepteur à l'insuline au niveau de la membrane plasmique. Il a également été montré que l'augmentation de l'activité des tyrosines phosphatases, impliquées dans la déphosphorylation et l'inactivation de l'IR et des IRS, pourrait être mise en cause dans le développement de l'insulino-résistance. En effet, les souris présentant une inactivation du gène

codant pour la *protein-tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B), sont caractérisées par une activation plus importante de l'IR dans le muscle et le foie, entraînant une meilleure sensibilité à l'insuline et une tolérance au glucose améliorée (Klaman *et al.*, 2000). L'IR et les IRS peuvent également être inactivés par phosphorylation sur leurs résidus sérine et thréonine par l'intermédiaire de la PKC ou des MAPK par exemple. L'augmentation de l'activité de ces enzymes peut donc provoquer une réduction de l'activité de la voie de l'IR (Zick, 2003).

### 3) La contribution du tissu adipeux dans l'insulino-résistance

#### a) *L'hypothèse portale*

Le tissu adipeux est chargé de stocker les excès d'apports énergétiques qui ne sont pas utilisés par les autres organes. L'adipocyte augmente donc son activité métabolique de lipogenèse et réduit son activité lipolytique. La vacuole lipidique augmente donc de volume, mais celui-ci est limité. Comme décrit précédemment, la vacuole lipidique est entourée de périlipines qui jouerait le rôle de senseur du contenu lipidique (Blouin *et al.*, 2006). Une fois qu'un certain étirement de la membrane de la vacuole est atteint, les périlipines induisent un signal stoppant le stockage lipidique. Le mécanisme par lequel l'adipocyte devient inactif est mal connu, mais il semble impliquer PPAR $\gamma$  dont l'expression diminuerait avec l'augmentation du volume de la vacuole (Tanabe *et al.*, 2004). Si la consommation calorique reste élevée, le tissu adipeux ne pourra plus jouer son rôle et les acides gras ne seront plus stockés. Ils circuleront librement dans le sang et pourront induire une lipotoxicité au niveau du foie, du pancréas et du muscle (Ravussin and Smith, 2002).

Nous avons vu que l'augmentation de la masse grasse est fortement corrélée au développement de perturbations métaboliques telle que la résistance à l'insuline. Ceci est plus particulièrement vrai concernant le tissu adipeux viscéral. Le tissu adipeux sous-cutané et le viscéral diffèrent au niveau de certaines caractéristiques. Le tissu adipeux viscéral présente une sensibilité à l'insuline plus faible que le tissu sous-cutané, ainsi qu'une meilleure activité lipolytique en réponse à la stimulation par les catécholamines (Wajchenberg, 2000). Ces caractéristiques influent donc sur la balance entre stockage et libération des acides gras circulants et joue en défaveur du tissu adipeux viscéral. De plus, ce dernier possède une position centrale au sein de l'organisme et sa vascularisation lui donne un accès direct à la veine porte. Les acides gras libérés par le tissu adipeux

vont alors directement rejoindre le foie et être à l'origine de bouleversements métaboliques. Ce concept est appelé l'hypothèse portale.

Comme expliqué précédemment, les adipocytes hypertrophiés voient leur fonction sécrétrice perturbée et un état inflammatoire se met en place dans le tissu adipeux obèse. La sécrétion de TNF $\alpha$  induit alors une inhibition de l'adipogenèse (Spiegelman and Hotamisligil, 1993) et une augmentation de l'activité lipolytique des adipocytes, ce qui augmente encore la libération d'acides gras (Guilherme *et al.*, 2008). De plus, les sécrétions des autres adipokines varient également en fonction de la taille de l'adipocyte, ce qui peut avoir des effets néfastes sur les organes cibles, qu'ils soient centraux ou périphériques.

### *b) La lipotoxicité*

Les acides gras et le glucose sont les principales sources d'énergie de l'organisme. En condition d'apports glucidiques et lipidiques normaux, le glucose est le substrat métabolisé en premier. Lors d'une activité physique, une fois que le glucose a été utilisé, les acides gras stockés sont métabolisés à leur tour. Il existe donc une synergie régulée entre l'utilisation du glucose et des acides gras comme ressources énergétiques. Cette régulation peut être perturbée lorsque la concentration du glucose ou celle des acides gras est anormalement élevée. Une hyperlipidémie est capable d'inhiber l'utilisation du glucose (Randle *et al.*, 1963), tandis qu'une augmentation du taux de glucose sanguin diminue la  $\beta$ -oxydation des acides gras et stimule l'expression des facteurs impliqués dans la lipogenèse, conduisant à une accumulation d'acide gras dans les cellules (Roche *et al.*, 1998). Dans le cas de l'obésité, les dysfonctionnements des adipocytes et l'inflammation du tissu adipeux contribuent à une hyperlipidémie qui va permettre l'accumulation d'acides gras au niveau des organes non-adipeux tel que le foie, le pancréas et le muscle. Cette accumulation d'acides gras cause des effets néfastes sur le métabolisme de l'organe (Schaffer, 2003). Elle est aussi à l'origine du développement de la résistance à l'insuline. Les acides gras induisent l'expression de PKC qui inhibe l'activité des protéines IRS en augmentant la phosphorylation de leur résidu sérine et thréonine. L'inactivation du gène codant pour PKC dans des souris améliore l'efficacité de la voie de signalisation de l'insuline et les protège de l'insulino-résistance (Kim *et al.*, 2004).

Le foie est un organe capable de produire des triglycérides en synthétisant des acides gras par lipogenèse *de novo*. Il est donc le lieu de stockage d'une petite quantité d'acides gras. Dans le cas de l'obésité, des acides gras provenant de l'alimentation et de la lipolyse du tissu adipeux, vont

s'ajouter à cette réserve d'acides gras, qui va alors devenir bien supérieure à ce que le foie peut supporter. On aboutit donc à une stéatose du foie et au développement d'une insulino-résistance. Cette dernière sera à l'origine d'une augmentation de la production de glucose par néoglucogenèse hépatique, ce qui renforce l'intolérance au glucose (Postic and Girard, 2008).

Au niveau du muscle, l'accumulation d'acide gras est possible en situation physiologique normale afin de subvenir à ses besoins lors d'exercices physiques intenses et prolongés. Au cours de l'obésité, ils s'accumulent dans le muscle en quantité bien supérieur aux besoins. Chez les personnes obèses insulino-résistantes, la  $\beta$ -oxydation des acides gras devient alors incomplète et induit la formation de résidus intermédiaires tels que le DAG et l'acyl-CoA, qui semblent être à l'origine du développement de l'insulino-résistance (Perseghin *et al.*, 1999).

Le pancréas est l'organe de détection de la glycémie et de la sécrétion de l'insuline. La toxicité des acides gras induit un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  et des dommages irréversibles pouvant aller jusqu'à induire leur apoptose. Par exemple, les acides gras augmentent l'expression de la protéine UCP-2 qui dissipe le potentiel électrochimique au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui fait baisser le ratio ATP/ADP. Or, la cellule  $\beta$  interprète cette diminution de ratio comme le signal d'une glycémie faible et la sécrétion d'insuline est donc réduite (Yamashita *et al.*, 2004) (Figure 15).

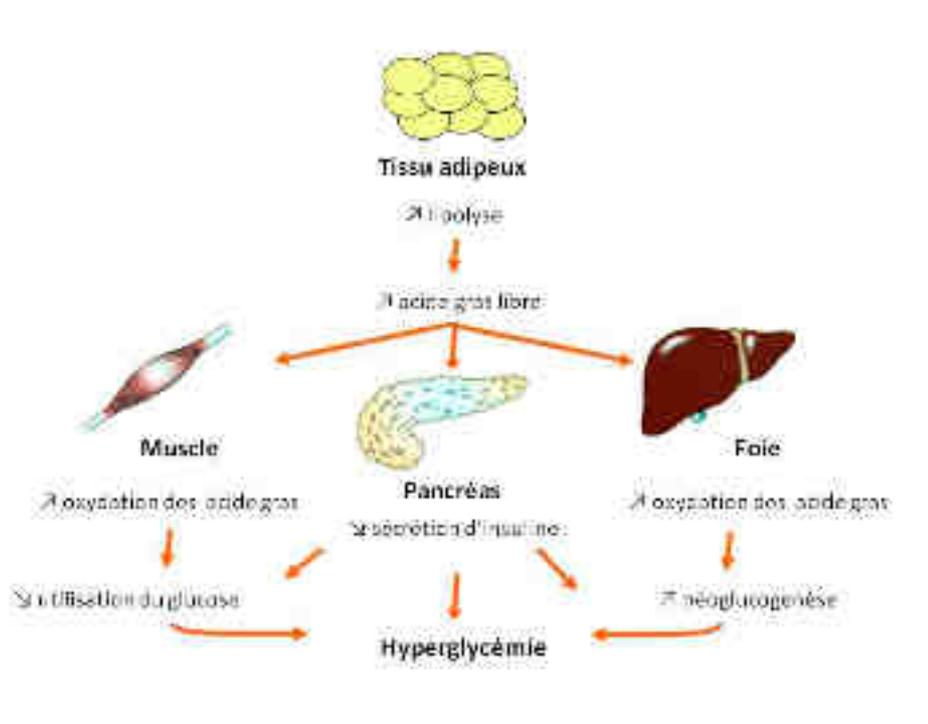


Figure 15 : Lipotoxicité et hyperglycémie.

L'hyperlipidémie causée par le tissu adipeux induit une augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau du muscle et du foie. La lipotoxicité diminue la sécrétion d'insuline par le pancréas. Il en résulte une augmentation du taux de glucose sanguin.

## II. Les prokinétines

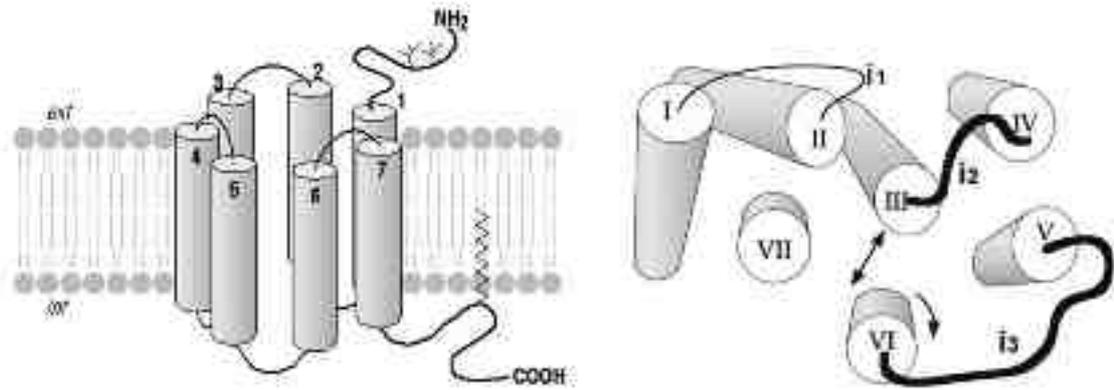
### A. Les récepteurs couplés aux protéines G

Afin d'assurer les principales fonctions de l'organisme, une bonne communication est nécessaire entre les organes, mais aussi entre les cellules de ces organes. Les cellules vont donc émettre des signaux sous forme d'hormones, de neurotransmetteurs ou de facteurs de croissance, qui vont être captés par les cellules cibles. La réception de ces signaux se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, qui vont alors interpréter les signaux reçus grâce à des effecteurs intercellulaires. Ces derniers vont permettre la transduction du signal à l'intérieur de la cellule et le déclenchement de la réponse cellulaire désirée.

Il existe différents types de récepteurs membranaires, tels que les récepteurs de type canaux ioniques et les récepteurs à activité enzymatique. Au sein de ce dernier type se trouvent les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui représentent l'une des plus grandes familles de protéines membranaires. Constituant plus d'1% du génome humain, ces récepteurs sont très largement distribués au sein de l'organisme et impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques, mais aussi physiopathologiques. Ils sont donc une cible privilégiée des industries pharmaceutiques, puisque 30% des médicaments ciblent des RCPG.

#### 1) La structure

Les RCPG sont aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires car ils sont constitués de sept hélices  $\alpha$  transmembranaires antiparallèles hydrophobes séparées par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires, de longueurs variables. Les segments transmembranaires sont constitués de 25 à 35 acides aminés et leur structure est très bien conservée entre les espèces. Les boucles extracellulaires 1 et 2 peuvent être reliées par un pont disulfure du fait de l'existence de résidus cystéine au niveau des boucles. L'extrémité N-terminale est extracellulaire, tandis que la C-terminale est intracellulaire (Rosenbaum *et al.*, 2009). Cette dernière extrémité comporte un site de palmitoylation pouvant être à l'origine d'un ancrage dans la membrane et de la formation d'une quatrième boucle intracellulaire. Les extrémités amino-terminales et carboxy-terminales sont des unités fonctionnelles variées du fait de leur taille, de leur structure et de leur rôle (Figure 16).



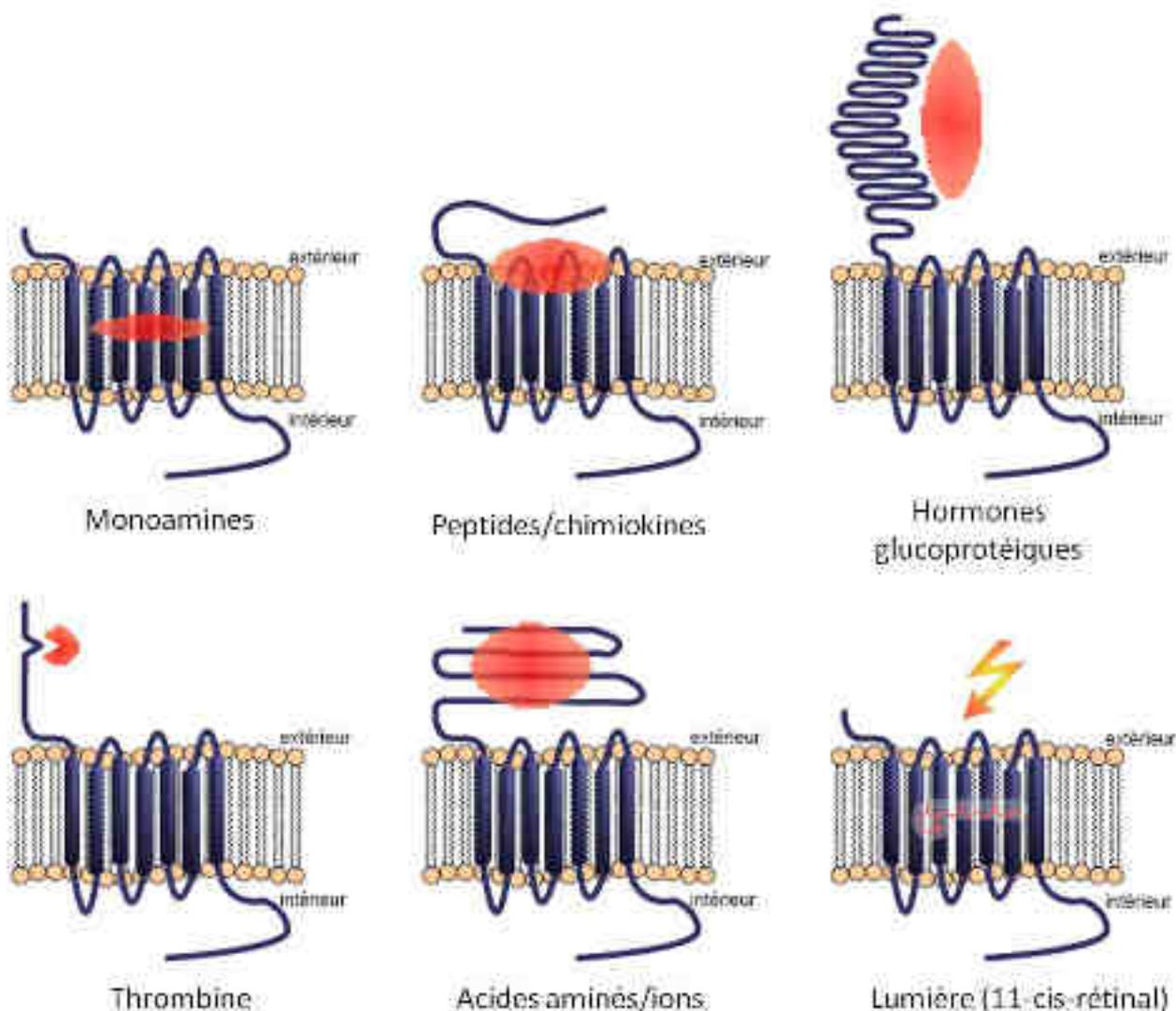
**Figure 16 : Structure des RCPG.**

Les RCPG sont formés de sept domaines transmembranaires reliés par des boucles intracellulaires et des boucles extracellulaires (Bockaert and Pin, 1999).

Au niveau tridimensionnel, les sept domaines transmembranaires sont insérés plus ou moins perpendiculairement à la membrane plasmique et forme une poche centrale de liaison (Figure 16). La modélisation des RCPG par homologie de séquence a été possible après la cristallisation de la rhodopsine bovine en 2000. Toutefois, la rhodopsine n'est pas un modèle parfait pour modéliser tous les RCPG, du fait de son mode d'activation. Son ligand, le 11-cis-rétinal, est un agoniste inverse lié de façon covalente et l'activation de la rhodopsine nécessite de la lumière. L'activation des autres RCPG n'utilise pas ce mécanisme (Costanzi *et al.*, 2009). Plus récemment, la cristallisation du récepteur  $\beta$ -2 adrénergique a permis d'affiner la structure tertiaire des RCPG. Les segments transmembranaires forment également une poche centrale, mais celle-ci est accessible au ligand du fait que la seconde boucle extracellulaire soit une courte hélice  $\alpha$ , alors que pour la rhodopsine cette boucle est un feuillet  $\beta$  qui obstrue l'accès à la poche de liaison (Cherezov *et al.*, 2007). Cependant, la structure de cette boucle semble être propre à chaque type de RCPG, car la cristallisation du récepteur adénosine A2A, en 2008, révèle une structure différente de celle de la rhodopsine ou du récepteur  $\beta$ -2 adrénergique.

Les RCPG sont activés par différents types de ligands, tels que les acides aminés (acide glutamique...), les peptides (angiotensine, neurotensine, somatostatine...), les protéines (thyrotropine, hormone folliculo-stimulante (FSH, *follicle-stimulating hormone*)...), les amines (acétylcholine, adrénaline, sérotonine...), les lipides (prostaglandines, leukotriènes...), les nucléotides et les nucléosides (adénosine ou ATP), les ions (calcium), les molécules odorantes et gustatives, les photons et les phéromones (Marinissen and Gutkind, 2001). Ils interviennent ainsi dans tous les grands systèmes de communication intercellulaire et jouent un rôle prépondérant dans la perception sensorielle chimique. En effet, la majorité des RCPG sont des récepteurs olfactifs et

gustatifs. Toutefois, tous les ligands des RCPG ne sont pas encore connus et 75% des RCPG sont dits orphelins car leur ligand n'a pas été identifié (Wettschureck and Offermanns, 2005). Etant donné les structures différentes des RCPG, les sites de liaison des ligands sont assez variables. Comme nous l'avons vu, pour la rhodopsine, le ligand est lié de façon covalente dans la poche centrale. Les monoamines, eux, entrent et se fixent dans la poche de liaison, comme c'est le cas pour le récepteur  $\beta$ -2 adrénergique. Les peptides se fixent au niveau du domaine extracellulaire du récepteur. Les hormones glycoprotéiques interagissent avec des RCPG possédant une terminaison amino-terminale longue, permettant la liaison du ligand. Les ions, eux aussi, se fixent au niveau du domaine N-terminal du récepteur. La thrombine a une activité particulière car elle possède une activité protéolytique capable de couper l'extrémité amino-terminale du récepteur (Kobilka, 2007) (Figure 17).



**Figure 17 : Sites de fixation des ligands sur les RCPG.**

Les RCPG possèdent des extrémités amino-terminales de structures différentes qui conditionnent le site de liaison du ligand. D'après (Kobilka, 2007).

## 2) La classification

Bien que les RCPG présentent tous une structure à sept domaines transmembranaires, ils diffèrent au niveau de la structure et de la longueur de leur extrémité amino-terminale, ainsi que par la nature de leur ligand et par leur mode d'interaction. Ces différences sont à l'origine de la classification des RCPG. Il en existe plusieurs, qui ont évolué au fur et à mesure des découvertes.

En 1994, le Dr. Kolakowski classe les RCPG en 6 familles de A à F, dont les 3 premiers groupes sont subdivisés en sous-groupe, basés sur l'homologie des RCPG (Kolakowski, 1994; Flower, 1999). Puis, en 1999, une nouvelle organisation des RCPG a été proposée en 5 classes en fonction des ligands et de leur mode de liaison (Bockaert and Pin, 1999). Enfin, sur la base des homologies phylogéniques des RCPG, ils ont été répertoriés dans la classification GRAFS, pour Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/taste2 et Sécrétine.

### *a) La famille A : rhodopsin-like*

La majorité des RCPG font partie de cette famille, tel que la rhodopsine et le récepteur  $\beta$ -adrénergique. La moitié de ces récepteurs sont des récepteurs sensoriels. Leur partie N-terminale est courte. Le second segment transmembranaire est caractérisé par la présence d'un acide aminé aspartate impliqué dans la liaison du ligand et le couplage à la protéine G. Le troisième présente le motif consensus E/DRY au niveau de son extrémité cytoplasmique. Le septième segment transmembranaire, lui, possède le motif NPXXY. La première et la seconde boucles extracellulaires sont constituées de deux cystéines qui permettent la formation d'un pont disulfure entre les deux boucles. L'extrémité C-terminale présente un site de palmitoylation qui permet la formation d'une quatrième boucle intracellulaire (Ceresa and Limbird, 1994; Rovati *et al.*, 2007).

En fonction du ligand et de son site de liaison, ce groupe est divisé en 3 sous-groupes.

Le groupe A.a correspondant aux récepteurs de petites molécules dont la fixation a lieu dans la poche centrale formée par les sept domaines transmembranaire.

Le type A.b contient les récepteurs des neuropeptides, qui se fixe sur le segment N-terminal, les boucles extracellulaires et la partie supérieure des segments transmembranaires.

Le groupe A.c comporte les récepteurs des hormones glycoprotéiques qui interagissent avec le récepteur au niveau de sa terminaison amino-terminale.

#### *b) La famille B : secretin-like*

Ce groupe comprend le récepteur à la sécrétine, ainsi que tous les récepteurs qui lui sont structurellement similaires. Ils possèdent une extrémité amino-terminale de 300 acides aminés, plus longue que celle de la famille A, constituée de résidus cystéine formant des ponts disulfures. Ce domaine N-terminal est donc impliqué dans la liaison du ligand. Ce dernier interagit aussi avec la première boucle extracellulaire et le premier segment transmembranaire du récepteur afin de l'activer. Les ligands sont des hormones peptidiques et des neuropeptides tel que la sécrétine, le glucagon, la calcitonine, l'hormone thyroïdienne, la *growth hormone releasing hormone* (GHRH), le peptide inhibiteur gastrique (GIP, *gastric inhibitory polypeptide*), le peptide vasointestinal (VIP, *vasoactive intestinal polypeptide*) et le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) (Miller *et al.*, 2007).

#### *c) La famille C : metabotrope-glutamate/pheromone*

Cette famille regroupe les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs des phéromones VR et G<sub>0</sub>-VN couplés aux protéines G<sub>0</sub>, les récepteurs de type B du *gamma-aminobutyric acid* (GABA), les récepteurs au calcium et les *retinoic acid-inducible orphan GPCR* (RAIG). Ils sont caractérisés par une longue extrémité amino-terminale de 500 acides aminés, repliée pour former deux lobes. Ces derniers représentent le site de liaison du ligand. La troisième boucle intracellulaire est courte et sa séquence est très conservée. L'activation du récepteur nécessite la dimérisation de deux récepteurs pour former des homodimères ou des hétérodimères (Pin *et al.*, 2003).

#### *d) La famille D*

Cette famille comprend des récepteurs aux phéromones exprimés dans les neurones sensoriels de voméronasal. Ils sont généralement couplés aux protéines Gi (Dulac and Axel, 1998).

#### *e) La famille E*

Cette famille unique n'existe pas chez les vertébrés. On la retrouve uniquement dans un groupe d'amibe, chez *Dictyostelium discoideum*. Elle regroupe des récepteurs à l'AMPc. Ceux-ci sont impliqués dans l'adhésion et le chimiotactisme (Prabhu and Eichinger, 2006).

#### *f) La famille F*

Ce groupe est constitué des récepteurs homologues aux protéines frizzled et smoothened. Ils sont caractérisés par des boucles intracellulaires très courtes et à une extrémité C-terminale dont la taille peut varier d'une dizaine d'acides aminés à plusieurs centaines. Ils jouent un rôle dans divers processus biologique au cours du développement tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Malbon, 2004).

### 3) Transduction du signal

Quelque soit le ligand et son mode de fixation, son interaction avec le récepteur induit un changement conformationnel de la poche centrale, qui active alors le RCPG. L'activation de ce dernier induit alors l'activation de la protéine G qui, à son tour, initie la transduction du signal *via* des effecteurs.

#### *a) Les protéines G*

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques, composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Il existe différentes sous-unités codées par différents gènes. Les protéines G sont divisées en 4 familles en fonction de la sous-unité  $\alpha$  qui les compose : Gs ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_{olf}$ ), Gi ( $\alpha_{i-1}$ ,  $\alpha_{i-2}$ ,  $\alpha_{i-3}$ ,  $\alpha_0$ ,  $\alpha_{t-1}$ ,  $\alpha_{t-2}$ ,  $\alpha_{gust}$ ,  $\alpha_z$ ), Gq ( $\alpha_q$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{14}$ ,  $\alpha_{15}$ ,  $\alpha_{16}$ ) et G12 ( $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{13}$ ). Il a été dénombré 5 sous-unités  $\beta$  différentes et 12 sous-unités  $\gamma$ . Etant donné la diversité des différentes sous-unités, l'association des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  est à l'origine d'une grande variété de protéines G (Wettschureck and Offermanns, 2005; Milligan and Kostenis, 2006).

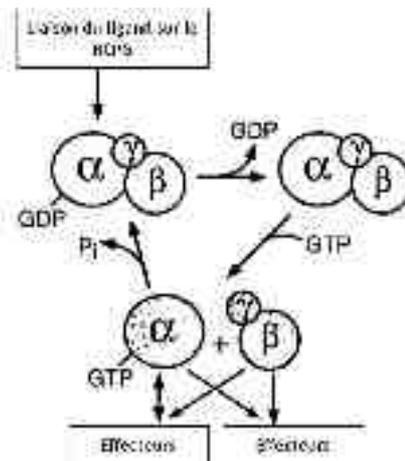
Les protéines G ne sont pas toujours trimériques puisque certaines sont monomériques telles que Ras, Rho/Rac/cdc42, Rab, Sar1/Arf et Ran (Bhattacharya *et al.*, 2004). Certains RCPG ne sont couplés qu'à un seul type de protéines G alors que d'autres peuvent en lier des différentes, mais la proportion est très faible (Wong, 2003). Il existe donc une spécificité de liaison entre récepteur et protéines G. Cependant, il existe également des récepteurs à sept domaines transmembranaires dit « RCPG » qui ne sont pas couplés aux protéines G et dont la transduction du signal est médiée par d'autres effecteurs comme la  $\beta$ -arrestine, par exemple (Ferguson, 2001).

Les protéines  $G\alpha$  sont localisées à proximité de la membrane. Elles y sont fixées par l'intermédiaire de lipides de type myristate ou palmitate. Tandis que les protéines  $G\beta\gamma$  le sont par des lipides du type géranyl ou farnésyl (Milligan and Kostenis, 2006).

A l'état inactif, la protéine G est déjà précouplée au récepteur (Gales and Bouvier, 2007). Leur interaction se fait au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Toutefois, aucune région spécifique n'a vraiment été identifiée du fait de l'absence de séquence consensus (Hermans, 2003). Des études par mutagenèse dirigée sur différents types de RCPG ont permis d'identifier trois régions impliquées dans la spécificité de l'interaction récepteur/protéine G, mais aussi dans le couplage proprement dit. Ainsi, la seconde boucle intracellulaire (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2010), la troisième boucle intracellulaire (Conchon *et al.*, 1997; Nanoff *et al.*, 2006) et la partie C-terminale, par l'intermédiaire de son site de palmitoylation et de la quatrième boucle intracellulaire qu'il forme (O'Dowd *et al.*, 1988; Anavi-Goffer *et al.*, 2007), joueraient un rôle important dans ce mécanisme. Cependant, l'importance de l'implication de ces régions dans le couplage aux protéines G dépend de chaque type de RCPG (Jin *et al.*, 1997). L'hypothèse est donc que différentes régions intracellulaires sont nécessaires à la sélectivité du couplage récepteur/protéine G.

Au niveau de la protéine G, la sous-unité  $\alpha$  semble être fortement impliquée dans la spécificité du couplage avec le récepteur, et plus particulièrement sa partie C-terminale. Cependant,  $G\beta$  et  $G\gamma$  jouent aussi un rôle dans cette spécificité (Jian *et al.*, 2001; McIntire *et al.*, 2001).

Les protéines G possèdent une activité GTPase. La forme inactive de la protéine G est constituée de la sous-unité  $\alpha$  lié au guanosine diphosphate (GDP), et du complexe formé par les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Lorsque le ligand se fixe au récepteur, celui-ci change de conformation. Ce changement induit une modification de la conformation de la protéine  $G\alpha$ , ce qui réduit l'affinité de  $G\alpha$  pour le GDP et induit l'échange du GDP par du guanosine triphosphate (GTP). Le récepteur est considéré comme un *guanine exchange factor* (GEF). La liaison du GTP à la sous-unité  $\alpha$  entraîne un réarrangement structural du  $G\alpha$ -GTP, de  $G\beta\gamma$  et du récepteur, ce qui conduit à la séparation de la protéine trimérique en deux complexes : d'une part,  $G\alpha$ -GTP et d'autre part,  $G\beta\gamma$ . Chacun de ces complexes sont alors capables de moduler l'activité d'effecteurs intracellulaires tels que des enzymes (adénylyl cyclases, phospholipases, phosphodiésterases ou kinases) ou des canaux ioniques.  $G\alpha$ -GTP va activer ses effecteurs grâce à son activité GTPase qui aboutit à la transformation du GTP en GDP. La sous-unité  $G\alpha$  se trouve alors à l'état inactif, elle se dissocie de son effecteur et peut se lier à nouveau aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Neer, 1995). Ce mécanisme peut être accéléré par des *regulator of G-protein signaling* (RGS).



**Figure 18 : Cycle de régulation des protéines G.**

La forme inactive de la protéine G est constituée de la sous-unité  $\alpha$  lié au guanosine diphosphate (GDP), et du complexe formé par les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Lorsque le ligand se fixe au récepteur, celui-ci change de conformation, ce qui réduit l'affinité de  $G\alpha$  pour le GDP et induit l'échange du GDP par du guanosine triphosphate (GTP). La liaison du GTP conduit à la séparation de la protéine trimérique en deux complexes : d'une part,  $G\alpha$ -GTP et d'autre part,  $G\beta\gamma$ . Chacun de ces complexes sont alors capables de moduler l'activité d'effecteurs intracellulaires.  $G\alpha$ -GTP va activer ses effecteurs grâce à son activité GTPase qui aboutit à la transformation du GTP en GDP. La sous-unité  $G\alpha$  se trouve alors à l'état inactif, elle se dissocie de son effecteur et peut se lier à nouveau aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Neer, 1995).

### b) Les effecteurs

**L'adénylate-cyclase (AC)** est une glycoprotéine membranaire constituée de deux régions transmembranaires, formées de six hélices  $\alpha$ , et de deux régions cytoplasmiques. Ces dernières possèdent une activité enzymatique. Elle est capable de catalyser la transformation d'ATP en AMPc. Cette réaction nécessite du magnésium et conduit à la libération de pyrophosphate. L'AMPc active alors la protéine kinase A (PKA), qui va, à son tour, moduler diverses réponses cellulaires. L'AC est activée par les complexes  $G\alpha_s$ -GTP et inhiber par les  $G\alpha_i$ -GTP (Sunahara *et al.*, 1996).

La PKA, constituée de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques, est activée par la fixation de deux molécules d'AMPc sur ses sous-unités régulatrices. Ces dernières vont alors se dissocier des sous-unités catalytiques. Celles-ci vont alors réguler l'activité de protéines cibles en catalysant le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur des résidus sérine ou thréonine des protéines cibles. Ces cibles sont variées et comprennent des kinases, des phosphatases, des canaux ioniques, des enzymes, mais aussi des facteurs de transcription (Meinkoth *et al.*, 1993).

**La phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ )** catalyse la transformation du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3). La PLC est activée par les protéines G $\alpha_q$  (Noh *et al.*, 1995).

L'IP3 va diffuser dans le cytoplasme afin d'agir au niveau de ses canaux calciques sur le réticulum endoplasmique. Il va alors induire une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium à partir des stockages intracellulaires. Le calcium va alors activer de nombreux processus cellulaires. L'IP3 peut également être recyclé en PIP2 par des phosphoinositides kinases.

Le DAG reste au niveau de la membrane, où il va activer la protéine kinase C (PKC). En effet, en présence de calcium, celle-ci va être transloquée du cytoplasme vers la membrane plasmique. Elle est impliquée dans une cascade de phosphorylation qui aboutit à l'activation de nombreux mécanismes biologiques.

En parallèle, le PIP2, situé à la membrane, peut être transformé en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) par la phosphoinositide 3,4,5-triphosphate kinase (PI-3K) activée par les RCPG de type G $i$ . Il va interagir avec la PKB, ou c-Akt, qui va alors changer de conformation. Ce changement va permettre sa phosphorylation au niveau de résidus sérine ou thréonine par la PDK1 et la PDK2. La PKB/Akt est alors active et peut ainsi retourner dans le cytoplasme pour réguler l'activité de protéines cibles impliquées dans divers processus.

Les RCPG, et notamment ceux couplés à une petite protéine G de type Ras, peuvent également activer la voie des MAPK. Ce sont des sérine/thréonine kinases, qui sont activées par des MAPK/ERK kinases (MEK), elles même activées par des MEK kinases. Les MAPK vont alors activer de nombreux facteurs de transcription.

Les précédents effecteurs cités sont tous activés par les sous-unités  $\alpha$  des protéines G. Cependant, le complexe  $\beta\gamma$  peut lui aussi activer des effecteurs. Parmi eux, on retrouve les canaux à courant potassique (GIRK, *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*). Il peut également activer des phospholipases de type A2 ou  $\beta$ . Tout comme la protéine G $\alpha$ , G $\beta\gamma$  peut aussi activer certains types d'adénylate-cyclase, la PI-3K et les MAPK.

## B. Les prokinéticines et leurs récepteurs

Comme nous l'avons vu, une large variété de substances bioactives sont capables d'activer un RCPG, activation qui est à l'origine de nombreux processus cellulaires. Toutefois, pour un grand nombre de RCPG, le ligand reste encore inconnu. Il est donc très important d'étudier ces RCPG afin de découvrir leur ligand naturel. Au cours de ces 20 dernières années, un grand nombre de ligand ont été identifiés, tels que l'orexine, l'apeline, la ghréline et la métastine (Sakurai *et al.*, 1998; Tatemoto *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 1999; Ohtaki *et al.*, 2001).

A cette même époque, une petite protéine, riche en résidus cystéines, a été isolée à partir des sécrétions de la peau de la grenouille *Bombina variegata*. Elle a alors été appelé Bv8, du fait de son origine et de son poids de 8kDa (Mollay *et al.*, 1999). Cette protéine a la propriété de provoquer des contractions de l'iléon chez le porc, le rat et la souris. De plus, chez le rat, elle est aussi capable d'induire une relaxation du colon et participer à l'hyperalgésie. Un homologue de Bv8 avait déjà été identifié dans la peau d'autres amphibiens, chez le lézard, chez le poisson *Takifugu*, et notamment dans le venin du serpent mamba, qui avait été appelé protéine A (Joubert and Strydom, 1980). Comme elle présentait une activité contractile sur l'iléon, elle a été appelée *mamba intestinal toxin* (MIT-1) (Schweitz *et al.*, 1999).

Des séquences orthologues à MTI-1 et Bv8 ont ensuite été identifiées chez le rat, la souris, le singe, ainsi que chez l'Homme. Leurs protéines ont porté différents noms du fait de leur découverte simultanée par différents groupes. Elles ont été appelées prokinéticines du fait de leur action contractile au niveau de l'intestin (Li *et al.*, 2001). MTI-1 a été nommé prokinéticine 1 (PK1), mais aussi *endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor* (EG-VEGF), du fait de son rôle angiogénique similaire à celui de VEGF dans certaines glandes endocrines (LeCouter *et al.*, 2001). Bv8 a été appelé prokinéticine 2 (PK2), mais aussi *mouse BV8* (mBv8) chez la souris et *human Bv8* (hBv8) chez l'Homme (Wechselberger *et al.*, 1999).

PK1 et PK2 exercent leurs fonctions biologiques en se fixant à deux RCPG, PKR1 et PKR2 (PKR : *prokineticin receptor*).

## 1) Leur structure

### a) *Les prokinétines*

Les protéines Bv8, MTI-1, PK1 et PK2, provenant de la grenouille, du poisson, du serpent et des mammifères, présentent un fort taux d'homologie, particulièrement au niveau de leur extrémité N-terminale et de leur région centrale, qui semblent donc jouer un rôle important dans leurs activités biologiques (Bullock *et al.*, 2004). En effet, elles sont constituées d'une séquence amino-terminale identique nommée AVITGA, qui leur confère le nom de « protéine AVIT ». Elles possèdent également 10 résidus cystéine, qui forment alors 5 ponts disulfures, pour donner une structure compacte à la protéine (Kaser *et al.*, 2003). Chez les mammifères, PK2 est retrouvée sous deux formes différentes, une courte de 81 acides aminés et une longue de 102 acides aminés appelé PK2L (Chen *et al.*, 2005). Ces deux formes sont obtenues du fait d'un épissage alternatif du gène. La forme courte est la forme la plus active. PK1 est constitué de 86 acides aminés et présentent 44% d'homologie avec PK2. Bv8 et MIT-1, eux, présentent 58% d'homologie.

Le gène codant pour PK2, *Prok2*, est localisé sur le chromosome 6 chez la souris et en position 3p13 chez l'Homme. L'exon 1 code pour le peptide signal et les 5 premiers acides aminés de la protéine mature. L'exon 2 code pour 42 acides aminés, dont 6 des 10 cystéines de la protéine mature. L'exon 3 code pour les 21 acides aminés qui différencient la forme courte de la forme longue de PK2 et il ne code donc que PK2L. Les 34 acides aminés restant, dont les 4 cystéines restantes sur les 10 présentes, sont codés par l'exon 4. Le gène *Prok1*, codant pour PK1, est localisé sur le chromosome 3 de la souris et en position 1p21 chez l'Homme.

### b) *Les récepteurs des prokinétines*

Les récepteurs des prokinétines, PKR1 et PKR2, sont des récepteurs couplés aux protéines G, découverts simultanément par trois équipes indépendantes (Lin *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2002; Soga *et al.*, 2002). Ils appartiennent à la même famille de RCPG que le neuropeptide Y qui est impliqué dans la régulation de l'appétit. Ils sont codés par deux gènes, constitués de 2 exons. Ces gènes présentent des localisations bien distinctes. En effet, PKR1 et PKR2 sont codés par des gènes localisés sur les chromosomes 2p13.1 et 20p12.3 respectivement, chez l'Homme (Kaser *et al.*, 2003). Chez la souris, le gène codant pour PKR1 est localisé sur le chromosome 6 et celui pour PKR2 sur le chromosome 2. Chez l'Homme, PKR1 est constitué de 393 acides aminés, tandis que PKR2 en

possède 384. Leurs séquences en acides aminés présentent 85% d'homologie. PK2 présente une bien meilleure affinité pour PKR1 et PKR2 que PK1 (Chen *et al.*, 2005).

Ces récepteurs sont couplés aux protéines Gs, Gq et Gi. Leur activation conduit donc à la régulation de l'activité de l'AC et du taux intracellulaire d'AMPc. La transduction du signal passe également par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire par l'intermédiaire de l'IP3, ainsi que par la phosphorylation des MAPK et d'Akt. Ces différents types de protéines G couplés aux PKRs induisent donc l'activation de différentes voies de signalisation, ce qui témoigne de leur implication dans divers processus cellulaires. Ainsi les PKRs sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, la migration de cellules cibles, et jouent un rôle anti-apoptotique (Maldonado-Perez *et al.*, 2007; Ngan *et al.*, 2008).

## 2) Leurs fonctions

Les prokinétines et leurs récepteurs sont exprimés dans différents tissus. PKR1 est largement distribué dans les organes périphériques tels que le tractus gastro-intestinal, les glandes surrénales, la rate, les ovaires, l'utérus, le placenta, les testicules, la prostate, les reins, le foie, la moelle osseuse et le tissu adipeux. PKR2, lui, est principalement exprimé dans le système nerveux central et au niveau des organes reproducteurs. Cette large répartition de leur expression confère aux prokinétines une implication dans de nombreux processus biologiques (Negri *et al.*, 2007; Ngan and Tam, 2008) (Figure 19).

### a) *La motilité gastro-intestinal*

Il est connu que PK1 et PK2 ont des fonctions similaires et qu'elles sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques dans divers organes. Le premier rôle physiologique identifié des prokinétines a été d'induire la contraction des muscles lisses longitudinaux de l'iléon et la relaxation du colon chez le porc (Schweitz *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001). Toutefois, il semble que le système PKs/PKR soit caractérisé par une certaine spécificité au niveau des tissus et de l'espèce. En effet, chez la souris, PKR1 est exprimé au niveau du plexus myentérique dans la partie proximale du colon et PK1 est capable d'induire la relaxation du colon proximal par un mécanisme dépendant de l'oxyde nitrique. Par contre, PK2 semble incapable de produire les mêmes effets (Hoogerwerf, 2006). PKR1 est aussi exprimé au niveau des cellules de la crête neurale entérique de

l'intestin embryonnaire chez la souris. PK1 module la prolifération et la différenciation de ces cellules durant le développement du système nerveux entérique (Ngan *et al.*, 2007).

### *b) La réponse immunitaire*

La voie PKs/PKR joue un rôle central dans l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire et de la douleur. Chez l'Homme et la souris, les organes lymphoïdes, les leucocytes circulants et les cellules hématopoïétiques expriment fortement PK2 et ses récepteurs. Ils sont donc capables de moduler la croissance, la survie et la fonction des cellules inflammatoires du système immunitaire inné et adaptatif. Par activation des PKRs à la surface des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques, ils jouent alors un rôle dans le chimiotactisme et dans la sécrétion de cytokines inflammatoires et pro-nociceptives.

En effet, les macrophages et les granulocytes inflammatoires produisent PK2 et cette dernière semble jouer le rôle d'agent pro-nociceptif (Martucci *et al.*, 2006). Son expression est fortement augmentée dans le cas d'inflammation des amygdales ou de l'appendice, ce qui est associé à une importante infiltration de neutrophiles (LeCouter *et al.*, 2004). L'induction d'un état inflammatoire chronique dans la patte de souris par l'injection sous-cutanée d'adjuvant de Freund augmente l'expression de PK2 et entraîne une augmentation de la sensibilité à la douleur. L'inactivation du gène codant pour PKR1 réduit la production de PK2, ainsi que l'hyperalgésie découlant de cette inflammation (Negri *et al.*, 2006a). PKR1 est lui aussi exprimé au niveau des macrophages murins et des splénocytes. PK2 est alors capable d'induire la prolifération et la différenciation des monocytes, ainsi que la migration des macrophages. Elle stimule aussi l'acquisition de leur phénotype inflammatoire, en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires et en diminuant celle des cytokines anti-inflammatoires (Martucci *et al.*, 2006). PK2 joue également un rôle dans la différenciation des lymphocytes T vers un profil Th1 en diminuant directement et indirectement la production de cytokines Th2 (Franchi *et al.*, 2008).

### *c) L'angiogenèse et le système cardiovasculaire*

PK1 est aussi appelé EG-VEGF du fait de son rôle angiogénique spécifique au niveau des glandes endocrines. En effet, l'administration de PK1 et PK2 dans l'ovaire ou le testicule induit une réponse angiogénique, qui n'est pas retrouvée lorsque les PKs sont administrées dans la peau ou le muscle squelettique (Ferrara *et al.*, 2004). Chez la souris, les PKs induisent donc la prolifération, la survie, la migration et la fenestration des cellules endothéliales isolées des tissus stéroïdogènes mais

pas des cellules dérivées de l'aorte, de la veine ombilicale ou de la cornée. De plus, les promoteurs des gènes codant pour les PKs possèdent un site de liaison pour le facteur de transcription HIF-1, qui augmente donc leur expression dans un environnement hypoxique (LeCouter *et al.*, 2001; LeCouter *et al.*, 2003a).

L'expression du système PKs/PKR est également retrouvée dans le foie et les reins, qui sont des organes caractérisés par la présence de capillaires fenestrés. PK1 est exprimée par les cellules épithéliales tubulaires du rein et par les hépatocytes du foie. PKR1 est exprimé dans les cellules endothéliales au niveau des glomérules et des structures tubulaires. PKR2 est également exprimé au niveau des cellules endothéliales, suggérant que PK1 est un facteur paracrine de croissance et de survie des cellules endothéliales du rein et du foie. PK2 joue également un rôle dans l'angiogenèse rénale puisqu'elle est capable d'induire la différenciation des EPDC (*epicardium-derived progenitor cells*) rénaux en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses (Boulberdaa *et al.*, 2011).

Chez l'Homme, PK1 est aussi exprimée dans les organes stéroïdogènes tels que l'ovaire, le testicule, la glande surrénale, le placenta et la prostate. Ces organes sont caractérisés par des endothéliums fenestrés et ils possèdent une grande capacité de remodelage vasculaire afin d'assurer les échanges de métabolites. De plus, le promoteur du gène codant pour PK1 possède un site de liaison pour le facteur stéroïdogénique SF-1. Au niveau des testicules des mammifères, PKR1 et PKR2 sont exprimés sur les cellules endothéliales de l'interstitium testiculaire. PK1 est produit par les cellules de Leydig, tandis que PK2 est exprimée dans les spermatozoïdes primaires au niveau des tubes séminifères. Les PKs régulent ainsi la prolifération et la formation des capillaires fenestrés afin de moduler l'excrétion de testostérone et l'entrée de facteurs régulateurs (LeCouter *et al.*, 2003b; Samson *et al.*, 2004). Au niveau des ovaires, PK1 est exprimée par les cellules de la granulosa des follicules primordiaux et primaires. Son expression est augmentée dans les grandes cellules lutéales entourant les cellules de la thèque après l'ovulation et persiste jusqu'à la disparition du corps jaune (Ferrara *et al.*, 2003). PKR1 et PKR2 sont exprimés sur les cellules endothéliales lutéales. PK1 favoriserait ainsi la prolifération et la survie des cellules endothéliales via l'activation de la voie des MAPK. De plus, il induirait l'angiogenèse en stimulant l'expression de VEGF (Kisliouk *et al.*, 2005). Au niveau de l'endomètre, les PKRs et les PKs sont exprimés mais seul PK1 voit son expression varier au cours du cycle, avec un pic lors de la phase sécrétoire du cycle, au moment de la fenêtre d'implantation de l'embryon. Il pourrait ainsi faciliter l'implantation en augmentant la perméabilité microvasculaire de l'endomètre. De plus, PK1 n'est plus exprimée pendant la ménopause, ce qui suggère que son expression est augmentée par les œstrogènes et la progestérone (Ngan *et al.*, 2006).

PK1 est également produite par le placenta au niveau du syncytiotrophoblaste, donnant ainsi à PK1 un rôle de facteur de croissance placentaire. Son expression semble être régulée par l'hypoxie (Maldonado-Perez *et al.*, 2007).

PKR1 est exprimé au niveau de l'épicaarde et du myocarde ventriculaire du cœur, ainsi que dans les cellules endothéliales aortiques chez la souris. PK2 semble être un candidat idéal pour la régulation des fonctions cardiaques. En effet, l'inactivation de PKR1 conduit à une cardiomégalie, à une fibrose interstitielle sévère et à une dysfonction cardiaque. Ce phénotype est dû à une importante perturbation de l'angiogenèse et à une apoptose des cardiomyocytes (Boulberdaa *et al.*, 2011). PK2, *via* l'activation de son récepteur PKR1, induit la formation de vaisseaux à partir de cellules endothéliales cardiaques en culture. De plus, les souris surexprimant PKR1 au niveau des cardiomyocytes présentent une augmentation du nombre de capillaires et du nombre de cellules dérivées de l'épicaarde (EPDC, *epicardium-derived progenitor cells*). PKR1 induit la prolifération et la différenciation des EPDC en cellules endothéliales et cellules musculaire lisses afin de stimuler la néovascularisation (Urayama *et al.*, 2008). Dans un modèle murin d'infarctus du myocarde, l'expression de PK2 et de PKR1 est augmentée 48h après la ligature de l'artère coronaire. L'injection du gène codant pour PKR1 au niveau du site de l'infarction entraîne une diminution de la taille de celle-ci, améliore la fonction du ventricule gauche et augmente alors la survie des souris. Son rôle ne se limite pas seulement à promouvoir la croissance des capillaires, mais module également la survie des cardiomyocytes. PK2 active Akt pour protéger les cardiomyocytes contre le stress oxydatif (Urayama *et al.*, 2007). De plus, le rôle des PKs sur la prolifération et la différenciation des monocytes, ainsi que son rôle chimiotactique sur les macrophages favorise la restauration de l'infarctus (Monnier and Samson, 2008). Ils induisent donc la migration des monocytes circulants jusqu'au site de l'infarctus, où ils vont se différencier en macrophages. Ces derniers phagocytent les cardiomyocytes nécrotiques, active la prolifération des fibroblastes et stimule l'angiogenèse *via* la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance.

Toutefois, bien que PKR2 joue un rôle clé dans la prolifération et la formation des capillaires fenêtrés des organes stéroïdogènes, son rôle apparait néfaste dans le cœur. En effet, la surexpression de PKR2 dans les cardiomyocytes de souris conduit à une augmentation de leur taille, à un élargissement du diamètre du ventricule gauche et à une hypertrophie cardiaque compensée qui n'entraîne pas de dysfonction cardiaque. Ce phénotype est dû à un défaut des cellules endothéliales, qui sont caractérisées par une désorganisation de leur zonula occludens, conduisant à une fuite vasculaire (Urayama *et al.*, 2009).

#### d) *La nociception*

Le système PKs/PKR2 joue également un rôle important dans la nociception. L'injection d'une faible dose de PK2 dans la patte de souris entraîne une forte sensibilité aux stimuli thermiques et mécaniques (Negri *et al.*, 2002). Les études de souris transgéniques n'exprimant plus PKR1 ou PKR2 ont permis de découvrir leur implication dans les réponses nociceptives. En effet, les souris, dans lesquelles le gène codant pour PKR1 est inactivé, sont 100 fois moins sensibles à l'hyperalgésie induite par PK2 que les souris contrôles (Negri *et al.*, 2006a). Les PKR2 sont exprimés au niveau des ganglions spinaux. Les neurones exprimant les PKR2 sont composés de petits neurones peptidergiques et de neurones exprimant le marqueur N52 spécifique des fibres myélinisées. PKR1 est plutôt retrouvé sur les petits neurones, tandis que PKR2 l'est sur les neurones moyens et larges. Lors de la liaison à ses récepteurs, PK2 induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et la translocation de PKC à la membrane neuronale. Les PKR2 sont coexprimés avec le récepteur à la capsaïcine (TRPV1, *transient receptor potential vanilloid 1*), un canal cationique connu pour être impliqué dans la transduction du signal nociceptif. TRPV1 participe donc à l'hyperalgésie induite par PK2. L'inactivation du gène codant pour TRPV1 ou l'inhibition de son signal par son antagoniste, la capsazepine, réduit l'hyperalgésie thermique induite par PK2 (Negri *et al.*, 2006b; Vellani *et al.*, 2006). De plus, dans la population non peptidergique de neurones exprimant les PKR2, l'exposition au facteur neurotrophique (GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) entraîne une expression *de novo* de PKR2 fonctionnels, suggérant une possible régulation de PKR2 lors de l'inflammation.

#### e) *La neurogenèse*

Au niveau du système nerveux central, PKR2 est fortement exprimé au niveau du bulbe olfactif, du neuroépithélium, du striatum, de l'hippocampe, du thalamus, des amygdales et du cortex ainsi que dans l'hypothalamus sur les noyaux paraventriculaires et les noyaux supra-chiasmatiques. PKR1, lui, est retrouvé seulement au niveau du cortex, ce qui suggère un rôle important de PKR2 lors du développement du cerveau (Negri *et al.*, 2006b).

En effet, le système PK2/PKR2 joue un rôle majeur dans le développement du bulbe olfactif, une région dans laquelle la neurogenèse persiste à l'âge adulte. Chez la souris, à l'état embryonnaire, PK2 est exprimée dans la zone sous-ventriculaire, puis dans la couche granulaire, la couche des cellules mitrales et la couche glomérulaire chez la souris néonatale et adulte. Ces différentes zones d'expression suggèrent que PK2, sécrétée par le bulbe olfactif, agit comme un

facteur chimioattractant pour les progéniteurs neuronaux dérivés de la zone sous-ventriculaire (Ng *et al.*, 2005). Les souris n'exprimant plus PKR2 ou PK2 sont caractérisées par une hypoplasie et une morphologie anormale du bulbe olfactif, et ce dès les stades précoces de développement fœtal (Matsumoto *et al.*, 2006). De plus, ces souris présentent une atrophie du système reproductif, du fait de l'absence des neurones à gonadotrophine dans l'hypothalamus, causée par un défaut de migration de ces neurones (Pitteloud *et al.*, 2007).

En plus de son action lors du développement, PK2 via pKR2 semble stimuler la survie neuronale lors de culture primaire de cellules granulaires du cervelet. Elle protège également les neurones corticaux en culture contre l'excitotoxicité, en activant les voies de signalisations de ERK et d'Akt (Melchiorri *et al.*, 2001).

#### *f) La régulation du cycle circadien*

PK2 est produite dans différentes régions du cerveau comme le noyau suprachiasmatique, l'aire préoptique médiane et le noyau du tractus solitaire. PKR2 est exprimé au niveau du cortex piriforme, le noyau thalamique paraventriculaire, le noyau parataenial, le noyau suprachiasmatique, les noyaux hypothalamiques paraventriculaires et dorsomédians, le noyau arqué et l'organe subfornical. La voie de signalisation de PK2 *via* PKR2 régule le cycle circadien car ils sont tous deux exprimés au niveau du noyau suprachiasmatique. L'augmentation de l'activité nocturne est corrélée à la diminution de la sécrétion de PK2. En effet, l'expression de PK2 est très élevée pendant le jour et est presque indétectable pendant la nuit chez le rat et la souris (Negri *et al.*, 2004). Toutefois, cette variation circadienne se retrouve également lorsque les souris sont maintenues de façon constante dans l'obscurité. La régulation de l'expression est donc plus complexe. En effet, l'étude des souris dont les gènes *Clock* ou *Cryptochrome* sont inactivés montre que l'oscillation d'expression de PK2 est contrôlée par le mécanisme circadien endogène, mais la lumière joue un rôle modulateur. Le gène codant pour PK2 est un gène cible pour de nombreux facteurs de transcription contrôlant le rythme circadien tels que *Clock* et *Bmal1*, qui activent alors son expression. Cependant, la stimulation de souris avec des pulses de lumière montre que l'oscillation de PK2 dans le noyau suprachiasmatique répond à la lumière. L'application de ces pulses en début ou en fin de phase de nuit retarde ou avance, respectivement, la production de PK2. De plus, les neurones exprimant PK2 reçoivent des projections directes des neurones rétinien et sont donc photoréceptif. PK2 est donc une molécule sécrétée qui transmet le rythme de l'activité locomotrice du noyau suprachiasmatique, puisque l'administration intracérébroventriculaire de PK2 lors de la phase nocturne inhibe l'activité locomotrice chez le rat (Cheng *et al.*, 2002). L'inactivation du gène

codant pour PK2 perturbe le rythme de nombreux processus biologiques tels que les cycles éveil/sommeil, la température corporelle, la sécrétion des glucocorticoïdes et le taux de glucose sanguin. Cet effet de PK2 semble passer par PKR2 étant donné que l'inactivation du gène codant pour PKR2 induit aussi une dérégulation d'une variété de processus physiologique chez la souris (Prosser *et al.*, 2007).

#### *g) La régulation de la prise alimentaire*

Le noyau arqué, qui exprime PKR2, est considéré comme le principal site de contrôle du comportement alimentaire. Il reçoit des signaux provenant du noyau suprachiasmatique, de l'aire préoptique médiane et du noyau du tractus solitaire, dont les neurones produisent PK2. L'expression hypothalamique de PK2 est réduite chez le rat à jeun. L'injection intracérébroventriculaire de PK2 inhibe la prise alimentaire alors que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre PK2 l'augmente (Gardiner *et al.*, 2009). Cette inhibition de la prise alimentaire a lieu durant les phases diurnes et nocturnes, mais aussi quand la prise alimentaire est induite par le jeun ou par le neuropeptide Y. On observe également une augmentation de la consommation d'eau en phase diurne alors que la nuit cette augmentation n'est visible que chez le rat à jeun. PK2 a donc un effet anorexigène et dipsogénique. Les neurones du noyau suprachiasmatique qui sécrète PK2 se projettent sur les neurones exprimant PKR2 du noyau arqué afin de transmettre le cycle circadien de la prise alimentaire. Alors que les projections des neurones du noyau du tractus solitaire au niveau des neurones de l'organe subfornical transmettent les informations viscérales sur la balance électrolytique et la régulation osmotique (Cottrell *et al.*, 2004; Negri *et al.*, 2004). De plus, l'injection intracérébroventriculaire de PK2 augmente l'expression de c-fos dans les neurones à proopiomélanocortine du noyau arqué et augmente la sécrétion d' $\alpha$ -MSH. L'effet anorexique de PK2 est donc bloqué par l'utilisation de l'AgRP, un antagoniste de l' $\alpha$ -MSH. L'injection de PK2 en périphérie diminue également la prise alimentaire, ce qui induit une perte de poids chez les souris minces et obèses.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'absence d'expression de PKR2 chez la souris induit une dérégulation des cycles circadiens au niveau de l'activité locomotrice et de la thermorégulation. De plus, ces souris présentent des accès de torpeur spontanés et sporadiques. Lors de ces accès de torpeur, la température corporelle et l'activité locomotrice diminuent fortement, ainsi que la consommation en oxygène et la production de dioxyde de carbone. Ces réponses physiologiques et comportementales sont caractéristiques d'une balance énergétique négative. La

voie de signalisation de PKR2 joue donc un rôle dans le contrôle de la balance énergétique (Jethwa *et al.*, 2008).

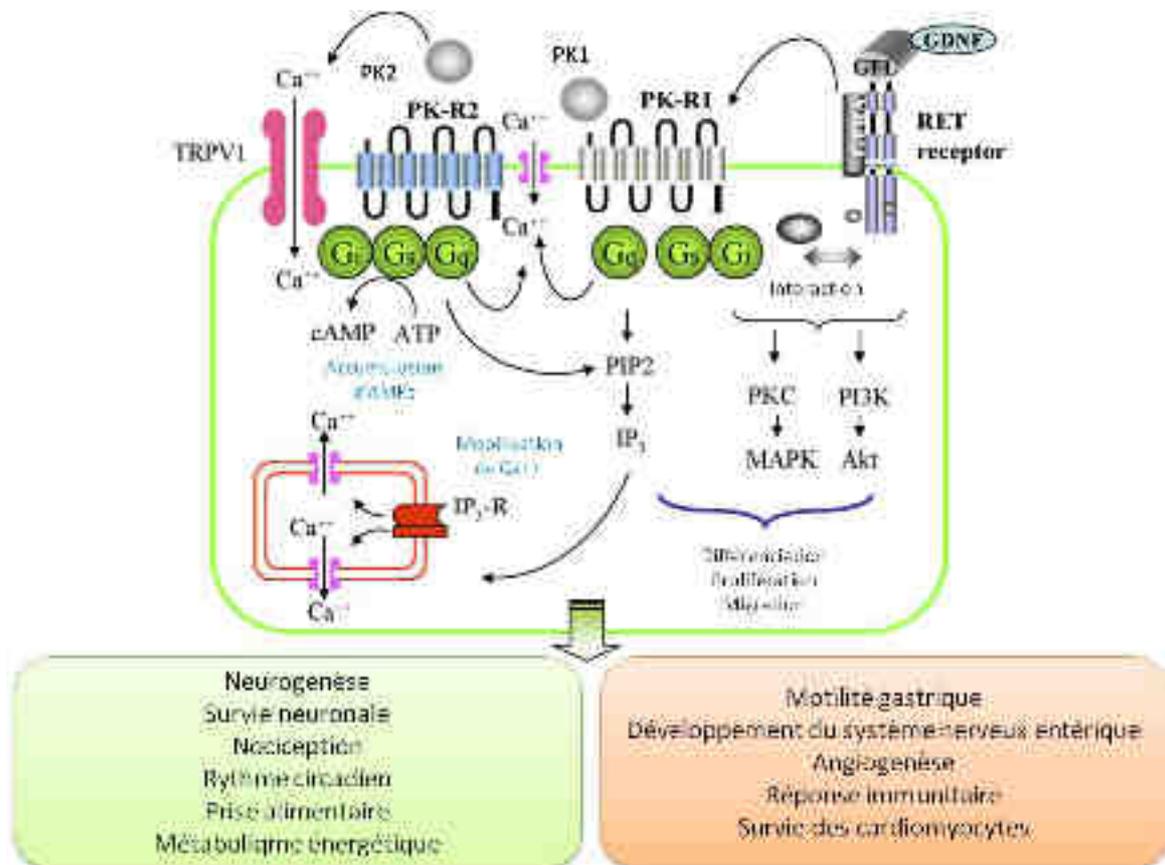


Figure 19 : La voie de signalisation des prokinétines et leurs effets biologiques.

D'après (Ngan and Tam, 2008).

# OBJECTIFS DU PROJET

---

L'obésité est définie comme un excès anormal de masse adipeuse. Cette expansion de tissu adipeux se fait par hypertrophie et/ou hyperplasie des adipocytes, en réponse à un déséquilibre de la balance énergétique. L'augmentation de masse grasse perturbe fortement les fonctions métaboliques et sécrétrices de l'adipocyte, ce qui peut avoir des répercussions importantes au niveau de l'homéostasie énergétique. Etant donné le rôle majeur du tissu adipeux dans l'organisme, l'obésité est impliquée dans la genèse de nombreuses pathologies, ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique. Il est donc important de comprendre la physiopathologie de l'obésité afin de développer des outils thérapeutiques.

Les prokinétines 1 et 2 (PK1 et PK2), ainsi que leurs récepteurs couplés aux protéines G, PKR1 et PKR2, sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Ainsi, la PK2 a été identifié comme un facteur angiogénique dont l'action est médiée par le récepteur PKR1. Elle est aussi un facteur anorexigène impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique *via* l'activation du récepteur PKR2.

Le Dr. Masuda et ses collaborateurs, en 2002, ont montré que les adipocytes expriment PKR1. Pourtant, le rôle fonctionnel de la PK2 dans le tissu adipeux n'a jamais été étudié. Nous émettons donc l'hypothèse que la PK2, *via* son récepteur PKR1, pourrait être impliquée dans la formation et la fonction du tissu adipeux, et avoir un rôle dans le développement de l'obésité.

Mon sujet de thèse a consisté, d'une part à étudier l'impact de l'inactivation de PKR1 *in vivo* sur deux lignées de souris, une dans laquelle PKR1 est inactivé de façon ubiquitaire (PKR1<sup>-/-</sup>) et l'autre dans laquelle l'inactivation de PKR1 est spécifiquement dirigé dans le tissu adipeux (aP2-PKR1<sup>-/-</sup>). D'autre part, nous avons étudié le rôle de la PK2 sur l'adipogenèse *in vitro* en utilisant une lignée de fibroblastes embryonnaires murins caractérisés comme des préadipocytes.

Le premier objectif du travail sur les souris PKR1<sup>-/-</sup> était de déterminer l'effet de l'inactivation de PKR1 sur la morphologie et l'expansion du tissu adipeux.

Ensuite, il nous a fallu déterminer si PKR1 pouvait jouer un rôle dans la balance énergétique, à la fois au niveau de l'appétit et de l'absorption des lipides par l'intestin, mais aussi au niveau de la thermogenèse induite par le froid.

L'expansion du tissu adipeux ayant besoin d'une riche vascularisation et PKR1 étant impliqué dans l'angiogenèse, nous avons pour but d'étudier l'effet de l'inactivation de PKR1 sur la formation de vaisseaux au sein du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup>.

L'obésité étant à l'origine du développement d'une résistance à l'insuline, nous avons alors analysé le rôle de PKR1 dans le métabolisme glucidique des souris PKR1<sup>-/-</sup>.

Etant donné le rôle prépondérant de la PK2 dans l'angiogenèse et l'importance de la vascularisation dans la genèse du tissu adipeux, nous ne pouvions pas exclure que les résultats observés sur la morphologie et la fonction du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> pouvaient provenir d'un effet indirecte de l'inactivation de PKR1 au niveau vasculaire. Nous avons donc créé la lignée de souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> dans lesquelles PKR1 est inactivé au niveau des adipocytes et des préadipocytes.

Notre objectif était donc de déterminer le rôle direct de l'inactivation de PKR1 au niveau du tissu adipeux en s'affranchissant du rôle indirecte de la vascularisation. Nous avons alors analysé la morphologie du tissu adipeux et vérifié sa vascularisation.

Puis nous avons étudié le profil glycémique des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> pour voir l'impact direct de l'inactivation de PKR1 dans le tissu adipeux sur le métabolisme énergétique.

Afin de confirmer nos résultats *in vivo*, nous avons déterminé le rôle de la PK2 sur la prolifération des préadipocytes et sur la conversion des cellules 3T3-L1 en adipocytes.

# RESULTATS

---

# MATERIELS ET METHODES

---

## Génération des modèles de souris transgéniques $PKR1^{-/-}$

Les souris  $PKR1^{-/-}$  sont générées par recombinaison homologue dans des souris C57BL/6 à la Clinique de la Souris (Illkirch). Des cellules souches embryonnaires murines sont électroporées avec le plasmide pGPR73 L3 qui contient l'exon 2 de  $PKR1$  entouré par deux sites  $Lox-P$ , ainsi que le gène de résistance à la néomycine entouré par deux sites  $Frt$  et deux sites  $LoxP$ , permettant de sélectionner les clones recombinants. Ces derniers sont alors injectés dans un embryon, qui est introduit dans une femelle pseudogestante. On obtient alors une lignée de souris chimériques capables de transmettre l'exon floxé à leur descendance. Le croisement de ces souris avec une lignée de souris sauvages permet d'obtenir des souris  $GPR73^{L3/+}$ . Afin d'induire l'excision des sites  $LoxP$ , ces souris sont alors croisées avec des souris  $CMV-Cre$  dans lesquelles l'expression de la recombinaise  $Cre$  est sous la dépendance du promoteur fort du cytomégalo virus. La recombinaise  $Cre$  va alors exciser les sites  $Lox-P$  et on obtient des souris hétérozygotes  $GPR73^{+/L-}$ . Ces souris sont croisées entre elles afin d'obtenir des souris  $GPR73^{L-/L-}$  que nous avons nommé  $PKR1^{-/-}$ .

Les souris sont soumises à un cycle jour-nuit de 12h-12h et maintenues à une température de 22-24°C pendant 40 semaines. Elles ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. L'alimentation des souris est, soit une nourriture équilibrée contenant 5% de matières grasses (NFD, *normal fat diet*), soit une nourriture riche en graisse (60%) (HFD, *high fat diet*) qui est donnée aux souris à partir de l'âge de 6 semaines jusqu'à l'âge requis pour les expérimentations.

## Génération des modèles de souris transgéniques $aP2-PKR1^{-/-}$

Les souris  $aP2-PKR1^{-/-}$  sont générées en croisant des souris  $GPR73^{L2/L2}$  avec des souris hémizygotés  $aP2-Cre-ER^{T2(Tg/0)}$ . Ces dernières expriment la recombinaise  $Cre$  couplée au récepteur des œstrogènes, sous la dépendance du promoteur  $aP2$ , dont l'expression est spécifiquement dirigée dans le tissu adipeux. Les souris  $GPR73^{L2/L2}$  sont générées à partir des souris  $GPR73^{L3/+}$  qui sont croisées avec des souris exprimant la recombinaise  $Flp$  capable d'exciser les sites  $Frt$  qui encadre le gène de résistance à la néomycine. On obtient les souris  $GPR73^{L2/+}$ , qui sont alors croisées entre elles afin d'obtenir des souris  $GPR73^{L2/L2}$ . Le croisement des souris  $GPR73^{L2/L2}$  avec des souris  $aP2-Cre-ER^{T2(Tg/0)}$  aboutit à la naissance de souris  $GPR73^{L2/L2}$  (aussi appelées  $L2/L2$ ) et aux souris  $aP2-Cre-ER^{T2(Tg/0)}-GPR73^{L2/L2}$  (appelées  $aP2-L2/L2$ ) dans lesquelles la recombinaise  $Cre$  est exprimée dans le tissu adipeux mais n'est pas encore active. Pour qu'elle soit active, les souris sont injectées intrapéritonéalement avec 1mg/jour de tamoxifène (Tam) pendant 5 jours, à partir de

l'âge de 3 semaines. On obtient alors les souris aP2-GPR73<sup>L-/L-</sup> que nous nommons aP2-PKR1<sup>-/-</sup>. Ces souris sont à nouveau réinjectées avec du Tam à l'âge de 13 semaines. Les souris sont soumises à un cycle jour-nuit de 12 h-12 h et maintenues à une température de 22-24°C. Elles ont un accès libre à l'eau et à la nourriture dite équilibrée.

### **Etude en cages métaboliques**

Les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> sont placées pendant 3 jours dans des cages métaboliques individuelles permettant de mesurer la quantité de nourriture ingérée et d'eau consommée. Elles permettent également de récolter les urines et les fèces excrétées. Les souris sont maintenues en acclimatation pendant 24h, puis la nourriture consommée est pesée, le volume d'eau bu est mesuré, les urines et les fèces sont récoltées aux jours 2 et 3.

### **Thermogénèse induite par le froid**

Les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> sont placées dans des cages individuelles. Pendant 3 heures, les souris sont maintenues à jeun dans un environnement tempéré. Elles sont ensuite placées dans un environnement à 4°C pendant 2 heures. La température rectale est mesurée avec un thermomètre 3 heures avant de placer les souris dans la chambre à 4°C, juste avant l'exposition au froid et 2 heures après (Kasahara *et al.*, 2007).

### **Absorption intestinale de lipides**

Les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> sont placées dans des cages individuelles et maintenues à jeun toute la nuit. Ensuite, elles reçoivent 500µl d'huile d'olive par gavage. Les souris sont sacrifiées 1 heure après (Wang *et al.*, 2005). Les différentes parties de l'intestin sont incluses dans de la cryomatrice (Thermo Scientific) et congelées à -80°C.

### **Quantification des lipides fécaux**

Les fèces sont pesés puis broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les lipides sont extraits des fèces avec du solvant constitué de chloroforme et de méthanol (2 :1) (20 ml de solvant pour 1 g de fèces). Le mélange est placé sous agitation pendant 20 min. Après sédimentation du broyat de fèces, le solvant est récupéré. Les matières non-lipidiques sont séparées des lipides avec 0,9% de NaCl qui permet la séparation de la phase organique contenant uniquement les lipides (Folch *et al.*, 1957). Cette phase est prélevée et transférée dans un ballon en verre pré-pesé. Les lipides sont alors séchés grâce à un évaporateur pendant 5min à 40°C. Le ballon avec les lipides secs est à nouveau pesé. La différence de poids entre le ballon contenant les lipides et le ballon vide correspond alors au poids des lipides secs.

### **Test de tolérance au glucose et test de tolérance à l'insuline**

Les souris sont placées dans des cages individuelles. Pendant 5 heures, les souris sont maintenues à jeun. Pour le test de tolérance au glucose, les souris sont injectées, intrapéritonéalement, avec 1g/kg de glucose. Pour le test de sensibilité à l'insuline, l'insuline (Umluline) à une concentration de 0,75U/kg est injectée. Le taux de glucose sanguin est mesuré en prélevant une goutte de sang au niveau de la veine de la queue. La mesure est faite avec un glucomètre Contour TS (Bayer), juste avant l'injection de glucose ou d'insuline, puis 20 min, 40 min, 60 min, 90 min et 120 min après l'injection.

### **Coupes semi-fines et ultrafines**

Les tissus adipeux et les intestins sont prélevés et fixés dans du glutaraldéhyde. Ils sont post-fixés avec du tétraoxyde d'osmium, puis inclus dans de la résine époxy. Les coupes semi-fines sont réalisées au microtome à une épaisseur de 1 µm. Elles sont ensuite colorées au bleu de toluidine et observées au microscope optique à un grossissement x20. Les photos du tissu adipeux permettent de compter le nombre d'adipocyte par champs, ainsi que de mesurer la taille et l'aire des adipocytes. Par champs, chaque adipocyte a été mesuré et plusieurs champs ont été pris en compte. Les coupes ultrafines sont réalisées avec un ultramicrotome à une épaisseur de 0,05 µm d'épaisseur. Elles sont alors observées au microscope électronique.

### **Immunofluorescence PECAM/Collagène et CD68/ Collagène**

Les tissus adipeux congelés sont coupés au cryostat à une épaisseur de 10 µm. Les coupes sont fixées avec 3,7% de formaldéhyde pendant 30 min à température ambiante. Après lavage au *phosphate buffer saline* (PBS), afin de bloquer les liaisons aspécifiques entre anticorps et antigènes, les coupes sont incubées avec du PBS contenant 10% de sérum d'âne et 0,5% de Triton 100-X pendant 2h à température ambiante. Pour visualiser le contour des adipocytes et les cellules endothéliales, les anticorps de lapin anti-collagène VI (Abcam) et de rat anti-PECAM-1 (Santa Cruz) sont dilués au 1/150 et 1/100, respectivement, dans du PBS contenant 1% de sérum d'âne et 0,05% de Triton 100-X. Pour visualiser le contour des adipocytes et les macrophages, les anticorps de lapin anti-collagène VI (Abcam) et de rat anti-CD68 (Serotec) sont dilués au 1/150 et 1/100, respectivement, dans du PBS contenant 1% de sérum d'âne et 0,05% de Triton 100-X. Les coupes sont incubées avec les anticorps toute la nuit à 4°C. Après lavage au PBS, les anticorps primaires sont détectés par l'intermédiaire des anticorps secondaires anti-lapin couplés à l'Alexa 555 et anti-rat couplés à l'Alexa 488, dilués au 1/300 dans du PBS. Les coupes sont donc incubées pendant 30 min avec les anticorps secondaire, puis sont lavées au PBS, et enfin montées entre lame et lamelle

avec du milieu de montage Vectashield contenant du Dapi dilué au 1/500. Les coupes sont visualisées avec un microscope à fluorescence (Leica) à un grossissement x40.

### **Coloration de la succinate déshydrogénase SDH**

Les coupes de tissu adipeux sont incubées 1h à 37°C dans une solution de nitrobleu de tétrazolium à 0,2% contenant 20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (dihydrogénophosphate de potassium), 150 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (dihydrogénophosphate de sodium) et 100mM de succinate de sodium, à pH 7,3. Les coupes sont ensuite lavées au PBS, puis fixées avec 3,7% de formaldéhyde. Un rinçage avec 15% d'éthanol est effectué et les lamelles sont montées sur les lames avec le milieu de montage Vectashield. Les coupes sont visualisées avec un microscope optique (Leica) à un grossissement x40.

### **Adipogenèse *in vitro***

Les cellules 3T3-L1 proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD). Les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 60000 cellules/puits. Elles sont cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant 4,5 g/l de glucose, 10% de sérum de veau fœtal (FCS, *fetal calf serum*) et 100 U de gentamycine. Deux jours post-confluence, les cellules sont stimulées ou non avec 5 nM de PK2. Puis, 12h après ce traitement, un cocktail pro-adipogénique contenant 0,5 mM d'isobutylméthylxanthine, 1 $\mu$ M de dexaméthasone et 10  $\mu$ g/ml d'insuline est ajouté. Au bout de 48h, les cellules sont traitées avec le milieu supplémenté avec 10  $\mu$ g/ml d'insuline pendant 2 jours. Enfin, le milieu DMEM contenant 10  $\mu$ g/ml d'insuline est renouvelé pendant 2 jours. Les cellules différenciées sont alors rincées 2 fois au PBS et fixées avec 3,7% de formaldéhyde. Les cellules fixées sont colorées avec de l'huile rouge afin de visualiser les adipocytes.

### **Coloration à l'huile rouge**

Les cellules 3T3-L1 différenciées avec le cocktail adipogénique sont colorées avec de l'huile rouge afin de distinguer les adipocytes. Les cellules sont rincées 2 fois au PBS, puis fixées avec 3,7% de formaldéhyde pendant 30 min à température ambiante. Après lavage au PBS, elles sont incubées pendant 30 min avec 0,5% d'Oil Red O (Sigma Aldrich) dissout dans 60% de triéthylphosphate, à une dilution de 36% dans de l'eau. Les cellules sont ensuite rincées à l'eau, puis contre-colorées avec de l'hématoxyline diluée au 1/100 dans de l'eau pendant 10 min. Les adipocytes colorés sont observés au microscope optique inversé à un grossissement x63. Ils sont quantifiés par rapport au nombre de cellules totales par champs et exprimé en %.

L'intestin congelé est coupé au cryostat à une épaisseur de 5  $\mu$ m. Les coupes sont fixées avec 3,7% de formaldéhyde pendant 30 min à température ambiante. Le reste de la coloration à l'huile rouge

est identique à celle des cellules 3T3-L1. Après coloration, les coupes sont observées sous un microscope optique à un grossissement x20. La quantité de lipide contenu dans l'intestin est quantifiée en mesurant la coloration de l'huile rouge avec le logiciel Image J.

### **Prolifération et apoptose**

Les cellules 3T3-L1 sontensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de 5000 cellules/puits et maintenues dans le milieu DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, 10% de sérum de veau fœtal et 100 U de gentamycine pendant 2 jours. Elles sont ensuite synchronisées avec un milieu de sevrage contenant seulement 0,5% de sérum pendant 16h. Après synchronisation, les cellules sont traitées avec, soit du milieu complet contenant 10% de sérum, soit avec du milieu de sevrage contenant 0,5% de sérum. Pour chacun des deux milieux, les cellules sont stimulées ou non avec 5 nM de PK2 pendant 4 jours. Les cellules sont énumérées juste après la synchronisation, puis toutes les 24h pendant 4 jours. Pour cela, les cellules sont détachées du puits avec 100 µl de trypsine diluée à 0,25%. Puis, 400 µl de milieu complet est ajouté pour neutraliser la trypsine. Les cellules sont comptées à l'aide d'une lame de Kova observée avec un microscope optique afin de déterminer le nombre de cellules/puits au cours du temps.

Les cellules sont aussiensemencées dans des plaques 8 puits à une densité de 2000 cellules/puits et maintenues 2 jours dans le milieu de culture complet. Elles sont ensuite cultivées pendant 16h dans du milieu de sevrage. Ensuite, elles sont stimulé ou non avec de la PK2, en présence du milieu complet ou du milieu de sevrage. Au bout de 10h, les cellules sont fixées avec 3,7% de formaldéhyde à température ambiante pendant 30 min afin d'étudier la prolifération cellulaire par un marquage de la protéine Ki67. D'autres cellules sont fixées après 48h de traitement afin de voir l'effet de la PK2 sur l'apoptose.

### **Immunofluorescence Ki67/Pref**

Les tissus adipeux congelés sont coupés au cryostat à une épaisseur de 10 µm. Les coupes sont fixées avec 3,7% de formaldéhyde pendant 30 min à température ambiante, puis post-fixées avec un mélange éthanol/acide acétique (2 :1) pendant 20 min à -20°C. Après lavage au PBS, afin de bloquer les liaisons aspécifiques entre anticorps et antigènes, les coupes sont incubées avec du PBS contenant 10% de sérum d'âne et 1% de Triton 100-X pendant 2h à température ambiante. Pour visualiser les préadipocytes en prolifération, les anticorps de lapin anti-Pref-1 (Abcam) et de chèvre anti-Ki67 (Santa Cruz) sont dilués au 1/100 dans du PBS contenant 1% de sérum d'âne et 0,1% de Triton 100-X. Les coupes sont incubées avec les anticorps toute la nuit à 4°C. Après lavage au PBS, les anticorps primaires sont détectés par l'intermédiaire des anticorps secondaires anti-lapin couplés à l'Alexa 555 et anti-rat couplés à l'Alexa 488, dilués au 1/300 dans du PBS. Les coupes sont donc

incubées pendant 30 min avec les anticorps secondaire, puis sont lavées au PBS, et enfin montés entre lame et lamelle avec du milieu de montage Vectashield contenant 1/500 de Dapi. Les coupes sont visualisées avec un microscope à fluorescence (Leica) à un grossissement x40.

L'immunomarquage des cellules 3T3-L1 après 10h de prolifération est réalisé de la même manière que pour le tissu adipeux, hormis le fait que le marquage Ki67 soit effectué seul sans le marquage pour Pref-1.

## **TUNEL**

L'apoptose est visualisée par la méthode *Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling* (TUNEL) avec le kit Apoptag (Millipore) selon les instructions du fabricant. Les cellules 3T3-L1 adhérentes sur les lames sont fixées après 48h de prolifération avec 3,7% de formaldéhyde pendant 30 min à température ambiante. Après lavage au PBS, une post-fixation avec un mélange éthanol/acide acétique (2 :1) est effectuée pendant 20 min à -20°C. Les cellules sont lavées au PBS, puis les antigènes sont bloqués avec le tampon d'équilibration pendant 10 sec à température ambiante. Puis les lames sont incubées pendant 1h à 37°C avec le tampon contenant l'enzyme TdT transférase. La réaction est stoppée avec un tampon stop. Après lavage au PBS, les cellules sont incubées avec un tampon contenant un anticorps anti-digoxigénine conjugué à la fluorescéine pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Enfin, les cellules sont lavées au PBS puis montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Vectashield contenant 1/500 de Dapi.

## **Extraction de l'ARN**

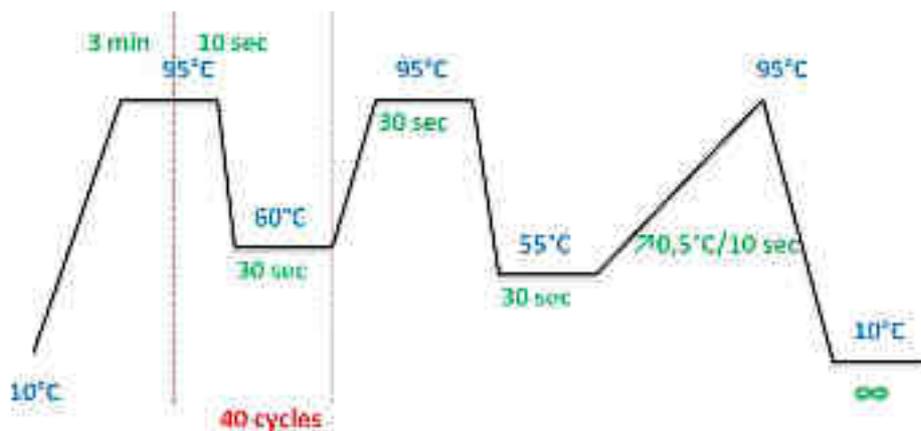
L'extraction des ARN totaux des cellules 3T3-L1 cultivées en plaque 6 puits est effectuée avec du TriReagent (MRC, Cincinnati, OH) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules sont lysées avec 1ml de TriReagent et le lysat est placé dans un tube de 1,5 ml. Un volume de 50 µl de 4-bromoanisole (BAN) est ajouté, le tout est vortexé, puis centrifugé à 12000 x g pendant 15 min à 4°C. 500 µl de la phase aqueuse supérieure est récupérée, placée dans un tube de 1,5 ml et 500 µl d'isopropanol est ajouté. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante, puis centrifugé 10 min à 12000 x g à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol 80%. Le tout est centrifugé pendant 5 min à 7500 x g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre. Enfin, le culot est dissout dans 20 µl d'eau traité au diéthylpyrocarbonate (DEPC). La concentration des ARN en µg/ml est calculée grâce à la formule  $40 \times A_{260} \times \text{facteur de dilution}$ , où  $A_{260}$  est l'absorbance optique à 260 nm des ARN dilués et 40 correspond à la concentration d'1  $A_{260}$  en µg/ml.

## Transcription inverse

Avant la transcription inverse, l'ARN est traité avec le kit DNase I RNase Free (Fermentas) selon les instructions du fabricant. 1 U de DNase est donc ajoutée à 5 µg d'ARN dilué dans de l'eau DEPC et incubé à 37°C pendant 30 min. La réaction est stoppée avec 5 mM d'EDTA pendant 10 min à 65°C. La synthèse d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) est réalisée avec le kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Elle débute par l'ajout de 500 ng d'amorces dT et 500 µM de dNTP et le tout est incubé à 65°C pendant 5 min. Puis après un transfert sur la glace, 10 mM de dithiothreitol (DTT) est ajouté avec 1/5 de tampon 5X et le mélange est placé à 42°C pendant 2 min. Enfin, 200 U de Superscript transcriptase est ajoutée et la réaction de synthèse se déroule à 42°C pendant 50 min. La réaction est arrêtée après une incubation de 15 min à 72°.

## PCR en temps réel

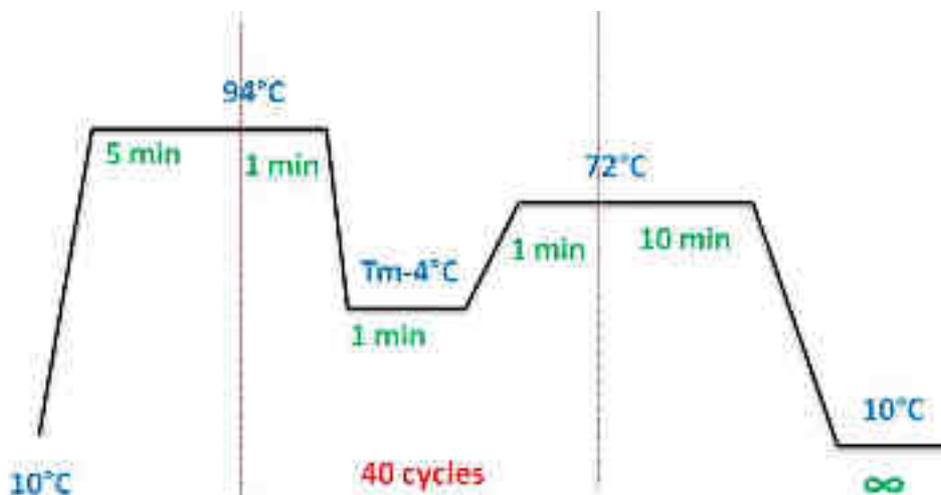
Après la transcription inverse, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel est réalisée à l'aide du kit Sybr Green Master Mix (BioRad) selon les instructions du fournisseur. Le mix contient le Sybr Green, les dNTP, 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, de la fluorescéine et la iQ DNA polymérase. Le mix est dilué au ½ par ajout de 0,125 µg d'ADNc et 200 nM d'amorces pour le gène cible (Tableau). La PCR est ensuite réalisée dans le thermocycleur MyIQ (BioRad) avec le protocole suivant :



L'expression des gènes cibles est calculée en prenant en compte le Ct relativisé par rapport à celui du gène de référence, la β-actine. Puis l'expression dans la condition cible est, elle aussi, relativisée par rapport à celle de la condition de référence.

## PCR semi-quantitative

La PCR semi-quantitative est réalisée à partir du tampon 10X (Fermentas) dilué au 1/10 par ajout de 0,5 µg d'ADN, 250 µM de dNTP, 0,1 µg d'amorces (Tableau) et 5 U de Taq ADN polymérase (Fermentas). La réaction a lieu dans un thermocycleur selon le protocole suivant :



Les produits de la PCR sont déposés sur un gel d'agarose 2%-TAE 0,5X et visualisé sous UV.

**Tableau 1 : Séquences des amorces pour les PCR.**

Les amorces en bleu représentent celle utilisées en PCR semi-quantitative et les noires en PCR en temps réel.

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
GAPDH	TGAGGCCGGTGTGAGTATGTCTG	CCACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG
PKR1	GCCATTGCCATTGACAGGTA	TGGTGAAGTAGGCAGCTGGA
HIF 1	TACAAGGCAGCAGAAACCTAC	TGTGCAATTGTGGCTACC
β-actine	CATCTTGGCCTCACTGTCCA	GGGCCGACTCATCGTACT
PPARγ	CGAGAAGGAGAAGCTGTTGG	GAAACTGGCACCCTTGAAAA
C/EBPa	CAAGAACAGCAACGAGTACCG	GTCCTGGTCAACTCCAGCAC
Pref-1	CTGTGTCAATGGAGTCTGCAAG	CTACGATCTCACAGAAGTTGC
Adiponectine	AATCCTGCCAGTCATGCCGAAG	TCTCCAGGAGTGCCATCTTGCCATC
Résistine	AGAAGGCACAGCAGTCTT	TGTCCAGTCTATCCTTGC
Cycline D1	GAGATTGTGCCATCCATGC	CTCCTCTTCGCACTTCTGCT
Cycline E1	TTCTGCAGCGTCATCCTCT	TGGAGCTTATAAGACTTCGCACA
Cdk-2	CACAGCCGTGGATATCTGG	CATGGTGCTGGGTACACACT
c-Myc	CCTAGTGCTGCATGAGGAGA	TCTCCTCATCTTCTTGCTCTTC

## Analyse statistique

Tous les résultats présentés correspondent aux moyennes d'au moins 3 expériences et les barres d'erreur représentent les écarts standards à la moyenne (sem). Les différences entre la condition d'intérêt et la condition référence ont été analysées par un test de Student's bilatérale. Elles sont considérées comme significatives pour une valeur de  $p < 0,05$  et sont représentées par une \*.

# RESULTATS

---

## I. Caractérisation des souris PKR1<sup>-/-</sup>

### A. Problématiques et stratégies

Notre étude porte sur des souris contrôles (WT, *wild type*) et des souris mutantes PKR1<sup>-/-</sup> dans lesquelles PKR1, est totalement inactivé. Ces deux groupes de souris ont été nourris avec de la nourriture dite équilibrée contenant 5% de matières grasses (NFD, *normal fat diet*).

Au bout de 40 semaines, nous avons cherché à savoir si cette inactivation de PKR1 pouvait influencer le poids du tissu adipeux et donc la masse corporelle totale. L'augmentation de masse grasse peut se faire soit par hypertrophie des adipocytes, soit par hyperplasie du tissu adipeux qui nécessite la prolifération de préadipocytes puis leur différenciation en adipocytes matures. Nous avons donc observé le phénotype de la masse adipeuse grâce à des coupes semi-fines. Puis nous avons étudié la prolifération des préadipocytes par l'intermédiaire d'un coimmunomarquage dirigé contre la protéine Pref-1, spécifique des préadipocytes, et Ki67, un marqueur de la division cellulaire. Comme expliqué précédemment, la forme transmembranaire de Pref-1 est un excellent marqueur des préadipocytes. L'antigène Ki67 est présent uniquement dans les cellules activement impliquées dans la division cellulaire et est, par conséquent, un solide marqueur de la réplication cellulaire. Cette protéine est localisée dans le noyau lors des phases G1 et S/G2/M du cycle cellulaire mais n'est pas détectable dans les cellules quiescentes en G0 (Lalor *et al.*, 1987).

Au sein du laboratoire, nous avons montré une forte implication de la PK2 et de son récepteur PKR1 au niveau de l'angiogenèse. Nous avons voulu analyser les conséquences de l'inactivation de PKR1 sur la vascularisation du tissu adipeux issu des souris PKR1<sup>-/-</sup>. Nous avons alors étudié la vascularisation du tissu adipeux par un immunomarquage de la protéine PECAM-1, spécifiquement exprimée par les cellules endothéliales. De plus, la mitochondrie utilisant l'oxygène pour produire de l'énergie, nous avons vérifié l'activité respiratoire mitochondriale des adipocytes par une coloration qui permet de mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH) qui fait partie de la chaîne respiratoire. Cette coloration contient du succinate de sodium et du nitrobleu de tétrazolium. Le succinate de sodium est transformé par la SDH en fumarate avec une libération d'hydrogène. Ce dernier se combine au nitrobleu de tétrazolium qui devient bleu. Nous avons aussi mesuré l'expression du facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF-1 qui est exprimé en condition hypoxique.

L'augmentation de la masse corporelle est, en général, due à un déséquilibre de la balance énergétique. La variation de poids observée chez les souris mutantes pourrait être causée par une augmentation des apports caloriques et/ou à une diminution des dépenses énergétiques.

Nous avons tout d'abord mesuré la quantité de nourriture ingérée par les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup>. Comme l'apport énergétique provenant de la nourriture dépend, aussi, de l'absorption des graisses par l'intestin, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'absorption intestinale des lipides, d'une part en extrayant puis en quantifiant les lipides non digérés contenus dans les fèces et d'autre part en colorant l'intestin des souris à l'huile rouge afin de visualiser les lipides absorbés après gavage des souris avec de l'huile d'olives. Les dépenses énergétiques ont été mesurées grâce à l'étude de la thermogénèse induite par le froid.

L'obésité est un facteur de risque majeur du diabète de type 2, qui lui-même, est un facteur de risque aux affections cardiaques. Le diabète de type 2 se déclenche généralement à l'âge adulte, voire à un âge avancé, chez des individus généralement obèses. Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences de la prise de poids des souris PKR1<sup>-/-</sup> sur le métabolisme glucidique des souris âgées de 40 semaines. Le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperglycémie chronique, associé à une insulino-résistance et à une réduction plus ou moins élevée de l'insulino-sécrétion. Nous avons étudié la glycémie des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> grâce à un test de tolérance au glucose (GTT, *glucose tolerance test*) qui permet de contrôler la capacité d'un organisme à normaliser rapidement un épisode hyperglycémique. Un défaut de tolérance au glucose injecté intrapéritonéalement suggère un défaut au niveau de la sécrétion d'insuline et/ou de la sensibilité à l'insuline. Pour mesurer l'insulino-résistance, nous avons effectué un test de tolérance à l'insuline (ITT, *insulin tolerance test*). Il permet de voir l'étendue de l'hypoglycémie induite par l'injection d'insuline, qui représente un index de la sensibilité à l'insuline.

Le diabète de type 2 étant une pathologie qui se développe progressivement, et qui reste longtemps asymptomatique, nous avons suivi la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de nos souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> au cours du temps. Nous avons donc réitéré les tests GTT et ITT sur des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> âgées de 15 semaines.

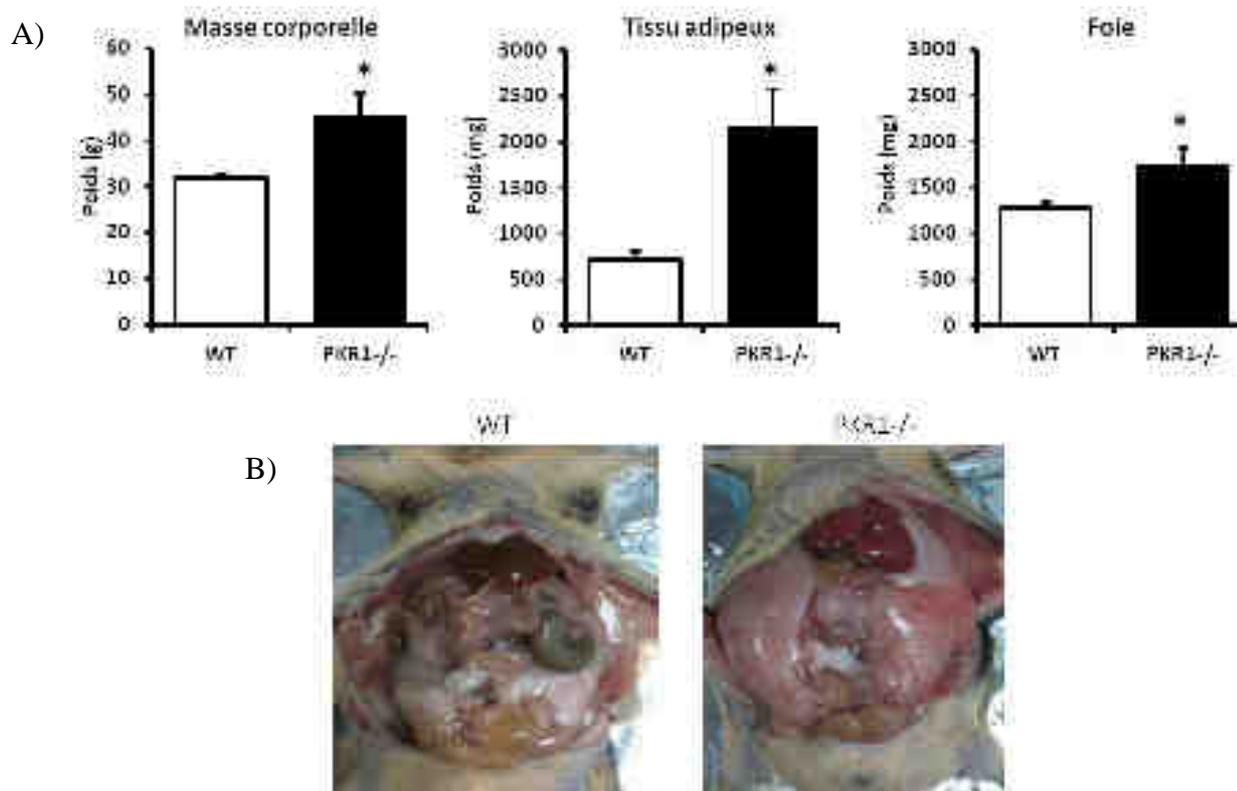
Dans la littérature, les souris nourries avec un régime alimentaire riche (60%) en matières grasses (HFD, *high fat diet*) sont souvent utilisées comme modèle animal de l'obésité et du diabète de type 2. Nous avons donc utilisé ce type d'alimentation pour nourrir les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> à partir de l'âge de 6 semaines. Puis nous avons étudié le phénotype métabolique de ces souris à l'âge de 40 et 15 semaines par des tests GTT et ITT.

## B. Résultats

### 1) Caractérisation du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup>

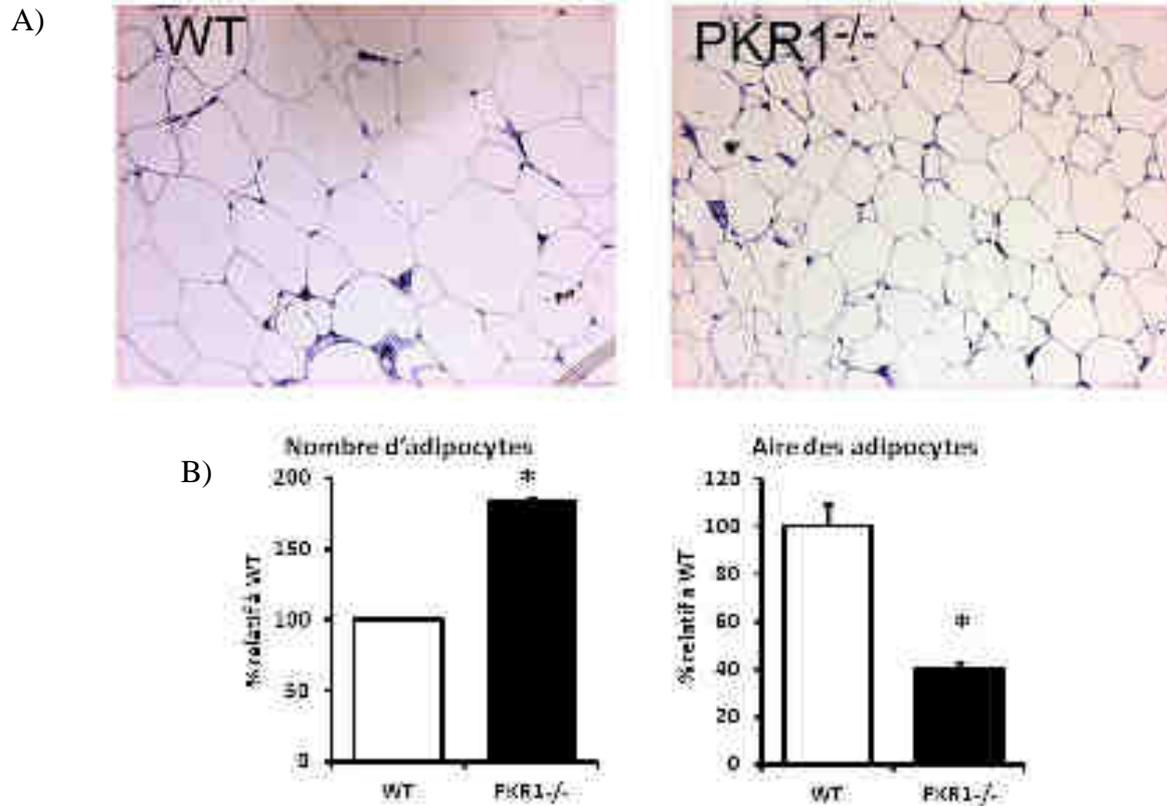
La première partie de notre étude porte sur l'analyse du phénotype du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> afin de déterminer l'impact de l'inactivation de PKR1 dans ce tissu.

A l'âge de 40 semaines, les souris PKR1<sup>-/-</sup> présentent une masse corporelle 40 % plus élevée que celle des souris WT ( $31,8 \pm 0,8$  g et  $45,5 \pm 4,5$  g pour WT et PKR1<sup>-/-</sup>, respectivement). Cette augmentation de poids est due, en grande partie, à une augmentation de la masse du tissu adipeux viscéral des souris PKR1<sup>-/-</sup>, puisque celle-ci est 3 fois supérieure à celle du tissu adipeux des souris WT (Figure 20 A). Cette différence est visible à l'œil nu sur des photos de l'abdomen des souris (Figure 20 B). Nous avons également constaté une augmentation de la masse du foie issu des souris PKR1<sup>-/-</sup> comparé au foie des souris WT (Figure 20 A).



**Figure 20 : Masse corporelle et poids des organes des souris PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Histogrammes de la masse corporelle (en g) (à gauche), du poids du tissu adipeux (en mg) (au milieu) et du foie (en mg) (à droite) des souris WT (barre blanche) et PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). (\* :  $p < 0,05$  entre WT et PKR1<sup>-/-</sup>). B) Photos de l'abdomen des souris WT (à gauche) et PKR1<sup>-/-</sup> (à droite) permettant de voir les masses de tissus adipeux périgonadiques.

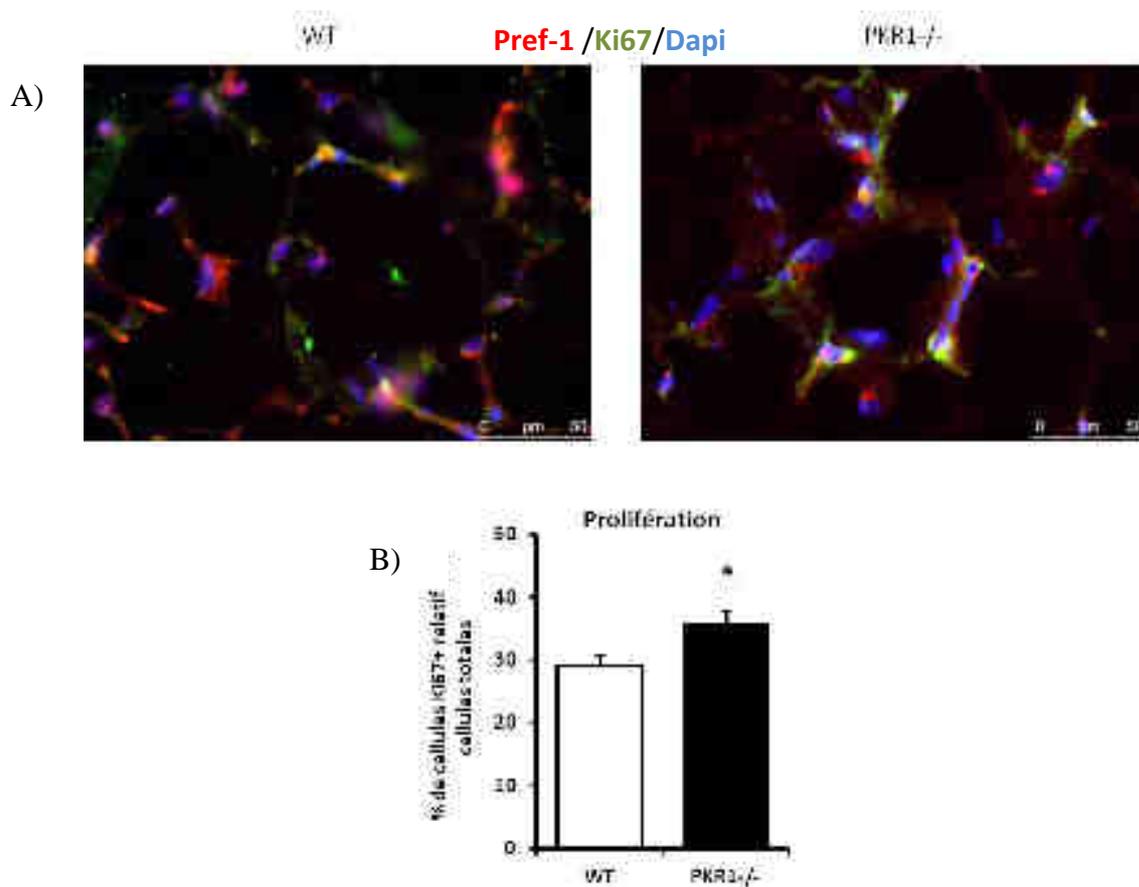


**Figure 21 : Hyperplasie du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Coupes semi-fines des tissus adipeux observées à un grossissement X20 qui permet de voir l'hyperplasie du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> (à droite) comparée à celui des souris WT (à gauche). B) Histogrammes représentant le nombre d'adipocytes (à gauche) et l'aire des adipocytes (à droite) présents au sein des masses adipeuses des souris WT (barre blanche) et PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). Résultats exprimés en % par rapport au WT, WT correspondant à 100%. (\* :  $p < 0,05$  entre WT et PKR1<sup>-/-</sup>).

Etant donné la forte augmentation de masse adipeuse, nous nous sommes intéressés à la morphologie du tissu adipeux viscéral des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> afin de savoir si cette augmentation de masse grasse était due à une augmentation du nombre d'adipocytes ou à une augmentation de la taille des adipocytes. Les coupes semi-fines des tissus adipeux nous révèlent que les souris PKR1<sup>-/-</sup> présentent une obésité hyperplasique (Figure 21 A). En effet, nous observons que le nombre d'adipocytes double au sein du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> et que leur superficie diminue de 60% (Figure 21 B).

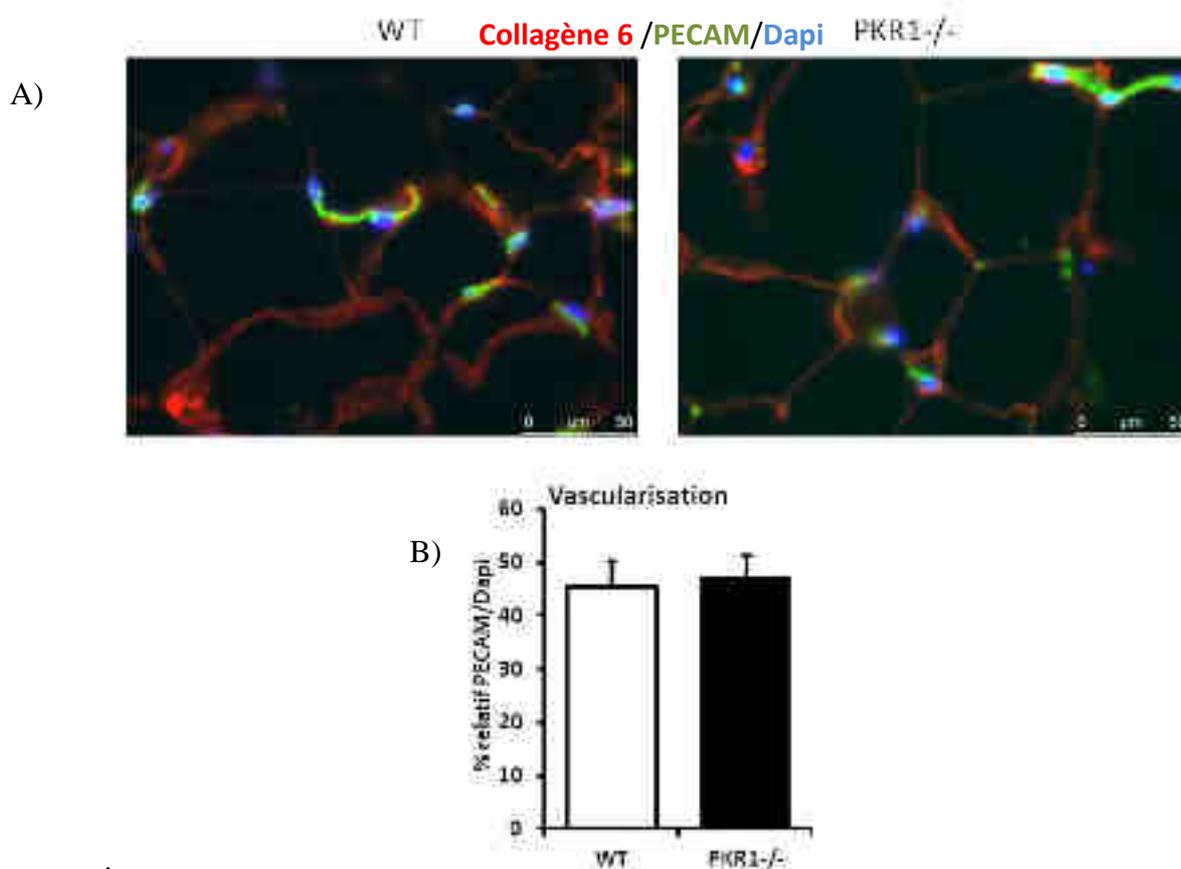
L'hyperplasie du tissu adipeux provenant de la prolifération puis de la différenciation des préadipocytes, nous avons quantifié la prolifération des préadipocytes au sein des tissus adipeux des souris WT et  $PKR1^{-/-}$  par un coimmunomarquage dirigé contre les protéines Pref-1 et Ki67. Sur nos coupes de tissus adipeux issus des souris WT et  $PKR1^{-/-}$ , nous observons une colocalisation de Ki67 avec Pref-1, confirmant la prolifération des préadipocytes (Figure 22 A). De plus, la quantification des immunomarquages montre une augmentation significative du nombre de préadipocytes engagés dans la division cellulaire au sein du tissu adipeux des souris  $PKR1^{-/-}$  comparé au tissu adipeux issus des souris WT (Figure 22 B).



**Figure 22 : Prolifération des préadipocytes dans le tissu adipeux des souris  $PKR1^{-/-}$ .**

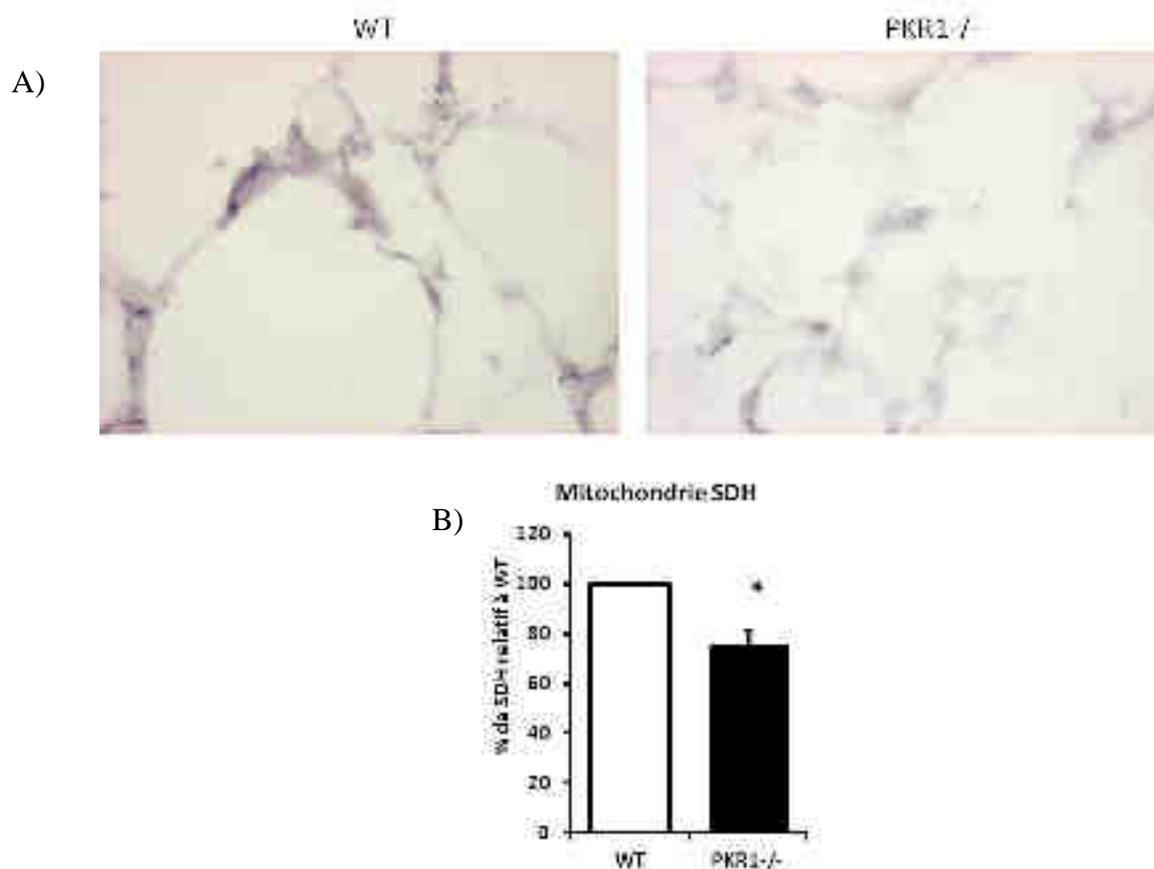
A) Représentation de la prolifération des préadipocytes dans les tissus adipeux des souris WT (à gauche) et  $PKR1^{-/-}$  (à droite), visualisée par un coimmunomarquage dirigé contre Pref-1 (rouge) et Ki67 (vert). Les noyaux sont marqués avec du Dapi (bleu). Les photos ont été prises à un grossissement X40. B) Quantification du nombre de cellules marquées pour Pref-1 et Ki67, exprimé en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi. (\* : p<0,05 entre WT et  $PKR1^{-/-}$ ).

Le tissu adipeux est un organe richement vascularisé. La prokinéticine jouant un rôle important dans l'angiogenèse, nous avons contrôlé la vascularisation des tissus adipeux WT et  $PKR1^{-/-}$  par immunomarquage de la protéine PECAM-1 (Figure 23 A). Nous observons que le nombre de capillaires dans le tissu adipeux  $PKR1^{-/-}$  est identique à celui qu'on observe dans le tissu adipeux WT malgré l'augmentation du nombre d'adipocytes dans la masse adipeuse  $PKR1^{-/-}$  (Figure 23 B).



**Figure 23 : Vascularisation du tissu adipeux des souris  $PKR1^{-/-}$ .**

A) Représentation du réseau vasculaire dans les tissus adipeux des souris WT (à gauche) et  $PKR1^{-/-}$  (à droite), visualisée par un coimmunomarquage dirigé contre le collagène (rouge) pour visualiser les contours des adipocytes et PECAM-1 (vert) afin de marquer les cellules endothéliales. Les noyaux sont marqués avec du Dapi (bleu). Les photos ont été prises à un grossissement X40. B) Quantification du nombre de cellules marquées pour PECAM-1 dans les tissus adipeux des souris WT (barre blanche) et  $PKR1^{-/-}$  (barre noire). Les résultats sont exprimés en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi.

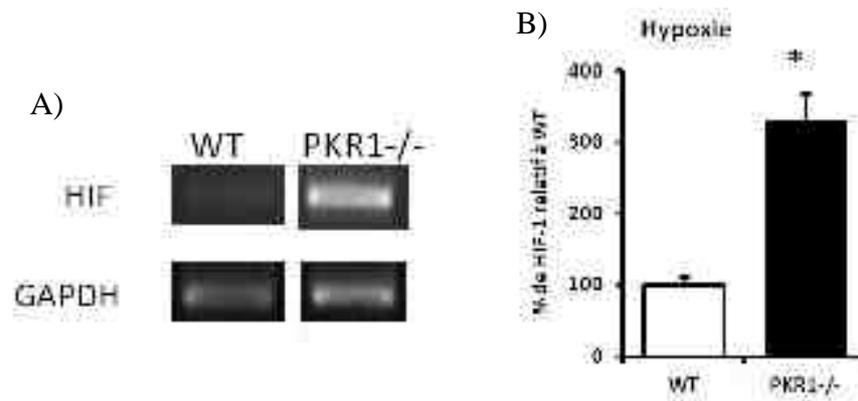


**Figure 24 : Activité mitochondriale des adipocytes du tissu adipeux PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Représentation de l'activité de la SDH des mitochondries dans les tissus adipeux des souris WT (à gauche) et PKR1<sup>-/-</sup> (à droite), visualisée par la coloration bleue de son activité enzymatique. Les photos ont été prises à un grossissement X40. B) Quantification du marquage de la SDH dans le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire), exprimée en % par rapport au WT (barre blanche), WT correspondant à 100%. (\* : p<0,05 entre WT et PKR1<sup>-/-</sup>).

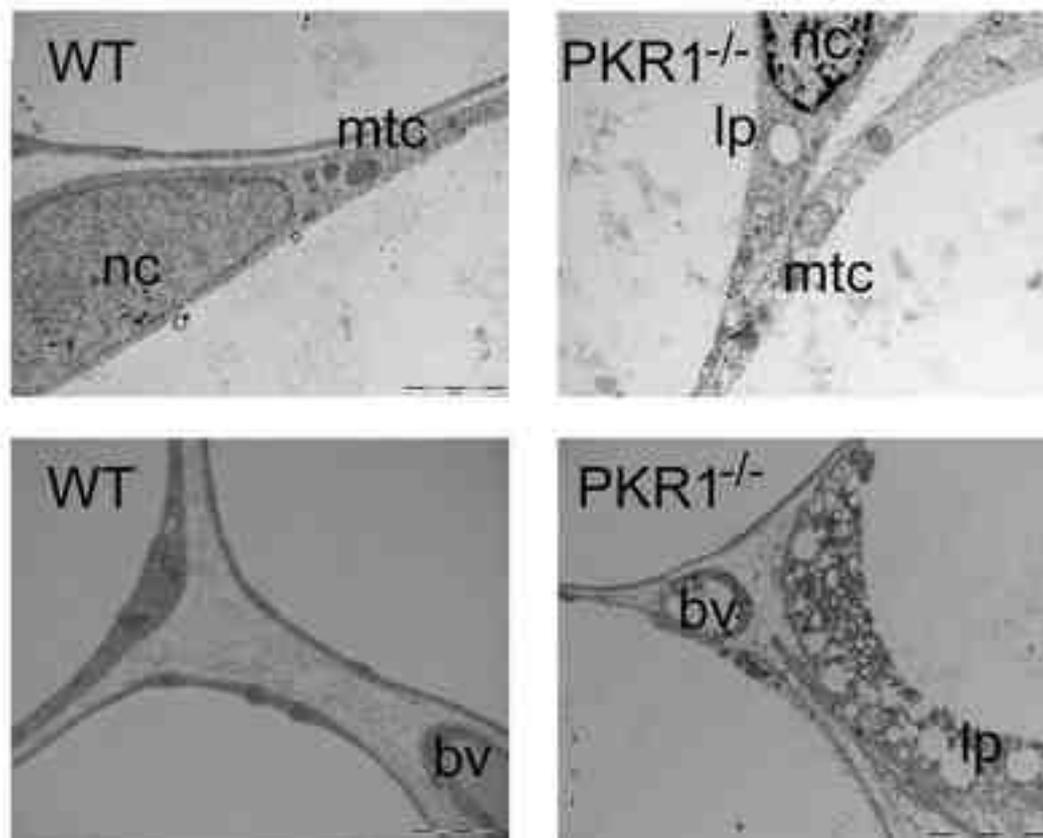
Pour vérifier la respiration des mitochondries des adipocytes, les coupes de tissus adipeux issus des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> ont été colorées pour mesurer l'activité de la SDH (Figure 24 A). Le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> présente une coloration SDH 25% moins intense que celle du tissu adipeux des souris WT, témoignant de la plus faible activité respiratoire des mitochondries des adipocytes issus des souris PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 24 B).

Un défaut d'angiogenèse est souvent corrélé au développement de conditions hypoxiques qui entraînent l'expression du facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF-1. Nous avons donc mesuré, par PCR semi-quantitative, le niveau d'expression de ce facteur hypoxique au sein des tissus adipeux (Figure 25 A). Le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> présente une forte augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  comparé au tissu adipeux des souris WT, ce qui indique le développement d'un état hypoxique (Figure 25 B).



**Figure 25 : Expression du facteur HIF-1 au sein du tissu adipeux  $PKR1^{-/-}$ .**

A) Mesure de l'expression de GAPDH et de HIF-1 $\alpha$  dans les tissus adipeux WT et  $PKR1^{-/-}$  par PCR semi-quantitative.  
 B) Quantification de l'expression de HIF-1 $\alpha$  par rapport à l'expression de GAPDH. Les résultats pour les souris  $PKR1^{-/-}$  (barre noire) sont exprimés en %, sachant que WT (barre blanche) correspond à 100% d'expression (\* :  $p < 0,05$  entre WT et  $PKR1^{-/-}$ ).



**Figure 26 : Adipocytes nécrotiques du tissu adipeux  $PKR1^{-/-}$ .**

Représentation de l'ultrastructure des adipocytes issus des tissus adipeux WT (à gauche) et  $PKR1^{-/-}$  (à droite), analysée par microscopie électronique. Les adipocytes des souris  $PKR1^{-/-}$  présentent un noyau nécrotique, des mitochondries dilatées et une accumulation de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. nc : noyau, mtc : mitochondrie, bv : capillaire sanguin, lp : gouttelette lipidique.

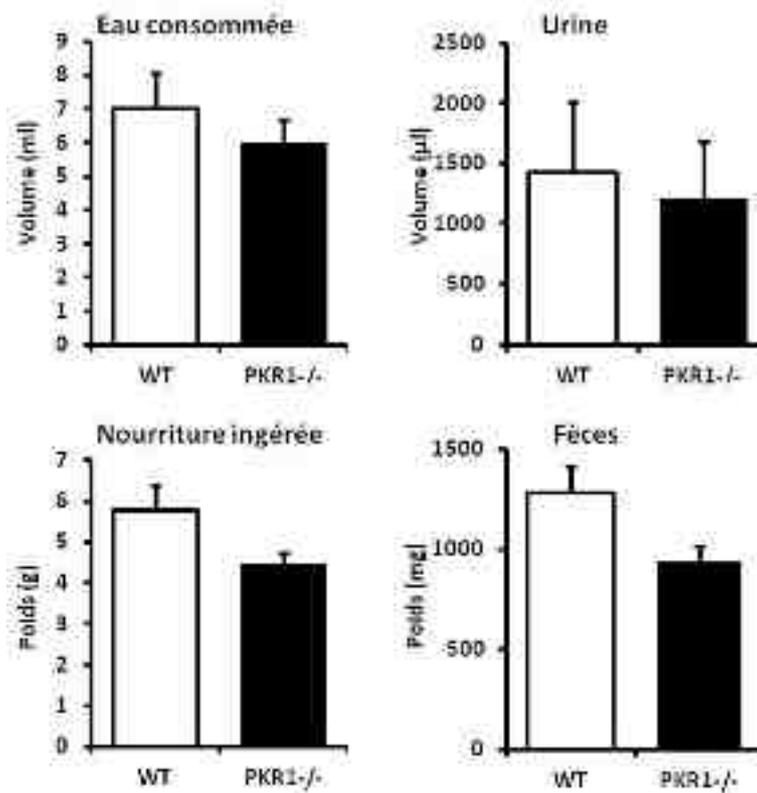
Nous avons voulu connaître les conséquences du défaut d'angiogenèse et de l'hypoxie au niveau des adipocytes issus des souris  $PKR1^{-/-}$ . L'ultrastructure de ces adipocytes montre qu'ils présentent des caractéristiques nécrotiques telles que la rupture de la membrane basale et une dégénération des organelles. La présence de mitochondries dilatées à crêtes désorganisées est accompagnée par la présence de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Figure 26).

L'ensemble de ces résultats montrent donc que l'absence de  $PKR1$  dans les souris mutantes conduit à une obésité hyperplasique due à la prolifération des préadipocytes. L'angiogenèse qui permettrait d'assurer une vascularisation correcte du tissu n'est pas assurée, ce qui crée un état hypoxique au sein du tissu adipeux. Cette hypoxie entraîne la nécrose d'une partie des adipocytes.

## 2) Etude de la balance énergétique des souris $PKR1^{-/-}$

Etant donnée l'augmentation très significative de tissu adipeux issu des souris  $PKR1^{-/-}$ , nous avons analysé la balance énergétique de ces souris en mesurant l'apport énergétique de la nourriture puis les dépenses énergétiques par thermogénèse adaptative.

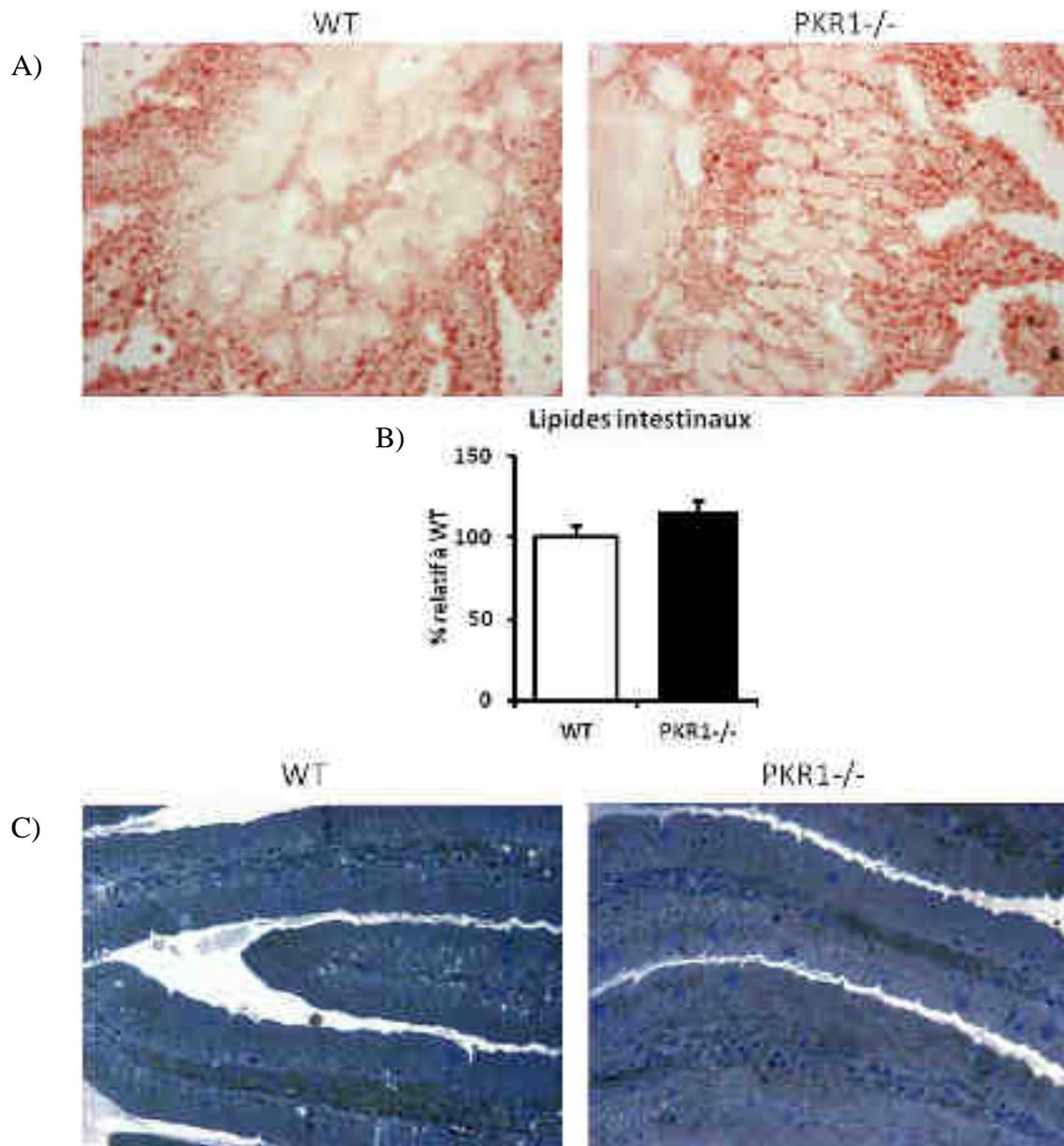
Les souris WT et  $PKR1^{-/-}$  ont été placées individuellement dans des cages métaboliques qui permettent de mesurer les quantités de nourriture et d'eau ingérées par jour, ainsi que de recueillir et de quantifier l'excrétion d'urine et de fèces des souris. Les données collectées montrent que les souris  $PKR1^{-/-}$  boivent la même quantité d'eau que les souris WT et excrètent la même quantité d'urine. La quantité de nourriture ingérée par les souris  $PKR1^{-/-}$  est légèrement inférieure à celle des souris WT et la quantité de fèces excrétée par les souris  $PKR1^{-/-}$  est, par conséquent, légèrement inférieure à celle des souris WT (Figure 27).



**Figure 27 : Etude en cage métabolique des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup>.**

Histogrammes représentant la différence de quantité d'eau consommée (ml) (en haut à gauche), d'urine excrétée (µl) (en haut à droite), de nourriture ingérée (g) (en bas à gauche) et de fèces excrétés (mg) (en bas à droite), entre les souris WT (barre blanche) et les souris PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire).

Ces résultats laissent penser que l'obésité des souris PKR1<sup>-/-</sup> ne provient pas d'un excès d'apport calorique. Toutefois, l'apport énergétique provenant de la nourriture dépend, aussi, de la capacité de l'intestin à absorber les lipides alimentaires.

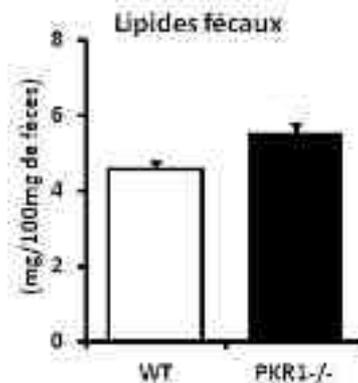


**Figure 28 : Absorption des lipides par l'intestin des souris PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Représentation des lipides absorbés au niveau du jéjunum des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> après gavage, visualisés grâce à la coloration à l'huile rouge et observés au microscope optique à un grossissement X20. B) Quantification des lipides absorbés par le jéjunum PKR1 (barre noire) exprimée en % par rapport à 100% des lipides absorbés par le jéjunum WT (barre blanche). C) Coupe semi-fines des jéjunums des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> après gavage, afin de visualiser les lipides absorbés.

Les coupes de jéjunums issus des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> après gavage avec de l'huile ont été colorées à l'huile rouge afin de visualiser les lipides absorbés. Nous observons une grande quantité de lipides dans les intestins WT et PKR1<sup>-/-</sup>, que ce soit au niveau des entérocytes ou du chorion, mais aucune différence significative n'est visible entre les deux groupes (Figure 28 A et B). Des coupes semi-fines de jéjunums confirment ce résultat (Figure 28 C).

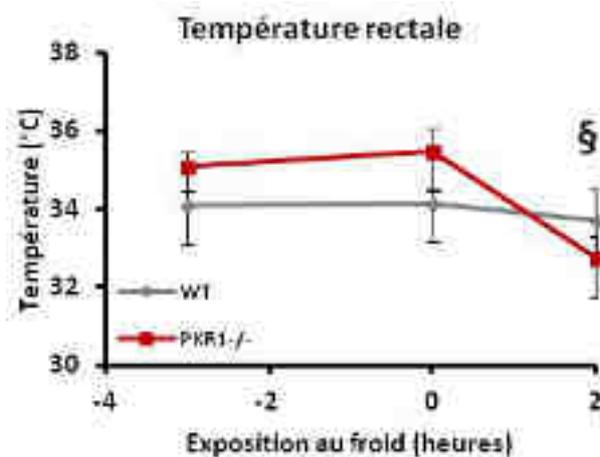
Les lipides, qui n'ont pas été absorbés par l'intestin, se retrouvent dans les fèces. L'utilisation des cages métaboliques nous a permis de récolter les fèces des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> nourries avec de l'alimentation équilibrée. Les lipides ont alors été extraits des fèces puis quantifiés. La quantification des lipides fécaux ne montre aucune différence significative de la quantité de lipides contenus dans les fèces des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 29).



**Figure 29 : Lipides contenus dans les fèces des souris PKR1<sup>-/-</sup>.**

Différence de quantité de lipides extrait des fèces entre les souris WT (barre blanche) et PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). Les résultats sont exprimés en mg de lipides/100 mg de fèces.

La dépense énergétique est en partie due à la thermogenèse adaptative. Nous avons alors étudié la thermogenèse induite par le froid en mesurant la température rectale des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> après 2h passée dans un environnement à 4°C. Exposées au froid, la température corporelle des souris WT ne change pas, tandis que celle des souris PKR1<sup>-/-</sup> diminue, mais nous n'observons pas de différence de température entre les deux groupes de souris (Figure 30).



**Figure 30 : Effet de l'inactivation de PKR1 sur la thermogenèse induite par le froid.**

Comparaison de la température rectale en °C des souris WT (courbe grise) et PKR1<sup>-/-</sup> (courbe rouge) mesurée 3h avant l'exposition au froid, juste avant (t=0) et 2h après. (§ : p<0,05 entre PKR1<sup>-/-</sup> à t=0 et à t=2h).

Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de poids observée chez les souris  $PKR1^{-/-}$  ne provient pas d'un déséquilibre de la balance énergétique.

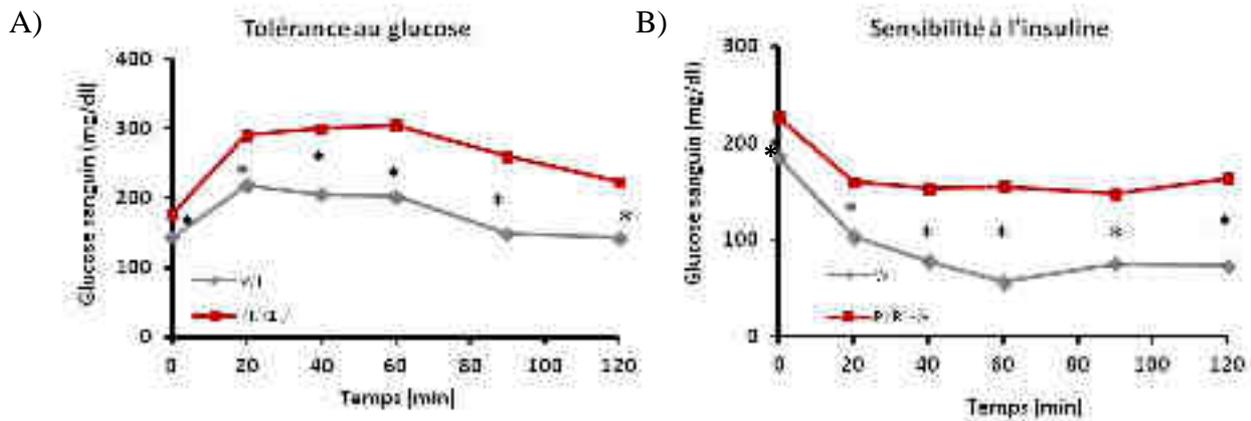
### 3) Etude des conséquences métaboliques de l'obésité des souris $PKR1^{-/-}$

Le diabète de type 2 se déclenche généralement à l'âge adulte, voire à un âge avancé, chez des individus généralement obèses. Les souris  $PKR1^{-/-}$  étant caractérisées par une obésité, nous nous sommes alors intéressés aux conséquences de ce surpoids sur le métabolisme glucidique des souris WT et  $PKR1^{-/-}$ . Nous avons suivi le développement de l'intolérance au glucose chez les souris  $PKR1^{-/-}$  au cours du temps, à l'âge de 40, 30 et 15 semaines.

De plus, dans la littérature, les souris nourries avec un régime alimentaire riche en matières grasses (HFD) sont souvent utilisées comme modèle animal de l'obésité et du diabète de type 2. Nous avons donc utilisé ce type d'alimentation sur nos souris WT et  $PKR1^{-/-}$  afin d'en étudier le phénotype métabolique.

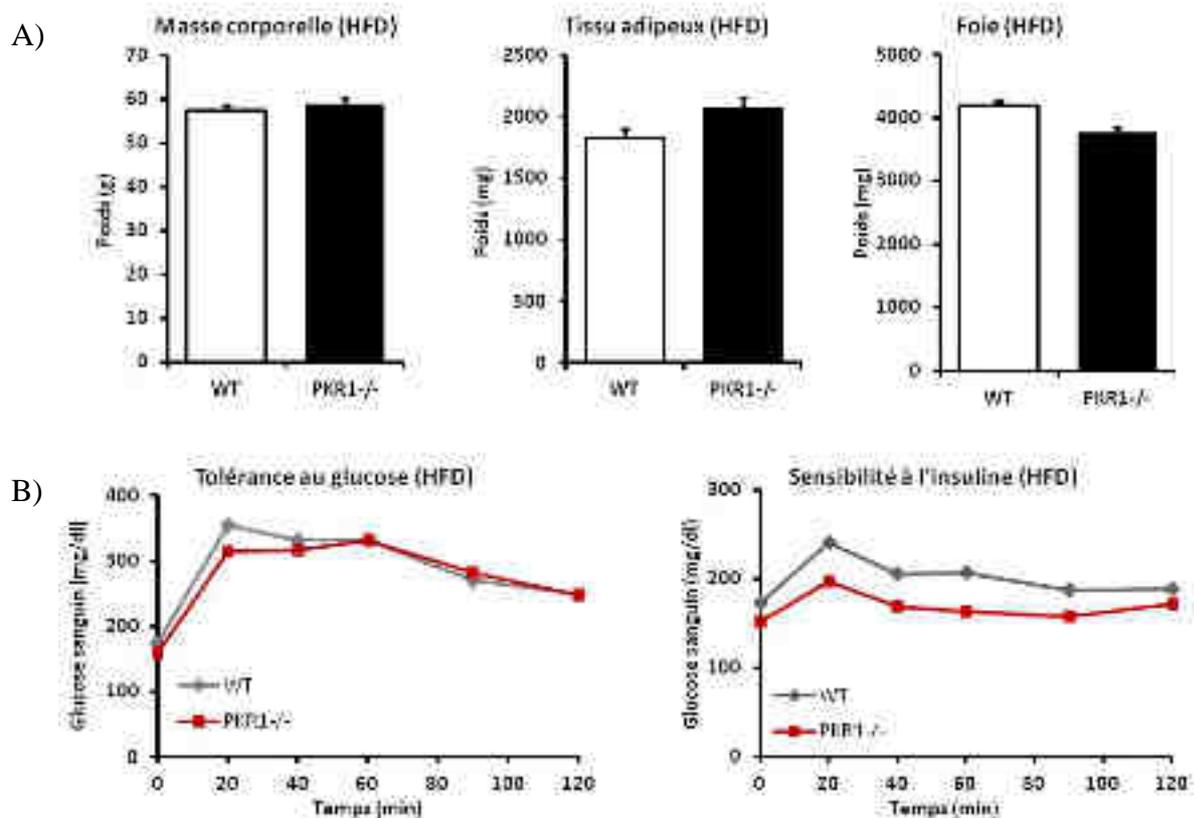
#### *a) Etude à l'âge de 40 semaines*

A l'âge de 40 semaines, les souris WT et  $PKR1^{-/-}$ , nourries avec une nourriture équilibrée (NFD), ont subi un test de tolérance au glucose. Le test GTT révèle que les souris  $PKR1^{-/-}$  présentent une glycémie basale (à temps 0) supérieure à celle des souris WT. Après injection de glucose, les souris  $PKR1^{-/-}$  montrent une certaine incapacité à normaliser le taux de glucose sanguin induit par l'hyperglycémie, comparé aux souris WT (Figure 31 A). Pour confirmer ce défaut de tolérance au glucose, nous avons effectué un test de tolérance à l'insuline. L'hypoglycémie induite par l'injection d'insuline est significativement moins importante chez les souris  $PKR1^{-/-}$  que chez les souris WT (Figure 31 B). Ces résultats suggèrent donc que les souris  $PKR1^{-/-}$  présentent une intolérance au glucose due à une insensibilité à l'insuline.



**Figure 31 : Métabolisme des souris PKR1<sup>-/-</sup> à 40 semaines.**

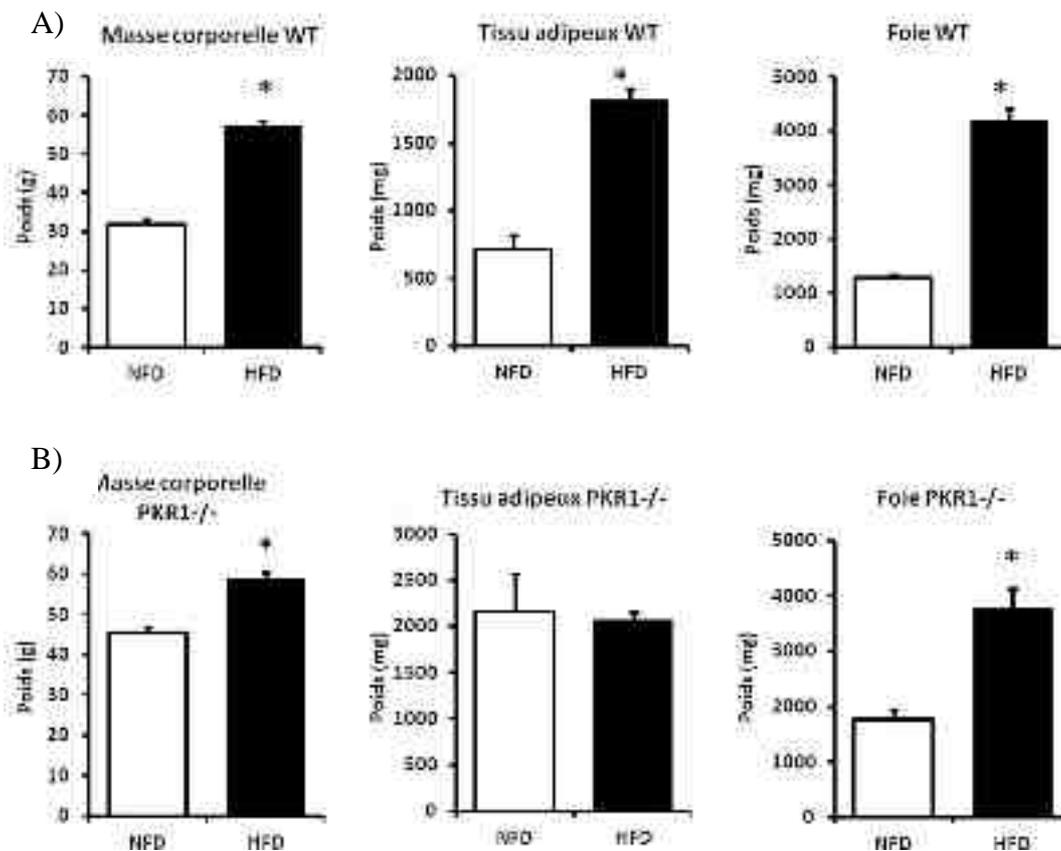
A) Graphique représentant la glycémie des souris WT (courbe grise) et PKR1<sup>-/-</sup> (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de 1 mg de glucose par g de souris. Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang. (\* : p<0,05 entre WT et PKR1<sup>-/-</sup>). B) Graphique représentant la glycémie des souris WT (courbe grise) et PKR1<sup>-/-</sup> (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de 0,75 mU d'insuline par g de souris. Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang. (\* : p<0,05 entre WT et PKR1<sup>-/-</sup>).



**Figure 32 : Effet de la nourriture HFD sur le poids et le métabolisme des souris PKR1<sup>-/-</sup> à 40 semaines.**

A) Histogrammes de la masse corporelle (en g) (à gauche), du poids du tissu adipeux (en mg) (au milieu) et du foie (en mg) (à droite) des souris WT (barre blanche) et PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire) à 40 semaines après 34 semaines de traitement avec de la nourriture HFD. B) Graphiques représentant la glycémie des souris WT (courbe grise) et PKR1<sup>-/-</sup> (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de glucose (à gauche) ou d'insuline (à droite). Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang.

Les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> ont été nourries avec une alimentation HFD à partir de l'âge de 6 semaines. A l'âge de 40 semaines, la masse corporelle des souris WT s'avère être identique à celle des souris PKR1<sup>-/-</sup>, car les poids du tissu adipeux et du foie WT ont un poids similaire à ceux des souris PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 32 A). Un test GTT nous apprend que le profil de clairance métabolique du glucose sanguin des souris WT mime celui des souris PKR1<sup>-/-</sup> puisque les deux lignées de souris présente des taux de glucose sanguin identique au cours du temps. Le test ITT montre que l'injection d'insuline ne provoque pas d'hypoglycémie chez les souris WT, qui présentent la même sensibilité à l'insuline que les souris PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 32 B).



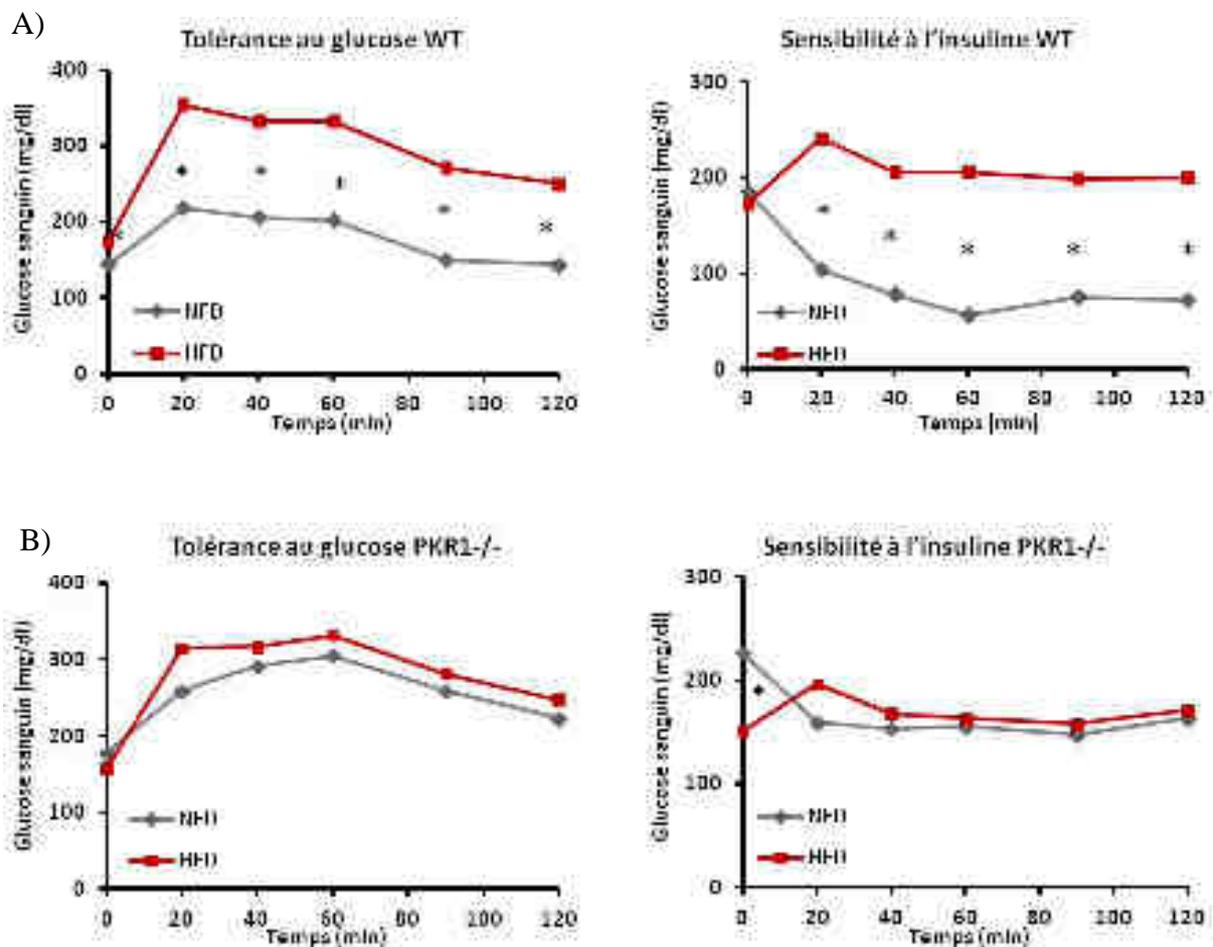
**Figure 33 : Poids des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> en fonction de la nourriture à 40 semaines.**

A) Comparaison de la masse corporelle (en g) (à gauche), du poids du tissu adipeux (en mg) (au milieu) et du foie (en mg) (à droite) des souris WT (en haut) nourries avec de la nourriture équilibrée NFD (barre blanche) ou avec de la nourriture grasse HFD (barre noire). (\* : p<0,05 entre NFD et HFD). B) Comparaison de la masse corporelle (en g) (à gauche), du poids du tissu adipeux (en mg) (au milieu) et du foie (en mg) (à droite) des souris PKR1<sup>-/-</sup> (en bas) nourries avec de la nourriture NFD (barre blanche) ou avec de la nourriture HFD (barre noire). (\* : p<0,05 entre NFD et HFD).

Ces résultats montrent que l'apport de matières grasses dans la nourriture masque les différences entre les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> observées avec une nourriture NFD, du fait d'une augmentation massive de la masse grasse des souris WT. En effet, en présence de nourriture HFD,

la masse corporelle des souris WT augmente fortement alors que chez les souris  $PKR1^{-/-}$  cette augmentation est moins importante. Les masses du tissu adipeux et de foie issus des souris WT augmentent considérablement après traitement avec la nourriture HFD (Figure 33 A). Chez les souris  $PKR1^{-/-}$ , cette augmentation est moins marquée, puisque la masse corporelle augmente légèrement du fait de l'élévation du poids du foie. Par contre, la masse du tissu adipeux ne change pas (Figure 33 B).

Au niveau métabolique, l'apport de fort taux de matière grasse chez les souris WT conduit à une incapacité à normaliser le taux de glucose sanguin induit par l'hyperglycémie et à une insensibilité à l'injection d'insuline comme le révèle les tests GTT et ITT (Figure 34 A). Chez les souris  $PKR1^{-/-}$ , la nourriture HFD ne provoque pas de changement significatif au niveau de la sensibilité à l'insuline ou de la tolérance au glucose (Figure 34 B).



**Figure 34 : Métabolisme des souris WT et  $PKR1^{-/-}$  en fonction de la nourriture à 40 semaines.**

A) Comparaison de la glycémie des souris WT nourries avec de la nourriture NFD (courbe grise) ou avec de la nourriture HFD (courbe rouge) après injection de glucose (graphique de gauche) ou injection d'insuline (graphique de droite). (\* :  $p < 0,05$  entre NFD et HFD). B) Comparaison de la glycémie des souris  $PKR1^{-/-}$  nourries avec de la nourriture NFD (courbe grise) ou avec de la nourriture HFD (courbe rouge) après injection de glucose (graphique de gauche) ou injection d'insuline (graphique de droite). (\* :  $p < 0,05$  entre NFD et HFD).

b) Etude à l'âge de 15 semaines

A la vue de nos résultats à l'âge de 40 semaines, nous avons voulu savoir si les souris  $PKR1^{-/-}$  présentent déjà des troubles métaboliques à l'âge de 15 semaines.

Lors d'un apport calorique équilibré, les souris  $PKR1^{-/-}$  âgées de 15 semaines présentent une masse corporelle plus élevée que celle des souris WT (Figure 35 A).

Le test GTT montre une normalisation de la glycémie correcte chez les souris WT, tandis que les souris  $PKR1^{-/-}$  semble avoir des difficultés à normaliser l'épisode hyperglycémique car le profil glycémique change légèrement. Lors du test ITT, les souris  $PKR1^{-/-}$  présentent une glycémie supérieure à celle des souris WT en réponse à l'injection d'insuline (Figure 35 B). Ces résultats révèlent un changement de la tolérance au glucose chez les souris  $PKR1^{-/-}$  dû à une légère insensibilité de ces souris à l'insuline.

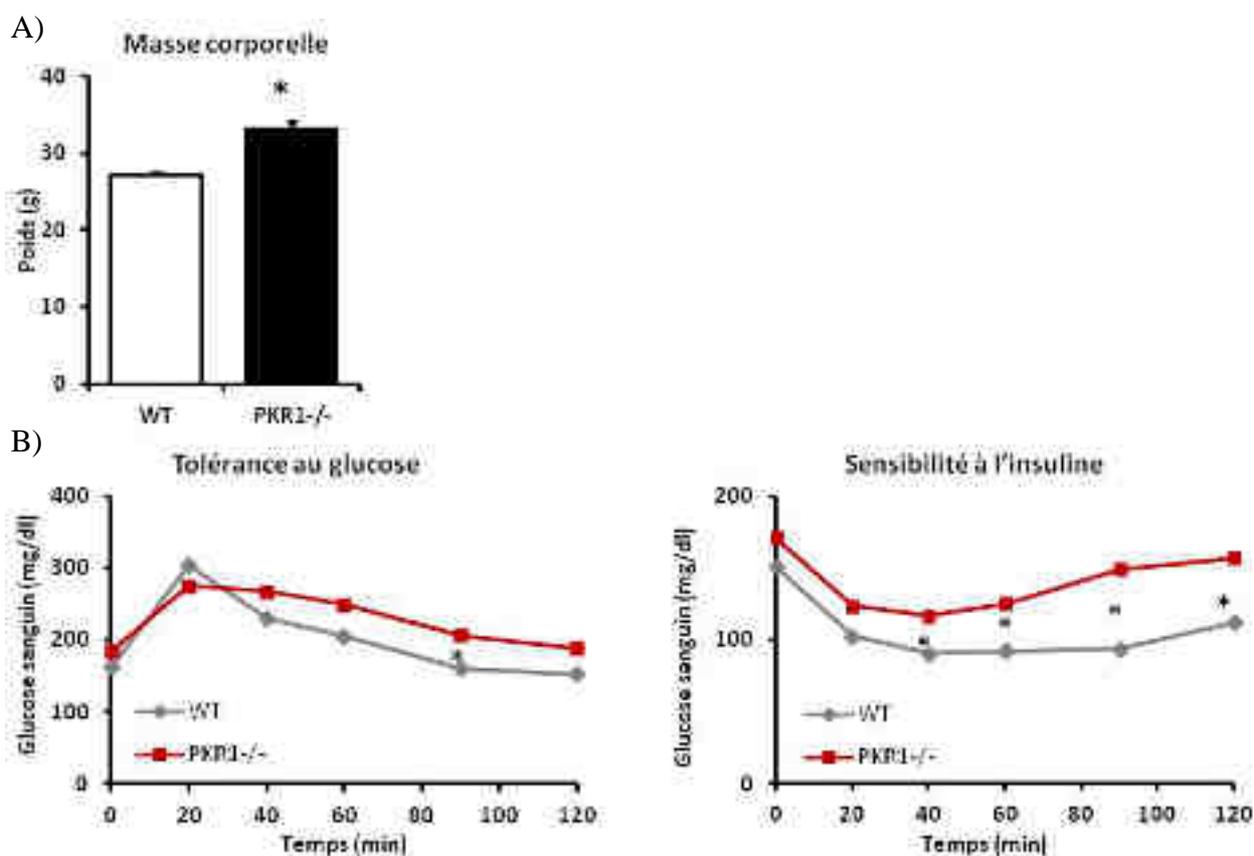
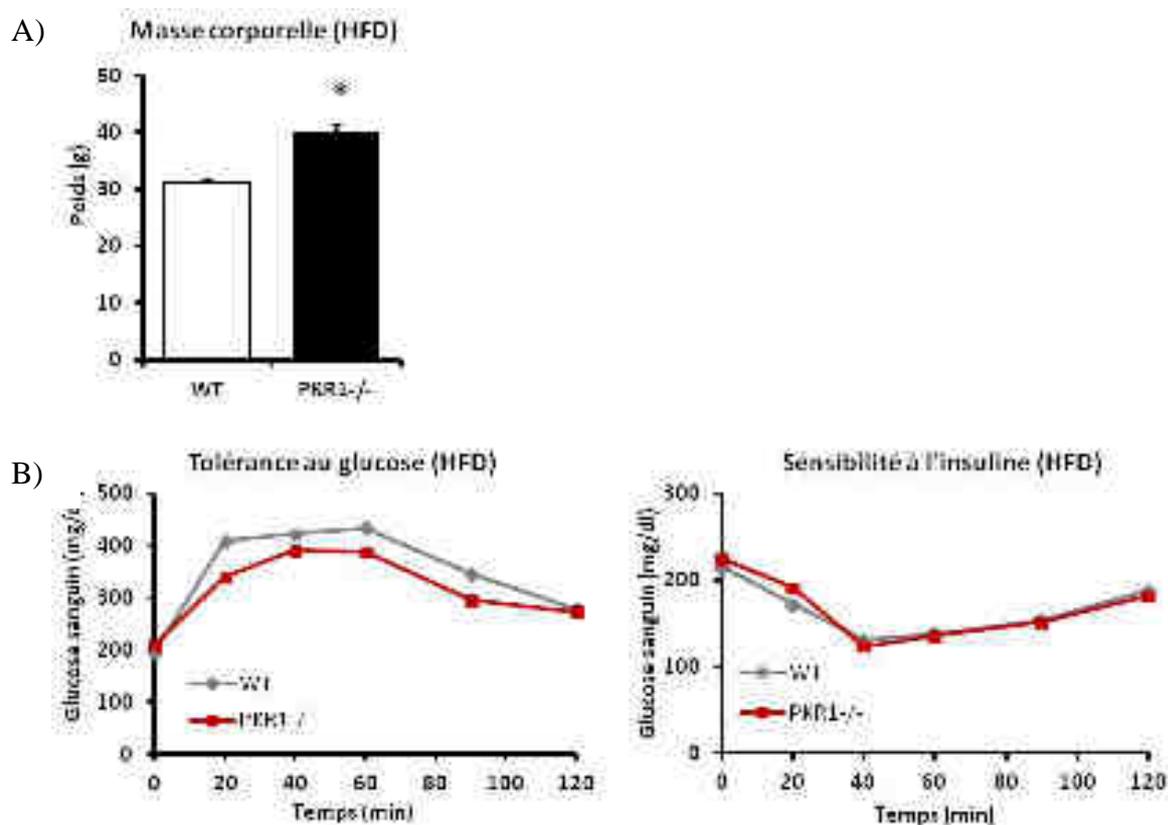


Figure 35 : Poids et métabolisme des souris  $PKR1^{-/-}$  à 15 semaines.

A) Histogramme représentant la masse corporelle (en g) des souris WT (barre blanche) et  $PKR1^{-/-}$  (barre noire) à 15 semaines. (\* :  $p < 0,05$  entre WT et  $PKR1^{-/-}$ ). B) Graphiques représentant la glycémie des souris WT (courbe grise) et  $PKR1^{-/-}$  (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de glucose (à gauche) ou d'insuline (à droite). Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang. (\* :  $p < 0,05$  entre WT et  $PKR1^{-/-}$ ).

Lorsque les apports alimentaires sont enrichis en matière grasse, nous observons encore une augmentation significative du poids du corps des souris  $PKR1^{-/-}$  comparé aux WT (Figure 36 A).

Les tests GTT et ITT ne révèlent aucune différence de glycémie entre les deux groupes de souris, que ce soit après l'injection de glucose ou après l'injection d'insuline (Figure 36 B).



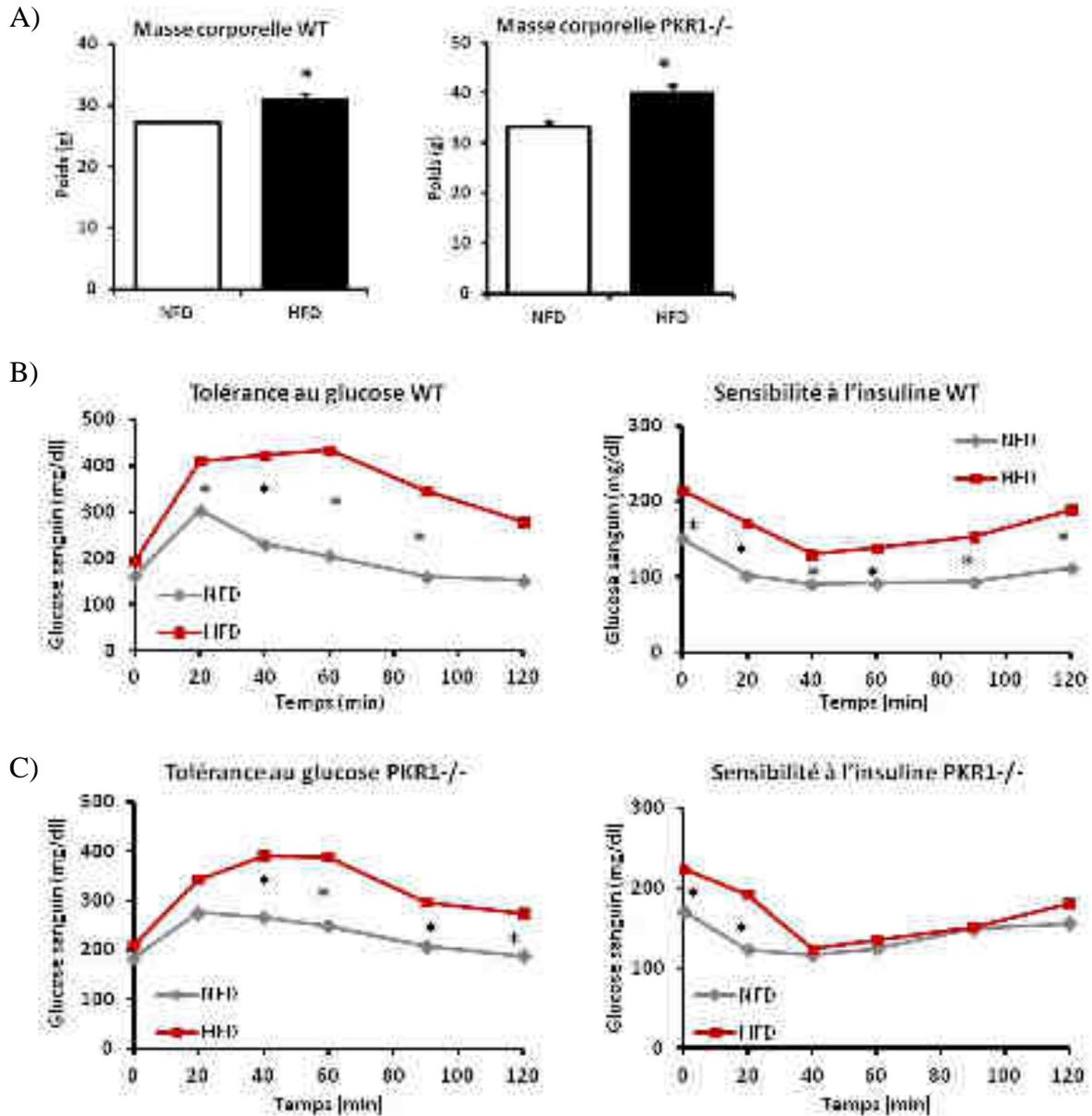
**Figure 36 : Effet de la nourriture HFD sur le poids et le métabolisme des souris  $PKR1^{-/-}$  à 15 semaines.**

A) Histogramme représentant la masse corporelle (en g) des souris WT (barre blanche) et  $PKR1^{-/-}$  (barre noire) à 15 semaines après 9 semaines de traitement avec de la nourriture HFD. (\* :  $p < 0,05$  entre WT et  $PKR1^{-/-}$ ). B) Graphiques représentant la glycémie des souris WT (courbe grise) et  $PKR1^{-/-}$  (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de glucose (à gauche) ou d'insuline (à droite). Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang.

La comparaison du poids des souris en fonction de la nourriture NFD et HFD montre que la nourriture HFD induit une augmentation de masse chez les deux lignées de souris (Figure 37 A).

La nourriture HFD n'entraîne pas les mêmes changements métaboliques entre les souris WT et  $PKR1^{-/-}$ . Le test GTT des souris WT nourries avec une nourriture NFD comparé avec celui nourries avec un régime HFD montre une augmentation de la glycémie après l'injection de glucose. Cette différence est due à une plus grande insensibilité à l'insuline. L'augmentation de la glycémie avant l'injection d'insuline, que montre l'ITT, suggère que la nourriture HFD pourrait induire une hyperglycémie à jeun (Figure 37 B). Ces différences de résultats entre NFD et HFD sont moins

marquées chez les souris  $PKR1^{-/-}$ . La nourriture HFD accentue le léger défaut de clairance du glucose, suggérant, à présent, une intolérance au glucose. Cette nourriture n'aggrave pas beaucoup l'insensibilité à l'insuline de ces souris, qui ne présentent qu'une légère augmentation de leur insulino-résistance 20 min après l'injection d'insuline (Figure 37 C).



**Figure 37 : Métabolisme des souris WT et  $PKR1^{-/-}$  en fonction de la nourriture à 15 semaines.**

A) Comparaison de la masse corporelle (en g) des souris WT (à gauche) et  $PKR1^{-/-}$  (à droite) nourries avec de la nourriture équilibrée NFD (barre blanche) ou avec de la nourriture grasse HFD (barre noire). (\* :  $p < 0,05$  entre NFD et HFD). B) Comparaison de la glycémie des souris WT nourries avec de la nourriture NFD (courbe grise) ou avec de la nourriture HFD (courbe rouge) après injection de glucose (graphique de gauche) ou injection d'insuline (graphique de droite). (\* :  $p < 0,05$  entre NFD et HFD). C) Comparaison de la glycémie des souris  $PKR1^{-/-}$  nourries avec de la nourriture NFD (courbe grise) ou avec de la nourriture HFD (courbe rouge) après injection de glucose (à gauche) ou injection d'insuline (à droite). (\* :  $p < 0,05$  entre NFD et HFD).

## II. Caractérisation des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>

### A. Introduction

Dans les souris PKR1<sup>-/-</sup>, le récepteur PKR1 est inactivé dans le corps entier. Nous avons pu observer un effet de cette inactivation au sein du tissu adipeux. Les souris deviennent obèses du fait d'une hyperplasie du tissu adipeux. Mais un défaut de la vascularisation des adipocytes conduit à une hypoxie et à l'apparition d'adipocytes nécrotiques. De plus, ces souris présentent une intolérance au glucose due à une insensibilité à l'insuline.

Mais la prokinéticine jouant un rôle important dans la vascularisation, nous ne pouvons exclure que le défaut de vascularisation observé au sein du tissu adipeux PKR1<sup>-/-</sup> pourrait avoir une action indirecte sur la morphologie du tissu adipeux. De même, l'inactivation de PKR1 peut affecter le fonctionnement d'autres organes, tels que le foie ou le pancréas, ce qui pourrait avoir des conséquences indirectes sur les fonctions du tissu adipeux.

Il nous fallait donc éliminer ces possibilités en créant une lignée de souris dans lesquelles le récepteur PKR1 est spécifiquement inactivé au niveau du tissu adipeux grâce au système Cre-Lox. Nous avons croisé nos souris L2/L2, dans lesquelles l'exon 2 du récepteur PKR1 est flanqué par 2 sites LoxP sur les 2 allèles du gène, avec les souris hémizygote aP2-Cre-ER<sup>T2(Tg/0)</sup>. Dans ces dernières, la recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur aP2 et est couplée à un récepteur aux oestrogènes modifié ER<sup>T2</sup> qui est activé par le tamoxifène (Tam). Nous obtenons alors des souris aP2-L2/L2, dans lesquelles la recombinaison Cre s'exprime dans le tissu adipeux mais les sites LoxP ne sont pas encore coupés. Après injection du Tam, nous obtenons alors les souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> qui n'exprime plus le récepteur PKR1 dans le tissu adipeux. Les souris ont été élevées dans les mêmes conditions et nourries avec la même nourriture NFD.

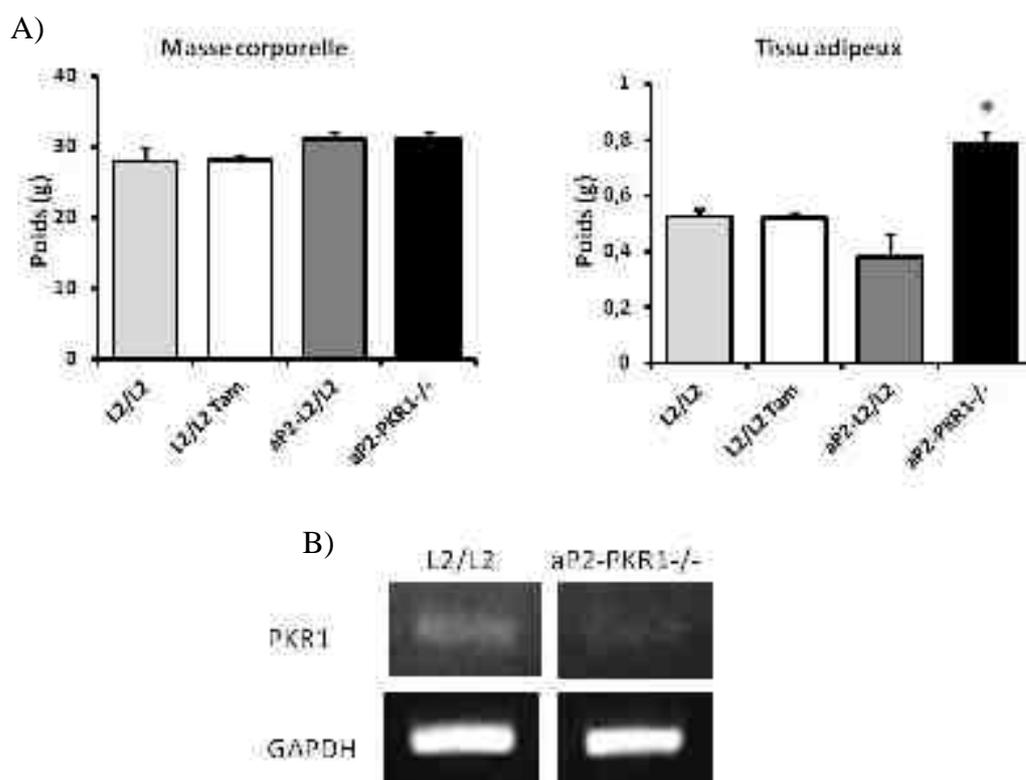
Tout comme dans les souris PKR1<sup>-/-</sup>, nous avons étudié la morphologie du tissu adipeux, ainsi que le maintien de sa vascularisation au sein des souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>. Enfin, nous avons analysé les conséquences métaboliques de l'inactivation spécifique de PKR1 dans le tissu adipeux.

## B. Résultats

### 1) Etude des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> à l'âge de 24 semaines

Nous avons commencé notre étude avec 4 groupes de souris : L2/L2, L2/L2-Tam, aP2-L2/L2 et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> car il était important de montrer que le Tam n'avait pas d'effet sur les souris L2/L2, et que l'effet observé dans les souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> était bien dû à l'injection de Tam comparé aux souris aP2-L2/L2.

A l'âge de 24 semaines, les souris des différents groupes ne présentent pas de différence de masse corporelle. Nous constatons que les tissus adipeux L2/L2 et L2/L2-Tam ont un poids identique, ce qui confirme que le Tam n'a pas d'effet sur le développement du tissu adipeux. Par contre, le poids du tissu adipeux aP2-PKR1<sup>-/-</sup> augmente de façon significative comparé au tissu adipeux L2/L2-Tam (Figure 38 A). Etant donné ces résultats, nous nous focaliserons sur les souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> pour le reste de notre étude.

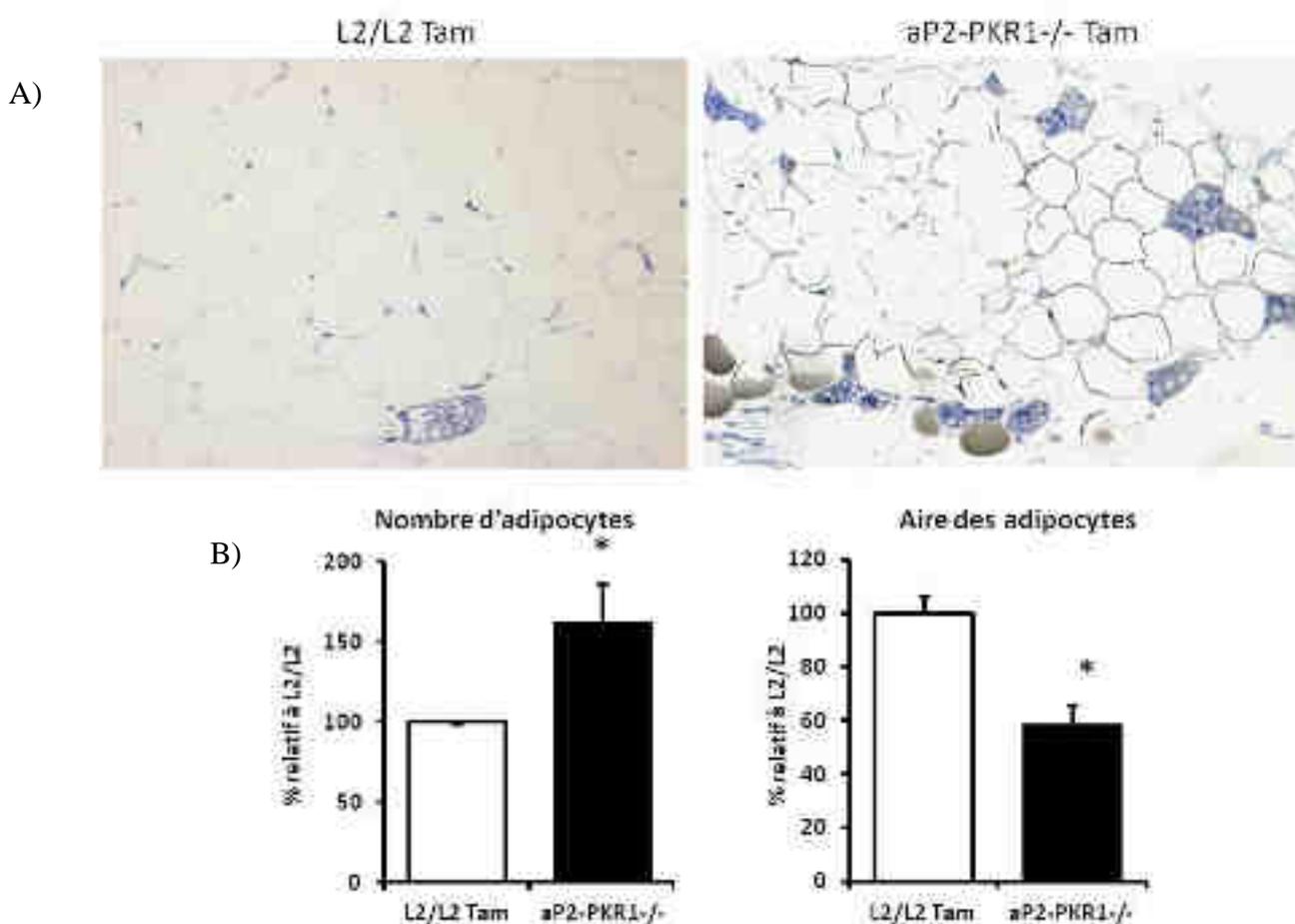


**Figure 38 : Masse corporelle et du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Histogrammes de la masse corporelle (en g) (à gauche) et du poids du tissu adipeux (en g) (à droite) des souris L2/L2 (barre grise claire), L2/L2-Tam (barre blanche), aP2-L2/L2 (barre grise foncée) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). (\* :  $p < 0,05$  entre L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>). B) Mesure par PCR semi-quantitative de l'expression de PKR1 dans le tissu adipeux des souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> par rapport à l'expression de GAPDH.

De plus, l'analyse de l'expression de PKR1 par PCR indique une diminution de l'expression de PKR1 dans le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> comparée à celle des souris L2/L2-Tam (Figure 38 B).

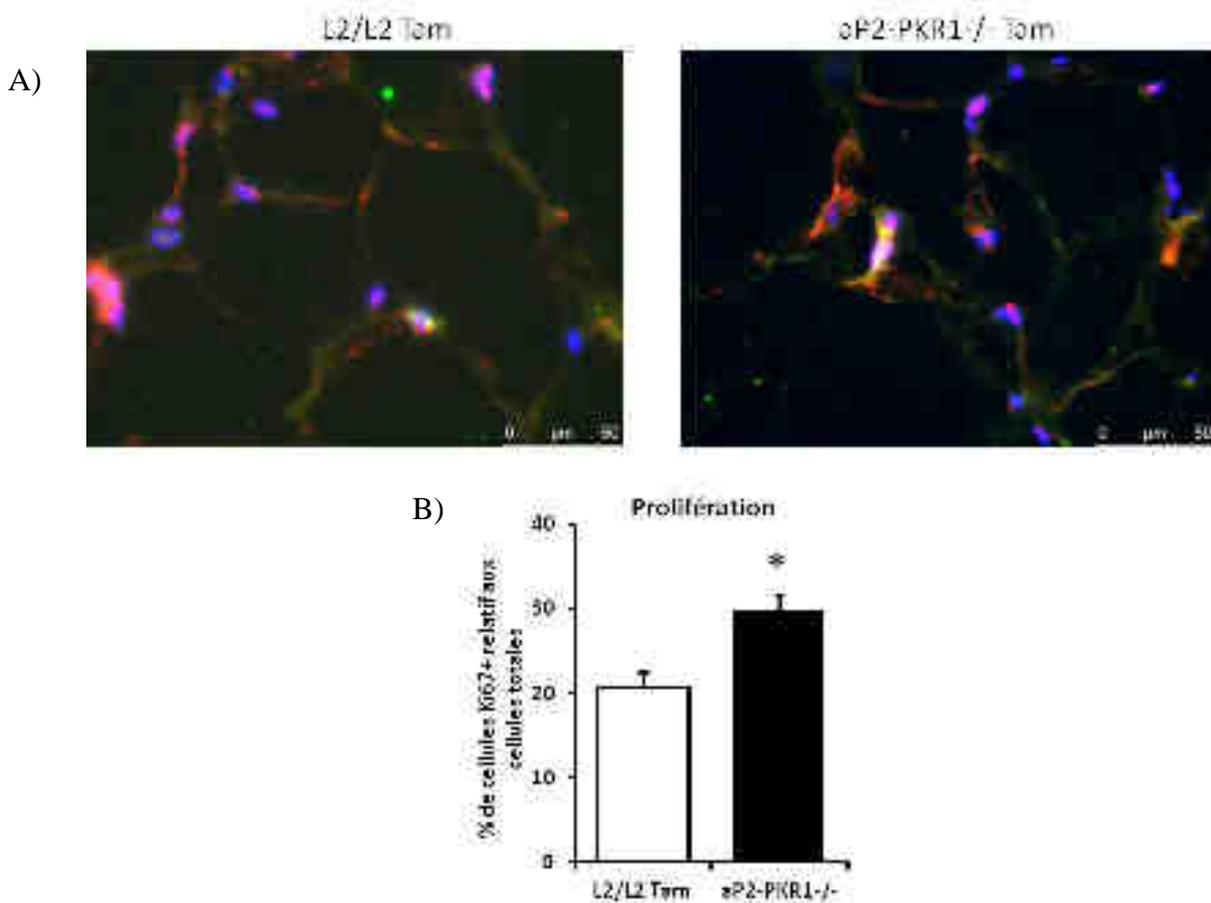
L'étude de la morphologie des tissus adipeux issus des souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> grâce à des coupes semi-fines nous révèle une hyperplasie du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 39 A). Dans ce dernier, le nombre d'adipocytes est 1,5 fois plus élevé que dans le tissu adipeux des souris L2/L2-Tam et la surface des adipocytes issus du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> est 40% plus faible que celle des adipocytes des souris L2/L2-Tam (Figure 39 B). Un épaissement de la matrice extracellulaire des adipocytes issus des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> est également observé (Figure 39 A).



**Figure 39 ; Hyperplasie du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>.**

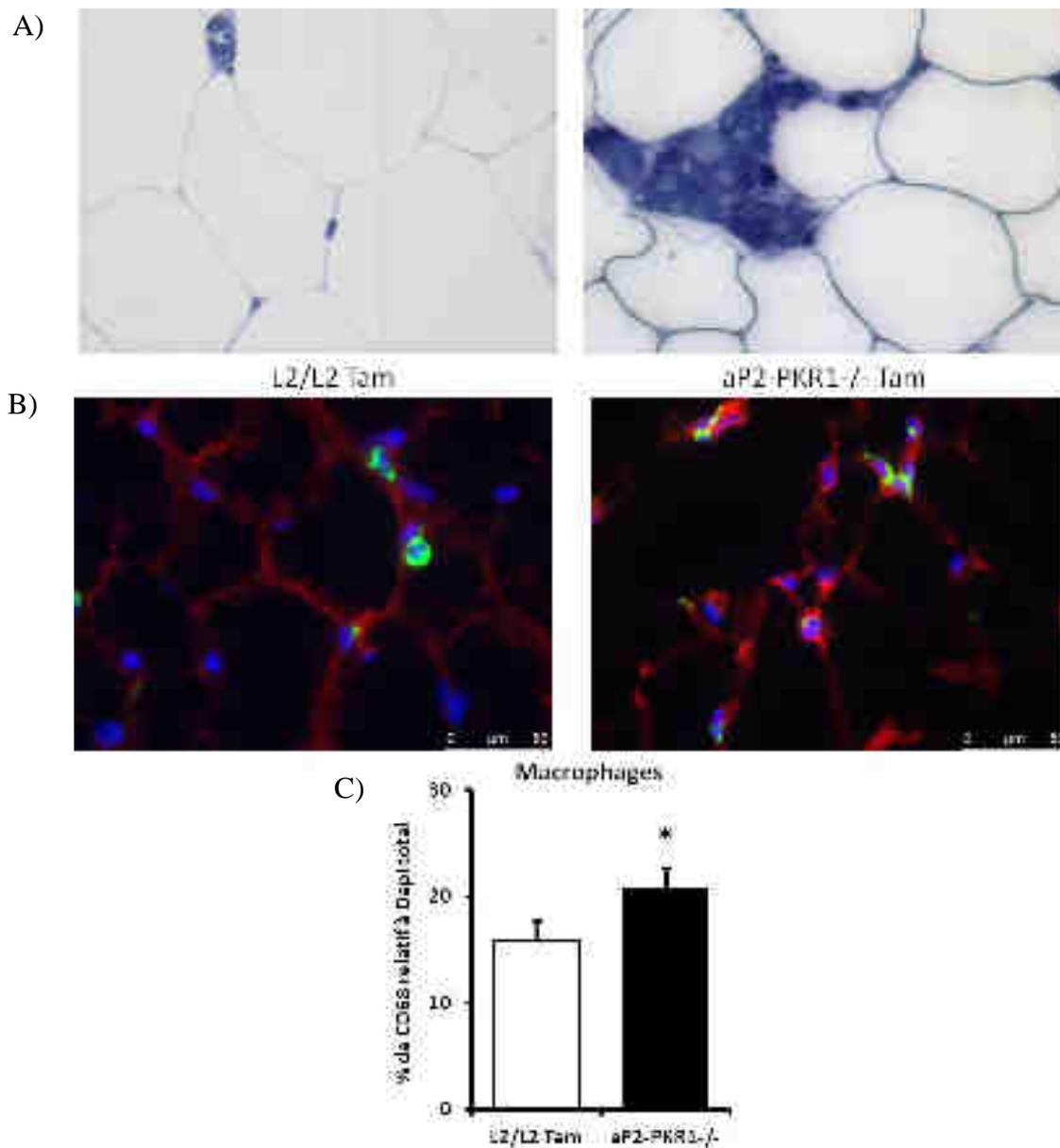
A) Coupes semi-fines des tissus adipeux observées à un grossissement X20 qui permet de voir l'hyperplasie du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (à droite) comparé à celui des souris L2/L2-Tam (à gauche). B) Histogrammes représentant le nombre d'adipocytes (à gauche) et l'aire des adipocytes (à droite) présents au sein des masses adipeuses L2/L2-Tam (barre blanche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). Résultats exprimé en % par rapport à L2/L2-Tam, ce dernier correspondant à 100%. (\* : p<0,05 entre L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>).

Pour confirmer l'augmentation du nombre d'adipocytes dans le tissu adipeux des souris  $\alpha P2\text{-PKR1}^{-/-}$ , nous avons quantifié les préadipocytes en division cellulaire par un coimmunomarquage dirigé contre les protéines Pref-1 et Ki67. Les marquages de ces deux protéines se superposent, confirmant la réplication des préadipocytes (Figure 40 A). Les préadipocytes engagés dans la division cellulaire sont significativement plus nombreux dans le tissu adipeux des souris  $\alpha P2\text{-PKR1}^{-/-}$  que dans le tissu adipeux issu des souris L2/L2-Tam (Figure 40 B).



**Figure 40 : Prolifération des préadipocytes du tissu adipeux  $\alpha P2\text{-PKR1}^{-/-}$ .**

A) Représentation de la prolifération des préadipocytes dans les tissus adipeux des souris L2/L2-Tam (à gauche) et  $\alpha P2\text{-PKR1}^{-/-}$  (à droite), visualisée par un coimmunomarquage dirigé contre Pref-1 (rouge) et Ki67 (vert). Les noyaux sont marqués avec du Dapi (bleu). Les photos ont été prises à un grossissement X40. B) Quantification du nombre de cellules marquées pour Pref-1 et Ki67, exprimé en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi. (\* :  $p < 0,05$  entre L2/L2-Tam et  $\alpha P2\text{-PKR1}^{-/-}$ ).

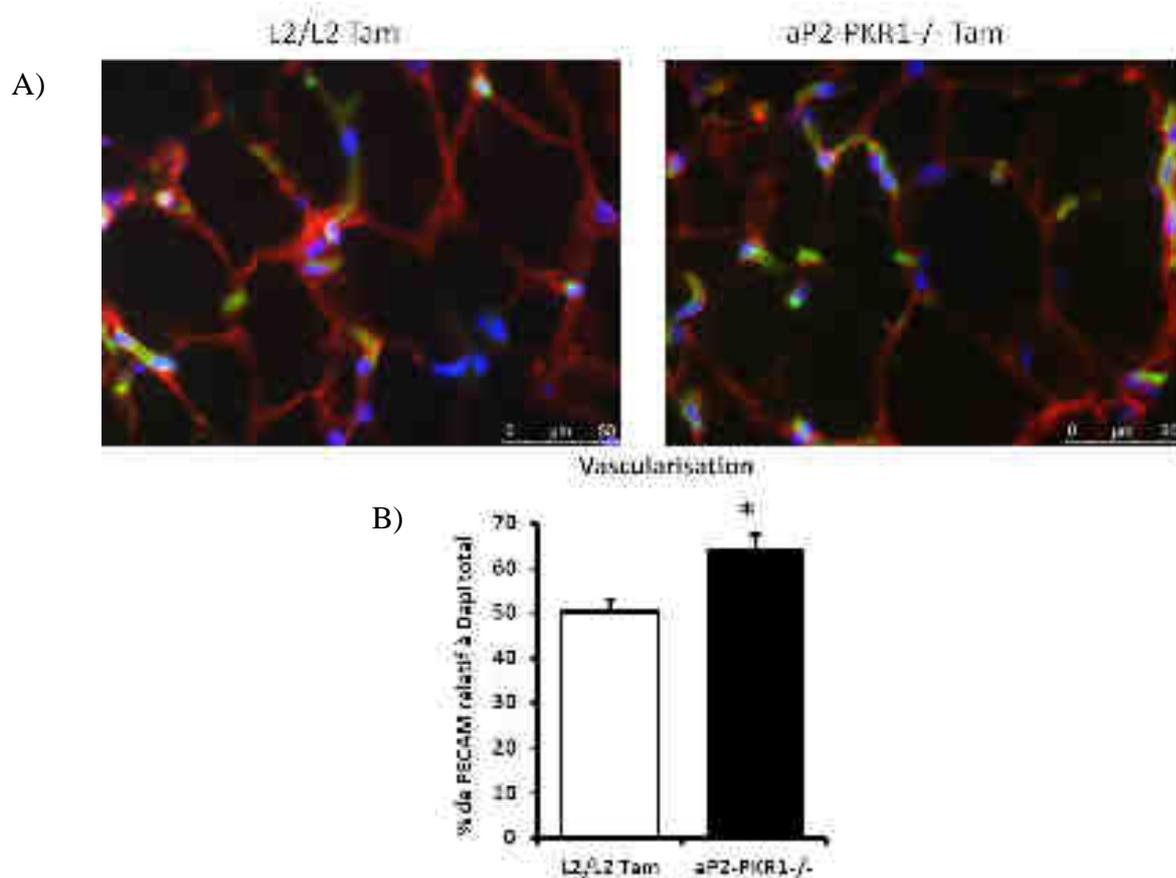


**Figure 41 : Infiltration de macrophages dans le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Coupes semi-fines des tissus adipeux des souris L2/L2-Tam (à gauche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (à droite) permettant de voir les macrophages observés à un grossissement X40. B) Visualisation des macrophages dans les tissus adipeux des souris L2/L2-Tam (à gauche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (à droite), visualisée par un coimmunomarquage dirigé contre le collagène (rouge) pour visualiser les contours des adipocytes et CD68 (vert) afin de marquer les macrophages. Les noyaux sont marqués avec du Dapi (bleu). Les photos ont été prises à un grossissement X40. C) Quantification du nombre de cellules marquées pour CD68 dans les tissus adipeux des souris L2/L2-Tam (barre blanche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). Les résultats sont exprimés en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi. (\* : p<0,05 entre L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>).

Nous constatons une infiltration de macrophage au sein du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>, ce qui provoque une désorganisation de celui-ci (Figure 41 A). Leur présence au sein de la masse grasse issue des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> est confirmée par un immunomarquage dirigé contre la protéine CD68, spécifique des macrophages (Figure 41 B). En effet, le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> présente une augmentation significative du nombre de macrophage CD68-positif comparé à celui des souris L2/L2-Tam (Figure 41 C).

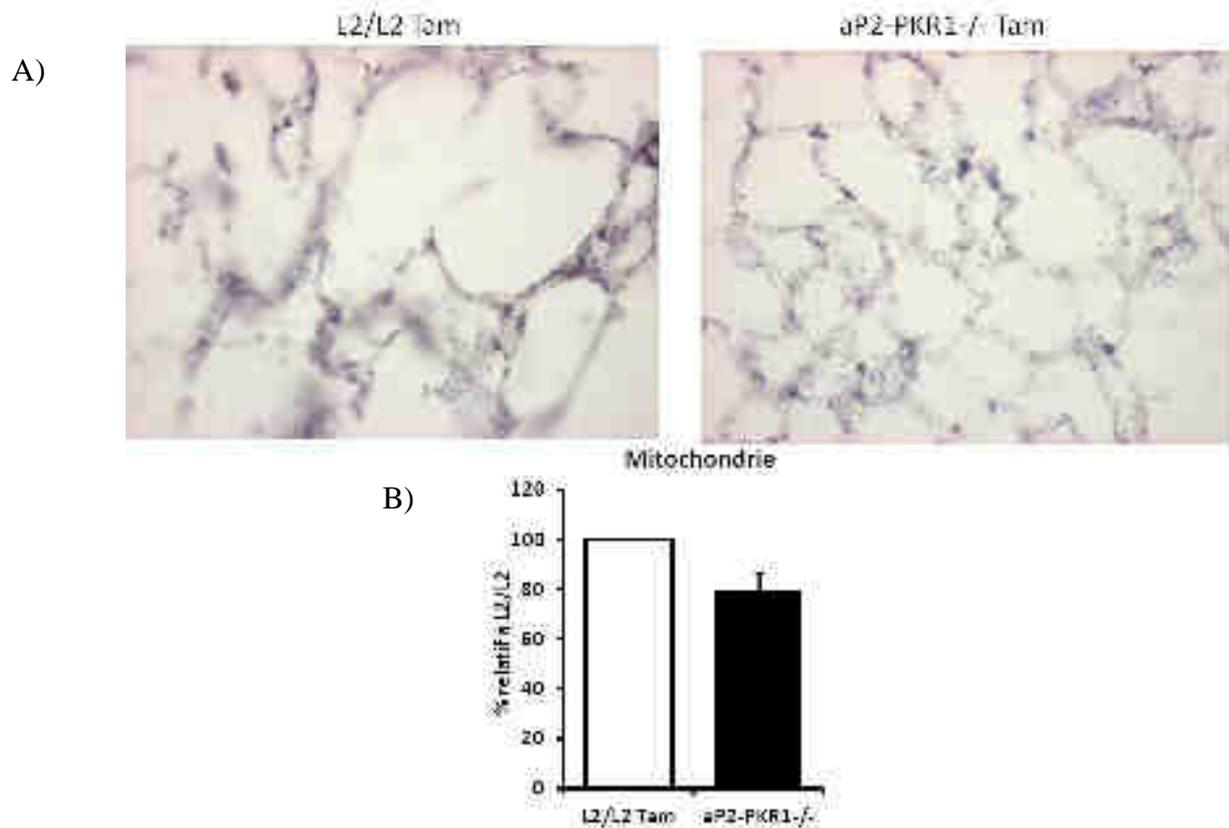
La masse adipeuse augmentant en taille, nous nous sommes assurés de sa bonne vascularisation par un immunomarquage dirigé contre PECAM-1 sur des coupes de tissus adipeux issus des souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 42 A). Le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> apparaît être significativement plus vascularisé que celui des souris L2/L2-Tam (Figure 42 B).



**Figure 42 : Vascularisation du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Représentation du réseau vasculaire des tissus adipeux des souris L2/L2-Tam (à gauche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (à droite), visualisé par un coimmunomarquage dirigé contre le collagène (rouge) pour visualiser les adipocytes et PECAM-1 (vert) afin de marquer les cellules endothéliales. Les noyaux sont marqués avec du Dapi (bleu). Les photos ont été prises à un grossissement X40. B) Quantification du nombre de cellules marquées pour PECAM-1 dans le tissu adipeux des souris L2/L2-Tam (barre blanche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire). Les résultats sont exprimés en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi. (\* : p<0,05 entre L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>).

Nous avons alors contrôlé l'activité mitochondriale en colorant les coupes de tissus adipeux L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> pour voir l'activité de la SDH (Figure 43 A). Il semble que l'activité mitochondriale des adipocytes de la masse adipeuse des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> soit légèrement plus faible que celle du tissu adipeux des souris L2/L2-Tam (Figure 43 B).

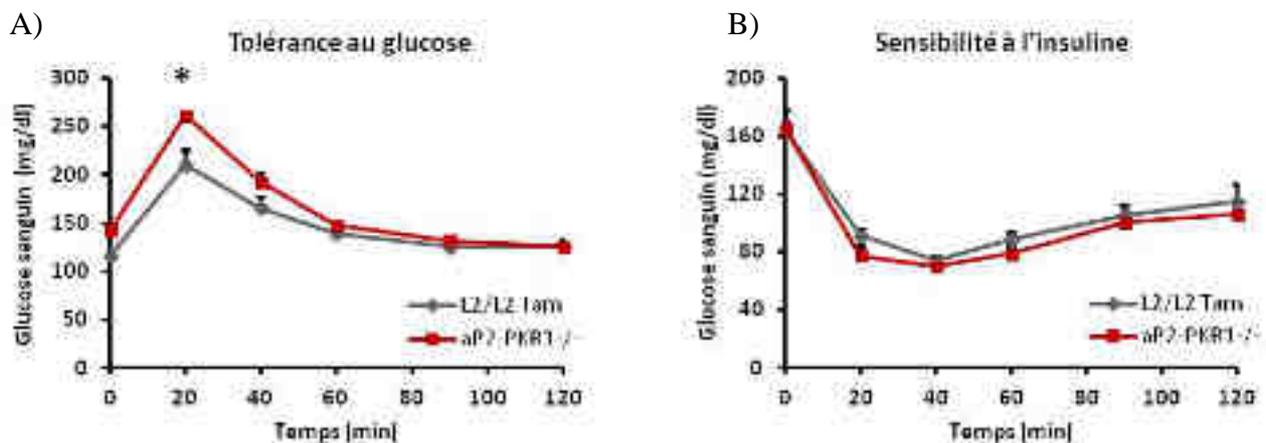


**Figure 43 : Activité mitochondriale des adipocytes du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Représentation de l'activité de la succinate déshydrogénase des adipocytes dans les tissus adipeux des souris L2/L2-Tam (à gauche) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (à droite), visualisée par la coloration bleue de l'activité enzymatique. Les photos ont été prises à un grossissement X40. B) Quantification du marquage de la SDH dans le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (barre noire), exprimée en % par rapport à L2/L2-Tam (barre blanche), correspondant à 100%.

Les conséquences métaboliques de cette augmentation de masse grasse chez les souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> ont été analysées par des tests GTT et ITT.

Le test GTT révèle que les souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> présentent des profils de clairance de glucose identiques. Toutefois, le taux de glucose sanguin des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> est significativement supérieur à celle des souris L2/L2-Tam 20 min après l'injection de glucose (Figure 44 A). Le test ITT ne montre pas de différence de sensibilité à l'insuline entre les souris L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (Figure 44 B).



**Figure 44 : Métabolisme des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>.**

A) Graphique représentant la glycémie des souris L2/L2-Tam (courbe grise) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de 1 mg de glucose par g de souris. Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang. (\* : p<0,05 entre L2/L2-Tam et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>). B) Graphique représentant la glycémie des souris L2/L2-Tam (courbe grise) et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> (courbe rouge) au cours du temps après injection intrapéritonéale de 0,75 mU d'insuline par g de souris. Les résultats sont exprimés en mg de glucose par dl de sang.

L'ensemble de ces résultats suggère que les souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de la masse grasse, sans répercussion sur la masse corporelle. Le tissu adipeux issu des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> est caractérisé par une hyperplasie due à la prolifération de préadipocytes. Le réseau vasculaire est maintenu et suit l'expansion du tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>. Une infiltration de macrophages est visible dans le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> modifiant l'organisation du tissu. Ces dernières présentent un taux de glucose sanguin légèrement supérieur à celui des souris L2/L2-Tam sans qu'il y ait de différence dans la sensibilité à l'insuline.

### III. Effet de la prokinéticine-2 sur l'adipogenèse in vitro

#### A. Introduction

Au sein des tissus adipeux  $PKR1^{-/-}$  et  $aP2-PKR1^{-/-}$ , nous avons pu observer une augmentation du tissu adipeux par hyperplasie, due à la prolifération puis à la différenciation de préadipocytes. Nous avons donc étudié le rôle de la PK2 sur une lignée de fibroblastes embryonnaires murins, les cellules 3T3-L1, décrites dans la littérature comme des préadipocytes.

Nous avons tout d'abord étudié le rôle de la PK2 dans l'adipogenèse des préadipocytes. La différenciation des préadipocytes a été initiée par l'ajout d'un cocktail pro-adipogénique (CA) contenant 0,5 mM d'isobutylméthylxanthine, 1 $\mu$ M de dexaméthasone et 10  $\mu$ g/ml d'insuline. Les cellules ont été stimulées avec le CA pendant 2 jours, puis l'adipogenèse a été maintenue par un traitement à l'insuline pendant 4 jours. Les cellules ont été traitées ou non avec 5 nM de PK2 10h avant la stimulation au CA. La présence d'adipocytes différenciés au sein des préadipocytes est observée 6 jours après l'ajout du CA, par l'intermédiaire d'une coloration à l'huile rouge (oil red o staining) qui colore en rouge les lipides contenus dans les vacuoles lipidiques des adipocytes mature ou en maturation. Nous avons vérifié la différenciation des préadipocytes en mesurant l'expression des facteurs PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  et des adipokines, l'adiponectine et la résistine.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'effet de la PK2 sur la prolifération des préadipocytes car une phase d'expansion clonale mitotique des préadipocytes est nécessaire à l'initiation de la différenciation. Les cellules 3T3-L1 ont étéensemencées puis la prolifération a été induite par un milieu riche en sérum favorisant la prolifération des cellules. Les cellules ont été traitées ou non avec 5 nM de PK2. La prolifération des cellules a été analysée par un immunomarquage de la protéine Ki67 et par l'étude de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, les cyclines D1 et E1, Cdk2 et c-Myc. Enfin, l'effet de la PK2 sur l'apoptose a été vérifié par un marquage des coupures de l'ADN par la méthode TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*).

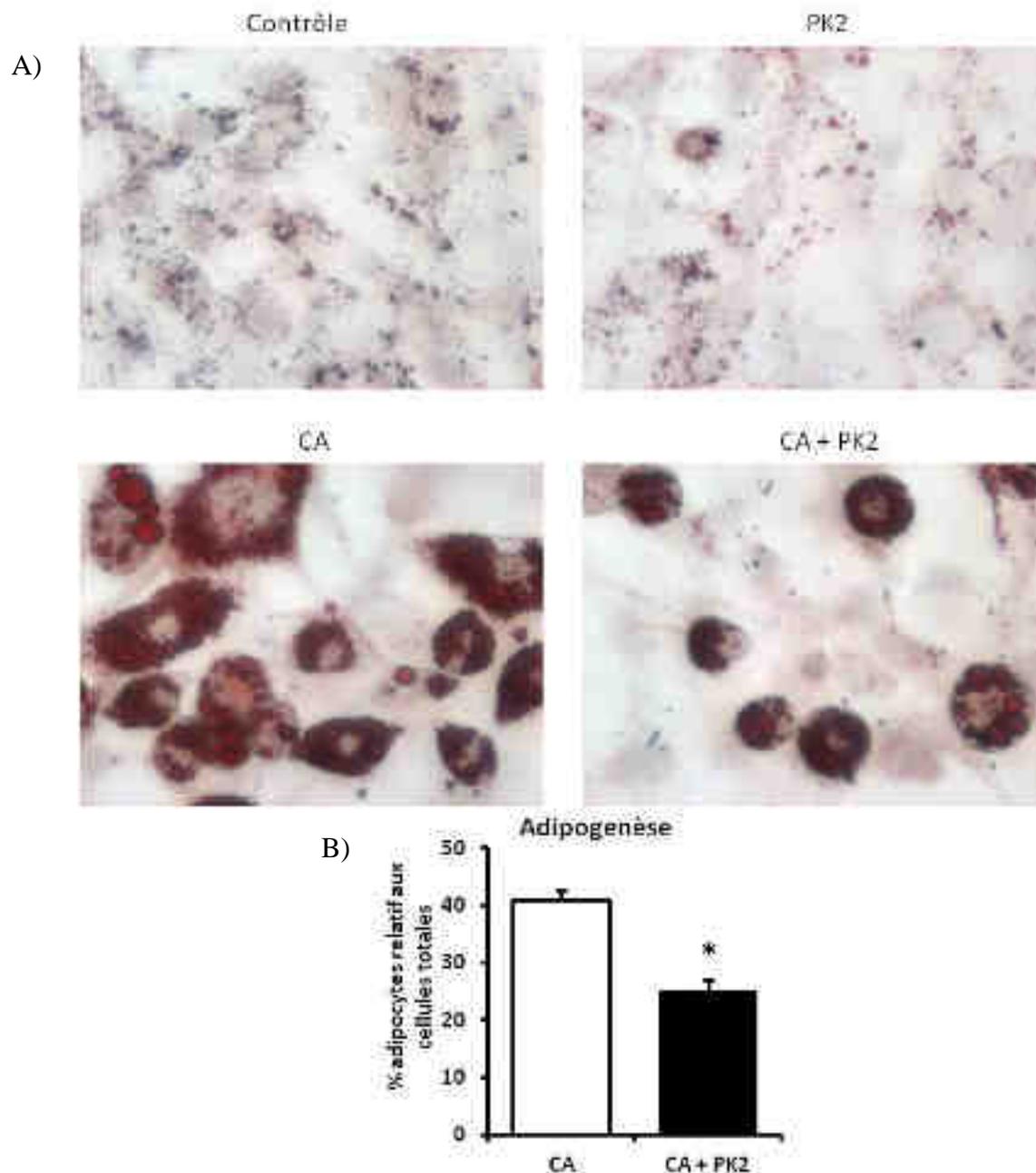
## B. Résultats

### 1) Effet de la prokinéticine-2 sur la différenciation des préadipocytes in vitro

L'effet de la PK2 sur l'adipogenèse a été observé par coloration à l'huile rouge des préadipocytes stimulés ou non par un CA et traités ou non avec 5 nM de PK2. Les cellules 3T3-L1, maintenues dans un milieu sans aucune stimulation adipogénique (condition contrôle), ne se différencient pas en adipocytes matures comme le prouve l'absence de coloration à l'huile rouge. Il en est de même pour les préadipocytes qui ont été traités avec 5 nM de pK2 sans CA. La coloration à l'huile rouge révèle, qu'en présence du CA, 40% des cellules sont des adipocytes matures. En présence de la PK2, seulement 25% des préadipocytes se sont différenciés en adipocytes matures, suggérant un rôle inhibiteur de la PK2 sur l'adipogenèse (Figure 45 A et B).

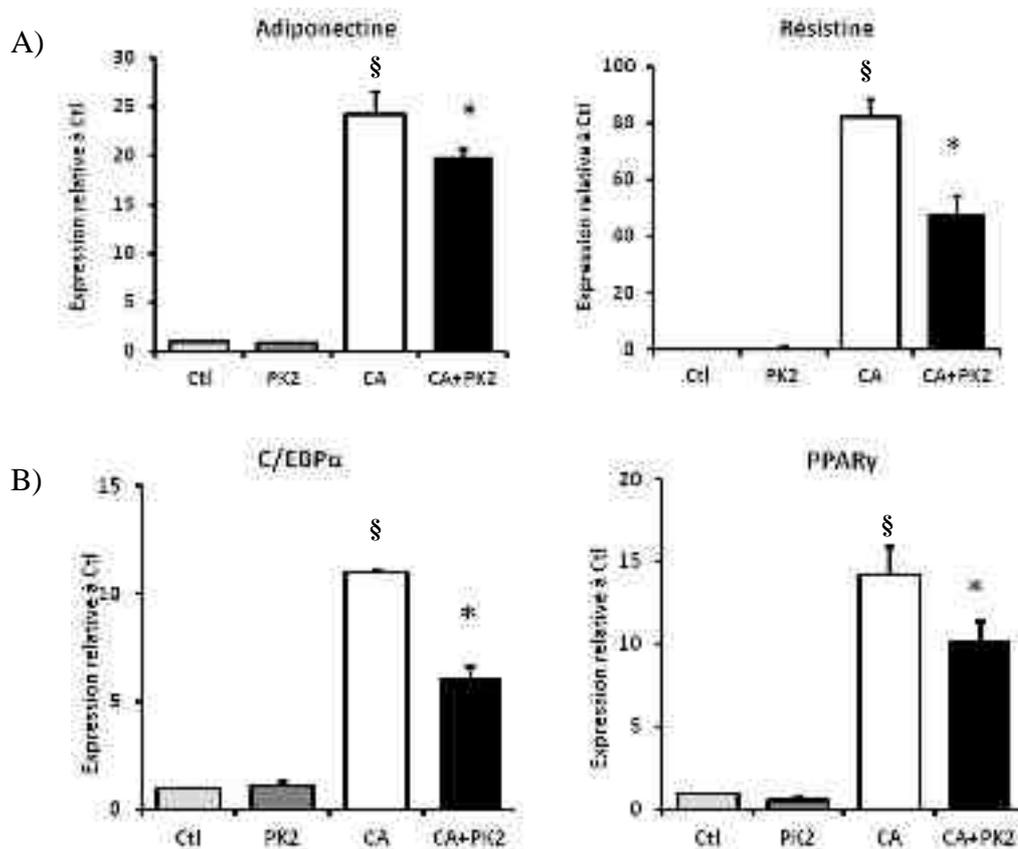
Pour confirmer la diminution du nombre d'adipocytes différenciés à partir des préadipocytes 3T3-L1 par la PK2, nous avons mesuré l'expression des gènes de l'adiponectine et de la résistine, hormones uniquement sécrétées par les adipocytes matures. Le traitement avec le CA augmente considérablement l'expression de ces gènes comparée à la condition contrôle. En présence du CA, le traitement à la PK2 induit une diminution de l'expression de ces gènes, suggérant une diminution du nombre d'adipocytes matures dans cette condition (Figure 46 A).

L'adipogenèse est étroitement contrôlée par l'expression des facteurs de transcription PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ . Nous avons donc étudié l'expression de ces facteurs lors de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1. L'expression génique de ces facteurs augmente considérablement en présence du CA comparée à la condition sans CA ou avec la PK2 seule. Toutefois, l'ajout de PK2 au CA diminue significativement l'expression de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ , confirmant une inhibition de l'adipogenèse par la PK2 (Figure 46 B)



**Figure 45 : Effet de la PK2 sur l'adipogenèse des cellules 3T3-L1.**

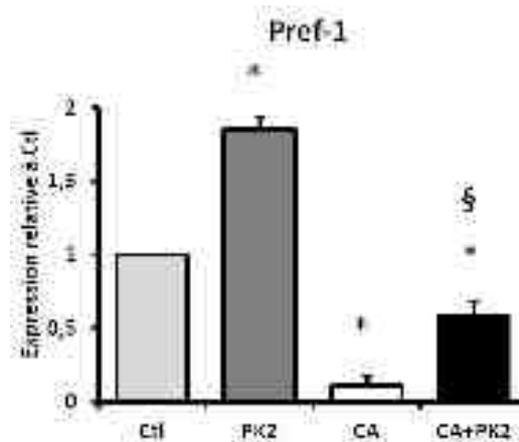
A) Observation de la différenciation des cellules 3T3-L1 à un grossissement X63. Les adipocytes ont été colorés à l'huile rouge, après 6 jours de stimulation, avec du milieu sans cocktail adipogénique (Ctl) (en haut à gauche), avec 5 nM de PK2 (PK2) (en haut à droite), avec le cocktail adipogénique (CA) (en bas à gauche) ou avec la PK2 et le cocktail adipogénique (CA+PK2) (en bas à droite). B) Histogramme représentant le nombre d'adipocytes différenciés après stimulation avec le cocktail adipogénique (CA) (barre blanche) et avec le cocktail adipogénique précédé par un traitement à la PK2 (CA+PK2) (barre noire). Résultats exprimés en % par rapport au nombre de cellules totales par champs (\* :  $p < 0,05$  entre CA et CA+PK2).



**Figure 46 : Effet de la PK2 sur l'expression des adipokines et des facteurs adipogéniques.**

A) Mesure de l'expression de l'adiponectine (à gauche) et de la résistine (à droite) par les adipocytes différenciés à partir des cellules 3T3-L1, sans stimulation adipogénique (Ctl) (barre grise claire), après stimulation avec 5 nM de PK2 (PK2) (barre grise foncée), après stimulation avec le cocktail adipogénique (CA) (barre blanche) ou après stimulation avec la PK2 et le cocktail adipogénique (CA+PK2) (barre noire). (§ :  $p < 0,05$  entre Ctl et CA ; \* :  $p < 0,05$  entre CA et CA+PK2). B) Mesure de l'expression des facteurs adipogéniques C/EBPα (à gauche) et PPARγ (à droite) par les adipocytes différenciés à partir des cellules 3T3-L1, sans stimulation adipogénique (Ctl) (barre grise claire), après stimulation avec 5 nM de PK2 (PK2) (barre grise foncée), après stimulation avec le cocktail adipogénique (CA) (barre blanche) ou après stimulation avec la PK2 et le cocktail adipogénique (CA+PK2) (barre noire). (§ :  $p < 0,05$  entre Ctl et CA ; \* :  $p < 0,05$  entre CA et CA+PK2).

La protéine Pref-1 est uniquement exprimée par les préadipocytes et son expression diminue durant la différenciation. Après 48h de stimulation de l'adipogenèse par le CA, une diminution de l'expression de Pref-1 est observée. Le traitement à la PK2 en présence du CA conduit à une augmentation de l'expression de Pref-1. Nous pouvons également constater une augmentation de l'expression de Pref-1 lorsque les cellules 3T3-L1 sont stimulées par la PK2 en absence du traitement pro-adipogénique (Figure 47).



**Figure 47 : Expression de Pref-1 en présence de la PK2.**

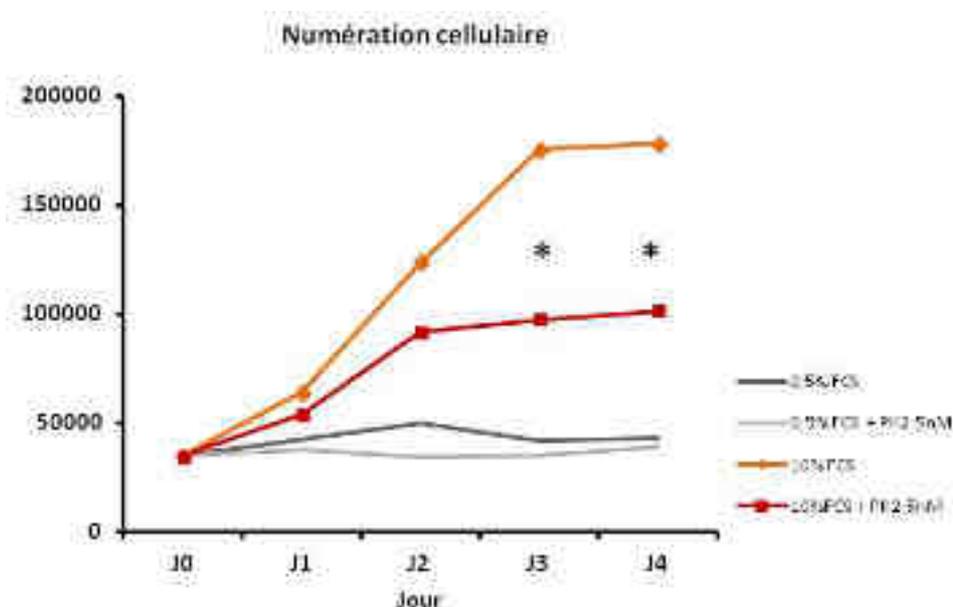
Mesure de l'expression de Pref-1 dans les préadipocytes 3T3-L1, sans stimulation adipogénique (Ctl) (barre grise claire), après stimulation avec 5 nM de PK2 (PK2) (barre grise foncée), après stimulation avec le cocktail adipogénique (CA) (barre blanche) ou après stimulation avec la PK2 et le cocktail adipogénique (CA+PK2) (barre noire). (\* :  $p < 0,05$  avec Ctl ; § :  $p < 0,05$  entre CA et CA+PK2).

L'ensemble de ces résultats indique donc que la PK2 est capable d'inhiber l'adipogenèse par l'activation de son récepteur PKR1.

## 2) Rôle la prokinéticine-2 sur la prolifération des préadipocytes in vitro

Au sein du tissu adipeux, l'adipogenèse des préadipocytes est précédée par une phase d'expansion clonale mitotique indispensable à l'initiation de la différenciation des préadipocytes. Nous avons donc étudié l'effet de la PK2 sur les cellules 3T3-L1 cultivées pendant 4 jours, soit dans un milieu de sevrage à faible pouvoir prolifératif contenant seulement 0,5% de sérum de veau fœtal (FCS, *fœtal calf serum*), soit dans un milieu à fort pouvoir prolifératif contenant 10% de sérum. La quantification des préadipocytes dans le milieu 10% FCS montre une augmentation croissante du

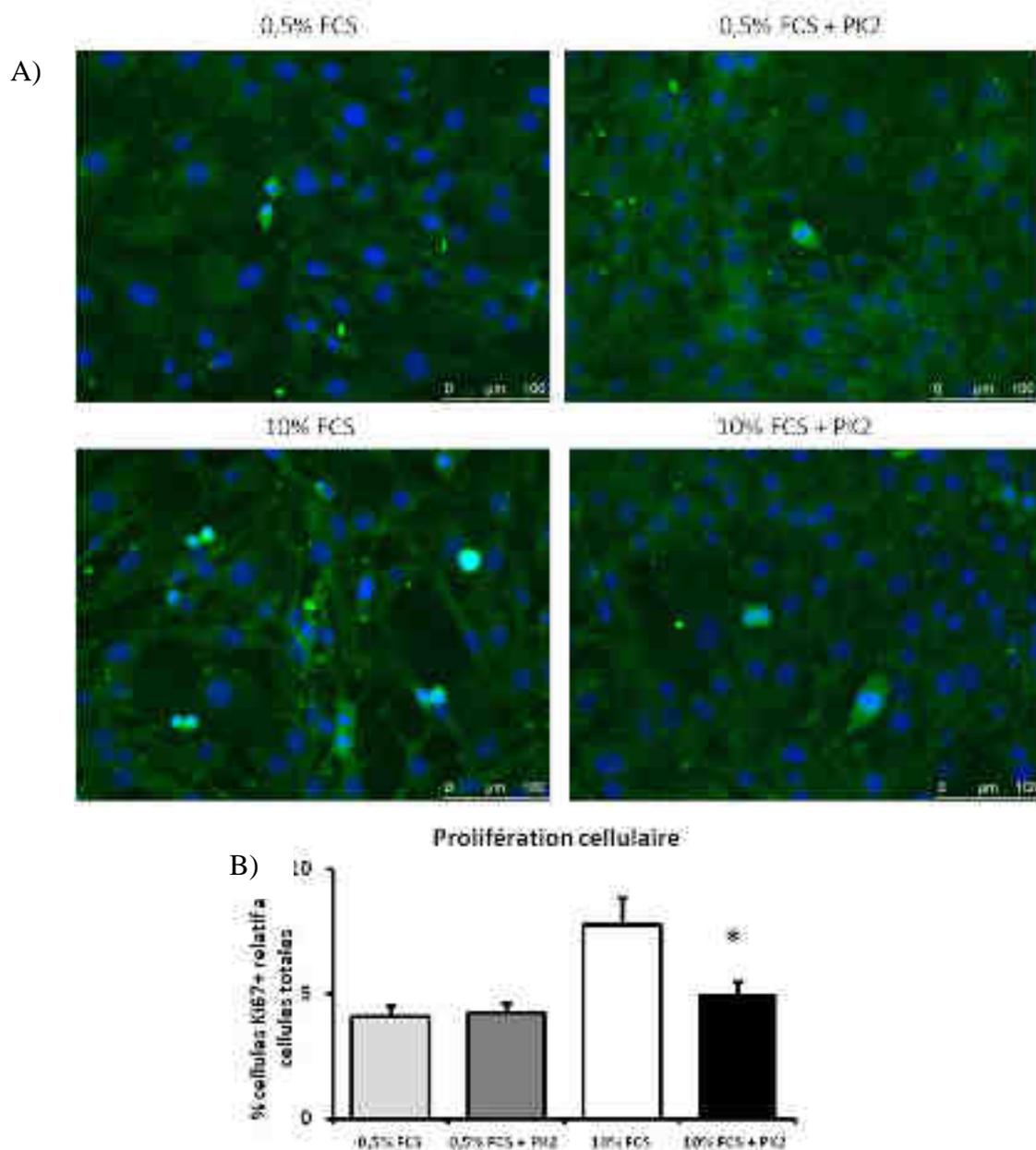
nombre de cellules au cours du temps. L'ajout de PK2 dans cette condition entraîne une diminution significative du nombre de cellules comparée à la condition sans PK2. Dans le milieu 0,5% FCS, le nombre de cellules ne semble pas différent en présence ou en absence de la PK2 (Figure 48).



**Figure 48 : Comptage de la prolifération des cellules 3T3-L1 en présence de la PK2.**

Graphique représentant le comptage des cellules 3T3-L1 cultivées pendant 4 jours dans un milieu contenant, soit 0,5% de sérum (FCS) (courbe grise foncée), soit 0,5% de FCS + 5 nM de PK2 (courbe grise claire), soit 10% de FCS (courbe orange), soit 10% de FCS + 5 nM de PK2 (courbe rouge) (\* :  $p < 0,05$  avec entre 10% FCS et 10% FCS+PK2).

Cette diminution du nombre de cellules induite par la PK2 en présence du milieu prolifératif peut être due à une diminution de la prolifération des préadipocytes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression de la protéine Ki67 impliquée dans la division cellulaire par un immunomarquage (Figure 49 A). La quantification du marquage de Ki67 nous montre que le nombre de cellules positives pour Ki67 augmente significativement en présence du milieu avec 10% FCS comparé au milieu à faible pouvoir prolifératif. Dans le milieu à fort pouvoir prolifératif, l'ajout de PK2 induit une diminution du nombre de préadipocytes en division (Figure 49 B).

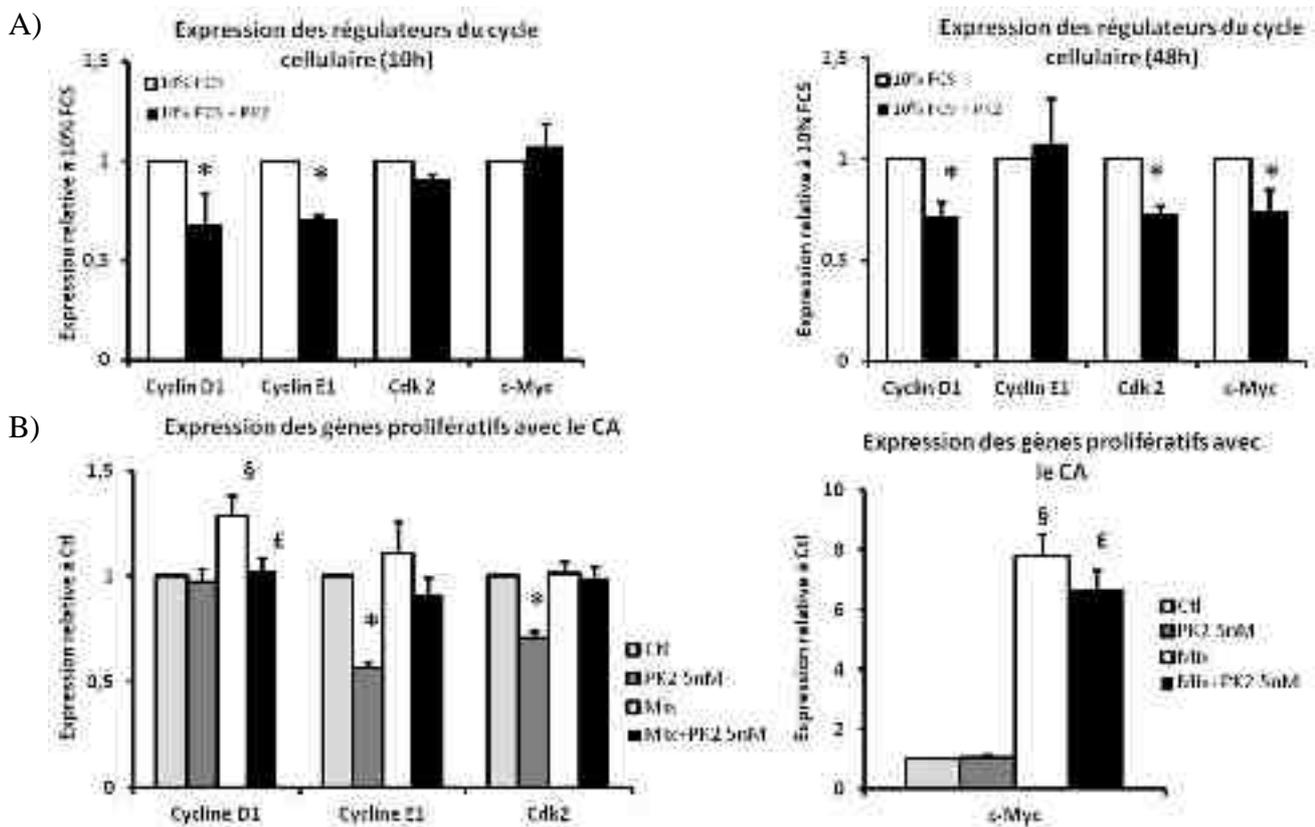


**Figure 49 : Effet de la PK2 sur la prolifération des cellules 3T3-L1.**

A) Observation de la prolifération des cellules 3T3-L1 cultivées dans un milieu contenant 0,5% FCS (en haut à gauche), 0,5% FCS+PK2 (en haut à droite), 10% FCS (en bas à gauche) ou 10% FCS+PK2 (en bas à droite). Les cellules en prolifération sont marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine Ki67 (vert). Les noyaux sont colorés au Dapi (bleu). Les cellules sont observées à un grossissement X40. B) Quantification du nombre de cellules marquées pour Ki67, exprimé en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi. Les cellules 3T3-L1 sont cultivées dans un milieu contenant 0,5% FCS (barre grise claire), 0,5% FCS+PK2 (barre grise foncée), 10% FCS (barre blanche) ou 10% FCS+PK2 (barre noire). (\* :  $p < 0,05$  entre 10% FCS et 10% FCS+PK2).

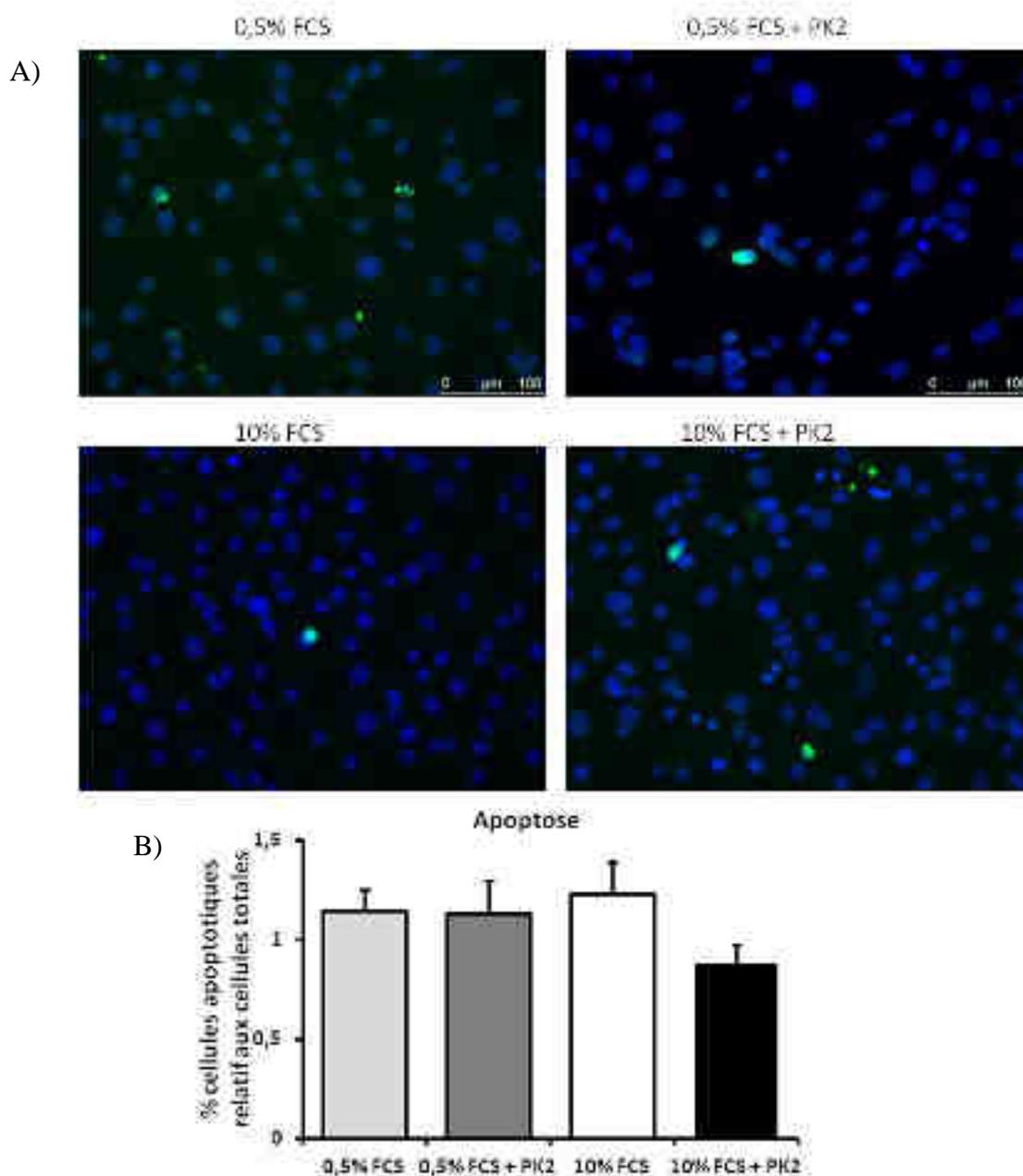
Pour vérifier cette diminution de la prolifération des préadipocytes en présence de la PK2, nous avons mesuré l'expression des facteurs impliqués dans le contrôle et le déroulement du cycle cellulaire, les cyclines D1 et E1, Cdk2 et c-Myc. Dans un milieu contenant 10% FCS, 10 heures

après l'ajout de la PK2, nous observons une diminution significative de l'expression des cyclines D1 et E1. Dans le même milieu, une diminution de l'expression de Cdk-2 et c-Myc est constatée 48h après l'ajout de la PK2 (Figure 50 A). Nous avons refait cette même expérience mais, cette fois, en stimulant les préadipocytes avec le CA pendant 48h, en présence ou non de PK2. Il s'avère que la présence du CA induit une augmentation de l'expression des facteurs cycline D1 et c-Myc. L'ajout de PK2 induit alors une diminution de l'expression de ces facteurs (Figure 50 B).



**Figure 50 : Effet de la PK2 sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire.**

A) Mesure de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire cycline D1, cycline E1, Cdk2 et c-Myc par les cellules 3T3-L1, 10h (à gauche) ou 48h (à droite) après avoir été cultivées dans un milieu contenant 10% FCS (barre blanche) ou 10% FCS+PK2 (barre noire) (\*:  $p < 0,05$  entre 10% FCS et 10% FCS+PK2). B) Mesure de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire cycline D1, cycline E1, Cdk2 et c-Myc par les cellules 3T3-L1, sans stimulation adipogénique (Ctl) (barre grise claire), avec 5 nM de PK2 (PK2) (barre grise foncée), avec le cocktail adipogénique (CA) (barre blanche) ou avec la PK2 et le cocktail adipogénique (CA+PK2) (barre noire). (\*:  $p < 0,05$  entre Ctl et PK2, §:  $p < 0,05$  entre Ctl et CA, £:  $p < 0,05$  entre CA et CA+PK2).



**Figure 51 : Apoptose des cellules 3T3-L1 en présence de la PK2.**

A) Représentation de l'apoptose des cellules 3T3-L1 cultivées dans un milieu contenant 0,5% FCS (en haut à gauche), 0,5% FCS+PK2 (en haut à droite), 10% FCS (en bas à gauche) ou 10% FCS+PK2 (en bas à droite). Les cellules en apoptotiques sont marquées au TUNEL (vert) et les noyaux sont colorés au Dapi (bleu). Les cellules sont observées à un grossissement X40. B) Quantification du nombre de cellules apoptotiques, exprimé en % par rapport au nombre total de cellules marquées par le Dapi. Les cellules 3T3-L1 sont cultivées dans un milieu contenant 0,5% FCS (barre grise claire), 0,5% FCS+PK2 (barre grise foncée), 10% FCS (barre blanche) ou 10% FCS+PK2 (barre noire).

La diminution du nombre d'adipocytes induite par la PK2 en présence du milieu prolifératif peut aussi être due à une augmentation de l'apoptose des cellules. Nous avons donc vérifié l'apoptose des préadipocytes en présence de la PK2, soit dans le milieu 0,5% FCS, soit dans

le milieu 10% FCS, grâce à un marquage TUNEL (Figure 51 A). Il apparaît que le nombre de préadipocytes apoptotiques ne change pas en présence de la PK2, quelque soit le milieu utilisé. Ces résultats laissent penser que la PK2 n'induit pas l'apoptose des préadipocytes (Figure 51 B).

L'ensemble de ces résultats suggère que la PK2 est capable d'inhiber la prolifération des préadipocytes et qu'elle ne provoque pas de mort cellulaire. De plus, il semble que la PK2 soit capable d'inhiber la différenciation des préadipocytes en inhibant la phase d'expansion clonale mitotique nécessaire à l'adipogenèse.

# DISCUSSION

---

L'obésité est un problème de santé publique. Le nombre de nouveau cas d'obésité augmente de façon épidémique dans de nombreux pays. Il est donc important de comprendre les mécanismes de développement de l'obésité, d'identifier les facteurs influençant la croissance du tissu adipeux et ceux pouvant être utilisés comme traitement contre l'obésité.

Mon sujet de thèse consistait donc à étudier l'implication de la prokinéticine-2 (PK2) et de son récepteur PKR1 dans le tissu adipeux, mais également son impact sur l'obésité et sur les conséquences métaboliques de l'obésité.

Pour cela, nous avons, tout d'abord, utilisé un modèle murin dans lequel le gène codant pour le récepteur PKR1 est totalement inactivé. Les souris PKR1<sup>-/-</sup> sont obèses à l'âge de 40 semaines, du fait d'une forte augmentation de la masse adipeuse par hyperplasie, due à l'augmentation de la prolifération des préadipocytes. Chez l'Homme, la survenue de l'obésité est fortement corrélée à un déséquilibre de la balance énergétique. Nous avons alors étudié l'impact de l'inactivation de *Pkr1* au niveau de la balance énergétique.

La protéine PK2 a été décrite comme un facteur anorexigène capable d'inhiber la prise alimentaire, en augmentant la sécrétion d' $\alpha$ -MSH, et d'induire une réponse physiologique caractéristique d'une balance énergétique négative. Toutefois, ce rôle sur la prise alimentaire fait intervenir le récepteur PKR2 (Gardiner *et al.*, 2009). Nos résultats semblent confirmer que PKR1 n'intervient pas dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire.

Les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> excrètent la même quantité de fèces. De plus, l'intestin de ces souris présentent une absorption lipidique identique, ce qui est confirmé par la quantité identique de lipides retrouvés dans les fèces des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup>. Chez la souris, PKR1 étant exprimé dans l'intestin et les prokinéticines jouant un rôle dans la motilité gastro-intestinale (Schweitz *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001), nous nous attendions à une modification du passage du bol alimentaire dans le tractus gastro-intestinal, ce qui aurait pu conduire à une modification de l'absorption intestinale des lipides chez les souris PKR1<sup>-/-</sup>. Toutefois, ce phénomène n'étant pas observé, nous suggérons que l'inactivation du gène codant pour PKR1 n'influence pas l'absorption lipidique intestinale, qui n'est donc pas à l'origine de la prise de poids des souris PKR1<sup>-/-</sup>.

Les dépenses énergétiques regroupent le métabolisme de base, la thermogénèse et l'activité physique. La souris ayant un tissu adipeux brun bien plus développé que l'Homme, la thermogénèse joue un rôle important dans la dissipation des excès énergétique. Dans un environnement froid, les souris PKR1<sup>-/-</sup> présentent un défaut de maintien de leur température corporelle, ce qui laisse sous-entendre un défaut de la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun. Toutefois, la température des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> n'est pas significativement différente. Ce résultat nous laisse penser que la

différence de masse adipeuse observée entre les souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> ne peut pas provenir du défaut de thermogenèse des souris PKR1<sup>-/-</sup>. Cependant, nous ne pouvons exclure le fait que les souris PKR1 présentent des déficiences cardiaques et rénales, qui pourraient affecter leur activité physique et leur dépense énergétique. Il semble tout de même que le phénotype du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> soit dû à un impact direct de l'inactivation de *Pkr1* et non à un dérèglement de la balance énergétique. Il est donc important de comprendre pourquoi l'absence de PKR1 induit une obésité.

L'adipogenèse et l'angiogenèse sont des mécanismes étroitement couplés au sein du tissu adipeux. L'inhibition de l'angiogenèse par un anticorps dirigé contre VEGFR2 inhibe l'angiogenèse, mais aussi l'adipogenèse (Fukumura *et al.*, 2003). Il a été montré un rôle très important des prokinétines dans l'angiogenèse. En effet, PK2, *via* son récepteur PKR1, stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que l'angiogenèse (Urayama *et al.*, 2007). Ainsi, les souris PKR1<sup>-/-</sup> sont caractérisées par un défaut d'angiogenèse au niveau du cœur et des reins (Boulberdaa *et al.*, 2011). Dans le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup>, ce défaut d'angiogenèse est retrouvé puisque l'augmentation du nombre d'adipocytes n'est pas corrélée à une augmentation du nombre de capillaires. Il en résulte une diminution de l'activité respiratoire mitochondriale au niveau des adipocytes issus des souris PKR1<sup>-/-</sup>. Cette anomalie au niveau de la communication entre adipocytes et cellules endothéliales conduit au développement d'un environnement hypoxique caractérisé par une augmentation de l'expression de HIF-1 au sein du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup>. L'expression de HIF-1 a pour but d'induire l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que les prokinétines et le VEGF afin d'augmenter l'angiogenèse (LeCouter *et al.*, 2001). Toutefois, le gène codant pour PKR1 n'étant plus exprimé, la PK2 est incapable de stimuler l'angiogenèse et l'induction des autres facteurs angiogéniques ne semble pas suffisante pour restaurer l'angiogenèse. Il en résulte donc une nécrose des adipocytes, caractérisée par la présence de mitochondries dilatées, présentant une désorganisation des crêtes, ainsi que l'accumulation de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques.

L'hypoxie peut contribuer à l'établissement de l'insulino-résistance. De plus, l'obésité est un facteur de risque de développement du diabète de type 2 car le tissu adipeux apporte une large contribution au développement de la résistance à l'insuline. Le développement de l'insulino-résistance est un phénomène lent et longtemps asymptomatique. Les souris PKR1<sup>-/-</sup> présentent déjà une obésité à l'âge de 15 semaines. Il semble que l'obésité induite par l'absence de l'expression de PKR1 conduit à un dérèglement métabolique de type insulino-résistance. Cette dernière évolue et s'aggrave au cours du temps. De plus, les souris WT nourries avec de la nourriture HFD présentent

une insulino-résistance semblable à celle qu'induit l'inactivation de PKR1 avec une nourriture équilibrée. Ces résultats sous-entendent que l'inactivation du gène codant pour PKR1 conduit à un phénotype identique à celui induit par un régime riche en graisse. Il faudrait compléter nos expériences par des tests supplémentaires qui pourrait nous permettre de comprendre l'évolution exact des phénotypes des souris WT et PKR1<sup>-/-</sup> au cours du temps. De plus, nous ne pouvons pas attribuer ces troubles métaboliques au seul impact de l'inactivation de PKR1 au niveau du tissu adipeux. Il est tout à fait possible que l'inactivation de PKR1 au niveau des organes non-adipeux puisse modifier leur structure et leurs fonctions. Ces organes jouent des rôles clés dans le métabolisme énergétique et leur implication doit être prise en compte. L'inactivation du gène codant pour PKR1 induit le développement de problèmes fonctionnels cardiaques et rénaux à l'âge de 12 semaines et de 24 semaines (Boulberdaa *et al.*, 2011). La présence d'une déficience dans le cœur et le rein induit le dysfonctionnement d'autres organes tels que le foie (Shamseddin and Parfrey, 2009). Il est donc possible que l'augmentation du poids du foie des souris PKR1<sup>-/-</sup> soit une conséquence des dysfonctionnements cardiaques et rénaux. Ainsi, le foie pourrait participer à l'établissement de l'insulino-résistance et de l'intolérance au glucose observée. Il serait donc intéressant d'étudier la fonction de PKR1 dans le foie et le pancréas afin d'analyser leur rôle dans le phénotype des souris PKR1<sup>-/-</sup>.

Pour éliminer la contribution du défaut d'angiogenèse dans le développement de la masse grasse et afin de voir le rôle propre de l'inactivation du gène codant pour PKR1 spécifiquement au niveau du tissu adipeux, nous avons étudié le phénotype de la masse grasse des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>. Comparées aux souris L2/L2-Tam, ces souris présentent une augmentation significative de leur masse adipeuse. Tout comme dans les souris PKR1<sup>-/-</sup>, elle est la résultante d'une hyperplasie adipocytaire, du fait d'une augmentation de la prolifération des préadipocytes. Contrairement à la masse grasse des souris PKR1<sup>-/-</sup>, la croissance de celle des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> est corrélée à l'expansion du réseau vasculaire. Il semble donc que PK2, *via* PKR1, ait un rôle propre au niveau de la prolifération et de la différenciation des préadipocytes. Le phénotype du tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> n'est donc pas secondaire à un défaut d'angiogenèse. La masse adipeuse des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> présente également un épaissement de la lame basale, laisse sous-entendre le développement d'une fibrose, ainsi qu'une infiltration de macrophages qui désorganisent la structure du tissu. L'obésité est définie comme une maladie inflammatoire chronique et l'expansion de la masse adipeuse est corrélée à l'augmentation de l'infiltration des macrophages (Canello *et al.*, 2005). La présence des macrophages dans le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> pourrait contribuer au processus de néovascularisation. En effet, les macrophages peuvent produire de

nombreux facteurs angiogéniques tels que VEGF, FGF-2, TNF $\alpha$  et IL-6 (Wellen and Hotamisligil, 2003). En outre, la présence des macrophages dans la masse adipeuse des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> pourrait être à l'origine de l'hyperplasie. En effet, les macrophages peuvent se différencier en préadipocytes afin d'en augmenter le nombre et de promouvoir ainsi l'hyperplasie (Chazenbalk *et al.*, 2011). Cependant, le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> n'est pas caractérisé par l'infiltration des macrophages. Or, dans le cas des déficiences cardiaques et rénales, ces souris présentent une infiltration de macrophages au niveau du cœur et des reins (Boulberdaa *et al.*, 2011). Il nous est donc difficile d'expliquer l'absence des macrophages dans le tissu adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup>, ainsi que leur rôle exact dans l'hyperplasie. L'absence des macrophages dans le tissu adipeux PKR1<sup>-/-</sup> est peut être due au défaut de vascularisation du tissu, qui perturbe l'infiltration des macrophages. L'inactivation du gène codant pour PKR1 au niveau systémique peut avoir de nombreuses répercussions sur la physiologie de la souris. De plus, des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place, ce qui fait de ce modèle animal un système complexe. Toutefois, l'hyperplasie observée au niveau des tissus adipeux des souris PKR1<sup>-/-</sup> et aP2-PKR1<sup>-/-</sup> permet de supposer que PKR1 jouerait un rôle direct sur l'adipogénèse.

Afin de comprendre le rôle direct de PK2 au niveau de l'adipogénèse, nous avons étudié l'effet d'un traitement à la PK2 sur la différenciation de la lignée cellulaire 3T3-L1, induite par un cocktail pro-adipogénique. PK2 agit comme un facteur anti-adipogénique, capable d'inhiber la différenciation. L'expression des facteurs adipogéniques PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  est inhibée, ce qui montre que les cellules 3T3-L1 sont incapables d'exprimer ces facteurs de transcription en présence de PK2. Il est donc possible que l'activation de PKR1 puisse moduler l'activation de ces facteurs clés de l'adipogénèse. D'autres RCPG sont impliqués dans les mécanismes anti-adipogénique. Le récepteur des prostaglandines EP4 inhibe l'adipogénèse en modulant l'expression de PPAR $\gamma$  (Inazumi *et al.*, 2011). De même, l'angiotensine II, *via* son RCPG, est également capable d'inhiber l'adipogénèse en activant la voie des MAPK, qui augmente alors la phosphorylation de PPAR $\gamma$  (Fuentes *et al.*, 2010). En effet, l'activation de la PKC et celle de la voie des MEK/ERK sont impliquées dans les mécanismes anti-adipogéniques (Artemenko *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2010). PDGF est, lui aussi, capable d'inhiber l'adipogénèse en induisant la phosphorylation de PPAR $\gamma$  via la voie des MAPK (Camp and Tafuri, 1997). D'autres facteurs angiogéniques tels que l'isoforme basique du FGF (Krieger-Brauer and Kather, 1995) et le *heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF) ont également été identifiés comme des facteurs inhibant la différenciation des préadipocytes en adipocytes. La voie de transduction de PKR1 passant par

l'activation de la PKC et des MAPK, il serait envisageable que PK2 inhibe l'adipogenèse par ces mêmes voies.

L'analyse de l'expression de l'ARNm de Pref-1 dans les cellules 3T3-L1, stimulées par le cocktail adipogénique, montre une diminution de son expression. Ce résultat est cohérent avec le fait que la dexaméthasone contenue dans le cocktail adipogénique inhibe l'expression de Pref-1 (Smas *et al.*, 1999). En présence de PK2, l'inhibition de l'expression de Pref-1 est moins importante, puisque l'adipogenèse est inhibée. Toutefois, il est intéressant de constater qu'en l'absence de cocktail adipogénique, PK2 augmente l'expression de Pref-1. Il est donc possible que l'activation de PKR1 puisse jouer un rôle sur l'expression de Pref-1. Cependant, les souris n'exprimant plus Pref-1 sont caractérisées par une augmentation de la masse adipeuse due à une hypertrophie des adipocytes. Etant donné l'hyperplasie des souris PKR1<sup>-/-</sup> et aP2-PKR1<sup>-/-</sup>, il est fort possible que le rôle anti-adipogénique de PK2 ne soit pas uniquement dépendant de celui de Pref-1. Il ne faut pas oublier que la cellule possède plusieurs récepteurs à sa surface et que les processus biologiques dépendent de l'intégration de différentes voies de transduction en simultanées. Il est donc tout à fait possible que Pref-1 et PKR1 puissent agir en parallèle. L'action anti-adipogénique de Pref-1 passe par l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK, qui aboutit à l'inhibition de l'expression des facteurs C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  (Sul, 2009). L'activation de PKR1 induit l'activation de la voie MEK/ERK, ce qui suggère que PK2 pourrait inhiber l'adipogenèse par cette voie de transduction. Cependant étant donné l'augmentation de la prolifération des préadipocytes dans le tissu adipeux des souris mutantes, il est probable que PK2 ait une influence sur l'augmentation du nombre d'adipocytes et donc sur la prolifération des préadipocytes.

L'initiation de la différenciation des préadipocytes en adipocyte est caractérisée par une phase d'expansion clonale mitotique, dont le blocage peut inhiber l'adipogenèse (Tang *et al.*, 2003). Cette phase est marquée par l'expression de facteurs adipogéniques et de régulateurs du cycle cellulaire, qui vont interagir les uns avec les autres afin d'inhiber la prolifération et d'activer la différenciation. L'effet anti-adipogénique de la PK2 semble passer par l'inhibition de la prolifération des préadipocytes. En effet, PK2 induit une diminution de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire c-myc, cycline D, cycline E et cdk-2. En général, les voies de signalisation activées par PKR1 tels que celle des MAPK, sont impliquées dans l'activation de la prolifération cellulaire. On pourrait donc envisager que l'activation de PKR1 puisse influencer l'expression d'un gène suppresseur de tumeur tel que p53 ou p21. Toutefois, l'activation de ces voies dirige la cellule vers l'apoptose. Il est donc possible que l'activation de PKR1 puisse activer une autre voie de signalisation afin d'inhiber l'apoptose. En effet, l'activation de la voie de PKR1 peut activer la voie PI3K/Akt, qui est connue pour être impliquée dans la survie cellulaire. De plus, il n'est pas

impossible qu'une autre voie de signalisation se mette en place en parallèle de celle de PKR1 afin de favoriser la survie.

C/EBP $\beta$  fait le lien entre l'arrêt de l'expansion clonale mitotique et l'activation de l'adipogenèse (Tang *et al.*, 2003). En effet, C/EBP $\beta$  va activer p21, qui va alors inactiver les Cdk, bloquant ainsi le cycle cellulaire. Il va également induire l'expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  qui sont des facteurs clés de l'adipogenèse. Il est donc envisageable que l'activation de PKR1 influence le déroulement du cycle cellulaire en favorisant l'activité de C/EBP $\beta$ . Cependant, l'activation de C/EBP $\beta$  initierait l'adipogenèse, ce qui n'est pas le cas avec PKR1. Il est donc fortement possible que PK2 puisse agir à travers différentes voies de signalisation, qui seront intégrées afin d'inhiber à la fois la prolifération et la différenciation.

### *Conclusion et perspectives*

Cette étude a permis de mettre en évidence un rôle nouveau de la protéine PK2 et de son récepteur dans le tissu adipeux. En effet, l'impact de l'inactivation du gène codant pour PKR1 dans le tissu adipeux n'avait jamais été étudié jusqu'à présent. Nous avons montré que la PK2 est un facteur anti-adipogénique qui inhibe la prolifération des préadipocytes lors de la phase d'expansion clonale mitotique. Cependant, le mécanisme par lequel la PK2 joue ce rôle n'est pas encore élucidé. Il serait intéressant de déterminer le rôle exact de la PK2 au niveau de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire et des facteurs adipogéniques, afin de savoir si elle agit uniquement sur la prolifération ou également sur la différenciation. Cette approche nous permettrait également de savoir quelles sont les voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes.

Nos investigations nous ont permis de comprendre que la PK2 joue un rôle direct sur la prolifération et la différenciation des préadipocytes. Cependant, nous n'avons pas étudié le rôle de la PK2 sur des adipocytes matures. Nous pourrions ainsi envisager que la PK2 puisse avoir un impact sur la dédifférenciation des adipocytes en préadipocytes afin d'augmenter l'hyperplasie du tissu adipeux.

De plus, nous ne nous sommes pas intéressés à la fonction sécrétrice des adipocytes et des préadipocytes. Il est possible que la PK2 induise la sécrétion de facteurs paracrines qui pourraient moduler la prolifération et la différenciation des préadipocytes, voire même stimuler la dédifférenciation des adipocytes en préadipocytes.

Nos résultats *in vivo* nous laissent penser que la souris PKR1<sup>-/-</sup> pourraient être un modèle d'obésité humaine pour expliquer les cas d'obésité hyperplasique. Cependant, étant donné le

phénotype observé au niveau du tissu adipeux, nos investigations sur la souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> mérite d'être menées plus avant. Cette souris pourrait être un bien meilleur modèle que les souris PKR1<sup>-/-</sup> puisque le phénotype du tissu adipeux correspond mieux aux caractéristiques de l'obésité humaine. En effet, la notion d'obésité comme maladie inflammatoire est très importante chez l'Homme et ce paramètre ne peut pas être exclu du modèle animal. Il serait bon d'étudier le phénotype de ces souris à différents âges. Nous pourrions ainsi explorer la morphologie du tissu adipeux pour voir l'évolution au cours du temps. Il serait également intéressant d'analyser le rôle de l'inflammation et de l'angiogenèse dans l'évolution du phénotype de la masse grasse. Il est possible que la vascularisation encore maintenue à 24 semaines ne le soit plus à l'âge de 40 semaines et le phénotype risquerait alors de s'aggraver. De plus, les macrophages présents dans le tissu adipeux des souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup> pourraient y jouer un rôle clé en modulant l'expansion de la masse grasse et celle du réseau vasculaire. Il est possible que les macrophages sécrètent des facteurs paracrines afin de moduler l'angiogenèse, la prolifération des préadipocytes, voire même leur différenciation. Nous envisageons également que les macrophages pourrait être directement impliqués dans l'hyperplasie du tissu adipeux. En effet, il se peut que PKR1 stimule la différenciation des macrophages en préadipocytes, qui pourrait alors se multiplier et se différencier en adipocytes.

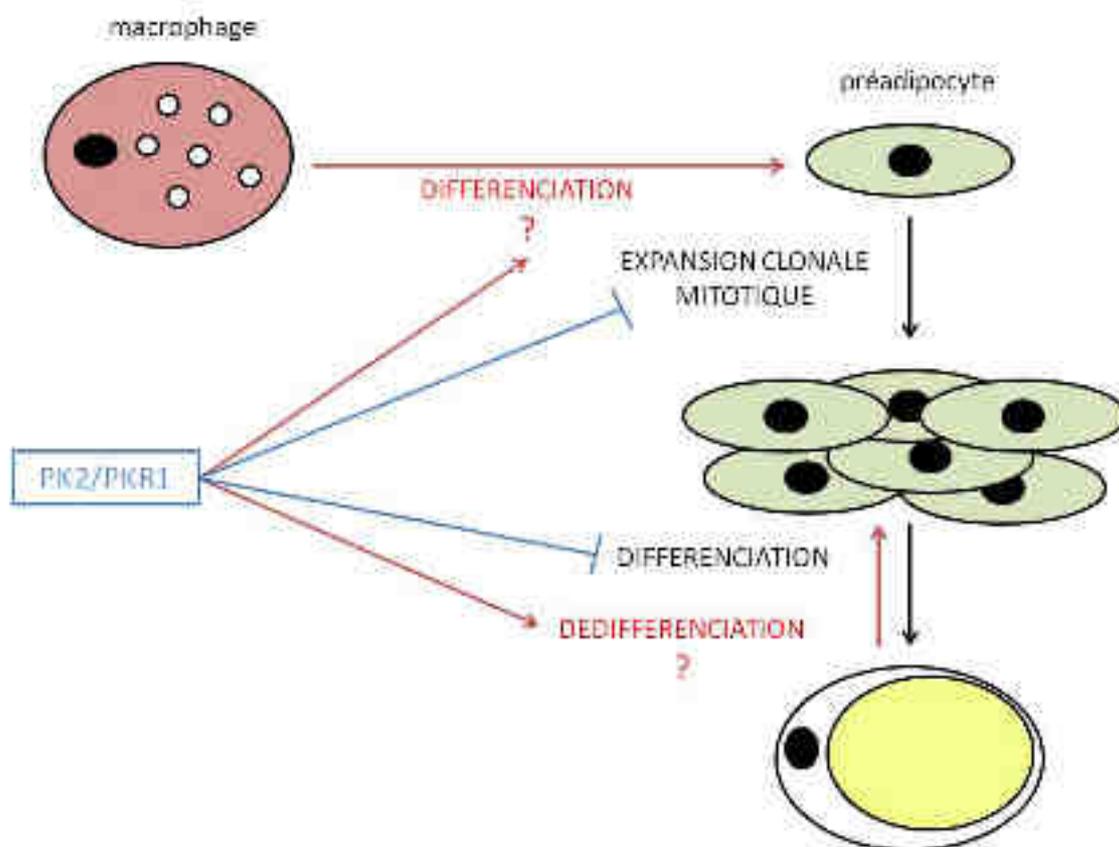


Figure 52 : Rôle de la voie PK2/PKR1 dans l'adipogenèse.

Notre étude du profil métabolique des souris PKR1<sup>-/-</sup> a permis de corrélérer l'évolution de l'insulino-résistance des souris avec celle des personnes obèses. Toutefois, nous ne pouvons négliger le rôle du réseau vasculaire et des organes non-adipeux dans la résistance à l'insuline observée. Nous avons déjà commencé à déterminer le rôle direct de la PK2 au niveau du tissu adipeux par l'étude de la souris aP2-PKR1<sup>-/-</sup>. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail le métabolisme de ces souris afin de déterminer la contribution réelle du tissu adipeux dans les défauts métaboliques observés. De plus, la vascularisation et l'inflammation induites par les macrophages pourraient également influencer le développement de l'insulino-résistance. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de la PK2 au niveau du foie et du pancréas, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Nous pourrions ainsi envisager la création de souris dans lesquelles PKR1 est spécifiquement inactivé dans le foie et le pancréas afin de voir l'implication de ces organes dans le phénotype des souris PKR1<sup>-/-</sup>.

		PKR1 <sup>-/-</sup>		aP2-PKR1 <sup>-/-</sup>	
		15 semaines	40 semaines	24 semaines	40 semaines
Tissu adipeux			- hyperplasie - défaut vasculaire - hypoxie - nécrose	- hyperplasie - maintien de la vascularisation - fibrose - infiltration de macrophages	?
Métabolisme	NFD	- résistance à l'insuline légère - légère modification de la clairance du glucose	- résistance à l'insuline - intolérance au glucose	- sensibilité à l'insuline normale - léger défaut de la clairance du glucose	?
	HFD	- WT : profil similaire à PKR1 <sup>-/-</sup>	- WT : profil similaire à PKR1 <sup>-/-</sup>	?	?

**Tableau 2.: Effet de l'inactivation de PKR1 dans les modèles murins**

A l'heure actuelle, l'identification d'une cible thérapeutique permettant de réduire l'obésité est primordiale. Les récepteurs couplés aux protéines G étant les cibles médicamenteuses les plus répandues, les récepteurs des prokinétines constituent donc une cible d'intérêt dans l'étude de l'obésité. Nos investigations ouvrent donc une nouvelle voie d'étude de la physiopathologie de l'obésité et de la contribution de cette dernière dans le développement de l'insulino-résistance. Les résultats obtenus permettent d'envisager un rôle de la PK2 et de son récepteur PKR1 dans le traitement et/ou le pronostic de l'obésité. En effet, il serait intéressant de savoir si la PK2 est capable de réverser l'obésité observé chez les souris. Nous pourrions envisager l'injection de PK2 recombinante ou de l'ADN codant pour PKR1 au niveau du tissu adipeux afin d'induire une

diminution de la masse grasse et restaurer le défaut métabolique. Ce type de traitement pourrait ensuite être transposé chez l'Homme afin de vaincre l'obésité.

De plus, les obésités humaines pouvant aussi être dues à des mutations génétiques, il serait intéressant d'étudier les mutations de PKR1 au niveau du tissu adipeux humain afin de déterminer si ces mutations peuvent être considérées comme un nouveau facteur de risque de l'obésité hyperplasique. Nous aurions alors découvert un nouveau moyen de pronostiquer le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Agno W, Squizzato A, Garcia D, Imberti D** (2006). Epidemiology and risk factors of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 32: 651-8.
- Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F** (2005). Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 42: 1339-48.
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB** (1999). Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 282: 1530-8.
- Amri EZ, Ailhaud G, Grimaldi PA** (1994). Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *J Lipid Res* 35: 930-7.
- Anavi-Goffer S, Fleischer D, Hurst DP, Lynch DL, Barnett-Norris J, Shi S, Lewis DL, Mukhopadhyay S, Howlett AC, Reggio PH, Aboud ME** (2007). Helix 8 Leu in the CB1 cannabinoid receptor contributes to selective signal transduction mechanisms. *J Biol Chem* 282: 25100-13.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y** (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79-83.
- Artemenko Y, Gagnon A, Aubin D, Sorisky A** (2005). Anti-adipogenic effect of PDGF is reversed by PKC inhibition. *J Cell Physiol* 204: 646-53.
- Baar RA, Dingfelder CS, Smith LA, Bernlohr DA, Wu C, Lange AJ, Parks EJ** (2005). Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2(-/-) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E187-93.
- Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL** (1999). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20: 1341-5.
- Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SS** (2004). Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 32: 1040-4.
- Blouin C, Hajdouch E, Dugail I** (2006). [A new look at adipocyte lipid droplets: towards a role in the sensing of triacylglycerol stores?]. *J Soc Biol* 200: 59-65.
- Bockaert J, Pin JP** (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18: 1723-9.
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpenne C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P** (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146: 1764-71.
- Boulberdaa M, Turkeri G, Urayama K, Dormishian M, Szatkowski C, Zimmer L, Messaddeq N, Laugel V, Dolle P, Nebigil CG** (2011). Genetic inactivation of prokineticin receptor-1 leads to heart and kidney disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 842-50.
- Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R** (2005). Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8: 347-54.

- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R** (1998). Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83: 1059-66.
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A** (2008). Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117: 806-15.
- Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhiotovskiy B, Funahashi T, Cao Y** (2004). Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2476-81.
- Brownson RC, Boehmer TK, Luke DA** (2005). Declining rates of physical activity in the United States: what are the contributors? *Annu Rev Public Health* 26: 421-43.
- Buchholz AC, Bugaresti JM** (2005). A review of body mass index and waist circumference as markers of obesity and coronary heart disease risk in persons with chronic spinal cord injury. *Spinal Cord* 43: 513-8.
- Bullock CM, Li JD, Zhou QY** (2004). Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 65: 582-8.
- Camp HS, Ren D, Leff T** (2002). Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 8: 442-7.
- Camp HS, Tafuri SR** (1997). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 10811-6.
- Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K** (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54: 2277-86.
- Cannon B, Nedergaard J** (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359.
- Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y** (2001). Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6390-5.
- Cao Y** (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 117: 2362-8.
- Cao Y** (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 9: 107-15.
- Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, Daviaud D, Guigne C, Valet P** (2005). Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol* 245: 7-9.
- Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK** (2007). Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* 14: 1361-73.

- Ceresa BP, Limbird LE** (1994). Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling. *J Biol Chem* 269: 29557-64.
- Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA** (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135: 798-800.
- Chazenbalk G, Bertolotto C, Heneidi S, Jumabay M, Trivax B, Aronowitz J, Yoshimura K, Simmons CF, Dumesic DA, Azziz R** (2011). Novel pathway of adipogenesis through cross-talk between adipose tissue macrophages, adipose stem cells and adipocytes: evidence of cell plasticity. *PLoS One* 6: e17834.
- Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C** (2005). Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 67: 2070-6.
- Chen XP, Yang W, Fan Y, Luo JS, Hong K, Wang Z, Yan JF, Chen X, Lu JX, Benovic JL, Zhou NM** (2010). Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i). *Br J Pharmacol* 161: 1817-34.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY** (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417: 405-10.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC** (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258-65.
- Cheung WW, Mao P** (2012). Recent advances in obesity: genetics and beyond. *ISRN Endocrinol*: 536905.
- Cinti S** (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 9-15.
- Cinti S** (2006). The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 569-74.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS** (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46: 2347-55.
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI** (1999). Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341: 240-6.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L** (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108: 1875-81.

- Conchon S, Barrault MB, Miserey S, Corvol P, Clauser E** (1997). The C-terminal third intracellular loop of the rat AT1A angiotensin receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal. *J Biol Chem* 272: 25566-72.
- Costanzi S, Siegel J, Tikhonova IG, Jacobson KA** (2009). Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* 15: 3994-4002.
- Cottrell GT, Zhou QY, Ferguson AV** (2004). Prokineticin 2 modulates the excitability of subfornical organ neurons. *J Neurosci* 24: 2375-9.
- Cummings DE, Overduin J** (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117: 13-23.
- Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumie A** (2006). Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 49: 744-7.
- Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpenè C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I** (2006). TNF $\alpha$  up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 20: 1528-30.
- Davis KE, Moldes M, Farmer SR** (2004). The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279: 42453-61.
- del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R, Perrone L** (2001). Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* 50: 2157-60.
- Dhaliwal SS, Welborn TA** (2009). Central obesity and multivariable cardiovascular risk as assessed by the Framingham prediction scores. *Am J Cardiol* 103: 1403-7.
- Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA** (2005). Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 54: 2305-13.
- Digby JE, Montague CT, Sewter CP, Sanders L, Wilkison WO, O'Rahilly S, Prins JB** (1998). Thiazolidinedione exposure increases the expression of uncoupling protein 1 in cultured human preadipocytes. *Diabetes* 47: 138-41.
- DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R** (1998). Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274: R1460-7.
- Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, Attane C, Wanecq E, Guigne C, Bost F, Tanti JF, Laville M, Vidal H, Valet P, Castan-Laurell I** (2010). Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1161-9.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenè C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P** (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437-45.

- Dubern B, Clement K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, Tounian P** (2001). Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr* 139: 204-9.
- Dulac C, Axel R** (1998). Expression of candidate pheromone receptor genes in vomeronasal neurons. *Chem Senses* 23: 467-75.
- Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C** (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8537-41.
- Fain JN** (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74: 443-77.
- Fantuzzi G, Faggioni R** (2000). Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 68: 437-46.
- Farmer SR** (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4: 263-73.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S** (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110: 1093-103.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R** (2001). Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507: 142-6.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R** (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1084-9.
- Ferguson SS** (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24.
- Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F** (2003). Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 162: 1881-93.
- Ferrara N, LeCouter J, Lin R, Peale F** (2004). EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta* 1654: 69-78.
- Flower DR** (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1422: 207-34.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Forbes S, Bui S, Robinson BR, Hochgeschwender U, Brennan MB** (2001). Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4233-7.

**Franchi S, Giannini E, Lattuada D, Lattanzi R, Tian H, Melchiorri P, Negri L, Panerai AE, Sacerdote P** (2008). The prokineticin receptor agonist Bv8 decreases IL-10 and IL-4 production in mice splenocytes by activating prokineticin receptor-1. *BMC Immunol* 9: 60.

**Friedman JM** (2002). The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60: S1-14; discussion S68-84, 85-7.

**Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF** (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2005-10.

**Fuentes P, Acuna MJ, Cifuentes M, Rojas CV** (2010). The anti-adipogenic effect of angiotensin II on human preadipose cells involves ERK1,2 activation and PPARG phosphorylation. *J Endocrinol* 206: 75-83.

**Fukumura D, Ushiyama A, Duda DG, Xu L, Tam J, Krishna V, Chatterjee K, Garkavtsev I, Jain RK** (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* 93: e88-97.

**Gales C, Bouvier M** (2007). [New talk between receptor and trimeric G proteins: "an intertwined body dance"]. *Med Sci (Paris)* 23: 1031-4.

**Gardiner JV, Bataveljic A, Patel NA, Bewick GA, Roy D, Campbell D, Greenwood HC, Murphy KG, Hameed S, Jethwa PH, Ebling FJ, Vickers SP, Cheetham S, Ghatel MA, Bloom SR, Dhillon WS** (2009). Prokineticin 2 is a hypothalamic neuropeptide that potently inhibits food intake. *Diabetes* 59: 397-406.

**Gesta S, Tseng YH, Kahn CR** (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-56.

**Gordon DA** (1997). Recent advances in elucidating the role of the microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein B lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 8: 131-7.

**Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.

**Grimaldi PA** (2001). The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Prog Lipid Res* 40: 269-81.

**Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP** (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 367-77.

**Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R** (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277: 4806-15.

**Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE** (2009). Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29: 4467-83.

- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ** (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2: 239-54.
- Hensrud DD, Klein S** (2006). Extreme obesity: a new medical crisis in the United States. *Mayo Clin Proc* 81: S5-10.
- Hermans E** (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99: 25-44.
- Hirsch J, Batchelor B** (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5: 299-311.
- Hoogerwerf WA** (2006). Prokineticin 1 inhibits spontaneous giant contractions in the murine proximal colon through nitric oxide release. *Neurogastroenterol Motil* 18: 455-63.
- Hube F, Lee YM, Rohrig K, Hauner H** (1999). The phosphodiesterase inhibitor IBMX suppresses TNF-alpha expression in human adipocyte precursor cells: a possible explanation for its adipogenic effect. *Horm Metab Res* 31: 359-62.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F** (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-41.
- Imai T, Jiang M, Kastner P, Chambon P, Metzger D** (2001). Selective ablation of retinoid X receptor alpha in hepatocytes impairs their lifespan and regenerative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4581-6.
- Inazumi T, Shirata N, Morimoto K, Takano H, Segi-Nishida E, Sugimoto Y** (2011). Prostaglandin E(2)-EP4 signaling suppresses adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts via an autocrine mechanism. *J Lipid Res* 52: 1500-8.
- James WP** (2008). The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 263: 336-52.
- Jethwa PH, I'Anson H, Warner A, Prosser HM, Hastings MH, Maywood ES, Ebling FJ** (2008). Loss of prokineticin receptor 2 signaling predisposes mice to torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1968-79.
- Jian X, Clark WA, Kowalak J, Markey SP, Simonds WF, Northup JK** (2001). Gbetagamma affinity for bovine rhodopsin is determined by the carboxyl-terminal sequences of the gamma subunit. *J Biol Chem* 276: 48518-25.
- Jin H, Zastawny R, George SR, O'Dowd BF** (1997). Elimination of palmitoylation sites in the human dopamine D1 receptor does not affect receptor-G protein interaction. *Eur J Pharmacol* 324: 109-16.
- Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speakman JR** (2005). Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr* 82: 941-8.

- Joubert FJ, Strydom DJ** (1980). Snake venom. The amino acid sequence of protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361: 1787-94.
- Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ** (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30: 393-402.
- Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH** (2000). Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8536-41.
- Kamijo Y, Hora K, Kono K, Takahashi K, Higuchi M, Ehara T, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T** (2007). PPARalpha protects proximal tubular cells from acute fatty acid toxicity. *J Am Soc Nephrol* 18: 3089-100.
- Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA** (2007). C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem* 282: 24660-9.
- Kasahara Y, Takayanagi Y, Kawada T, Itoi K, Nishimori K** (2007). Impaired thermoregulatory ability of oxytocin-deficient mice during cold-exposure. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 3122-6.
- Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G** (2003). The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* 4: 469-73.
- Kasuga M** (2006). Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116: 1756-60.
- Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M** (2001). Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 1538: 162-71.
- Kershaw EE, Flier JS** (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-56.
- Kim JB, Spiegelman BM** (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10: 1096-107.
- Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI** (2004). PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114: 823-7.
- Kisliouk T, Podlovni H, Spanel-Borowski K, Ovadia O, Zhou QY, Meidan R** (2005). Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* 146: 3950-8.
- Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB** (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 20: 5479-89.

- Klimcakova E, Moro C, Mazzucotelli A, Lolmede K, Viguerie N, Galitzky J, Stich V, Langin D** (2007). Profiling of adipokines secreted from human subcutaneous adipose tissue in response to PPAR agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 897-902.
- Kobilka BK** (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768: 794-807.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-60.
- Kolakowski LF, Jr.** (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2: 1-7.
- Korbonits M, Trainer PJ, Little JA, Edwards R, Kopelman PG, Besser GM, Svec F, Grossman AB** (1997). Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46: 751-7.
- Krieger-Brauer HI, Kather H** (1995). Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in 3T3 L1-cells. *Biochem J* 307 ( Pt 2): 549-56.
- Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Gruters A** (2003). Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4633-40.
- Lafontan M, Girard J** (2008). Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* 34: 317-27.
- Lalor PA, Mapp PI, Hall PA, Revell PA** (1987). Proliferative activity of cells in the synovium as demonstrated by a monoclonal antibody, Ki67. *Rheumatol Int* 7: 183-6.
- Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ** (1992). Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130: 43-52.
- Langin D, Arner P** (2006). Importance of TNF $\alpha$  and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol Metab* 17: 314-20.
- Langin D, Lucas S, Lafontan M** (2000). Millennium fat-cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks. *Horm Metab Res* 32: 443-52.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M** (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30: 294-309.
- Lau R, Blinn WD, Bonen A, Dyck DJ** (2001). Stimulatory effects of leptin and muscle contraction on fatty acid metabolism are not additive. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E122-9.
- LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N** (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877-84.

- LeCouter J, Lin R, Frantz G, Zhang Z, Hillan K, Ferrara N** (2003a). Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis. *Endocrinology* 144: 2606-16.
- LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, Ferrara N** (2003b). The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2685-90.
- LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N** (2004). Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16813-8.
- Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY** (2001). Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 59: 692-8.
- Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B** (2004). Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 219: 9-15.
- Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY** (2002). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277: 19276-80.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J** (2002). Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360: 57-8.
- Lolmede K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A** (2003). Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 1187-95.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR** (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-84.
- Luquet S** (2008). [What's new in the regulation of eating?]. *Med Sci (Paris)* 24: 680-2.
- Malbon CC** (2004). Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci* 9: 1048-58.
- Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN** (2007). Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18: 66-72.
- Marinissen MJ, Gutkind JS** (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22: 368-76.
- Marques BG, Hausman DB, Martin RJ** (1998). Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol* 275: R1898-908.
- Martinez JA, Aguado M, Fruhbeck G** (2000). Interactions between leptin and NPY affecting lipid mobilization in adipose tissue. *J Physiol Biochem* 56: 1-8.

**Martucci C, Franchi S, Giannini E, Tian H, Melchiorri P, Negri L, Sacerdote P** (2006). Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *Br J Pharmacol* 147: 225-34.

**Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M** (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 396-402.

**Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y** (2006). Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4140-5.

**Mayfield DK, Brown AM, Page GP, Garvey WT, Shriver MD, Argyropoulos G** (2001). A role for the Agouti-Related Protein promoter in obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 568-73.

**McIntire WE, MacCleery G, Garrison JC** (2001). The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J Biol Chem* 276: 15801-9.

**Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M, Feramisco JR** (1993). Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 127-128: 179-86.

**Melchiorri D, Bruno V, Besong G, Ngomba RT, Cuomo L, De Blasi A, Copani A, Moschella C, Storto M, Nicoletti F, Lepperdinger G, Passarelli F** (2001). The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways. *Eur J Neurosci* 13: 1694-702.

**Miller LJ, Dong M, Harikumar KG, Gao F** (2007). Structural basis of natural ligand binding and activation of the Class II G-protein-coupled secretin receptor. *Biochem Soc Trans* 35: 709-12.

**Milligan G, Kostenis E** (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.

**Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB** (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-43.

**Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A** (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110: 349-55.

**Mollay C, Wechselberger C, Mignogna G, Negri L, Melchiorri P, Barra D, Kreil G** (1999). Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 374: 189-96.

**Monnier J, Samson M** (2008). Cytokine properties of prokineticins. *FEBS J* 275: 4014-21.

- Moussa NM, Claycombe KJ** (1999). The yellow mouse obesity syndrome and mechanisms of agouti-induced obesity. *Obes Res* 7: 506-14.
- Nanoff C, Koppensteiner R, Yang Q, Fuerst E, Ahorn H, Freissmuth M** (2006). The carboxyl terminus of the Galpha-subunit is the latch for triggered activation of heterotrimeric G proteins. *Mol Pharmacol* 69: 397-405.
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B** (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E444-52.
- Neer EJ** (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-57.
- Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci M, Margheriti F, Melchiorri P, Vellani V, Tian H, De Felice M, Porreca F** (2006a). Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci* 26: 6716-27.
- Negri L, Lattanzi R, Giannini E, De Felice M, Colucci A, Melchiorri P** (2004). Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats. *Br J Pharmacol* 142: 181-91.
- Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Melchiorri P** (2006b). Modulators of pain: Bv8 and prokineticins. *Curr Neuropharmacol* 4: 207-15.
- Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Melchiorri P** (2007). Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci* 81: 1103-16.
- Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Metere A, Colucci M, Barra D, Kreil G, Melchiorri P** (2002). Nociceptive sensitization by the secretory protein Bv8. *Br J Pharmacol* 137: 1147-54.
- Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY** (2005). Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308: 1923-7.
- Ngan ES, Lee KY, Sit FY, Poon HC, Chan JK, Sham MH, Lui VC, Tam PK** (2007). Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 1773: 536-45.
- Ngan ES, Lee KY, Yeung WS, Ngan HY, Ng EH, Ho PC** (2006). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* 147: 88-95.
- Ngan ES, Shum CK, Poon HC, Sham MH, Garcia-Barcelo MM, Lui VC, Tam PK** (2008). Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 1783: 467-78.
- Ngan ES, Tam PK** (2008). Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1679-84.
- Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P** (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* 48: 101-15.

- Noh DY, Shin SH, Rhee SG** (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1242: 99-113.
- O'Dowd BF, Hnatowich M, Regan JW, Leader WM, Caron MG, Lefkowitz RJ** (1988). Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J Biol Chem* 263: 15985-92.
- Obici S, Rossetti L** (2003). Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology* 144: 5172-8.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M** (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411: 613-7.
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T** (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-61.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS** (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-8.
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K** (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 1304-9.
- Pagano C, Marin O, Calcagno A, Schiappelli P, Pilon C, Milan G, Bertelli M, Fanin E, Andrighetto G, Federspil G, Vettor R** (2005). Increased serum resistin in adults with prader-willi syndrome is related to obesity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4335-40.
- Peltz G, Aguirre MT, Sanderson M, Fadden MK** (2010). The role of fat mass index in determining obesity. *Am J Hum Biol* 22: 639-47.
- Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L** (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48: 1600-6.
- Pin JP, Galvez T, Prezeau L** (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98: 325-54.
- Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF, Jr.** (2007). Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17447-52.
- Postic C, Girard J** (2008). The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 34: 643-8.

- Prabhu Y, Eichinger L** (2006). The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors. *Eur J Cell Biol* 85: 937-46.
- Prentice AM, Jebb SA** (1995). Obesity in Britain: gluttony or sloth? *BMJ* 311: 437-9.
- Prosser HM, Bradley A, Chesham JE, Ebling FJ, Hastings MH, Maywood ES** (2007). Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 648-53.
- Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A** (2008). Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199: 5-19.
- Rajala MW, Scherer PE** (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144: 3765-73.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA** (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-9.
- Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA** (2004). Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 53: 1937-41.
- Ravussin E, Smith SR** (2002). 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* 967: 363-78.
- Redinger RN** (2008). The prevalence and etiology of nongenetic obesity and associated disorders. *South Med J* 101: 395-9.
- Reidy SP, Weber J** (2000). Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125: 285-98.
- Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vidal H** (1999). Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* 48: 699-705.
- Roche E, Farfari S, Witters LA, Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Brun T, Corkey BE, Saha AK, Prentki M** (1998). Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47: 1086-94.
- Rodbell M** (1964). Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-80.
- Rosen ED, MacDougald OA** (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-96.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM** (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-307.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK** (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-63.

- Rosik CH** (2005). Psychiatric symptoms among prospective bariatric surgery patients: rates of prevalence and their relation to social desirability, pursuit of surgery, and follow-up attendance. *Obes Surg* 15: 677-83.
- Rovati GE, Capra V, Neubig RR** (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 71: 959-64.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF** (2002). Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51: 3176-88.
- Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Ritov VB, Menshikova EV, Kelley DE, Hidalgo J, Pedersen BK, Kelly M** (2006). Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes* 55 Suppl 2: S48-54.
- Saillan-Barreau C, Cousin B, Andre M, Villena P, Casteilla L, Penicaud L** (2003). Human adipose cells as candidates in defense and tissue remodeling phenomena. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 502-5.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M** (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 1 page following 696.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J** (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-9.
- Salans LB, Cushman SW, Weismann RE** (1973). Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest* 52: 929-41.
- Salans LB, Horton ES, Sims EA** (1971). Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *J Clin Invest* 50: 1005-11.
- Saltiel AR, Kahn CR** (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- Samson M, Peale FV, Jr., Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N** (2004). Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4078-88.
- Sartipy P, Loskutoff DJ** (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7265-70.
- Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Imamura M, Sekiguchi N, Nakashima N, Nawata H** (2005). Adenovirus-mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice. *Endocrinology* 146: 273-9.
- Schaffer JE** (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14: 281-7.

- Schweitz H, Pacaud P, Diochot S, Moinier D, Lazdunski M** (1999). MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett* 461: 183-8.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM** (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454: 961-7.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM** (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6: 38-54.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA** (2003). Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278: 13740-6.
- Sethi JK, Hotamisligil GS** (1999). The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 10: 19-29.
- Shamseddin MK, Parfrey PS** (2009). Mechanisms of the cardiorenal syndromes. *Nat Rev Nephrol* 5: 641-9.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB** (2006). Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-801.
- Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ** (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1092-101.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H** (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1023-33.
- Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS** (1999). Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 274: 12632-41.
- Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K** (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579: 173-9.
- Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B, Hammarstedt A, Schmelz M, Yang X, Jansson PA, Smith U** (2004). High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res* 12: 454-60.
- Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B** (2005). The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 131: 12-7.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P** (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783-7.
- Spiegelman BM, Hotamisligil GS** (1993). Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. *Cell* 73: 625-7.

- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA** (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-12.
- Sul HS** (2009). Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol* 23: 1717-25.
- Sun S, Liu Y, Lu J, Omar A, Bi Y, Wang C** (2010). The inhibitory effects of PKC $\theta$  on adiponectin expression is mediated by ERK in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol Invest* 34: 8-15.
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG** (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 461-80.
- Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S** (2002). The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1208-12.
- Tanabe Y, Koga M, Saito M, Matsunaga Y, Nakayama K** (2004). Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR $\gamma$ 2. *J Cell Sci* 117: 3605-14.
- Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S** (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J* 16: 7432-43.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD** (2003). Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 44-9.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD** (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9607-11.
- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM** (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322: 583-6.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M** (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 471-6.
- Thirone AC, Huang C, Klip A** (2006). Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17: 72-8.
- Thompson BR, Lobo S, Bernlohr DA** (2009). Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol* 318: 24-33.
- Tilg H, Moschen AR** (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 772-83.
- Trayhurn P, Beattie JH** (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60: 329-39.
- Trayhurn P, Wood IS** (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92: 347-55.

- Tso P, Nauli A, Lo CM** (2004). Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 32: 75-8.
- Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA, Conn PM** (1999). Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res* 30: 420-35.
- Urayama K, Dedeoglu DB, Guilini C, Frantz S, Ertl G, Messaddeq N, Nebigil CG** (2009). Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res* 81: 28-37.
- Urayama K, Guilini C, Messaddeq N, Hu K, Steenman M, Kurose H, Ert G, Nebigil CG** (2007). The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J* 21: 2980-93.
- Urayama K, Guilini C, Turkeri G, Takir S, Kurose H, Messaddeq N, Dierich A, Nebigil CG** (2008). Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 841-9.
- Vellani V, Colucci M, Lattanzi R, Giannini E, Negri L, Melchiorri P, McNaughton PA** (2006). Sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 by the prokineticin receptor agonist Bv8. *J Neurosci* 26: 5109-16.
- Villena JA, Kim KH, Sul HS** (2002). Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm Metab Res* 34: 664-70.
- Wajchenberg BL** (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21: 697-738.
- Wallenius K, Wallenius V, Sunter D, Dickson SL, Jansson JO** (2002). Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 560-5.
- Wang Y, Iordanov H, Swietlicki EA, Wang L, Fritsch C, Coleman T, Semenkovich CF, Levin MS, Rubin DC** (2005). Targeted intestinal overexpression of the immediate early gene *tis7* in transgenic mice increases triglyceride absorption and adiposity. *J Biol Chem* 280: 34764-75.
- Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS** (2006). Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr* 136: 2953-6.
- Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS** (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 174: 801-9.
- Wechselberger C, Puglisi R, Engel E, Lepperdinger G, Boitani C, Kreil G** (1999). The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett* 462: 177-81.
- Weir GC, Bonner-Weir S** (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3: S16-21.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-808.

- Wellen KE, Hotamisligil GS** (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1785-8.
- Wettschureck N, Offermanns S** (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-204.
- WHO** (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253.
- Wilborn C, Beckham J, Campbell B, Harvey T, Galbreath M, La Bounty P, Nassar E, Wismann J, Kreider R** (2005). Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. *J Int Soc Sports Nutr* 2: 4-31.
- Williams KV, Kelley DE** (2000). Metabolic consequences of weight loss on glucose metabolism and insulin action in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2: 121-9.
- Wong SK** (2003). G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals* 12: 1-12.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM** (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3: 151-8.
- Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, Feldmann HM, Liang Z, Zhu Z, Nedergaard J, Cannon B, Cao Y** (2009). Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab* 9: 99-109.
- Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, Yamashita S, Yamauchi T, Sekine N, Nagai R, Noda M, Kadowaki T** (2004). Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a beta-cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c. *Endocrinology* 145: 3566-77.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T** (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-6.
- Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL** (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9: 168-81.
- Zick Y** (2003). Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S56-60.
- Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D, Zechner R** (2003). Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* 44: 2089-99.



Cécilia SZATKOWSKI

## Rôle de la prokinéticine-2 dans le tissu adipeux



### Résumé

L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses maladies telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. La prokinéticine-2 a été caractérisée comme une hormone anorexigène qui joue un rôle dans la régulation de l'appétit et le métabolisme énergétique via une action sur le récepteur PKR2 au niveau centrale. Cette étude consiste à étudier l'implication de la PK2 et de PKR1 dans le tissu adipeux et dans la physiopathologie de l'obésité.

Les souris PKR1<sup>-/-</sup> dans lesquelles le gène codant pour PKR1 est totalement inactivé, présentent une obésité par hyperplasie, du fait de la prolifération des préadipocytes. Les souris PKR1<sup>-/-</sup> présentent un état diabétique, avec une insensibilité à l'insuline accrue et une forte intolérance au glucose. Les souris  $\alpha$ P2-PKR1<sup>-/-</sup> dans lesquelles PKR1 est spécifiquement inactivé dans le tissu adipeux, présentent, elle aussi, une obésité hyperplasique, due de la prolifération des préadipocytes. In vitro, nos résultats montrent que la PK2 est capable d'inhiber la différenciation des préadipocytes en inhibant la prolifération des préadipocytes lors de la phase d'expansion clonale mitotique.

Nos résultats permettent d'envisager un rôle de la PK2 et de son récepteur PKR1 dans le traitement de l'obésité.

Mots-clé : prokinéticine-2, tissu adipeux, obésité, insuline, diabète, prolifération adipocytaire, différenciation adipocytaire

### Résumé en anglais

Obesity is a risk factor for various disorders such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases. The prokineticins, prokineticin-1 and prokineticin-2 bind two similar G protein-coupled receptors, PKR1 and PKR2. Prokineticin-2 is an anorexigenic hormone that plays a role in appetite regulation and energy metabolism, via a direct hypothalamic mechanism. Since adipocytes express mainly PKR1, we investigated the role of PKR1 in adipocyte functions.

PKR1-null mutant mice exhibit increased body weight that is due to an increased visceral fat mass. Mutant adipose tissue is characterized by adipocyte hyperplasia due to an increase in number of proliferating preadipocyte. Mutant adipocytes exhibit downregulation of insulin signaling that is associated with glucose and insulin tolerance. Adipocyte-specific  $\alpha$ P2-PKR1 knockout mice present also an increased visceral adipose tissue that lead to a slight increased body weight. Fat mass is also characterized by an hyperplasia and an increased preadipocyte proliferation. This mice present slight metabolic changes. Utilizing 3T3-L1 murine preadipocytes, our study reveals that prokineticin-2 exerts an anti-adipogenic function in murine cells. Inhibition of adipogenesis mediated by prokineticin-2 involved PKR1. Prokineticin-2 also inhibits proliferation of preadipocytes.

These results suggest that prokineticin-2 via PKR1 signaling plays a crucial role in adipogenesis and adipose tissue hyperplasia.

Keywords : prokineticin-2, adipose tissue, obesity, insulin, diabete, adipocyte proliferation, adipocyte differentiation