



HAL
open science

Rôle de l'hyperactivité sympathique dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Gaëlle Aubertin-Kirch

► **To cite this version:**

Gaëlle Aubertin-Kirch. Rôle de l'hyperactivité sympathique dans la physiopathologie du syndrome métabolique. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ031 . tel-01703233

HAL Id: tel-01703233

<https://theses.hal.science/tel-01703233>

Submitted on 7 Feb 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire
(EA7296)**

THÈSE présentée par :

Gaëlle AUBERTIN-KIRCH

soutenue le : **23 juin 2017**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Rôle de l'hyperactivité sympathique dans la
physiopathologie du syndrome métabolique**

THÈSE dirigée par :

Madame NIEDERHOFFER Nathalie

MCU, Faculté de Médecine,
Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur HEYMES Christophe

Directeur de recherche, Institut des
Maladies Métaboliques et
Cardiovasculaires, Université de
Toulouse

Monsieur ANDRIANTSITOHAINA Ramaroson

Directeur de recherche, Institut du
Stress oxydant et pathologies
métaboliques, Université d'Angers

EXAMINATEUR :

Madame JEANDIDIER Nathalie

PU-PH, Faculté de Médecine,
Université de Strasbourg

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :

M. les Docteurs Christophe Heymes et Andriantsitohaina Ramaroson pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et pour votre contribution à l'amélioration de sa qualité scientifique.

Mme le Professeur Nathalie Jeandidier, qui a bien voulu examiner ce travail en tant qu'examinateur, pour vos encouragements et vos conseils.

Je remercie tout particulièrement Mme le Docteur Nathalie Niederhoffer, ma directrice de thèse, pour m'avoir confié ce projet, pour m'avoir accordée sa confiance et laissée une grande autonomie dans mes recherches. A son contact, j'ai appris la rigueur scientifique et à aller toujours plus loin dans la recherche.

Je remercie également le Professeur Laurent Monassier pour m'avoir accueillie dans son équipe et contribuer à ma formation, tant sur le plan scientifique que humain. Merci pour les conseils scientifiques et le regard toujours critique pour faire avancer mes résultats.

Je souhaite également remercier toute l'équipe du *Preclinical Imaging Lab* pour notre travail sur le micro-CT : Ariane, Catherine, Fabien, Jean-Philippe, Christian, pour toutes ces années à échanger sur nos problèmes de segmentation et pour vos conseils avisés. Je remercie particulièrement Amira, pour son dévouement, sa bonne humeur et son sens de l'organisation. Sans elle, mes manips auraient été beaucoup plus longues. Merci également au Docteur Philippe Choquet pour toutes ces années, pour son expertise, pour ses précieux conseils, son soutien dans la réalisation de ces travaux et son regard constructif sur mes résultats.

Merci à toute l'équipe du Département d'Ecologie, Physiologie et Ethologie (DEPE) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC, Strasbourg), et en particulier Mm Isabelle Chery et M. Alexandre Zahariiev pour leur aide technique et logistique sur la bio-impédance et la dilution isotopique, ainsi que leur disponibilité.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Mmes Ghina Bou About, de la plateforme cardiovasculaire, et Olivia Wendling, de la plateforme d'histologie de l'Institut Clinique de la Souris (ICS-Strasbourg) pour leur aide technique et logistique, ainsi que leur disponibilité.

Je souhaiterais remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire (EA 7296) pour ces quatre années passées ensemble, pour nos échanges et le soutien mutuel aussi bien dans les moments dans les moments de joie que dans les moments plus durs. Merci au Professeur Pascal Bousquet pour son expertise du syndrome métabolique et ses conseils scientifiques. Merci à M. Hugues Greney pour son expertise technique et sa contribution à ma formation scientifique. Merci à mes collègues thésards Roland Lawson, et surtout Maud Weiss, co-thésarde du syndrome métabolique, pour nos échanges passionnés et notre collaboration. Merci à Mmes Sylvia Mutterer et Denise Jung pour leur sympathie et leur disponibilité. Je remercie également Magali, Florian, Marlène, Samson et Alizée pour votre passage dans notre laboratoire, votre bonne humeur et votre contribution à ce travail. Merci à Mme Sylvia Da Silva pour sa gentillesse, sa sympathie et son aide très précieuse. Merci également à Mme Claudia de Tapia, pour sa joie de vivre et pour nos sorties sportives, ou non, qui redonnent du courage. Enfin, je tiens à remercier de tout cœur le Docteur Estelle Ayme-Dietrich avec qui j'ai partagé le bureau, le poste, et tellement plus. Merci pour ton soutien, ton aide, ta gentillesse, tes conseils, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Je te souhaite plein de réussite pour le futur.

Et finalement je remercie toute ma famille, mes parents, mon mari pour leur soutien indéfectible à travers toutes ces années. Merci particulièrement à Arnaud, mon amour pour son courage à me supporter, son écoute surtout ces derniers mois...

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	10
Liste des annexes.....	12
Liste des abréviations.....	13
Introduction Générale	17
Revue bibliographique :	21
Le système nerveux sympathique, son rôle physiologique et son implication dans le syndrome métabolique.....	21
I. Le système nerveux sympathique et son rôle physiologique.....	22
A. Organisation générale du système nerveux autonome.....	22
1. Définition du système nerveux autonome.....	22
2. Efférences du système nerveux autonome.....	22
a) Voies efférentes du système nerveux parasympathique.....	23
b) Voies efférentes du système nerveux sympathique.....	23
3. Neurotransmetteurs impliqués dans la transmission sympathique.....	24
a) Synthèse et dégradation de la noradrénaline et de l'adrénaline.....	25
b) Sécrétion et recapture.....	27
4. Récepteurs adrénergiques.....	29
a) Récepteurs α_1 -adrénergiques.....	29
b) Récepteurs α_2 -adrénergiques.....	30
c) Récepteurs β -adrénergiques.....	31
B. Rôles physiologiques du système nerveux sympathique.....	33
1. Dans le muscle cardiaque.....	33
2. Dans les vaisseaux.....	35
3. Dans le tissu adipeux.....	36
4. Dans le pancréas.....	39
5. Dans le foie.....	41
II. Implication du système nerveux sympathique dans le syndrome métabolique.....	44
A. Définitions du syndrome métabolique.....	44
1. Définition par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).....	45

2.	Définition par l' European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR).....	45
3.	Définition par le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III)	46
4.	Définition par l'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE).....	46
5.	Définition par l'American Heart Association (AHA)/National Heart, Lung and Blood Institute.....	47
6.	Définition par l'International Diabetes Federation (IDF)	47
B.	Liens entre troubles cardio-métaboliques et hyperactivité sympathique	50
1.	Obésité et hyperactivité sympathique	50
2.	Hypertension artérielle et hyperactivité sympathique	51
3.	Troubles du métabolisme lipidique et hyperactivité sympathique.....	53
4.	Troubles du métabolisme glucidique et hyperactivité sympathique	55
C.	Hyperactivité sympathique comme cause des troubles métaboliques ?.....	56
III.	Objectifs du travail de thèse	60
	Résultats expérimentaux	63
	Partie I : Comparaison de l'impédancemétrie et de la microtomodensitométrie pour la mesure de la masse grasse totale chez la souris	64
I.	Introduction	64
II.	Article.....	65
III.	Conclusion.....	89
	Partie II : Hyperactivité sympathique chronique et syndrome métabolique	91
I.	Etude de l'influence d'une hyperactivité sympathique chronique sur le développement d'un syndrome métabolique	91
A.	Introduction	91
B.	Animaux et méthodes.....	92
1.	Modèle expérimental.....	92
2.	Etude de la sensibilité des récepteurs adrénergiques	92
a)	Etude <i>ex vivo</i> de la sensibilité des récepteurs α_1 et β_2 -adrénergiques.....	93
b)	Etude <i>in vivo</i> de la sensibilité des récepteurs β_1 -adrénergiques	93
3.	Suivi expérimental.....	94
4.	Recueil d'urines et dosage des catécholamines urinaires.....	94
5.	Test de tolérance au glucose.....	95
6.	Test de sensibilité à l'insuline	95

7.	Prélèvements sanguins	96
8.	Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque	96
9.	Mesure de la masse grasse et de la masse maigre par microtomodensitométrie.....	97
10.	Mesures en fin d'étude	98
11.	Etude de la signalisation cellulaire de l'insuline	99
	a) Dans le tissu pancréatique	99
	b) Dans le tissu hépatique	100
12.	Analyse statistique des données	101
C.	Résultats	101
1.	Etude de la sensibilité des récepteurs adrénergiques	101
	a) Sensibilité des récepteurs α_1 - et β_2 -adrénergiques	101
	b) Sensibilité des récepteurs β_1 -adrénergiques	102
2.	Suivi de la masse corporelle des animaux et de la consommation alimentaire.....	103
3.	Evaluation de l'activité sympathique	104
4.	Effet de l'hyperactivité sympathique sur les paramètres lipidiques.....	106
5.	Effet de l'hyperactivité sympathique sur les paramètres cardiovasculaires.....	107
6.	Effet de l'hyperactivité sympathique sur la proportion de masse grasse et la répartition du tissu adipeux	108
7.	Effet de l'hyperactivité sympathique sur les paramètres glucidiques	108
	a) Bilan glucidique à jeun : glycémie, insulinémie et HOMA-IR.....	108
	b) Test de tolérance au glucose.....	111
	c) Test de sensibilité à l'insuline	114
8.	Effet de l'hyperactivité sympathique sur la signalisation cellulaire de l'insuline..	115
	a) Dans le tissu pancréatique	115
	b) Dans le tissu hépatique	117
D.	Conclusion.....	118
II.	Etude de l'effet d'un régime enrichi associé à une hyperactivité sympathique chronique sur le développement d'un syndrome métabolique.....	120
A.	Introduction	120
B.	Animaux et méthode	121
1.	Modèle expérimental.....	121
2.	Suivi expérimental.....	122
3.	Analyses statistiques des données	123

C.	Résultats	124
1.	Suivi de la masse corporelle et de la consommation de nourriture et de boisson ..	124
2.	Evaluation de l'activité sympathique	125
3.	Effets du régime sur les paramètres cardiovasculaires.....	126
4.	Effets du régime sur le bilan lipidique	127
5.	Effet du régime sur la proportion de masse grasse et la répartition du tissu adipeux 129	
6.	Effet du régime sur les paramètres glucidiques	130
a)	Bilan glucidique à jeun : glycémie, insulinémie et HOMA-IR.....	130
b)	Test de tolérance au glucose.....	132
c)	Test de sensibilité à l'insuline	134
7.	Effet du régime sur la signalisation intracellulaire de l'insuline.....	135
D.	Conclusion.....	136
III.	Discussion générale des résultats et perspectives.....	139
A.	Choix du modèle et de la méthode de mesure de l'hyperactivité sympathique	139
1.	Choix des animaux	139
a)	Souris NET	139
b)	Autre modèle génétiquement modifié d'hyperactivité sympathique : les souris invalidées pour les gènes des récepteurs α_2	141
2.	Choix de la mesure de l'activité sympathique.....	142
3.	Choix du régime enrichi	144
B.	Hyperactivation sympathique et développement de troubles métaboliques	146
1.	Effets sur les lipides et le tissu adipeux.....	147
2.	Effets sur les paramètres cardiovasculaires.....	149
3.	Effets sur les paramètres glucidiques	150
	Conclusion	154
	Références bibliographiques	158
	A	158
	B	159
	Annexes	182
	Publications et communications.....	188
	Résumé :.....	192
	Abstract:.....	192

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes définitions du syndrome métabolique.	49
Tableau 2 : Caractéristiques des anticorps anti-AKT et AKT phosphorylé utilisés en Western-Blot.	100
Tableau 3 : Analyse de la masse grasse chez les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} à l'âge de 40 semaines (Moyennes ± SEM)	108
Tableau 4 : Dosage de la glycémie à jeun chez les souris NET en fonction de leur âge.	109
Tableau 5 : Bilan lipidique des souris NET ^{+/+} et NET ^{+/-} après 15 semaines de régime normal ou enrichi en fructose.	127
Tableau 6 : Analyse de la masse grasse chez les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} après 15 semaines de régime enrichi en fructose (Moyennes ± SEM)	129
Tableau 7 : Bilan glucidique des souris NET ^{+/+} et ^{+/-} après 15 semaines de régime normal ou enrichi en fructose.	131
Tableau 8 : Résumé des résultats obtenus sur les différents paramètres entre les souris contrôles (NET^{+/+}) et les souris avec une hyperactivité sympathique (NET^{+/-}) soumises à un régime enrichi en fructose à 30% dans l'eau de boisson	137
Tableau 9 : Résumé des résultats obtenus sur les différents paramètres pour les souris avec une hyperactivité sympathique (NET^{+/-} et NET^{-/-}) par rapport aux souris NET^{+/+} à l'âge de 25 semaines.	146

Liste des figures

Figure 1 : Organisation des systèmes nerveux parasympathique et sympathique	23
Figure 2 : Voies efférentes du système nerveux autonome.....	24
Figure 3 : Biosynthèse des catécholamines (d'après Flatmark 2000).....	26
Figure 4 : Stimulation sympathique de la cellule musculaire cardiaque ventriculaire ...	34
Figure 5 : Régulation sympathique de la lipolyse au niveau des adipocytes	38
Figure 6 : Contrôle de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques	41
Figure 7 : Stimulation sympathique de la glycogénolyse hépatique.....	42
Figure 8 : Schéma de synthèse des effets des acides gras libres et boucle d'auto-activation du SNS.....	54
Figure 9 : Rôle de l'hyperactivité sympathique dans le contrôle métabolique.....	60
Figure 10 : Schéma du protocole expérimental	94
Figure 11 : Segmentation du tissu adipeux abdominal du tissu adipeux sous-cutané par μ TDM.....	98
Figure 12 : Etude fonctionnelle de la sensibilité des récepteurs a) α_1 -adrénergiques et b) β_2 -adrénergiques chez les souris NET.....	102
Figure 13 : Variation de la fréquence cardiaque après injection de dobutamine chez les souris NET.....	103
Figure 14 : Suivi de la masse corporelle des souris NET au cours du temps.....	104
Figure 15 : Evolution des catécholamines urinaires des souris NET en fonction du génotype.....	105
Figure 16 : Taux de NA plasmatique à 40 semaines des souris NET en fonction du génotype.....	105
Figure 17 : Paramètres lipidiques des souris NET au cours du temps.....	106
Figure 18 : Paramètres cardiovasculaires des souris NET au cours du temps.....	107
Figure 19 : Insulinémie à jeun des souris NET au cours du temps.....	110
Figure 20 : HOMA-IR des souris NET au cours du temps.....	111
Figure 21 : Test de tolérance au glucose (IPGTT) des souris NET.....	112
Figure 22 : Test de tolérance au glucose et sécrétion d'insuline des souris NET à 40 semaines.....	114
Figure 23 : Test de sensibilité à l'insuline (ITT) des souris NET.....	115
Figure 24 : Analyse du contenu en insuline des îlots de Langerhans par immuno- histochimie.....	116

Figure 25 : Analyse de la présence des transporteurs GLUT2 dans les îlots de Langerhans par immuno-histochimie.	117
Figure 26 : Rapport AKT phosphorylé/AKT dans les tissus hépatiques de souris NET +/+ et NET +/-, après stimulation à l'insuline.	118
Figure 27 : Schéma du protocole expérimental	123
Figure 28 : Suivi de l'évolution des souris NET +/+ et +/- sous régime normal et enrichi en fructose.	125
Figure 29 : Taux de NA plasmatique à 40 semaines.	126
Figure 30 : Paramètres cardiovasculaires au bout des 15 semaines de régime.	127
Figure 31 : Variation des taux de a) cholestérol total et b) triglycérides après les 15 semaines de régime.	128
Figure 32 : Proportion de masse grasse totale chez les souris NET +/+ et NET +/- en fonction du régime.	130
Figure 33 : Evolution de l'HOMA-IR chez les souris a) NET +/+ et b) NET +/- avant et à la fin du régime normal ou enrichi en fructose.	132
Figure 34 : Test de tolérance au glucose (IPGTT) des souris NET après 15 semaines de régime.	133
Figure 35 : Test de tolérance au glucose et sécrétion d'insuline des souris NET après 15 semaines de régime.	134
Figure 36 : Test de sensibilité à l'insuline (ITT) des souris NET après 15 semaines de régime.	135
Figure 37 : Rapport AKT-phosphorylé/AKT dans les tissus hépatiques de souris NET +/+ et NET +/- après 15 semaines de régime et stimulation à l'insuline.	136
Figure 38 : Hypothèse de l'action de l'hyperactivité sympathique dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.	156
Figure 39 : Photo d'un gel d'électrophorèse illuminé par lumière UV.	184

Liste des annexes

Annexe 1 : Protocole de géotypage	183
Annexe 2 : Protocole de Western-Blot du LNPCV	185

Liste des abréviations

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
Ach	Acétylcholine
AC	Adénylate cyclase
AHA	American Heart Association
AKT	Protéine Kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide RiboNucleique messenger
AUC	Area Under the Curve
BH4	Tétrahydrobioptérine
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COMT	Catéchol-O-Méthyl Transférase
DAG	Diacyglycérol
DBH	Dopamine β -hydroxylase
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
Epacs	Protéines d'échanges activées par l'AMPC
FC	Fréquence Cardiaque
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HDL-C	High density lipoprotein-Cholestérol
HTA	Hypertension artérielle
IDF	International Diabetes Federation
IkkB	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta
IL6	Interleukine 6
IMC	Indice de Masse Corporelle
ip	Intrapéritonéal

IP ₃	Inositol-1, 4, 5- triphosphate
IPGTT	Test de Tolérance au Glucose en IntraPéritonéal
IRS-1	Substrat 1 du récepteur à l'insuline
ITT	Test de sensibilité à l'Insuline
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
iv	Intraveineux
Jnk1	C-jun N-terminal kinase 1
KO	Knock-Out
LDL-C	Low density lipoprotein-Cholestérol
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phénylalanine
LHS	Lipase hormonosensible
MAO	Monoamine oxidase
MIBG	Méta-Iodo-Benzyl-Guanidine
NOS (eNOS)	Nitric Oxide Synthase (NOS endothéliale)
μTDM	Micro-Tomodensitométrie
NA	Noradrénaline
NCEP-ATPIII	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NET	Norepinephrine Transporter ou Transporteur de recapture de la noradrénaline
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAS	Pression Artérielle Systolique
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PNMT	Phényléthanolamine N-Méthyl Transférase

PTB	Plateau Technique de Biologie
SEM	Ecart-type standard à la moyenne
SERT	Transporteur de la sérotonine
SHHF	Spontaneously hypertensive heart failure
SNA	Système Nerveux Autonome
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Parasymphatique
SNS	Système Nerveux Sympathique
SHROB	Spontaneously hypertensive obese Koletsky rat
TG	TriGlycérides
TH	Tyrosine Hydroxylase
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRPM2	Transient Receptor Potential Melastatin 2
VAMT	Vesicular MonoAmine Transporter

Introduction Générale

Le syndrome métabolique est une pathologie complexe qui combine le développement en parallèle de plusieurs troubles, aussi bien cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, que métaboliques comme une insulino-résistance, une intolérance au glucose, des dyslipidémies et une obésité abdominale. La prévalence du syndrome métabolique est en constante augmentation depuis la fin du vingtième siècle ce qui en fait un problème majeur de santé publique. De façon préoccupante, cette pathologie qui touchait initialement la population adulte, concerne de plus en plus d'adolescents ce qui renforce son côté préoccupant.

Malgré des années de recherche, les mécanismes responsables du développement du syndrome métabolique ne sont pas encore totalement identifiés. Par conséquent, la prise en charge actuelle des patients consiste à traiter chacun des symptômes de façon indépendante avec association de règles hygiéno-diététiques et, souvent, de plusieurs thérapeutiques : antihypertenseurs, médicaments du diabète de type 2, ou encore des hypolipémiants. La découverte d'un mécanisme unique sous-tendant le développement de tous les troubles cardio-métaboliques du syndrome métabolique permettrait d'envisager le développement d'un traitement spécifique et global de cette pathologie. Par ailleurs, cela pourrait également permettre de proposer de nouvelles pistes de recherche de marqueurs permettant le dépistage précoce de patients à risque.

S'il semble à peu près évident qu'une activation du système nerveux sympathique est liée au développement de l'hypertension artérielle, plusieurs travaux, y compris dans notre laboratoire, ont montré chez l'homme et dans des modèles murins qu'une hyperactivation sympathique peut être également associée aux différents troubles métaboliques de manière isolée. Toutefois, la relation causale entre ces deux entités n'est pas encore établie : est-ce le syndrome métabolique qui conduit à une hyperactivation du système nerveux sympathique ? Ou est-ce que l'installation d'une hypersympathicotonie chronique pourrait être la cause du syndrome métabolique ?

Notre sujet de recherche consiste donc à étudier si l'augmentation chronique constitutive de l'activité nerveuse sympathique est une condition suffisante au développement d'un syndrome métabolique ou s'il pourrait s'agir d'un facteur de risque aggravant. Les conséquences métaboliques de cette augmentation de l'activité sympathique ont été étudiées dans un modèle de souris génétiquement modifiées. Chez ces animaux, le gène du transporteur de recapture de la noradrénaline (NET) a été délété ce qui induit une augmentation des concentrations de catécholamines circulantes et donc une hypersympathicotonie chronique.

Ainsi, mon projet de thèse s'est fixé trois objectifs :

Développer une méthode de suivi par imagerie de la répartition de la masse grasse associé à une mesure du rapport masse grasse/masse maigre chez la souris.

Etudier l'influence d'une hyperactivation sympathique sur le développement d'un syndrome métabolique dans un modèle murin de souris génétiquement modifiées et présentant une hyperactivité sympathique : des souris dont le gène codant pour le transporteur de la noradrénaline a été invalidé.

Etudier si la présence d'une hyperactivation sympathique constitue un facteur aggravant sur le développement d'un syndrome métabolique dans notre modèle murin d'hyperactivité sympathique et soumis à un régime enrichi.

Revue bibliographique :

Le système nerveux sympathique, son rôle physiologique et son implication dans le syndrome métabolique

I. Le système nerveux sympathique et son rôle physiologique

A. Organisation générale du système nerveux autonome

1. Définition du système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (SNA) correspond à la portion du système nerveux qui régule la vie végétative permettant le maintien de l'homéostasie dans l'organisme. Au contraire du système nerveux somatique, son activité est totalement indépendante de la volonté et il va fonctionner de façon autonome pour accorder les fonctions des organes internes aux besoins de l'organisme. Il contrôle, par exemple, la contraction ou la relaxation des muscles lisses, l'activité cardiaque, respiratoire, le métabolisme énergétique et les sécrétions exocrines et endocrines.

Le SNA est lui-même divisé en deux composantes : le système nerveux parasympathique (SNP) et le système nerveux (ortho)sympathique (SNS). Généralement, ceux-ci vont innervier les mêmes organes mais avec des actions antagonistes permettant un fonctionnement en équilibre. Ainsi le SNP a plutôt un rôle dans le stockage des réserves et l'économie d'énergie alors que le SNS nous permet de libérer de l'énergie pour mobiliser l'organisme face à un exercice physique ou à une situation de stress.

2. Efférences du système nerveux autonome

Les voies nerveuses efférentes ou motrices du SNA comprennent deux neurones organisés en série, un neurone pré-ganglionnaire, dont le corps cellulaire est situé dans le système nerveux central (SNC), et un neurone post-ganglionnaire, dont le corps cellulaire se trouve dans le ganglion parasympathique ou sympathique.

a) Voies efférentes du système nerveux parasympathique

Pour le SNP, les corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires se situent soit dans le tronc cérébral avec projection des fibres dans les nerfs crâniens (III, VII, IX et X), soit dans la moelle épinière sacrée au niveau des racines S2, S3 et S4 (voir figure 1). Le ganglion parasympathique se situant à proximité de l'organe cible, les fibres nerveuses post-ganglionnaires sont très courtes. Cette caractéristique anatomique explique l'action localisée du SNP. Le neurotransmetteur du SNP impliqué aussi bien en pré-ganglionnaire qu'en post-ganglionnaire, est l'acétylcholine (ACh). Celle-ci agira respectivement sur des récepteurs nicotiques ou muscariniques.

b) Voies efférentes du système nerveux sympathique

Dans le SNS, les corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires sont localisés dans la corne latérale de la moelle épinière thoracique et lombaire. Contrairement au SNP, les fibres pré-ganglionnaires sont généralement courtes et aboutissent au niveau des ganglions sympathiques qui se situent de part et d'autre de la colonne vertébrale, et sont reliés entre eux de façon à former une chaîne ganglionnaire de la base du crâne au sacrum (voir figure 1). Les fibres post-ganglionnaires, plus longues et plus nombreuses que les fibres pré-ganglionnaires se terminent à proximité des organes cibles.

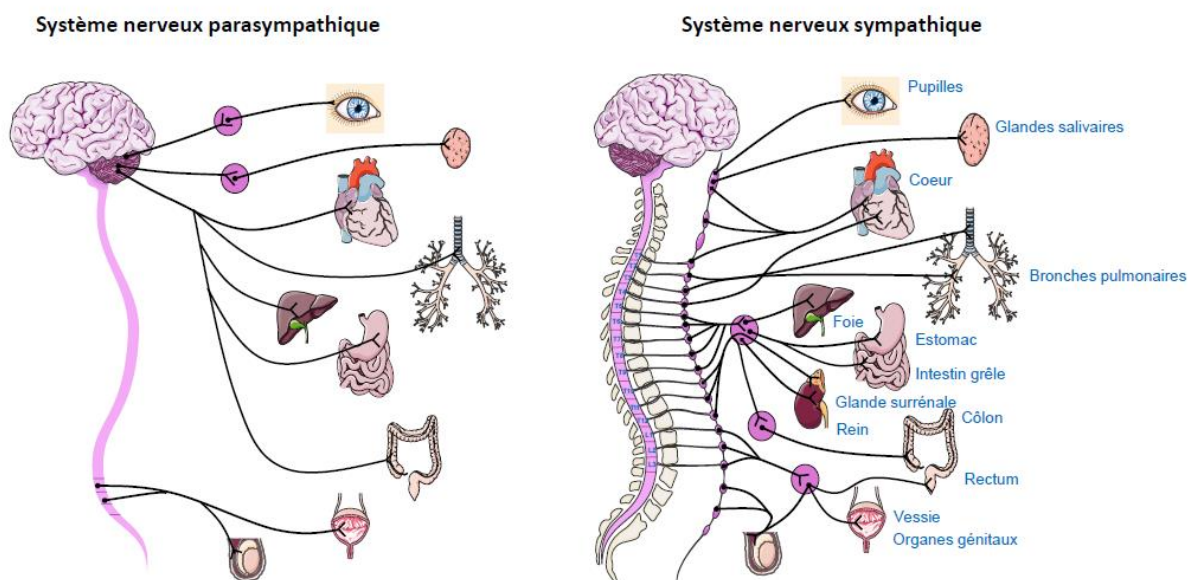


Figure 1 : Organisation des systèmes nerveux parasympathique et sympathique

Au niveau pré-ganglionnaire, le neuromédiateur impliqué dans la stimulation nerveuse est l'Ach qui va agir sur ces récepteurs nicotiques, alors qu'au niveau des organes effecteurs, on aura libération de noradrénaline (NA) qui se fixe sur des récepteurs adrénériques. L'exception à cette organisation du SNS concerne la médullosurrénale. En effet, les fibres pré-ganglionnaires sympathiques arrivent à proximité des glandes surrénales, libèrent de l'Ach entraînant la stimulation des cellules chromaffines de la médullosurrénale. Celles-ci vont synthétiser et libérer de l'adrénaline et de la NA qui passent dans la circulation sanguine pour exercer leurs effets à distance de la médullosurrénale (figure 2).

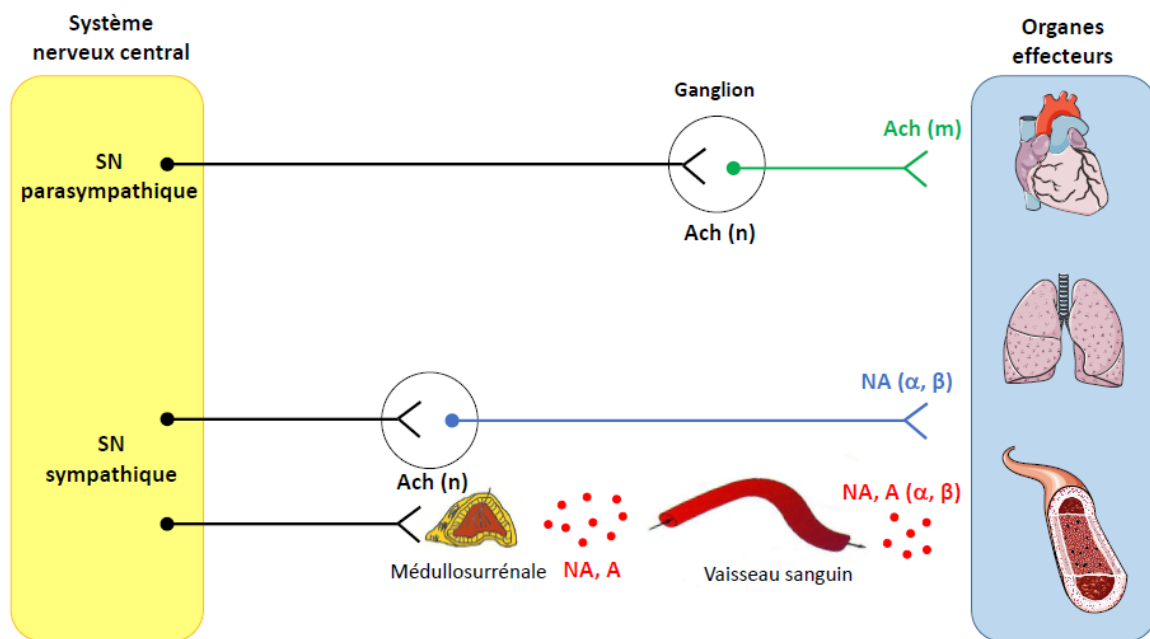


Figure 2 : Voies efférentes du système nerveux autonome.

A : adrénaline, Ach : acétylcholine, m : récepteurs muscariniques, n : récepteurs nicotiques, NA : noradrénaline, SN : système nerveux, α - β : récepteurs adrénériques)

3. Neurotransmetteurs impliqués dans la transmission sympathique

Tout comme pour le SNP, le neurotransmetteur impliqué au niveau pré-ganglionnaire est l'Ach qui, après fixation sur ses récepteurs nicotiques, stimulera le neurone sympathique post-ganglionnaire. Par contre, au niveau post-ganglionnaire, le neuromédiateur principal du SNS, décrit pour la première fois en 1946 par von Euler (Euler, 1946), est la NA. L'adrénaline, une hormone, est la deuxième molécule impliquée. Elle est synthétisée puis libérée principalement par les cellules chromaffines de la médullosurrénale. Ces deux molécules appartiennent, avec

la dopamine, à la famille des catécholamines et sont responsables des effets de la stimulation sympathique sur l'organisme.

a) Synthèse et dégradation de la noradrénaline et de l'adrénaline

La synthèse de la NA et de l'adrénaline s'effectue dans les neurones sympathiques (pour la NA) et dans les cellules chromaffines (pour la NA et l'adrénaline) de la médullosurrénale à partir d'un acide-aminé, la tyrosine selon 4 étapes successives (figure 3). La tyrosine peut provenir soit de l'alimentation soit de l'hydroxylation de la phénylalanine par la phénylalanine-4-hydroxylase.

1° Une hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (L-DOPA) sous le contrôle d'une enzyme limitant la synthèse, la tyrosine hydroxylase (TH) (Levitt M et al., 1965; Nagatsu et al., 1964). Pour être active, cette enzyme nécessite la présence de dioxygène et de tétrahydrobiotérine (BH₄) sous forme réduite comme cofacteur. Cette BH₄ est également un cofacteur de la phénylalanine-4-hydroxylase (Kaufman S and Levenberg B, 1959) et de la tryptophane-hydroxylase, intervenant dans la synthèse de sérotonine. La conversion de la tyrosine en L-DOPA a lieu aussi bien dans le SNC que dans les nerfs sympathiques, la médullosurrénale et les cellules neuroendocrines par le SNS (Flatmark, 2000).

2° Une décarboxylation de la L-DOPA en dopamine par la DOPA-décarboxylase encore appelée la décarboxylase des acides L-amines aromatiques. Cette enzyme n'est pas spécifique de la L-DOPA mais est commune à la synthèse de toutes les amines biogènes et nécessite de la vitamine B₆ comme cofacteur.

3° La dopamine produite est ensuite stockée dans des vésicules synaptiques via un transporteur, le *vesicular monoamine transporter* ou VAMT. La conversion de la dopamine en NA a lieu principalement au niveau de ces vésicules de stockage grâce à la dopamine β-hydroxylase (DBH) (Friedman and Kaufman, 1965). Les cofacteurs à cette réaction sont l'oxygène, l'ascorbate et le cuivre (Flatmark, 2000).

4° Une N-méthylation de la NA en adrénaline sous le contrôle de la phényléthanolamine N-méthyl transférase (PNMT). En périphérie, l'activité enzymatique de la PNMT est essentiellement retrouvée dans la médullosurrénale et elle nécessite la présence d'un donneur de groupement méthyl comme la S-adénosylméthionine.

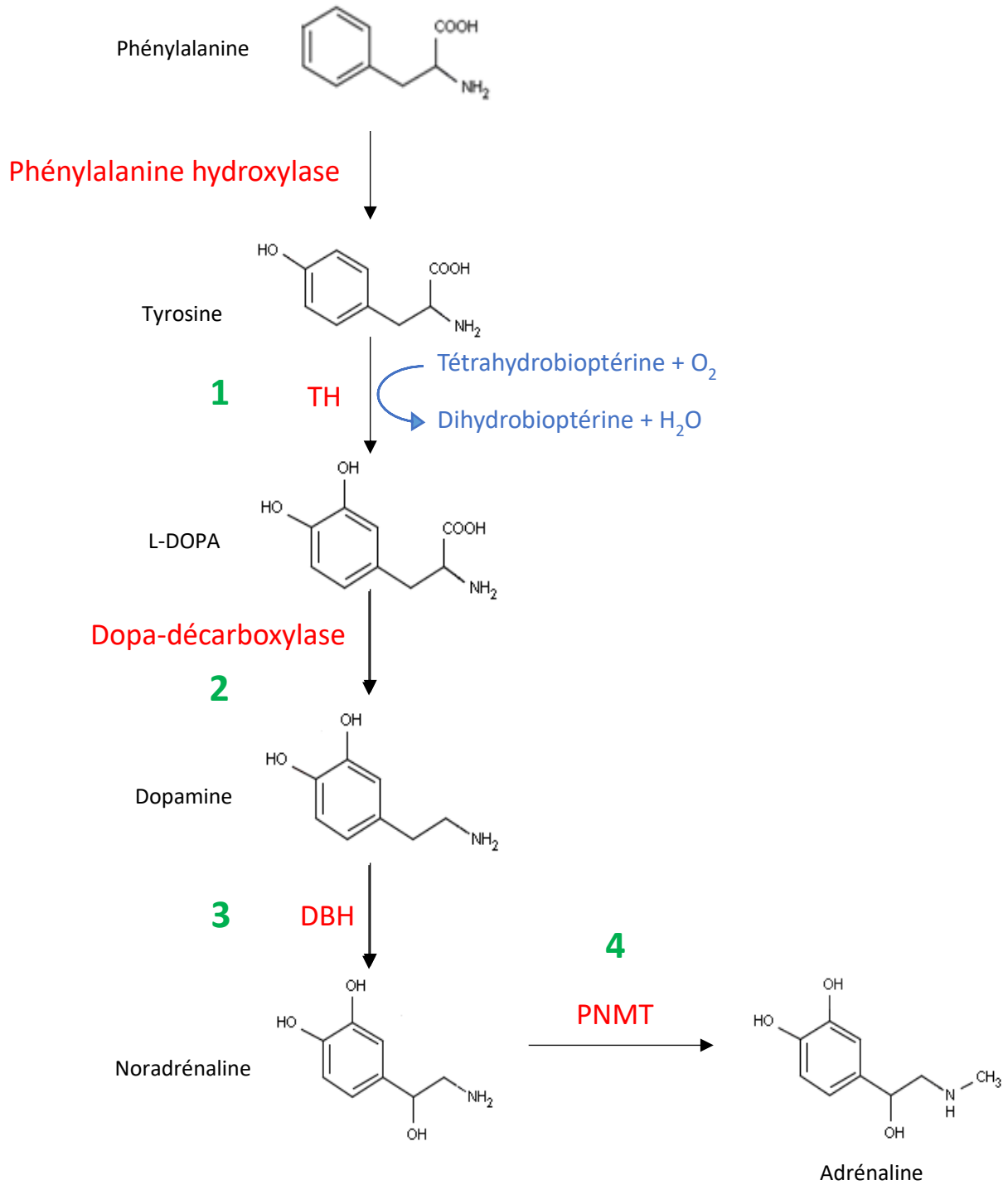


Figure 3 : Biosynthèse des catécholamines (d'après Flatmark 2000)

DBH : dopamine β -hydroxylase, PNMT : phénylethanolamine N-méthyltransférase, TH : tyrosine hydroxylase

La NA tout comme l'adrénaline peuvent être métabolisées via deux types d'enzymes différentes : les monoamines oxydases (MAO-A et MAO-B) ou les catéchol-O-méthyl transférases (COMT). Les deux iso-formes de la MAO sont présentes dans le SNC et vont être notamment responsables de l'oxydation de la NA et de l'adrénaline après recapture de celles-ci. Les COMT sont aussi bien retrouvées dans le SNC que dans différents organes périphériques comme le foie et les reins par exemple. Elles vont donc être responsables du métabolisme des catécholamines au niveau des organes cibles et dans la circulation systémique. Elles conduisent à une méthylation de l'adrénaline et de la NA qui vont être transformées en métabolites inactifs, la métanéphrine et la normétanéphrine respectivement qui seront éliminées par voie urinaire (Axelrod J, 1971).

b) Sécrétion et recapture

Au niveau ganglion sympathique, la fixation de l'Ach sur le récepteur nicotinique va induire une dépolarisation de la membrane cellulaire du neurone, d'où émission d'un potentiel d'action qui va permettre l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant provoquant la sécrétion de la NA de ses vésicules de stockage dans l'espace synaptique. Une fois libérée la NA va pouvoir se fixer sur les récepteurs adrénergiques situés à proximité, avant d'être rapidement recaptée au niveau présynaptique grâce au transporteur de recapture de la noradrénaline (NET) : environ 70 à 90% de la NA sécrétée. Une fois recapturée, elle sera à nouveau stockée dans les vésicules synaptiques ou métabolisée par les MAO ou les COMT. Toutefois, une partie de la NA sécrétée ne sera pas recapturée mais atteindra la circulation générale (Hertting and Axelrod, 1961; Peart, 1949) où elle pourra stimuler des organes/tissus à distance de son lieu de sécrétion.

L'adrénaline est sécrétée majoritairement par les cellules chromaffines de la médullosurrénale à la suite d'un stress ou en cas d'effort physique pour permettre la bonne adaptation de l'organisme. Après sa libération, l'adrénaline passe dans la circulation générale où elle ira se fixer sur les récepteurs adrénergiques des différents tissus de l'organisme et aura donc une action générale et non pas localisée.

Du fait de son passage dans la circulation systémique mais également de son élimination urinaire, les dosages de la NA plasmatique mais également urinaire, constituent une méthode d'évaluation indirecte de l'activité sympathique permettant d'avoir un reflet de l'activité générale dans l'organisme (Esler, 2011; Euler, 1971). Par contre, les dosages de l'adrénaline plasmatique et urinaire sont un reflet de la sécrétion par la médullosurrénale et donc sont sujets à des variations plus importantes, notamment liées au stress.

Le transporteur NET ou SCL6A2 (solute carrier family 6 member 2) appartient à la famille des transporteurs de monoamine dépendants du sodium, tout comme les transporteurs de la dopamine (DAT) et de la sérotonine (SERT). Il est composé de 12 domaines transmembranaires, les deux extrémités N- et C- terminales étant intracellulaires. Si le substrat naturel du NET est la NA, il peut également prendre en charge l'adrénaline et la dopamine. Dans tous les cas, les mécanismes mis en jeu lors du transport sont saturables avec des constantes de Michaelis K_m de 0,1 μ M pour la dopamine, 0,4 μ M pour la NA et 3 μ M pour l'adrénaline (Bönisch and Brüss, 2006; Burnette et al., 1996). Ce transporteur fonctionne grâce à un transporteur secondaire actif, la pompe Na^+/K^+ ATPase, en internalisant la NA, lors de l'influx de Na^+/Cl^- , puis de l'efflux de K^+ (Masson et al., 1999). En conséquence, une inhibition de cette pompe ou un déficit en ATP va induire une diminution de la recapture de NA. La plupart des inhibiteurs du NET appartiennent à la classe des antidépresseurs et notamment des antidépresseurs tricycliques. Leur affinité pour le NET est généralement très bonne, de l'ordre du nanomolaire avec par exemple un K_i de 4nM pour la désipramine, le tricyclique le plus sélectif du NET. Parmi les autres substances inhibitrices, on retrouve la cocaïne et son analogue le RTI-55 (ou β -CIT) et la sibutramine, un médicament utilisé comme « coupe-faim » dans le traitement de l'obésité, et retiré du marché en France depuis 2008.

Du fait de l'importance de la NA comme neuromédiateur du SNC et du SNP, le NET est localisé au niveau des neurones noradrénergiques de ces deux systèmes. Dans le SNC, la majorité des noyaux noradrénergiques se situent dans le locus coeruleus du tronc cérébral. De là, des projections partent pour innover différentes régions du cerveau comme le cortex préfrontal (impliqué dans les émotions), l'hippocampe (rôle dans le contrôle de l'anxiété), les noyaux du raphé et les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (rôle dans la régulation de l'état veille/sommeil) mais également la moelle épinière. L'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) est restreinte aux corps cellulaires plutôt que dans les terminaisons nerveuses du SNC, donc surtout dans le tronc cérébral (locus coeruleus et pont de varole par exemple). En périphérie, l'ARNm de NET est exprimé dans les corps cellulaires des ganglions sympathiques, la médullo-surrénale et le placenta (Li et al., 2001). Au contraire de son ARNm, on détecte le NET dans les corps cellulaires mais aussi le long des dendrites, des axones et à la fin des terminaisons nerveuses des nerfs sympathiques innervant les tissus (Eisenhofer, 2001).

L'expression de NET peut être régulée de façon aiguë ou chronique. Ainsi des administrations répétées de désipramine (pendant 2 jours ou 4 semaines) chez le rat ont montré une régulation positive de l'expression d'ARNm dans le locus coeruleus (Szot et al., 1993). A l'inverse, une

exposition prolongée de cellules PC12 (exprimant constitutionnellement le NET) à de la désipramine ou de la nisoxetine entraîne une réduction des sites de fixation de la nisoxetine ce qui conduit à une diminution de la capture de NA (Zhu and Ordway, 1997). Des traitements prolongés avec de la dexaméthasone ont également montré un effet négatif sur l'expression de NET dans des cultures de médullosurrénale de rat (Wakade et al., 1996).

Le gène codant pour le NET est situé sur le chromosome 16 (16q12.2), il est composé de 15 exons codants et est très polymorphe (plus 5000 SNPs recensés dans NCBI-SNP-database) et concerne surtout la région de l'exon 15. Si l'étude des variations génétiques est importante, un seul variant a été identifié comme ayant une répercussion pathologique. En effet, une mutation de l'acide aminé 457 (remplacement de l'alanine par une proline) a été identifiée chez une patiente souffrant d'intolérance orthostatique. Chez cette patiente, l'analyse fonctionnelle du NET muté a montré une perte d'activité d'environ 98% (Robertson et al., 2001). Parmi les autres pathologies où le NET est étudié, on retrouve bien sûr la dépression, le déficit de l'attention et d'hyperactivité chez l'enfant, l'addiction, mais également l'hypertension artérielle essentielle (voir paragraphe II-B-2) ou l'obésité. Dans cette dernière pathologie, Gehlert et al ont montré que l'administration à des rats d'un inhibiteur du NET induisait une diminution de la prise alimentaire d'environ 44% (Gehlert et al., 1998). Par ailleurs, la sibutramine, un inhibiteur de NET et de SERT permettait de diminuer puis de maintenir le poids des patients. Par conséquent, une surexpression de NET ou de sa fonction pourrait conduire à un phénotype d'obésité.

4. Récepteurs adrénergiques

Les cibles de la NA et de l'adrénaline sont les récepteurs adrénergiques qui sont retrouvés dans les différents tissus de l'organisme. Selon la classification de *l'International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR), il existe trois types de récepteurs, α_1 , α_2 et β , chacun subdivisé en trois sous-types. Ces neuf sous-types sont des récepteurs métabotropes, c'est-à-dire des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G.

a) Récepteurs α_1 -adrénergiques

La première classification proposée pour les récepteurs α -adrénergiques divisait ceux-ci en 2 types (Berthelsen and Pettinger, 1977; Langer S.Z., 1974) :

- les récepteurs α_1 qui possèdent une localisation post-synaptique et permettent les effets sympathiques de la noradrénaline, notamment la contraction des muscles lisses ;

- les récepteurs α_2 , avec une localisation pré-synaptique, qui ont pour rôle d'inhiber la libération de noradrénaline.

Toutefois, les différentes études de binding avec des antagonistes ($[^3\text{H}]$ -WB4101, $[^3\text{H}]$ -prazosine, $[^3\text{H}]$ -phentolamine) et des agonistes ($[^3\text{H}]$ -NA, $[^3\text{H}]$ -adrénaline, clonidine et chloroéthylclonidine, un agoniste irréversible) ont très rapidement montré une disparité tant au niveau structural que pharmacologique des récepteurs α_1 (Bylund DB et al., 1994; Morrow AL and Creese I, 1986; Ruffolo RR Jr et al., 1982, 1980) et ont conduit à l'identification de 3 sous-types, les récepteurs α_{1A} , α_{1B} et α_{1D} (Hieble JP et al., 1995). L'affinité de la NA pour ces 3 sous-types est environ 100 fois supérieure à celle de l'adrénaline ($K_i = 3,2 \text{ nM}$ vs $501,2 \text{ nM}$ respectivement (Landry and Gies, 2014)) et ils peuvent tous être bloqués par la fixation de prazosine. Les récepteurs α_{1A} ont la particularité d'avoir une forte affinité pour le WB4101 mais d'être peu sensibles à l'inactivation par la chloroéthylclonidine, alors que les récepteurs α_{1B} ont, à l'inverse, une faible affinité pour le WB4101 et sont très sensibles à la chloroéthylclonidine. Le sous-type α_{1D} présente, lui, une situation intermédiaire.

L'activation de ces 3 sous-types par la NA conduit à une augmentation du calcium intracellulaire via le couplage à une protéine G_q . Cette voie conduit à l'activation de la phospholipase C_β (PLC) qui va cliver les phospholipides membranaires pour donner de l'inositol-1, 4, 5- triphosphate (IP_3) et du diacylglycerol (DAG). L' IP_3 va ensuite permettre la libération de calcium intracellulaire par le réticulum endoplasmique, alors que le DAG va activer la protéine kinase C (PKC) (Chen and Minneman, 2005; Guarino et al., 1996; Hawrylyshyn et al., 2004; Koshimizu et al., 2003; Piascik and Perez, 2001).

Les récepteurs α_1 sont principalement localisés dans les muscles lisses des vaisseaux (aorte, artères pulmonaires, artères coronaires et vaisseaux mésentériques), mais aussi au niveau du tractus uro-génital, de l'intestin, des hépatocytes, et à un degré moindre par rapport aux récepteurs β , sur les cellules myocardiques pour les sous-types α_{1A} et α_{1B} .

b) Récepteurs α_2 -adrénergiques

La famille des récepteurs α_2 a tout d'abord été considérée comme un ensemble de récepteurs présynaptiques ayant notamment la capacité d'inhiber la libération des catécholamines (NA et

adrénaline). Toutefois, cette hypothèse a vite été remise en question lorsque des récepteurs avec les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs α_2 ont été retrouvés au niveau post-synaptique (U'Prichard DC et al., 1979, 1976) et sur les plaquettes (Daiguji et al., 1981; Shattil SJ et al., 1980) qui ne sont pas innervées. Comme pour les récepteurs α_1 , les récepteurs α_2 ont été subdivisés en 3 sous-types α_{2A} (ou α_{2D} chez les rongeurs), α_{2B} et α_{2C} , qui sont activés par les catécholamines physiologiques, NA et adrénaline, sans qu'aucune différence d'affinité n'ait pu être mise en évidence. Leur classification repose entre autre sur les différences d'affinité de (Bylund DB et al., 1994) :

- la prazosine (antagoniste α_1) : faible affinité pour les récepteurs α_{2A} et bonne affinité pour les récepteurs α_{2B} et α_{2C}
- la rauwolscine (antagoniste α_2) : forte affinité pour les 3 sous-types, mais avec dix fois plus d'affinité pour les récepteurs α_{2C} que pour les récepteurs α_{2A} et α_{2B}
- l'oxymétazoline (agoniste partiel α_2) : affinité forte pour les récepteurs α_{2A} , bonne pour les α_{2C} et moyenne pour les α_{2B} .

La stimulation des récepteurs α_2 , quel que soit le sous-type, par fixation de la NA libérée dans l'espace synaptique, entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase (AC), via le couplage des récepteurs à une protéine G_i . Ceci conduit à une diminution de l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant (Ca_v2), réduit l'influx intra-neuronal de calcium et donc la libération de NA (ou d'adrénaline) de leurs vésicules synaptiques de stockage (Starke, 2001).

Les récepteurs α_{2B} sont principalement retrouvés au niveau des cellules musculaires lisses des parois des vaisseaux où leur stimulation va entraîner une vasoconstriction transitoire (Hein, 2001; Philipp et al., 2002). Les récepteurs α_{2A} et α_{2C} sont, eux, retrouvés surtout dans le SNC et à l'extrémité des neurones sympathiques (inhibition du SNS), mais également sur les cellules β des îlots de Langerhans (inhibition de l'insulinosécrétion), sur les adipocytes (inhibition de la lipolyse), au niveau de l'œil (diminution de la pression intraoculaire) et sur les plaquettes (stimulation de l'agrégation) (Gilsbach and Hein, 2012; Philipp et al., 2002).

c) Récepteurs β -adrénergiques

Historiquement, les récepteurs β -adrénergiques ont été séparés en 2 sous-types, β_1 et β_2 , (Lands et al., 1967), toutefois, l'existence d'un troisième sous-type, différent d'un point de vue

pharmacologique, a rapidement été mis en évidence et le gène humain cloné à la fin des années 1980 (Emorine LJ et al., 1989; Lönnqvist et al., 1993).

Tout comme pour les récepteurs α_1 et α_2 , l'affinité de l'adrénaline et de la NA pour les différents sous-types de récepteurs β n'est pas égale. En effet, s'il n'existe que peu de différence entre ces neurotransmetteurs vis-à-vis du sous-type β_1 ($K_i = 316,2$ vs $158,5$ nM pour la NA et l'adrénaline respectivement), l'adrénaline est 10 fois plus sélective pour le récepteur β_2 que la NA ($K_i = 316,2$ vs $3162,3$ nM respectivement) (Landry and Gies, 2014) et à l'inverse, c'est la NA qui est a plus d'affinité pour le récepteur β_3 (Bylund DB et al., 1994).

Les 3 sous-types de récepteurs sont le plus souvent couplés à une protéine G_s et la stimulation de ces récepteurs provoque l'activation de l'AC permettant l'augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), second messenger qui va activer la protéine kinase A (PKA), responsable des différents effets du SNS.

Le sous-type β_1 est le principal récepteur β -adrénergique retrouvé au niveau du cœur (effet stimulant cardiaque). Il est également présent dans le tissu rénal (augmentation de la sécrétion de rénine) et adipeux (augmentation de la lipolyse).

Les récepteurs β_2 sont, quant à eux, retrouvés essentiellement sur la membrane des cellules des différents muscles lisses (bronches, vaisseaux, utérus, intestin) où leur stimulation va entraîner une relaxation des fibres musculaires. Ils sont également présents sur les cellules cardiaques, les hépatocytes (glycogénolyse), les cellules pancréatiques (augmentation de la sécrétion d'insuline), en faible quantité dans le tissu adipeux mature et au niveau présynaptique (stimulation de la libération de NA).

Chez l'Homme, les récepteurs β_3 -adrénergiques sont localisés dans le myocarde, les vaisseaux, le tissu adipeux brun de l'enfant et en faible proportion sur les adipocytes du tissu adipeux blanc de l'adulte. Ils sont par contre exprimés en forte quantité dans les tissus adipeux brun et blanc chez différentes espèces de mammifères (D'Allaire et al., 1995; Germack et al., 1997; Langin et al., 1991) et dans le modèle cellulaire d'adipocytes, les cellules 3T3 (Fève et al., 1990, 1991).

B. Rôles physiologiques du système nerveux sympathique

1. Dans le muscle cardiaque

Le cœur est innervé aussi bien par le SNS, qui a une action cardio-stimulante, que par le SNP qui a une action cardio-inhibitrice. Chez l'homme, au repos, c'est l'action du SNP qui va prédominer mais il sera surmonté par le SNS en cas de nécessité (stress ou activité physique).

Les fibres sympathiques post-ganglionnaires cheminent le long des principales artères coronaires et vont innover l'ensemble du cœur. Au niveau ventriculaire, l'innervation sympathique est caractérisée par un gradient allant de la base jusqu'à l'apex. La présence à la fois des récepteurs des sous-types β_1 et β_2 a depuis longtemps été mise en évidence dans le myocarde, avec une proportion de l'ordre de 70 à 80% de β_1 , (Bristow et al., 1986; Brodde et al., 2006). Plus récemment, la découverte de l'existence du sous-type β_3 dans le cœur a également été démontrée avec un rôle propre dans la fonction cardiaque (Gauthier et al., 1996; Rozec and Gauthier, 2006; Treinys et al., 2014).

La stimulation des récepteurs β_1 (et β_2) du muscle cardiaque par les catécholamines endogènes entraînent une activation de la PKA. Celle-ci va à son tour entraîner, entre autres effets, la phosphorylation et l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant de type L et donc permettre l'influx de calcium à l'intérieur de la cellule. Cet influx de calcium, via sa fixation sur la troponine C, va permettre la contraction des fibres musculaires. En parallèle, il permet la libération du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique augmentant ainsi la concentration intracellulaire en calcium, disponible pour la contraction (voir figure 4). Comme l'ouverture des canaux calciques de type L dépend du degré de phosphorylation de ceux-ci, la stimulation sympathique permet d'augmenter la force de contraction du muscle cardiaque (effet inotrope positif). Par ailleurs, la libération de NA par les neurones sympathiques au niveau du nœud sinusal entraîne une augmentation de la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif), et une augmentation de la vitesse de dépolarisation des fibres du nœud auriculo-ventriculaire (effet dromotrope positif).

Contrairement aux autres sous-types, les récepteurs β_3 situés au niveau des ventricules sont couplés à une protéine $G_{i/o}$, conduisant à l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (Nitric Oxide Synthase ou eNOS) et à la production de monoxyde d'azote (NO) (Gauthier et al., 1998). Le NO produit permet ensuite l'augmentation de la concentration intracellulaire en guanosine monophosphate cyclique (GMPC) qui va, entre autres effet, diminuer l'influx

calcique par inhibition de l'ouverture des canaux calciques de type L (voir figure 4). Les récepteurs β_3 auraient ainsi un effet inotrope négatif qui s'oppose à l'effet $\beta_{1/2}$ (Kitamura et al., 2000; Rozec et al., 2009; Varghese et al., 2000). Comme la stimulation de ce sous-type particulier se fait à des concentrations en catécholamines supérieures à celles nécessaires pour stimuler les récepteurs β_1 et β_2 , les récepteurs β_3 constitueraient une « soupape de sécurité » cardiaque en cas de stimulation adrénergique trop importante.

Au niveau de l'oreillette, les récepteurs β_3 -adrénergiques augmenteraient par contre la contractilité cardiaque via un couplage « classique » à une protéine G_s et en stimulant les canaux calciques de type L (Skeberdis et al., 2008).

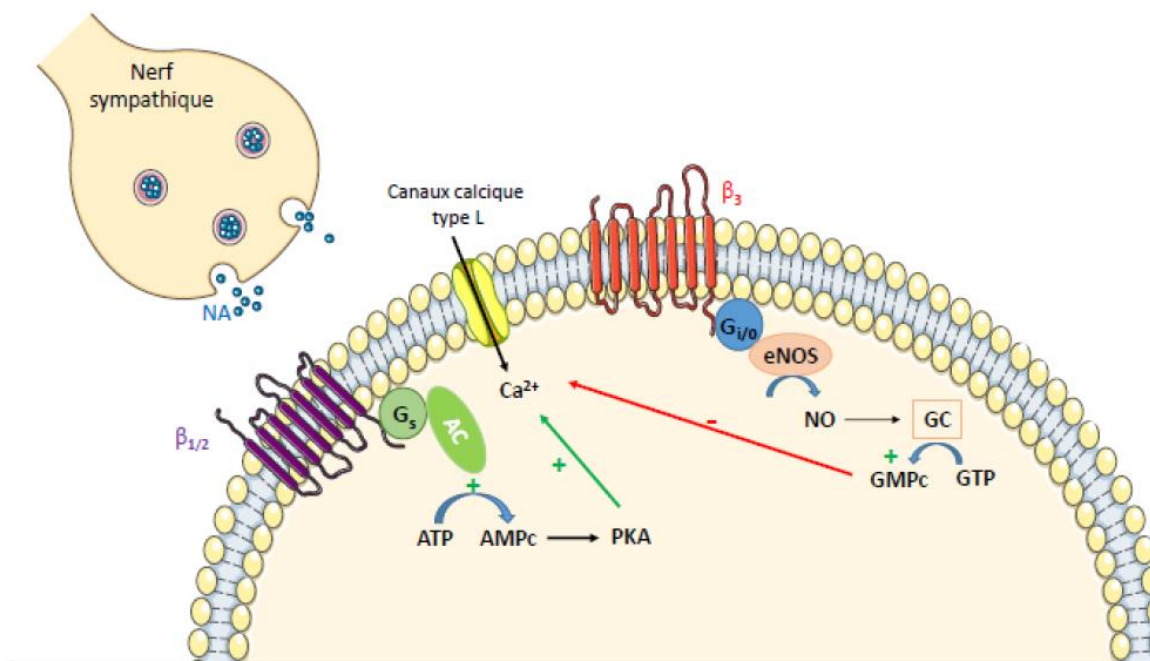


Figure 4 : Stimulation sympathique de la cellule musculaire cardiaque ventriculaire

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; β : récepteurs β -adrénergique ; eNOS : nitique oxyde synthase endothéliale ; $G_{i/o}$ ou s : protéine G inhibitrice ou stimulatrice ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; NA : noradrénaline ; NO : monoxyde d'azote ; PKA : protéine kinase A

2. Dans les vaisseaux

Les muscles lisses vasculaires sont majoritairement innervés par le SNS, où on retrouve simultanément les récepteurs α_1 , α_{2b} , β_1 , β_2 et β_3 .

La stimulation des récepteurs α (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ainsi que les récepteurs α_{2b} post-jonctionnels) entraîne une vasoconstriction. Quelle que soit la voie de signalisation induite, couplage à une protéine G_q ou G_i respectivement, cette vasoconstriction est le résultat :

- soit d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium après relargage des stocks sarcoplasmique de calcium
- soit de l'inhibition de la *Myosin Light Chain Phosphatase* (ou MLCP) qui a pour rôle de déphosphoryler la chaîne légère de myosine, empêchant son interaction avec l'actine, nécessaire à la contraction.

Si l'effet de la stimulation sympathique est, au final, le même, la différence provient en fait de la localisation de ces différents types de récepteurs. En effet, les récepteurs de type α_1 sont plutôt localisés au niveau des artères alors que les récepteurs α_2 sont surtout présents sur les veines. De même, tous les sous-types α_1 sont représentés au niveau vasculaire mais la prédominance de l'un ou l'autre sous-type dépend aussi bien de l'artère considérée (exemple : aorte, artères rénales, artères pulmonaires, artères mésentériques...) que de l'espèce considérée (Guimaraes and Moura, 2001; Tanoue A et al., 2003).

Pour les récepteurs β , il a classiquement été démontré que c'est le sous-type β_2 qui est majoritairement retrouvé sur les cellules des muscles lisses vasculaires où ils sont responsables d'une vasodilatation (Lands et al., 1967). Toutefois, s'il est vrai que les récepteurs β_2 sont effectivement le sous-type majoritaire dans la plupart des vaisseaux, il est apparu que les récepteurs β_1 sont également impliqués voire même prédominants dans la vasodilatation de gros vaisseaux comme les coronaires et les artères cérébrales (Guimaraes and Moura, 2001). Enfin, la présence du sous-type β_3 a également été mise en évidence au niveau de plusieurs vaisseaux (artère pulmonaire de chien, de carotides, artères fémorales ou aorte de souris... mais également de la veine portale de rat ou des veines de chevaux) où sa stimulation induit aussi une vasodilatation (Rozec and Gauthier, 2006).

3. Dans le tissu adipeux

Contrairement à d'autres organes, le tissu adipeux n'est pas une structure homogène mais peut être divisé en deux structures distinctes aussi bien sur un plan morphologique que physiologique, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun.

Les premières études *in vitro* ont montré que la stimulation de tissu adipeux péri-testiculaire de rat avec de l'adrénaline ou de la NA provoquait la lipolyse des triglycérides (TG). Ces premiers résultats ont également été confortés lors d'études *in vivo* dans différentes espèces (Himms-Hagen, 1967). Si ces études ont permis de montrer l'existence d'un effet des catécholamines endogènes sur le tissu adipeux, elles ne permettent pas de savoir si cette action provient d'une innervation directe du tissu adipeux ou d'une action à distance via l'innervation vasculaire ou via la sécrétion de catécholamines par la médullosurrénale. Après plusieurs décennies de recherche, Youngstrom *et al* ont été les premiers à démontrer l'innervation du tissu adipeux blanc dans une espèce de rongeurs (Youngstrom and Bartness, 1995). Ces résultats ont ensuite été confirmés sur différents échantillons de tissu adipeux blanc (Bartness et al., 2005; Bowers, 2004). Comme dans le cas des vaisseaux, le tissu adipeux est presque exclusivement innervé par le SNS mais de façon différente selon le type de tissu considéré. En effet, il existe beaucoup de terminaisons sympathiques au niveau des adipocytes bruns, alors que les adipocytes blancs sont plus faiblement innervés (Lafontan and Berlan, 1993). De même, la répartition des types de récepteurs adrénérgiques présents sur la membrane des adipocytes est un peu différente en fonction du type de tissu adipeux. Ainsi, pour le tissu adipeux blanc, les trois types de récepteurs β (avec une prédominance β_1 et des β_3) sont retrouvés ainsi que des récepteurs α_2 et, dans une faible proportion, des récepteurs α_1 ; alors que pour le tissu adipeux brun, on aura une prédominance des récepteurs β_1 , β_3 , et α_1 mais très peu de récepteurs α_2 .

Le premier rôle, largement étudié, de l'innervation sympathique du tissu adipeux est de mobiliser de l'énergie via la lipolyse des TG stockés dans celui-ci. Ainsi, dans les adipocytes, la stimulation des récepteurs β par la NA et l'adrénaline permet, via leur couplage à la protéine G_s , l'activation de la PKA qui va elle-même phosphoryler la lipase hormonosensible (LHS). Celle-ci va ensuite migrer au niveau des vésicules lipidiques et induire la lipolyse c'est-à-dire la lyse des TG en glycérol et en acides gras libres (voir figure 5). La PKA permet également la phosphorylation d'autres substrats comme, par exemple, la glycogène synthase, conduisant à une inhibition de l'entrée du glucose et de la synthèse de glycogène, mais également les

récepteurs β -adrénergiques eux-mêmes conduisant à leur désensibilisation. Par ailleurs, dans les adipocytes bruns, les TG hydrolysés vont pouvoir servir de combustible à la thermogénèse.

La stimulation des récepteurs α_1 a un effet synergique puisqu'elle permet également une activation de la lipolyse, qui est médiée cette fois-ci par la formation d'IP3 permettant une augmentation du calcium intracellulaire, et par la formation de DAG qui va activer la PKC. Ces deux éléments vont induire une stimulation de la LHS.

Les récepteurs α_2 sont par contre couplés à la protéine G_i et leur stimulation donc va s'opposer à l'effet dû aux récepteurs β -adrénergiques en inhibant l'adénylate cyclase (voir figure 5).

Du fait de la co-localisation des récepteurs β et α_2 sur un même adipocyte, la régulation de la lipolyse va dépendre de l'activation prédominante de ces 2 types de récepteurs. En effet, lorsque la stimulation β -adrénergique est prédominante, la lipolyse sera activée, alors qu'en cas de stimulation α_2 -adrénergique, la lipolyse sera inhibée. L'affinité naturelle de la NA et de l'adrénaline est plus forte pour les récepteurs α_2 que pour les récepteurs β (affinité de NA : $\alpha_2 > \beta_1 \geq \beta_2 > \beta_3$; adrénaline : $\alpha_2 > \beta_2 > \beta_1 > \beta_3$). Ces données suggèrent que lorsque l'organisme est au repos, l'activité lipolytique est inhibée et on observe donc une accumulation des TG à l'intérieur des adipocytes. Au contraire, lorsque le SNS est stimulé (stress, activité physique, exposition au froid...), on a libération plus importante et aiguë de NA et/ou d'adrénaline qui vont aller stimuler préférentiellement les récepteurs β au niveau des adipocytes, stimuler la lipolyse et ainsi mobiliser l'énergie dont l'organisme a besoin (Bartness and Song, 2007).

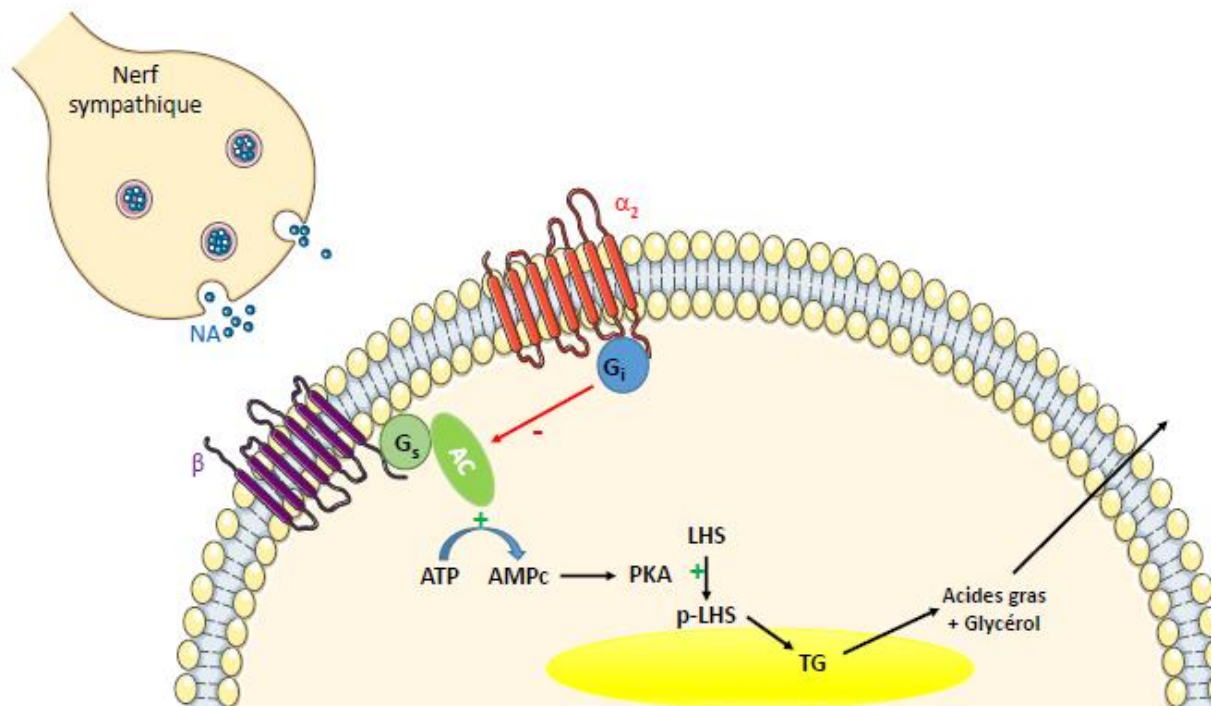


Figure 5 : Régulation sympathique de la lipolyse au niveau des adipocytes

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; α : récepteurs α -adrénergiques ; β : récepteurs β -adrénergique ; G_i ou G_s : protéine G inhibitrice ou stimulatrice ; LHS : lipase hormono-sensible ; NA : noradrénaline ; PKA : protéine kinase A ; p-LHS : lipase hormono-sensible phosphorylée (forme active) ; TG : triglycérides

Le deuxième rôle du SNS sur le tissu adipeux est de moduler sa sécrétion des peptides (leptine et adiponectine) et cytokines (Tumor necrosis factor (TNF α) et interleukine 6 (IL6)) synthétisés in situ.

La leptine est une protéine produite principalement par le tissu adipeux de façon proportionnelle à la quantité de masse grasse. Plusieurs études ont montré que la stimulation des récepteurs β -adrénergiques induisait une diminution des taux plasmatiques de leptine. La stimulation *in vitro* d'échantillons de tissu adipeux humains avec de l'isoprénaline n'a pas d'effet sur la biosynthèse de leptine (pas de modification des taux d'ARN messenger, et de la quantité de leptine synthétisée) mais plutôt un effet inhibiteur sur la sécrétion par le tissu adipeux de celle-ci. Au contraire de l'homme, la même étude chez le rat n'a pas montré de diminution de la sécrétion basale de leptine par le tissu adipeux. Dans ce cas, le mécanisme mis en jeu passe par l'inhibition de l'action de l'insuline qui permet d'augmenter la synthèse de leptine (Ricci, 2004). D'une manière similaire, des études sur les cellules 3T3 ont montré que l'insuline

stimulait la synthèse de leptine via l'activation de la PI3K et l'induction de la voie mTOR (*mamalian target of rapamycin*). A l'inverse, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques adipocytaires entraîne la lipolyse des TG, l'utilisation des réserves d'ATP pour former des acyl-coenzyme A. Ceci conduit à une augmentation des taux d'AMP qui vont activer l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), une protéine inhibitrice de la voie mTOR (Lee and Fried, 2009).

Fu et al (Fu et al., 2007), ont étudié l'influence de la stimulation de deux agonistes β_3 (CL 316,243 et BRL37344) sur l'expression d'adiponectine, des récepteurs à l'adiponectine (AdipoR1 et adipoR2) et de TNF α dans des cultures de tissu adipeux de souris. Leurs résultats montrent que la stimulation des récepteurs β_3 induit une diminution de l'expression d'adiponectine (diminution des taux d'ARN messenger), n'a pas d'effet sur le récepteur AdipoR1 et induit une augmentation de l'expression du récepteur AdipoR2.

Concernant les cytokines, l'expression de TNF α est augmentée suite à la stimulation β -adrénergique des adipocytes, aussi bien au niveau des cultures primaires de tissu adipeux de souris, que dans la culture de cellules 3T3 (Fu et al., 2007). On retrouve également une augmentation de la sécrétion d'IL6 après stimulation du tissu adipeux par les catécholamines (Vicennati et al., 2002)

4. Dans le pancréas

Les îlots pancréatiques sont richement innervés à la fois par le SNS et par le SNP (Ahren et al., 1981; Prinz et al., 1983). Les premières expériences menées dans les années 1960 ont montré que la stimulation des cellules β -pancréatiques avec de la NA conduisait à une inhibition de la sécrétion d'insuline (Porte and Williams, 1966). Cet effet est également retrouvé lors de la stimulation électrique des fibres noradrénergiques innervant le pancréas et dû à la fixation de la NA aux récepteurs α_2 -adrénergiques présents sur la membrane des cellules pancréatiques (Chan et al., 1997; Skoglund et al., 1988). A l'inverse, la stimulation des fibres du SNP avec libération d'Ach conduit à l'augmentation de la sécrétion d'insuline (Campfield and Smith, 1983).

Par ailleurs, des récepteurs adrénérgiques de type β_2 sont également présents sur la membrane des cellules pancréatiques. La stimulation de ceux-ci via des agonistes β -adrénergiques entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline qui est prévenue en cas de blocage de ceux-ci avec

des bêtabloquants (Ahrén et al., 1981; Ahrén and Lundquist, 1981; Porte, 1967). Il semble qu'à l'état basal, l'effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline, via la stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques, soit l'effet sympathique prédominant. La stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques ne constitue qu'un effet minoritaire lorsque la stimulation sympathique reste normale. Il faut une concentration plus importante en NA ou en adrénaline pour que l'effet s'inverse et favorise la sécrétion d'insuline (Ahren et al., 1987).

L'étude des mécanismes cellulaires impliqués après fixation de la NA sur les récepteurs α_2 a permis de mettre en évidence plusieurs effets synergiques conduisant tous à une inhibition de la sécrétion d'insuline (Straub and Sharp, 2012). En effet ce type de récepteur est couplé à une protéine $G_{i/0}$ qui est un hétérotrimère formé de plusieurs sous-unités ($G_{\alpha i1/2}$, $G_{\alpha 02}$, $G_{\beta\gamma}$) :

- Les sous-unités $G_{\alpha i1/2}$ et $G_{\alpha 02}$ sont responsables de l'ouverture des canaux au potassium ATP dépendant ce qui entraîne une hyperpolarisation de la membrane empêchant l'influx de calcium dans la cellule β -pancréatique (Zhao et al., 2007). Elles inhibent également l'activité de l'AC et donc la formation d'AMPC. Dans les cellules β -pancréatique, l'AMPC permet d'amplifier la sécrétion d'insuline via l'activation de la PKA et des protéines d'échanges activées par l'AMPC (Epacs). Le premier mécanisme mis en jeu est l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium soit par augmentation de l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant (voie PKA-dépendante), soit par relargage des stocks de calcium du réticulum sarcoplasmique (via la PKA et les Epacs). Le deuxième mécanisme mis en jeu, est un effet direct de l'AMPC (via la PKA et les Epacs) sur l'exocytose de l'insuline (Furman et al., 2010).
- La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ permet de bloquer l'exocytose des vésicules contenant l'insuline par liaison de cette sous-unité au complexe SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) et à l'inhibition de la liaison de la synaptotagmine. Par ailleurs, ce mécanisme induit une diminution du nombre d'exocytose sans changer la taille des vésicules (Y. Zhao et al., 2010).
- Les sous unités $G_{\alpha i1}$ et/ou $G_{\alpha i2}$ permettent également de retarder le remplissage des vésicules de stockage de l'insuline appartenant aux « *readily releasable pool* ». Le mécanisme impliqué reste toutefois à élucider mais ne semble pas être dépendant de l'inhibition de l'adénylate cyclase (Y. Zhao et al., 2010). En parallèle, la sous-unité $G_{\alpha 0}$ permet de réduire le nombre de vésicules amarrées à la membrane des cellules β -pancréatiques (A. Zhao et al., 2010).

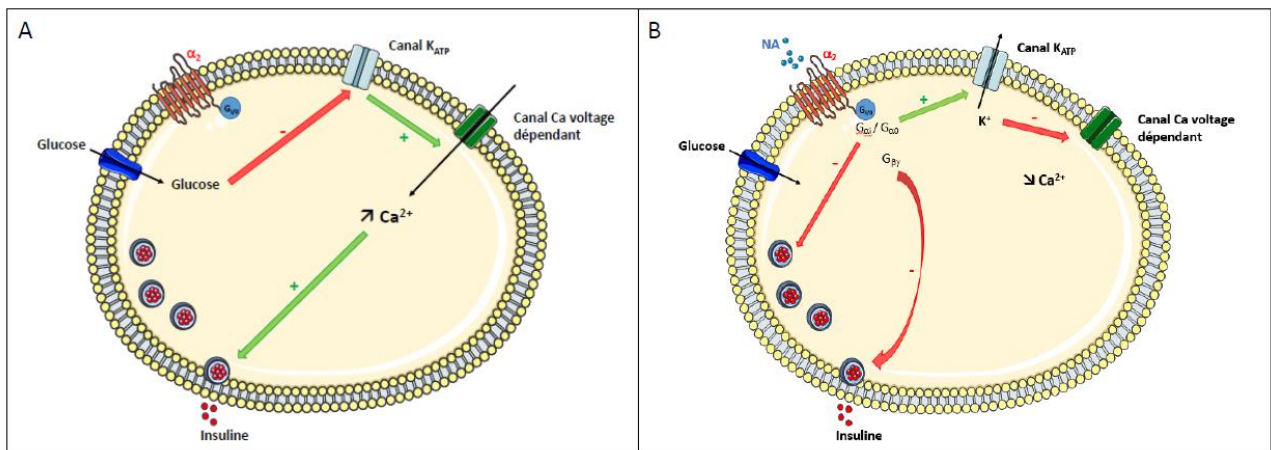


Figure 6 : Contrôle de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques

A. Sécrétion d'insuline induite par la fixation de glucose sur son récepteur. B. Inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose après stimulation sympathique via les récepteurs α_2 -adrénergiques.

α_2 : récepteur α_2 -adrénergique ; Canal K_{ATP} : canal au potassium ATP dépendant ; G_i : protéine G inhibitrice ; $G_{\alpha i}$: sous-unité α de la protéine G_i ; $G_{\beta\gamma}$: sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G_i ; NA : noradrénaline

5. Dans le foie

La relation entre le SNA et le tissu hépatique a été décrite pour la première fois par Jungermann *et al* lorsqu'ils ont mis en évidence que la stimulation électrique des fibres nerveuses de foies isolés perfusés de rat induisait une augmentation de la libération de glucose plasmatique, une diminution de l'urée et de la formation de glutamine ainsi qu'une réduction de la production de corps cétoniques. Par ailleurs, en parallèle de ces observations, ils ont pu mettre en évidence une augmentation de la concentration plasmatique en NA dans la veine hépatique, laissant supposer que les fibres nerveuses stimulées appartenait au SNS (Jungermann *et al.*, 1987). Quelques années plus tard, ces résultats ont été confirmés chez des lapins chez qui la stimulation hypothalamique des noyaux ventromédians (et donc une stimulation centrale du SNS) induisait rapidement une augmentation de la glycémie plasmatique associée à une diminution du contenu hépatique en glycogène (Shimazu, 1996). D'autres expériences ultérieures ont confirmé l'innervation directe par le SNA du tissu hépatique (Buijs *et al.*, 2003; Delalande *et al.*, 2004; la Fleur *et al.*, 2000). Les fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques prennent leur origine dans l'hypothalamus puis vont suivre la veine porte, l'artère hépatique ainsi que les voies biliaires. Les nerfs sympathiques prennent leur origine au niveau des vertèbres T7 à T10

puis innervent le foie via le ganglion cœliaque, alors que les nerfs parasympathiques cheminent à travers le nerf vague. La distribution des terminaisons nerveuses varie en fonction des espèces, elle est limitée aux vaisseaux et aux cellules parenchymateuses adjacentes chez le rat et la souris alors que chez le primate non humain et l'homme, les terminaisons nerveuses arrivent jusqu'aux acini hépatiques. Toutefois, même si l'innervation reste limitée à la surface, le message neuronal se répand à travers tout le tissu grâce aux « gap junctions ».

Dans le tissu hépatique, tous les effets induits par le SNS se font principalement via la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques et très peu via les récepteurs β_2 -adrénergiques (Seydoux et al., 1979; Ulken et al., 1991). Après fixation de NA sur ces récepteurs, on observe une activation de la PLC d'où production d'IP₃ qui va permettre le relargage du calcium du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol. Les ions Ca²⁺ vont permettre l'activation de la glycogène phosphorylase kinase (liaison à sa sous-unité calmoduline), et donc la phosphorylation de la glycogène phosphorylase, qui sera sous forme active, et de la glycogène synthase, qui sera sous forme inactive (figure 7).

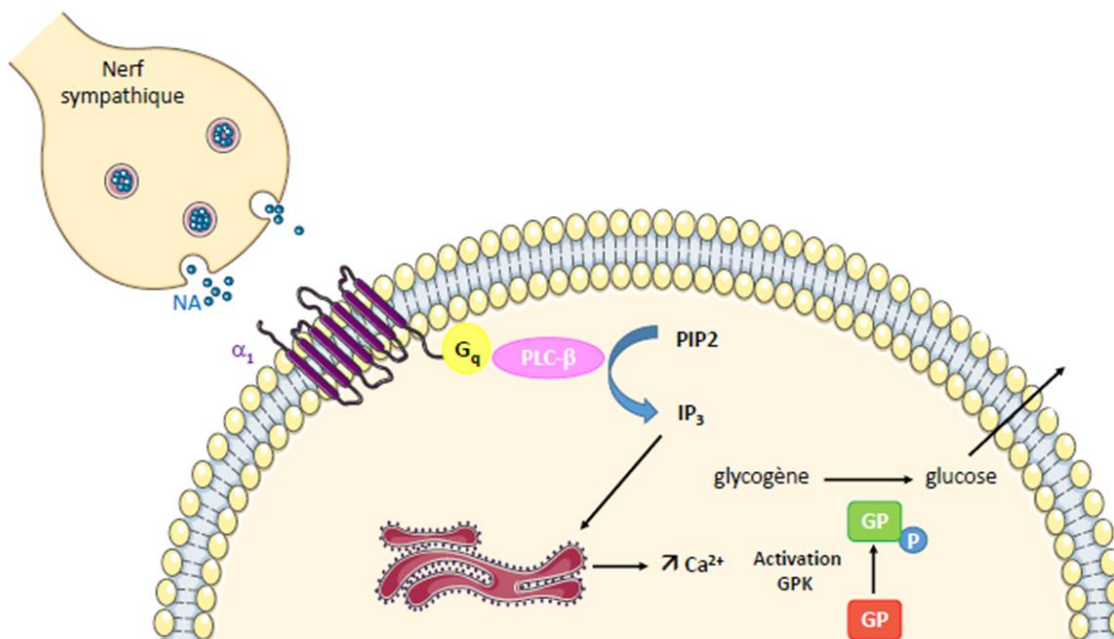


Figure 7 : Stimulation sympathique de la glycogénolyse hépatique

α_1 : récepteurs α_1 -adrénergiques ; G_q : protéine G_q ; GPK : glycogène phosphorylase kinase ; GP : glycogène phosphorylase (inactive) ; pGP : glycogène phosphorylase phosphorylée (active) ; IP₃ : inositol-1,4,5-triphosphate ; NA : noradrénaline ; PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ; PLC- β : phospholipase C β

La stimulation sympathique a donc pour conséquence une activation de la glycogène-phosphorylase et de la glucose-6-phosphatase ainsi qu'une inhibition de la glycogène synthase. Cette régulation enzymatique entraîne une diminution des réserves hépatiques en glycogène et une augmentation de la synthèse de glucose qui va être libéré dans la circulation sanguine. A côté de ces effets sur le métabolisme glucidique, le SNS a également un rôle au niveau du métabolisme lipidique où il va permettre de réguler la sécrétion des TG, de l'apo-B et des « very-low density lipoprotein » ou VLDL (Mizuno and Ueno, 2017; Taher et al., 2016; Yi et al., 2010). En effet, Yamagauchi *et al* ont montré sur des foies de rats que la perfusion *in situ* de NA diminuait la sécrétion de TG d'un facteur de 60% par rapport au contrôle. Par ailleurs cet effet met en jeu les récepteurs α_1 puisque la perfusion de phényléphrine permet de reproduire l'effet de la NA sur les TG au contraire d'une perfusion d'isoprénaline. De même, la sécrétion de l'apoprotéine ApoB (apoprotéine majoritaire des VLDL) est inhibée en présence de NA sans avoir d'effet sur sa synthèse. Ainsi, la sécrétion de VLDL par le foie va être diminuée en cas de stimulation par la NA (Tavares and Seelaender, 2008; Yamauchi et al., 1998) ou par l'adrénaline (Brindle and Ontko, 1988). Au niveau de la production des corps cétoniques, les résultats de différentes études sur l'effet de l'innervation hépatique par le SNS sont contradictoires. Les premières recherches menées sur des foies de rats perfusés *in situ* ont montré que la stimulation sympathique, via l'interaction NA et ATP, inhibait la production hépatique d'acétoacétate et de β -hydroxybutyrate ainsi que leur sécrétion plasmatique (Beuers et al., 1986; Yamamoto et al., 1995). Plus tard, Krentz *et al* ont, eux, étudié chez des volontaires sains les effets obtenus par perfusion de catécholamines à dose physiologique et à dose pathologique sur la sécrétion hépatique des corps cétoniques. Comme la production des corps cétoniques dépend de la disponibilité en acides gras libres, ils ont rapporté la concentration plasmatique en corps cétoniques à celle des acides gras libres. Il ressort de leur étude qu'à dose physiologique, aussi bien la NA que l'adrénaline stimule la sécrétion des corps cétonique, alors qu'à dose pathologique, seule la NA a un effet stimulant sur celle-ci (Krentz et al., 1996).

II. Implication du système nerveux sympathique dans le syndrome métabolique

La prévalence du syndrome métabolique est dépendante des critères utilisés mais également de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique. De façon générale, au niveau de la population des Etats-Unis, on retrouve une prévalence comprise entre 18,99% et 38,5% (Beltrán-Sánchez et al., 2013; Ford et al., 2010). D'autres études épidémiologiques retrouvent des prévalences allant de 10 à 55% (Cameron et al., 2004; Maggi et al., 2006) pour la population européenne, de 8 à 46% en Inde selon les différentes populations étudiées (Cameron et al., 2004), et jusqu'à plus de 50% en Nouvelle Zélande (D Simmons and Thompson, 2004). Par contre, on retrouve une prévalence plus faible dans la population asiatique, comprise entre 3 et 11% pour le Japon, de 7 à 29% en Corée (Lee et al., 2008) et 13,7% en Chine (Gu et al., 2005). Au vu d'une prévalence générale toujours plus importante à travers le monde, cette pathologie est devenue un véritable enjeu de santé publique. Ceci est d'autant plus vrai que cette « épidémie » touche désormais de plus en plus d'enfants (Benmohammed et al., 2016; Kuschnir et al., 2016; MacPherson et al., 2016; Vanlancker et al., 2017) et qu'il n'existe pas de traitement spécifique mais plutôt des traitements pour chaque symptôme. Après avoir rappelé la définition du syndrome métabolique, nous décrirons ici l'ensemble des éléments de la littérature soulignant le lien existant entre une hyperactivité du SNS et les différents symptômes inclus dans la définition du syndrome métabolique. En effet, s'il est depuis longtemps démontré que les différents troubles retrouvés dans le syndrome métabolique sont associés à une augmentation de l'activité du SNS, la relation de causalité existant entre les différents éléments n'est pas clairement établie (Canale et al., 2013; Moreira et al., 2015; Tentolouris et al., 2008; Thorp and Schlaich, 2015).

A. Définitions du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique a été décrit pour la première fois par Reaven sous la dénomination de « Syndrome X » (Reaven, 1988) comme l'association d'une insulino-résistance avec hyperinsulinémie, d'une intolérance au glucose, d'une hypertension artérielle et de dyslipidémies (hypertriglycéridémie et diminution du HDL-cholestérol (HDL-C)). Par ailleurs, il montre que ce syndrome est associé à une augmentation du risque de maladie coronarienne. A ce moment-là, Reaven ne considérait pas l'obésité comme un critère nécessaire rentrant dans

la définition. Par la suite, de nombreuses communautés scientifiques se sont penchées sur ce syndrome et ont proposé d'autres définitions avec des critères, et des valeurs seuils, plus ou moins similaires.

1. Définition par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

En 1999, une équipe d'expert pour l'OMS a proposé une nouvelle définition de ce syndrome, appelé « syndrome métabolique », lors d'un rapport sur la « Définition, le diagnostic et la classification du diabète et de ses complications » (Alberti and Zimmet, 1998; W.H.O, 1999). Leur définition reprend les troubles glucidiques (insulinorésistance et intolérance au glucose, pouvant aller jusqu'au diagnostic de diabète) comme des points obligatoires qui devront être associés à au moins deux critères parmi les suivants (voir aussi tableau 1) :

- augmentation de la pression artérielle ($\geq 140/90$ mmHg)
- hypertriglycéridémie (≥ 150 mg/dL) et/ou diminution de la concentration plasmatique en HDL-C (< 35 mg/dL pour les hommes et < 39 mg/dL pour les femmes)
- obésité centrale : mesurée soit par l'indice de masse corporelle (IMC, > 30 kg/m²), soit par le ratio taille/hanches ($> 0,90$ pour les hommes et $> 0,85$ pour les femmes)
- micro-albuminurie (albuminurie ≥ 20 mg/min ou albumine/créatinine ≥ 30 mg/g).

2. Définition par l' European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR)

En réponse à cette définition de l'OMS, l'EGIR propose notamment de renommer le syndrome métabolique en « syndrome d'insulinorésistance » du fait du rôle central de celle-ci mais également car tous les troubles décrits ne sont pas des troubles métaboliques (Balkau and Charles, 1999). Les patients diabétiques sont exclus et l'insulinorésistance devient ainsi le critère obligatoire. Celle-ci sera associée à au moins 2 critères parmi les suivants :

- hyperglycémie à jeun ($\geq 6,1$ mmol/L ou 110 mg/dL, mais non diabétique)
- hypertension artérielle (HTA) ($\geq 140/90$ mmHg, ou patients traités pour HTA)

- dyslipidémies (triglycéridémie ≥ 180 mg/dL ou HDL-C ≤ 40 mg/dL ou patients traités pour dyslipidémie)
- obésité centrale (tour de taille ≥ 94 cm chez l'homme ou ≥ 80 cm chez la femme)

Comme la présence d'une micro-albuminurie ne peut pas toujours être reliée à une insulino-résistance, ce critère a été abandonné par l'EGIR.

3. Définition par le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III)

Peu de temps après, le groupe de travail américain NCEP-ATP III (NCEP, 2001) reprend le terme de « syndrome métabolique » qui comprend au moins trois critères parmi l'obésité (tour de taille ≥ 102 cm chez l'homme ou ≥ 88 cm chez la femme), HTA ($\geq 130/85$ mmHg), hyperglycémie à jeun (110 mg/dL), hypertriglycéridémie (≥ 150 mg/dL) et HDL-C (< 40 mg/dL chez l'homme et < 50 mg/dL chez la femme). Contrairement aux autres définitions, celle-ci abandonne la notion d'insulino-résistance comme critère principal et est plus à destination des cardiologues pour l'évaluation du risque cardiovasculaire.

4. Définition par l'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)

En 2003, l'AACE décide de proposer une nouvelle définition en redonnant un rôle central à l'insulino-résistance dans la physiopathologie du syndrome métabolique (Einhorn et al., 2003). Les différents critères inclus sont un compromis entre la définition de l'OMS et celle du NCEP-ATP III mais avec en plus la prise en compte de nouveaux facteurs de risque de développer une insulino-résistance (histoire familiale de diabète de type 2, d'HTA ou de maladies cardiovasculaires, syndrome des ovaires polykystiques, sédentarité...). Contrairement aux autres définitions, le nombre de critères nécessaires à l'établissement du diagnostic du syndrome métabolique n'est pas imposé.

5. Définition par l'American Heart Association (AHA)/National Heart, Lung and Blood Institute

L'AHA a également proposé ses propres critères pour le diagnostic du syndrome métabolique (Grundy, 2005). Ceux-ci reprennent les critères du NCEP-ATP III en affinant deux paramètres. Ainsi le seuil d'hyperglycémie à jeun a été abaissé à 100 mg/dL et le tour de taille doit prendre en compte les spécificités ethniques.

6. Définition par l'International Diabetes Federation (IDF)

En parallèle, l'IDF a cherché à trouver un consensus pour rassembler les différentes définitions (OMS, EGIR et NCEP-ATP III) et proposer un outil simple de diagnostic, approprié à la clinique et pouvant être utilisé partout dans le monde (Alberti et al., 2005). Dans cette définition, le groupe de travail reconnaît toujours l'importance de l'insulinorésistance dans le développement du syndrome métabolique. Toutefois, comme ce critère est difficile à évaluer en pratique clinique, il n'a pas été retenu dans la définition. A la place, l'obésité centrale a été définie comme critère obligatoire et son évaluation doit être adaptée aux caractéristiques de la population considérée (dernière version de la définition de 2009 (Alberti et al., 2009)). Par ailleurs, cette obésité centrale doit être associée à au moins deux critères parmi les suivants :

- Hyperglycémie à jeun ≥ 100 mg/dL ou traitement en cours
- Triglycéridémie ≥ 150 mg/dL ou traitement en cours
- HDL-C < 40 mg/dL chez l'homme et < 50 mg/dL chez la femme ou traitement en cours
- Pression artérielle systolique ≥ 130 mmHg ou diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement en cours

Malgré les tentatives de consensus réalisées par l'IDF et l'AHA pour établir une définition claire et plus simple, le nombre important de définitions du syndrome métabolique ainsi que le critère principal considéré qui varie, engendrent une certaine confusion parmi les cliniciens et les chercheurs. Actuellement, les deux définitions les plus utilisées sont celles du NCEP-ATP III et de l'IDF. L'étude de Gonzalez-Ortiz *et al* (González-Ortiz et al., 2006) a comparé l'impact de ces deux définitions dans une population américaine avec un excès adipeux. Parmi la population considérée, seul 1% des volontaires présente un syndrome métabolique selon la

définition du NCEP-ATP III contre 11% selon la définition de l'IDF. Les résultats de cette étude montrent donc que l'application de la définition de l'IDF est une méthode plus sensible pour détecter un syndrome métabolique dans une population à risque.

Les principales caractéristiques de ces différentes définitions se trouvent résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes définitions du syndrome métabolique.

	WHO (1998)	EGIR (1999)	NCEP-ATP III (2001)	AACE (2003)	AHA (2005)	IDF (2005)
Critère principal	Troubles du métabolisme glucidique	Hyperinsulinémie à jeun	/	Intolérance au glucose ou hyperglycémie à jeun	/	Obésité abdominale
Nombre de critères secondaires	2 ou +	2	3	1 ou + (jugement clinique)	3	2 ou +
Glycémie à jeun	- augmentée ou intolérance au glucose ou diabète de type 2 - et/ou ou insulino-résistance	- ≥ 110 mg/dL - ou intolérance au glucose - diabète type 2 exclus	> 110 mg/dL	- augmentée - ou intolérance au glucose - diabète type 2 exclus	- ≥ 100 mg/dL - ou diabète type 2 traité	- ≥ 100 mg/dL - ou diabète type 2 traité
HTA	$\geq 140/90$ mmHg	$\geq 140/90$ mmHg - ou HTA traitée	$\geq 130/85$ mmHg	$\geq 130/85$ mmHg	$\geq 130/85$ mmHg	- $\geq 130/85$ mmHg - ou HTA traitée
Dyslipidémies	- TG ≥ 150 mg/dL -et/ou HDL-C < 35 mg/dL ♂ et < 39 mg/dL ♀	- TG ≥ 180 mg/dL - et/ou HDL-C ≤ 40 mg/dL	- TG ≥ 150 mg/dL - HDL-C : < 40 mg/dL ♂ et < 50 mg/dL ♀	- TG ≥ 150 mg/dL - HDL-C : < 40 mg/dL ♂ et < 50 mg/dL ♀	- TG ≥ 150 mg/dL ou traité - HDL-C : < 40 mg/dL ♂ et < 50 mg/dL ♀ ou traité	- TG ≥ 150 mg/dL ou traité - HDL-C : < 40 mg/dL ♂ et < 50 mg/dL ♀ ou traité
Obésité	- IMC > 30 kg/m ² - et/ou taille/hanches $> 0,90$ ♂ et $> 0,85$ ♀	Tour de taille : ≥ 94 cm ♂ et ≥ 80 cm ♀	Tour de taille : ≥ 102 cm ♂ et ≥ 88 cm ♀	- IMC > 25 kg/m ² - ou tour de taille : ≥ 102 cm ♂ et ≥ 88 cm ♀	Tour de taille : ≥ 102 cm ♂ et ≥ 88 cm ♀ - et selon critères ethniques spécifiques	- IMC > 30 kg/m ² - ou tour de taille augmentée selon critères ethniques spécifiques
Autres	Microalbuminurie	/	/	Tout autre facteur (ou maladie) lié à l'insulinorésistance	/	/

B. Liens entre troubles cardio-métaboliques et hyperactivité sympathique

1. Obésité et hyperactivité sympathique

L'obésité est définie par l'OMS comme une augmentation anormale de la masse grasse totale et plus particulièrement une augmentation de la taille des adipocytes. On peut toutefois la subdiviser en deux sous-catégories : l'obésité abdominale (ou centrale), qui correspond à une augmentation du tissu gras dans la région abdominale, et l'obésité sous-cutanée (ou périphérique) qui correspond à une augmentation du tissu gras sous-cutané. Communément, l'accumulation de ce tissu gras est expliquée par un déséquilibre entre les apports caloriques, trop importants, et la dépense énergétique, trop faible. Du fait du rôle prépondérant du SNS dans la mobilisation des réserves énergétiques et la prise alimentaire, il a été rapidement suggéré qu'un déséquilibre de celui-ci pourrait être en lien avec l'apparition d'une obésité. En effet, plusieurs études ont montré qu'une surconsommation d'aliments avaient tendance à augmenter l'activité du SNS alors qu'une sous-alimentation ou un jeûne avaient tendance à la diminuer (Arone et al., 1995; O'Dea et al., 1982; Welle et al., 1991). Partant de ce constat, Landsberg propose comme hypothèse que l'augmentation de l'activité sympathique serait une réponse physiologique pour stimuler la thermogénèse (mobilisant de l'énergie) de façon à maintenir un poids constant en cas de surconsommation, et que ce phénomène serait médié via la sécrétion plus importante d'insuline (Landsberg, 2001).

D'autres équipes se sont intéressées à la mesure de l'activité du SNS chez des patients obèses. Ainsi, Grassi *et al* ont montré que chez des patients obèses normotendus (IMC moyen = 38,5), on trouve une augmentation significative de l'activité sympathique par rapport à des sujets minces (IMC moyen = 23,7), que celle-ci soit mesurée par microneurographie ou par dosage de la noradrénaline plasmatique (Grassi et al., 2004). Parmi les sujets obèses, les patients avec une obésité centrale (ratio taille/hanche = 0,98) présentent une hyperactivité sympathique mesurée par microneurographie supérieure à ceux avec une obésité périphérique (ratio taille/hanche = 0,85). Ce dernier résultat est également confirmé dans d'autres études (Alvarez, 2002, 2004). Toutefois, il faut noter que même en cas d'obésité abdominale stricte, l'activation sympathique n'est pas homogène dans tout l'organisme. On peut ainsi avoir une augmentation de l'activité du SNS au niveau de la vascularisation des muscles squelettiques et dans le tissu rénal alors qu'elle est diminuée dans le cœur et la peau avec une sécrétion d'adrénaline par la

médullosurrénale inchangée (Esler et al., 2006; Vaz et al., 1997). Si l'ensemble de ces données permet d'affirmer l'existence d'un lien entre obésité et hyperactivité sympathique, la relation de causalité entre hyperactivité sympathique et obésité n'est pas définie.

L'une des hypothèses émises met en cause la sécrétion importante de leptine par le tissu adipeux abdominal. De façon physiologique, son rôle est d'exercer un rétrocontrôle négatif dans le SNC induisant une sensation de satiété et une activation de la thermogénèse (par activation du SNS) qui vont permettre d'empêcher une prise de poids (Canale et al., 2013; Smith and Minson, 2012). Ainsi, plusieurs travaux chez des rongeurs ont montré que l'injection intracérébrale de leptine permet une activation du SNS au niveau du tissu adipeux brun ce qui active la thermogénèse, et dans le tissu rénal ce qui induit une augmentation de la pression artérielle (Dunbar et al., 1997; Mark et al., 2009; Rahmouni and Morgan, 2007). Chez les patients obèses, la sécrétion de leptine est augmentée alors que son élimination reste inchangée par rapport à des sujets minces du même âge, ce qui conduit à une hyperleptinémie (Eikelis and Esler, 2005). Cette hyperleptinémie chronique conduirait à une résistance sélective de ses récepteurs centraux. Ainsi, les mécanismes permettant la satiété et la thermogénèse seraient inhibés au contraire de l'activation sympathique rénale.

2. Hypertension artérielle et hyperactivité sympathique

L'HTA et ses complications cardiovasculaires sont l'une des causes majeures de décès à travers le monde. Le lien entre activité sympathique et existence d'une HTA est depuis de nombreuses années un sujet d'études importantes (Grassi et al., 2015). Julius *et al* (Julius et al., 1991) ont montré que des sujets jeunes hypertendus présentent également une tachycardie associée à une augmentation des taux plasmatiques de NA, témoignant d'une augmentation de l'activité sympathique. Ceci a été confirmé aussi bien par microneurographie ou par mesure du « spillover » de la NA (mesure des taux de NA entrant dans la circulation sanguine) chez de jeunes adultes hypertendus (Esler et al., 1988; Floras and Hara, 1993; Grassi, 1998) mais également chez des patients jeunes à des stades très précoces (pression artérielle diastolique > 90 mmHg de façon intermittente) dans le développement de l'HTA (Anderson et al., 1989). De façon intéressante, l'hyperactivité sympathique est proportionnelle à la sévérité de l'HTA. D'autres études chez des patients d'âge moyen et des sujets âgés ont également montré une augmentation systématique de l'activité sympathique par microneurographie mais pas toujours lors de la mesure du « spillover » de NA au niveau rénal (Esler et al., 1988, 1989, Grassi et al.,

1998, 2000; Schlaich et al., 2004). Ainsi, l'augmentation de l'activité sympathique semble être impliquée dès les premiers stades du développement de cette pathologie et être une des causes possibles dans la physiopathologie de l'HTA essentielle. Ceci n'est par contre pas vrai dans le développement d'une HTA secondaire (Grassi et al., 1998).

En outre, les barorécepteurs de rats spontanément hypertendus sont moins sensibles aux variations de pression que ceux de rats normotendus (Brown et al., 1976). En effet, ceux-ci, situés au niveau de l'arc aortique et du sinus carotidien, sont très sensibles à une variation de pression artérielle et permettent, selon le cas, d'activer ou d'inhiber le SNS de façon à rétablir une pression artérielle normale. Chez les rats spontanément hypertendus, une augmentation de pression artérielle plus importante est nécessaire pour activer la boucle baroréflexe et donc inhiber le SNS. Cette boucle baroréflexe est également altérée chez l'homme en cas d'HTA mais aussi en cas d'obésité viscérale ou d'insulinorésistance (Thorp and Schlaich, 2015). De ce point de vue, l'hyperactivité sympathique pourrait donc être induite en cas de syndrome métabolique via l'altération de la boucle baroréflexe et ainsi conduire au développement de l'HTA. Toutefois, tous les patients avec un syndrome métabolique ne sont pas hypertendus soulignant la complexité des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du syndrome métabolique.

Enfin, un autre mécanisme mis en jeu passe par l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Au niveau rénal, l'hyperactivation du SNS entraîne une augmentation des résistances vasculaires (effet sur les récepteurs α_1 -adrénergiques vasculaires), un relargage de rénine par les cellules juxtaglomérulaires (via la fixation de NA sur les récepteurs β_1 -adrénergiques) et une rétention hydrosodée (Bell-Reuss et al., 1976; Kirchheim et al., 1989; Zanchetti, 1977). Celle-ci produit ensuite une augmentation du débit cardiaque et de la pression artérielle (Moss et al., 2011). Le rôle de la NA dans le tissu rénal a été montré dans des expériences chez le rat et le chien où la perfusion de NA dans l'artère rénale entraîne une HTA (Manolis et al., 2014). Le rôle du SNS dans la physiopathologie de l'HTA induite par l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone a eu d'importantes répercussions dans la prise en charge clinique des patients : développement de médicaments ciblant ce système et la dénervation rénale. L'objectif de cette dernière alternative thérapeutique est de détruire les fibres nerveuses sympathiques des artères rénales de façon à induire une baisse de la pression artérielle chez des patients présentant une HTA résistante à une quadrithérapie ou plus, bien menée (Pathak et al., 2012; Schlaich, 2016).

3. Troubles du métabolisme lipidique et hyperactivité sympathique

Par définition une dyslipidémie concerne un déséquilibre dans les concentrations plasmatiques en low density lipoprotein-cholestérol (LDL-C), en TG et en acides gras libres, qui augmentent, et celles en HDL-C, qui diminuent.

Comme décrit dans le paragraphe I.B.3, une activation du tissu adipeux blanc par le SNS induit la lipolyse des TG stockés dans les adipocytes pour produire du glycérol et des acides gras libres. Ces derniers sont ensuite sécrétés dans la circulation générale où ils auront différents effets sur les tissus périphériques. Différentes études ont montré qu'en cas d'obésité, les concentrations plasmatiques en acides gras libres sont augmentées et inversement corrélées à la sensibilité à l'insuline (Bruce et al., 1994; Perseghin et al., 1997). Ainsi, une augmentation des acides gras libres induit une résistance à l'insuline via une inhibition du substrat 1 du récepteur à l'insuline (IRS-1) et donc de l'activation de PI3K qui aura pour conséquence (i) une diminution de la translocation du transporteur au glucose GLUT4 au niveau du muscle squelettique (Kruszynska et al., 2002; Zierath et al., 1997), (ii) une augmentation de la néoglucogénèse hépatique qui va induire une hyperinsulinémie compensatrice (Smith and Minson, 2012) et (iii) une augmentation de la synthèse hépatique de TG et la production de very-low density lipoprotein (VLDL) et de LDL-C (Gutierrez et al., 2009). Le mécanisme cellulaire reliant les acides gras libres à l'inhibition d'IRS-1 a été élucidé par Shi *et al.* Leur étude montre que les acides gras libres ont la capacité d'induire les voies inflammatoires via la stimulation du Toll-like receptor 4 (TRL4) présent sur les macrophages mais aussi dans les tissus périphériques comme le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique (Shi et al., 2006). La fixation des acides gras libres sur TLR4 induit l'activation de l'Ik κ b (*inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta*, appartenant à la voie de NK κ B) et de Jnk1 (*C-jun N-terminal kinase 1* qui appartient à la voie JNK/AP-1). Ces deux enzymes induisent une phosphorylation de IRS-1 de la sérine en position 307 ce qui empêche son interaction avec le récepteur à l'insuline (Aguirre et al., 2002). Par ailleurs, les acides gras libres sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (Lam et al., 2005) et d'aller stimuler l'hypothalamus conduisant à une augmentation de l'activité sympathique (Florian and Pawelczyk, 2010), notamment au niveau cardiaque, aussi bien chez des sujets obèses que non obèses (Gadegbeku et al., 2002; Paolisso et al., 2000). De même, une infusion aiguë de lipides sous forme d'acides gras libres chez des sujets normotendus avec une histoire familiale d'hypertension ou non induit une augmentation aiguë de l'activité sympathique cardio-vasculaire qui va se manifester par une élévation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Lopes et al., 2001).

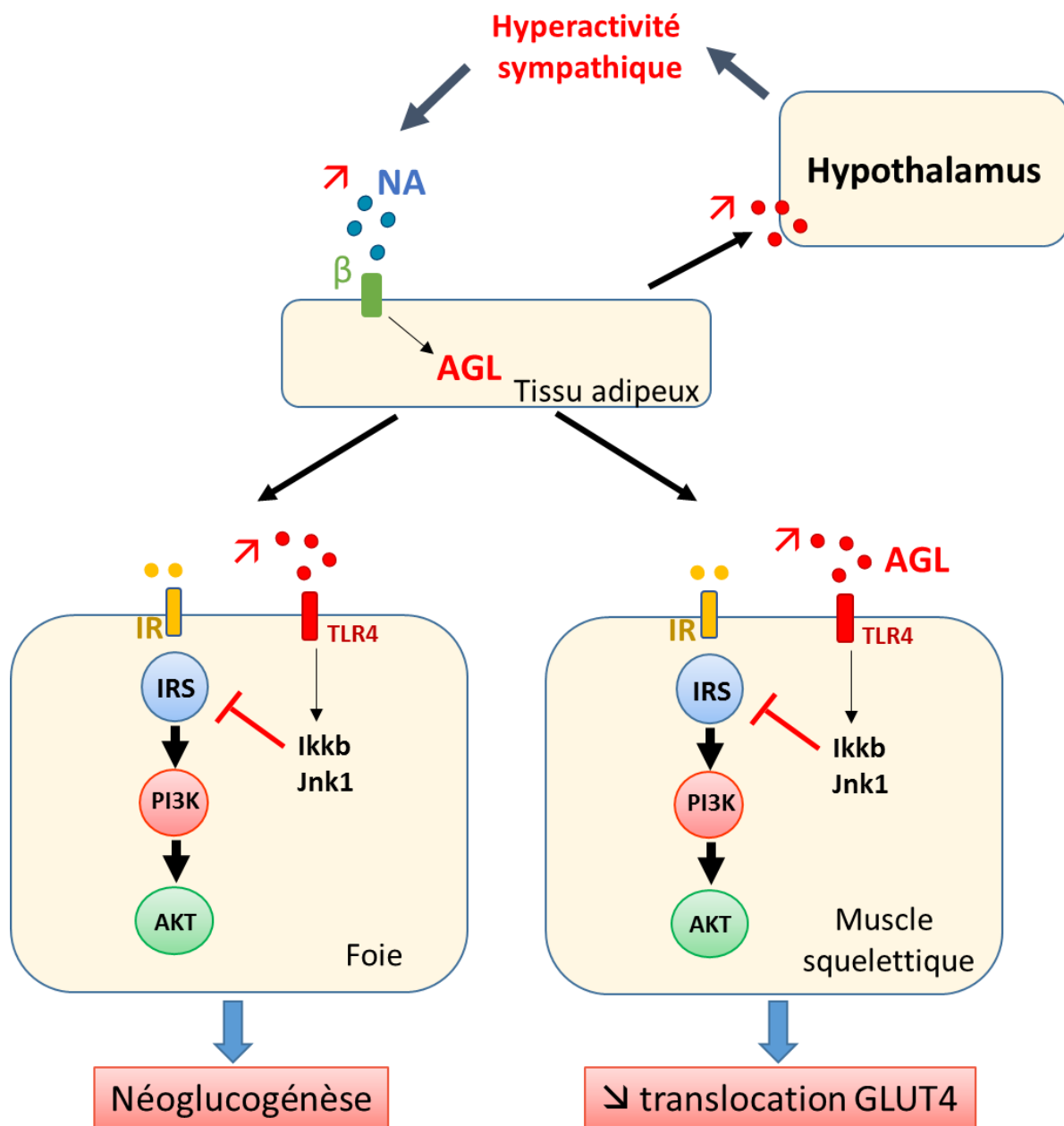


Figure 8 : Schéma de synthèse des effets des acides gras libres et boucle d'auto-activation du SNS.

L'augmentation de synthèse des acides gras libres (AGL) va induire une insulino-résistance (augmentation de la néoglucogénèse hépatique et diminution de la translocation de GLUT4 dans les muscles squelettiques) et augmenter l'activité sympathique par stimulation de l'hypothalamus.

β : récepteur β -adrénergique, IR : récepteur à l'insuline, IRS : Insuline receptor substrate, Ikkb : I kappa B kinase beta, Jnk1 : C-jun N-terminal kinase 1. NA : noradrénaline, TLR4 : Toll-like receptor 4.

4. Troubles du métabolisme glucidique et hyperactivité sympathique

Les troubles glucidiques observés dans le syndrome métabolique peuvent aller d'une hyperglycémie à jeun isolée jusqu'au diabète de type 2 pour les dernières définitions de 2005 émises par l'IDF et l'AHA. Quelle que soit la sévérité des troubles glucidiques observés, le point commun à l'origine de ceux-ci est le développement chez les patients d'une insulino-résistance, définie comme une incapacité de cette hormone à produire ses effets dans les organes cibles malgré une sécrétion normale par les cellules β -pancréatiques (Canale et al., 2013; Duvnjak and Duvnjak, 2009). D'un point de vue biologique, elle se traduit sous la forme d'une hyperinsulinémie basale et/ou d'une augmentation de l'*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (index HOMA-IR). La question de savoir si l'insulino-résistance est la cause ou la conséquence d'une hyperactivité sympathique a longtemps été, et est toujours, débattue.

Comme la présence d'une insulino-résistance est fortement associée à la plupart des symptômes du syndrome métabolique, il est difficile d'étudier l'activité sympathique chez des patients avec une insulino-résistance isolée. Des études chez des sujets sains soumis à un clamp euglycémique hyperinsulinémique ont montré que l'activité sympathique mesurée par microneurographie augmente de manière proportionnelle à l'augmentation de l'insulinémie (Anderson et al., 1991; Berne et al., 1992). De plus, on retrouve également une faible augmentation de la fréquence cardiaque tout au long du clamp ainsi que des taux plasmatiques de NA, mais pas de variation notable de la pression artérielle ni de l'activité sympathique au niveau de la peau. Une expérience similaire a comparé l'effet d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique à une perfusion de glucose ou de fructose sur l'activité sympathique. Il ressort de cette dernière que l'augmentation de l'activité sympathique est bien induite par l'hyperinsulinémie et non pas due aux variations du métabolisme glucidique (Vollenweider et al., 1993). Des études chez l'animal ont montré que des injections intracérébroventriculaires d'insuline permettent l'augmentation de l'activité du SNS mais de façon non uniforme dans l'organisme (Muntzel et al., 1994; Rahmouni et al., 2004). L'action centrale de l'insuline se fait par fixation à ses récepteurs localisés dans le noyau arqué hypothalamique (Cassaglia et al., 2011).

Par ailleurs, on retrouve une forte activité inflammatoire en cas d'obésité abdominale avec une infiltration macrophagique du tissu adipeux viscéral. Ces macrophages vont être responsables de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL6) ou le *tumor necrosis factor α* (TNF α) (Gutierrez et al., 2009). La sécrétion de ces deux cytokines par le

tissu adipeux viscéral en cas d'obésité peut jouer un rôle propre dans le développement d'une insulino-résistance. En effet ces facteurs peuvent activer des voies inhibitrices de la cascade de l'insuline qui aura donc moins d'effet au niveau des tissus périphériques sensibles (muscle squelettique et foie par exemple) et donc induire une insulino-résistance (de Luca and Olefsky, 2008).

C. Hyperactivité sympathique comme cause des troubles métaboliques ?

Si l'hyperactivité sympathique est depuis longtemps reconnue comme une cause possible de l'HTA primaire, de plus en plus d'arguments semblent également la définir comme étant à l'origine du développement des autres troubles métaboliques.

Une étude longitudinale menée chez des jeunes japonais non obèses et normotendus ou à la limite de l'HTA, a montré que l'augmentation de la NA plasmatique précède l'apparition d'une hyperinsulinémie et d'une élévation de la pression artérielle (Masuo et al., 1997). Ceci serait en faveur de l'hypothèse que l'hyperactivité sympathique serait une cause du développement de l'insulino-résistance. La vasoconstriction induite par une activation chronique du SNS peut également perturber l'augmentation postprandiale physiologique du flux sanguin au niveau du muscle squelettique, entraînant une diminution de l'entrée cellulaire de glucose ce qui va engendrer une production accrue d'insuline par le pancréas et donc une insulino-résistance (Julius and Valentini, 1998).

Dans leur étude, Jang *et al* ont également montré que les adipocytes de rats Sprague-Dawley sous régime enrichi en graisse ont des concentrations intracellulaires en calcium significativement plus élevées que chez les rats contrôles. Le régime enrichi en graisse induit également une insulino-résistance comme déterminée par un clamp euglycémique hyperinsulinémique chez ces rats. De façon intéressante, le prétraitement des rats sous régime enrichi en graisse avec un chélateur de calcium a permis d'améliorer l'insulino-résistance en normalisant les taux intracellulaires en calcium. D'après leur étude, il semble que le développement d'une insulino-résistance dans les organes cibles de l'insuline serait lié à une augmentation importante des concentrations intracellulaires en calcium (Jang et al., 2002). Or la stimulation sympathique des hépatocytes via les récepteurs α_1 induit une augmentation de calcium intracellulaire. On peut donc supposer qu'une hyperactivation sympathique chronique

pourrait être la cause du développement d'une insulino-résistance via l'augmentation trop importante de la concentration intracellulaire en calcium.

Enfin, l'hyperactivité sympathique conduit à une lipolyse accrue dans le tissu adipeux et donc à une augmentation des taux d'acides gras libres (voir paragraphe II-B-3). Ceux-ci inhibent les voies de signalisation de l'insuline au niveau intracellulaire. Ceci atteste donc d'un effet indirect de l'hyperactivité sympathique sur le développement d'une insulino-résistance (Johnson and Olefsky, 2013).

La définition de la relation entre obésité et hyperactivité sympathique est difficile à mettre en évidence puisque la plupart des études animales et humaines ont lieu chez des sujets déjà obèses. Un des premiers arguments en faveur d'une hyperactivité sympathique comme cause de l'obésité vient de l'étude de Palatini *et al* sur des enfants, non obèses et non hypertendus. En effet, ces enfants ont tout d'abord été classés en fonction de l'index cardiaque de leurs parents mesurés par doppler écho-cardiographique (faible, moyen ou élevé). Il est à noter que les parents avec l'index cardiaque le plus élevé présentent également une augmentation significative des concentrations plasmatiques en NA. Même s'ils ne présentent aucun trouble cardio-métabolique, les enfants issus des parents avec l'index cardiaque le plus élevé ont un IMC, un ratio taille sur hanche, une pression artérielle diastolique et une insulinoémie significativement supérieurs par rapport aux autres groupes d'enfants. Le statut cardiovasculaire (index cardiaque et taux plasmatiques de NA) des parents serait donc un facteur prédictif important du surpoids, de l'obésité abdominale, de l'HTA et de l'hyperinsulinoémie pour la descendance (Palatini et al., 1999).

Il est communément admis que la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux est inhibée en cas d'insulino-résistance et/ou d'obésité. Toutefois, plusieurs études ont montré que la stimulation de cellules 3T3-L1 (Fasshauer et al., 2001) et de cultures primaires d'adipocytes murins par des agonistes bêta-adrénergiques diminuait la sécrétion d'adiponectine. Ce phénomène est également retrouvé *in vivo* après injection à des souris d'un agoniste β -adrénergique, le BRL37344 (Delporte et al., 2002). Cette inhibition passe par une régulation dose-dépendante de l'expression du gène de l'adiponectine mais aussi par la maturation post-transcriptionnelle de l'adiponectine. L'administration d'un antagoniste β -adrénergique permet de réverser ces effets. Enfin il semble que ce sont plus particulièrement les agonistes β -adrénergiques qui vont inhiber l'expression du gène de l'adiponectine et stimuler l'expression

du gène du récepteur 2 de l'adiponectine et du $TNF\alpha$. Vis-à-vis des catécholamines endogènes, le récepteur β_3 -adrénergique a une affinité moins importante pour la NA que les autres récepteurs β -adrénergiques et il faudra donc des quantités plus importantes de NA pour le stimuler. Une hyperactivité sympathique, avec une sécrétion plus élevée de NA par les nerfs sympathiques au niveau adipocytaire pourrait donc être la cause d'une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'adiponectine.

Par ailleurs des études précliniques dans différents modèles de rats ont montré que l'utilisation de sympatho-inhibiteurs comme la moxonidine ou la rilménidine (agonistes des récepteurs aux II aux imidazolines) vont permettre non seulement de réduire la pression artérielle systolique mais vont également avoir des effets bénéfiques sur d'autres troubles du syndrome métabolique. Ainsi l'administration de moxonidine à des rats SHROB (spontaneously hypertensive obese Koletsky rat) induit une diminution des taux d'acides gras libres et de l'insulinémie à jeun et améliore l'insulinorésistance (Ernsberger et al., 1999) ou des taux de TG et de cholestérol total (Koletsky, 2003). Des effets similaires sont observés chez le rat Zucker avec une diminution de la glycémie à jeun et une amélioration de l'insulinorésistance (Yakubu-Madus et al., 1999) voire une diminution de la masse corporelle des animaux et une augmentation du transport du glucose dans le muscle squelettique (Henriksen et al., 1997). La rilménidine permet, quant à elle, de prévenir la prise de masse corporelle et d'abolir l'insulinorésistance induites par la mise en place d'un régime enrichi en fructose chez des rats Wistar (Berthault et al., 1996). Chez l'homme, l'utilisation de la moxonidine (Chazova et al., 2006; Chazova and Schlaich, 2013; Ebinç et al., 2008; Sanjuliani et al., 2006) et de la rilménidine (De Luca et al., 2000) permet également une amélioration des taux de TG, de cholestérol total, de leptine, de glycémie en association à l'effet hypotenseur. Toutefois, ces améliorations sont moins marquées que chez l'animal et selon les études, on peut même observer une légère aggravation de l'insulinorésistance. Cet effet négatif pourrait provenir de l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques qui même s'il est beaucoup moins important que pour la clonidine, n'est pas négligeable.

Des travaux dans notre laboratoire sur une nouvelle classe de ligand sélectif des récepteurs II aux imidazolines chez des rats spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) (Fellmann et al., 2013) et chez le rat Zucker (données non publiées) ont permis de montrer que la diminution de l'activité sympathique par une nouvelle molécule sympatho-inhibitrice entraîne une

amélioration de l'HTA, de la masse corporelle des animaux, de l'insulinorésistance, une baisse des TG et du cholestérol total ainsi qu'une augmentation de l'adiponectine.

A l'inverse des modèles animaux présentant une hyperactivité sympathique, les souris *Dbh^{-/-}* sont un modèle murin génétiquement induit d'hypoactivité sympathique par défaut de synthèse de NA et d'adrénaline. Des travaux effectués sur ces souris ont montré qu'elles sont intolérantes au froid (inhibition de la thermogénèse dans les adipocytes bruns par défaut de NA et d'adrénaline et absence de vasoconstriction périphérique), ont une augmentation de l'apport alimentaire mais sont résistantes au développement d'une obésité (Thomas and Palmiter, 1997). Elles présentent également à l'état basal une baisse chronique de la glycémie associée à une hyperinsulinémie, mais ont une réponse tout à fait normale lors de tests de tolérance au glucose (Marie and Palmiter, 2003). Ce modèle laisse donc penser qu'une hypoactivité sympathique serait protectrice du développement d'un syndrome métabolique.

Enfin et de façon très intéressante, une étude clinique au sein de notre laboratoire (données non publiées) a mis en évidence l'existence d'une hyperactivité sympathique (mesurée par microneurographie) chez des patients en « pré-syndrome » métabolique c'est-à-dire chez des patients qui ne présentent que 2 critères (dont le surpoids ou l'obésité modérée) parmi les 3 nécessaires à la définition du syndrome métabolique. Pour certains patients, cette hyperactivité sympathique précoce était mesurée même en l'absence d'hypertension artérielle. En parallèle, l'étude de Licht *et al* retrouve les mêmes résultats que nous, à savoir l'existence d'une hyperactivité sympathique chez des patients sans syndrome métabolique semble prédictive du développement de pathologies cardio-vasculaires, de diabète et de dyslipidémies au cours des années à venir (Licht et al., 2013).

Toutes ces données nous laissent finalement supposer que l'hyperactivité sympathique chronique pourrait être la cause primaire du développement de troubles métaboliques. Le schéma suivant récapitule les différents arguments que nous avons développés.

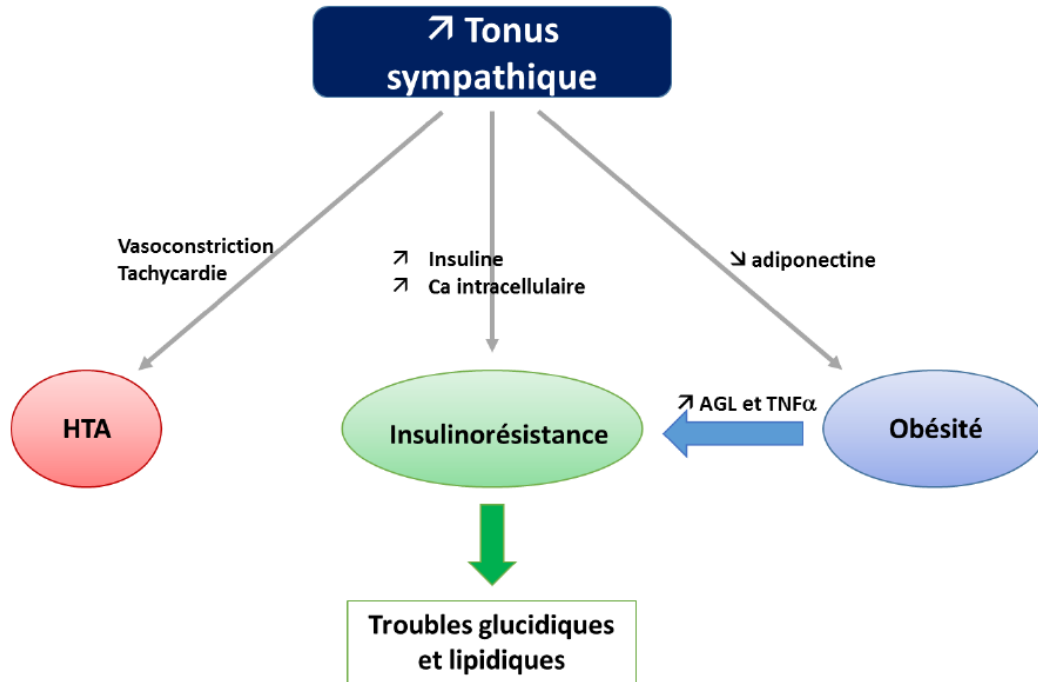


Figure 9 : Rôle de l'hyperactivité sympathique dans le contrôle métabolique

III. Objectifs du travail de thèse

Dans cette première partie introductive, nous avons mis en évidence le rôle du SNS dans le fonctionnement de l'organisme et son implication dans le syndrome métabolique mais surtout son association à chaque différent trouble pris de manière individuelle. L'absence de preuves formelles permettant d'établir la relation de causalité entre SNS et syndrome métabolique constitue un argument en faveur de ce travail. De plus en plus de travaux récents à travers le monde et dans notre équipe laissent à penser que l'hyperactivité sympathique n'est peut-être pas qu'une conséquence des dérèglements métaboliques observés dans le syndrome métaboliques. Nous avons donc émis l'hypothèse que la mise en place d'une hyperactivité sympathique chronique serait la cause d'au moins certains de ces troubles. Une réponse positive à cette hypothèse serait d'un intérêt clinique majeur, puisque (i) elle permettrait de constituer un facteur pronostic afin de diagnostiquer les patients à risque avant le début de leur maladie et

(ii) l'inhibition de l'activité sympathique deviendrait une cible thérapeutique intéressante chez des patients prenant jusqu'à présent une thérapeutique spécifique à chaque dysfonctionnement.

L'objectif principal de ce travail est donc de déterminer si le SNS pourrait être la cause des différents troubles associés au syndrome métabolique, et/ou un facteur aggravant la survenue de ceux-ci en présence d'un régime alimentaire déséquilibré.

Pour répondre à cet objectif, à travers les deux parties suivantes résumant l'ensemble de nos travaux, nous avons cherché à (1) développer une méthode d'évaluation de la quantité de masse totale et du rapport masse grasse/masse maigre permettant un suivi longitudinal chez la souris. Parmi les autres critères de choix de cette méthode, la facilité de mise en œuvre, la reproductibilité ainsi que la possibilité de segmenter les tissus adipeux viscéral et sous-cutané sont entrés en ligne de compte. Puis, après avoir déterminé la méthode la plus adaptée à nos attentes, nous avons étudié (2) l'influence d'une hyperactivation sympathique sur le développement de troubles métaboliques comme facteur suffisant et/ou aggravant, dans un modèle murin de souris génétiquement modifiées. Cette deuxième grande partie est scindée en deux chapitres : dans un premier temps (i) nous nous sommes intéressés à l'effet d'une hyperactivité chronique génétiquement induite sur le développement d'un ou plusieurs symptômes du syndrome métabolique. Nous avons ensuite étudié les effets d'un régime enrichi en fructose dans notre modèle murin d'hyperactivité sympathique pour voir si les troubles observés dans la partie (i) pouvaient être majorés.

Résultats expérimentaux

Partie I : Comparaison de l'impédancemétrie et de la microtomodensitométrie pour la mesure de la masse grasse totale chez la souris

I. Introduction

L'intérêt de cette mise au point est d'avoir un suivi non invasif et surtout sur le long terme des animaux. En effet, la méthode de référence consiste à sacrifier les animaux afin de récupérer les différents tissus adipeux et les peser, nous interdisant par là même le suivi du même animal au cours du temps. La microtomodensitométrie (μ TDM) est une méthode d'imagerie basée sur les différences de masse volumique des tissus rencontrés par un rayonnement X. De manière naturelle, le tissu adipeux présente une masse volumique supérieure à celle de l'air, et inférieure à celle des tissus mous et des os permettant sa visualisation en tomodensitométrie sans adjonction de produit de contraste iodé. Nous avons développé une segmentation semi-automatique afin d'observer et de quantifier le tissu adipeux sous-cutané et abdominal tout en éliminant les os et les tissus mous. Après segmentation, le volume de tissu adipeux est représenté par un rendu isosurfacique grâce à un algorithme du marching cubes (collaboration avec P. Choquet, laboratoire d'imagerie préclinique, Hôpital de Hautepierre). Cette visualisation de la répartition du tissu adipeux a été comparée à une mesure de la proportion totale de masse grasse par impédancemétrie (collaboration avec l'équipe de S. Blanc, DEPE, CNRS, Cronenbourg). L'impédancemétrie est une méthode peu invasive et rapide qui permet également la détermination de la proportion de masse grasse. Du fait de sa facilité de mise en œuvre, de son coût plus faible et de son caractère non ionisant, l'utilisation de l'impédancemétrie est une méthode qui prend de plus en plus d'ampleur tant chez l'Homme que chez l'animal. Toutefois, et contrairement à l'utilisation du μ TDM, l'impédancemétrie ne permet pas d'accéder à la répartition du tissu adipeux dans l'organisme. Afin de déterminer quelle méthode était la plus pertinente mais également dans un souci de translationnalité avec la recherche clinique, nous avons comparé pour la première fois chez la souris ces deux méthodes.

II. Article

Comparison of bioimpedance spectroscopy and X-Ray micro-computed tomography for total fat volume measurement in mice

Gaëlle Aubertin¹, Amira Sayeh², Jean-Philippe Dillenseger², Estelle Ayme-Dietrich¹, Philippe Choquet^{2&}, Nathalie Niederhoffer^{1*&}

¹ Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire (EA7296), Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

² Preclinical Imaging Lab, UF 6237, Pôle d'imagerie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, ICube, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France

& These authors contributed equally to this work

*Corresponding author

Email : nathalie.niederhoffer@unistra.fr

Abstract

Obesity and the metabolic syndrome are two pathologies whose prevalence are in a constant increase. Evaluation of the total fat mass but also of the distribution between visceral and subcutaneous adipose tissue are important factors while assessing the pathophysiology of these two pathologies. Computed tomography (CT) and bioimpedance (BIS) are the translational methods the most frequently used in human beings as well as in rodent models in longitudinal studies on adiposity and obesity. Surprisingly, no direct comparison of micro-CT and BIS was reported yet in mice. Therefore, the present study was carried out to evaluate and compare the accuracy and the uncertainty of measurement of micro-CT and BIS in this species.

The proportion of fat mass was measured with BIS, micro-CT and direct post-mortem tissue weight, and correlations between the data were established to evaluate the accuracy of the methods but also the uncertainty of BIS and micro-CT.

There were significant correlations between weights of fat tissues on scale and proportion of total fat mass determined by BIS or micro-CT ($r=0.81$ and 0.86 respectively) but both methods

overestimated the total fat mass, especially in the smallest animals; overestimation of fat mass was amplified with BIS compared to micro-CT. In addition BIS and micro-CT were highly correlated ($r=0.94$). Test-test reliability showed a greater variability of the BIS with respect to the micro-CT (coefficient of variation = 17.2 vs 5.6% respectively). Hence, as far as subtle differences between groups or changes within one group are awaited, micro-CT may appear as the most reliable method for determination of fat mass in mice. Micro-CT, unlike BIS, will also allow to qualitatively and quantitatively differentiate between subcutaneous and visceral adipose tissues, which is of major importance in studies on adiposity and its complications.

Key words: Adipose tissue, fat mass, X-Ray micro-computed tomography, bioimpedance spectroscopy

Introduction

Since its first description by Reaven in 1988 (1) as “Syndrome X”, prevalence of the metabolic syndrome is in constant increase all over the world (2–7). Between 1998 and 2009, several definitions of the metabolic syndrome have been proposed by different expert groups (8–12), all of them holding abdominal obesity as one of the diagnosis criterion. In its new worldwide definition of metabolic syndrome, the International Diabetes Federation (11) even retained central obesity as a mandatory criterion for diagnosis. Indeed, obesity is associated with a high risk of death by cardiovascular disease (13,14). However, several studies have suggested that changes in regional distribution of adipose tissues rather than obesity represent risk factors for cardiovascular and metabolic disorders. Hence, obese patients display worse metabolic profile when abdominal obesity is associated with an excess of visceral adipose tissue than when it is associated with an excess of subcutaneous fat tissue (15–19). These observations led Haffner (20) and Despres *et al* (21) to highlight the importance of being able to evaluate the amount of total adipose tissue and especially visceral adipose tissue, more than obesity in general.

In humans, the simplest and fastest methods to estimate the presence or absence of obesity are (i) the calculation of body mass index (BMI), defined as the ratio of weight (kg) to height (m^2) and (ii) the measurement of waist circumference (cm). If the BMI allows to classify the population in underweight ($BMI < 18,5 \text{ kg}/m^2$), normal ($18,5 \leq BMI < 25 \text{ kg}/m^2$), overweight ($25 \leq BMI < 30 \text{ kg}/m^2$) or obese ($\geq 30 \text{ kg}/m^2$), the relationship between BMI and the proportion of body fat depends largely on age, gender and ethnicity (22). In the same way, Despres *et al* (21) reported that waist circumference is a better predictor of visceral adipose tissue than BMI. For a long time, the gold standards for the quantification of total adipose tissue and especially

visceral adipose tissue have been X-Ray computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) (22). However, these two imaging methods are expensive and need specialized staff and specific installations; CT also exposes patients to ionizing radiations. Due to these disadvantages, new methods based on impedance measures were developed, *i.e.*, single or multiple frequency bioimpedance analysis (BIA) and bioimpedance spectroscopy (BIS). These methods are non-invasive, relatively inexpensive, portable and do not require extensive operator training; therefore, they are increasingly used to assess body composition in many clinical applications, as prognostic indicator of disease severity, morbidity, hydration status, malnutrition or lymphedema (23,24). However, if conventional BIS gives the proportion of adipose tissue, it does not provide information on the distribution of adipose tissue within the body. Recently, a new dual-BIA instrument has been developed to assess intra-abdominal fat area and subcutaneous fat area, by measuring truncal impedance and surface impedance at the abdomen (25).

As stated above, obesity seems to play a crucial role in the development of metabolic syndrome, but despite intensive research, the pathophysiological mechanisms involved remain poorly understood and efficient anti-obesity treatments are still lacking. Rodent animal models are the most largely used in preclinical studies to identify pathophysiological mechanisms and new therapeutical strategies for obesity, type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia or metabolic syndrome. The determination of adipose tissue proportion and distribution in these animals is therefore very important. Furthermore, since these pathologies usually evolve over several months, methods allowing longitudinal follow-up of the animals are needed.

The first method to determine the animal total fat mass (FM) is to recover and weigh all adipose tissues after sacrifice. Logically, this method does not allow to follow the evolution of the fat mass in the same animal over time. Another way to reach the proportion of fat mass is by using isotopic dilution. Animals are injected deuterium-labeled water (D_2O) and/or $H_2^{18}O$; the monitoring of the kinetics of deuterium (and/or ^{18}O) equilibration and disappearance allows the calculation of the total body water (TBW), then the deduction of the fat-free mass (FFM) and the FM (26,27). This method has been used in many animal species, including rats, but since it requires repeated blood sampling, it is hardly applicable to the longitudinal follow-up of mice. Moreover, as far as translational studies are concerned, it may appear more appropriate to use the same method of body composition analysis in animals and humans. Dual X-ray absorptiometry (DEXA) and quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) have also been used successfully to quantify the FFM and FM, but they do not provide spatial distribution of

adipose tissue (28,29). X-Ray micro-computed tomography (μ CT) is a well-established method since about ten years to determine adipose tissue proportion in rodents (30–34). Advantages of μ CT are multiple: it is non-invasive and relatively quick, enables repeated measurements over time in the same animal and provides detailed spatial information on body fat distribution. Limits are the image processing (manual or semi-automatic fat segmentation), which is time consuming, and exposure to ionizing radiation. Finally, over the last decade, the use of BIS to determine the body composition in small animals has spread from rat models (35–38) to mouse models (39). Similarly to μ CT, this method is rapid; additional advantages are the low cost and the possibility to obtain at once the proportion of the different body compartments (TBW, FFM and FM). However, the procedure is more invasive than μ CT due to the placement of needles and devices designed for BIS measurements in small animals do not allow to differentiate the various adipose tissues.

Accuracy of μ CT and BIS in rodents have been validated by comparing values of body composition obtained with reference techniques. Hence, quantification of adiposity by μ CT was mostly compared to direct post-mortem weighing of abdominal and subcutaneous fat pads (30,32–34); body composition evaluated by BIS was correlated to values obtained by isotopic dilution and chemical carcass analysis (36,37,40). To our knowledge, there is however no report of a comparison between μ CT and BIS in mice. Therefore, the present study was carried out to evaluate and compare the accuracy and the uncertainty of measurement of μ CT and BIS in this species. For this purpose, the proportion of adipose tissue was measured with these two methods and by direct post-mortem tissue weigh, and correlations between the data were established. Intra-mouse variations were also calculated. These data may help identifying the most adapted method according to the pursued objectives, and thus making the choice between μ CT and BIS when designing a new study in mice.

Materials and methods

Animals

A total of 51 male C57Bl/6J mice were housed in standard conditions (12 hours light/dark cycle, temperature controlled) and had *ad libitum* access to food and water. A first group of 5 mice was used to determine the density of visceral and subcutaneous adipose tissue (see below). A second group comprising 24 mice was defined, in which fat mass (FM) was evaluated by BIS, μ CT and in some of them, adipose tissue weight (see below); data served for the evaluation of uncertainty of the BIS and μ CT methods (Study 1, n=3) and for the analysis of the correlations

between the different methods of measurement of FM (Study 2, n=21). A third group of 10 mice was used to evaluate the inherent error of the *in vivo* measurement (due to physiological movements) by the μ CT (Study 3). Finally, a fourth group of 12 mice (aged of 25 weeks) was used to validate the use of μ CT for the assessment of FM increase in a longitudinal study (Study 4). Mice were randomized to receive either normal diet (n=6; A04 diet, SAFE, Augy, France) or enriched diet (n=6; high fat high glucose diet containing 12.5% added bacon, 0.4% added cholesterol and 33% added glucose, SDS Dietex, Argenteuil, France) for 15 weeks.

All procedures were conducted in accordance with the French and European regulations on experimentation in mammals. Experiments were approved by the animal ethics committee of the Strasbourg University.

Determination of fat density

Difficulty to find precise references for the value commonly used pushed us to develop a method of measurement of fat density. Based on the work of Ali *et al* (41), we designed an overflowing density meter (**Fig. 1**, Verlabo 2000, Strasbourg, France). As the density of fat is lower than water, kerosene was used as inert liquid to measure the volume of fat (42). Animals were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg intraperitoneally, Pentobarbital® 6%, Ceva, France), then sacrificed with an overdose of pentobarbital. Visceral and subcutaneous adipose tissue samples were immediately harvested. For the determination of density, a piece of fat was weighed and placed slowly in the density meter tank; the volume of kerosene (mL \pm 0.05 mL) that had flowed into the graduated tube was then measured. Five consecutive measurements were performed for a single fat sample (weight and corresponding volume). The density of fat was calculated by applying the standard formula, $d = \frac{m}{v}$ given in mg/mL. This protocol was repeated for a total of 10 samples (5 abdominal and 5 subcutaneous adipose tissue).

Determination of fat mass

All measurements were carried out by the same experimenter and in the same conditions.

Measurement of fat mass by Bioimpedance Spectroscopy (BIS)

The whole body composition was measured with the ImpediVet Bioimpedance Spectroscopy device (ImpediMed Limited, Brisbane, Australia) as described previously (36). Mice were weighed, anesthetized with 2% isoflurane (Iso-Vet, Piramal Healthcare UK Limited, United Kingdom) pushed by air and placed in prone position on a temperature-controlled table

(Minerve, Esternay, France) with a non-conductive single-use absorbent support. Hair from the head and the back were removed for placement of electrodes. Body position was standardized: fore- and hind-limbs on each side of the body and tail extended distally. Four 25G needles, used as electrodes, were placed subcutaneously along the midline of the back according to manufacturer's instructions (**Fig. 2**). The length between "B" and "C" electrodes was measured; this length, together with age and body mass of the animal is used for the calculation of the different parameters given by the BIS device. Thirty continuous BIS measurement (1 measurement/s) were acquired from 4 kHz to 1MHz. The acquired data were downloaded and analyzed with the proprietary software (ImpediVet BISI version 1.0.0.4) to determine TBW (L) and global FM (%). The whole procedure took less than 10 minutes.

Measurement of fat mass by micro-computed tomography (μ CT)

Following anesthesia with isoflurane (1.5-2%) pushed by air, mice were laid in a supine position in an imaging cell (Minerve, Esternay, France), in which the animal was kept anesthetized, warmed and could be monitored (respiration and/or ECG, Minerve Esternay, France). Three-dimensional x-ray images were acquired on the CT part of a μ SPECT- μ CT (eXplore speCZT Vision 120, General Electric, Waukesha, USA). Three fields of view were necessary to acquire whole body and the total acquisition time was 15 min. The tube voltage was set at 80kV with a constant 32mA current. All acquired volumes were reconstructed with a voxel size equal to $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$. Reconstructed and stitched together images to obtain a whole body volume, were filtered with a Gaussian filter to reduce noise.

Because X-ray are less attenuated by fat than by soft tissues, it could be isolated from the other structures (air, bones and soft tissues) by choosing thresholds based on the Hounsfield unit values. Values for the thresholds were established using a fat pad placed behind the animal, which was also taken in the field of view (see **Fig. 3a**). The volume of the fat pad was calculated from the sample weight and fat density (see above). On the reconstructed images, threshold was set so that the volume of the fat pad determined from density matched the calculated volume (see **Fig. 3c**) and therefore makes it possible to be independent from the operator. The proportion of global FM (%) was calculated as the ratio between the volume of total (subcutaneous and visceral) adipose tissue (mm^3 ; see **Fig. 3d**) and the whole body volume (mm^3 ; see **Fig. 3b**).

Measurement of fat mass by autopsy

At the end of the different procedures, anesthetized mice were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital (120mg/kg, intraperitoneally). Adipose tissues (visceral and subcutaneous) were harvested and weighed on a precision scale (Mettler Toledo PL200, ± 0.001 g, Zürich, Switzerland).

Study design

Study 1: Test-test reliability

To assess the uncertainty of BIS and μ CT methods, body composition measurements were performed with the two methods on 3 mice, three times a day (morning, noon and evening), during five consecutive days. For each method and each animal, coefficients of variation (CV, see below) were computed between all measurements (n=15 values/animal). A second comparison is related to the day, in this case mean was calculated for each day (n=5 values/animal). A third comparison is related to the time (morning, noon and afternoon), in this case mean was calculated for each time on the five days (n=3 values/animal). For all animals, anesthesia lasted less than 30min and recovery from anesthesia occurred within 5-10min; mice were placed in their own cage and had full access to food and water between the different sessions.

Study 2: Comparison of total body fat mass determined by BIS, μ CT and autopsy

Twenty one mice of variable body weight (26 to 36g) were weighed, then anesthetized with isoflurane to measure the proportion of FM by BIS, as described above. Immediately afterwards, and without awakening, each animal was subjected to μ CT scan. Correlations were calculated between total body weight and fat estimation by BIS or μ CT, and between FM values derived from BIS and μ CT. Autopsy took place within 24 hours after the measurements by BIS and μ CT. Total adipose tissue was recovered and weighed; correlations between the weight of harvested adipose tissue and the FM obtained by BIS or μ CT were calculated.

Study 3: Comparison of ungated and gated scans

Due to physiological, i.e., respiratory movements of the animals, partial volume effect is noticeable at the edges between air and soft tissues, especially at diaphragmatic cupola. Hence the CT value of the voxels at these edges decrease and so these voxels might be considered as adipose tissue. This is especially true for lungs and may require manual correction. These

artefacts may be minimized by respiratory-gated acquisitions. However, gated-scans increase scanning-time. In order to test whether results differ between scans performed in respiratory ungated animals and gated animals, we studied fat distribution in thoracic region of 10 mice and repeated the scans with respiratory-gating on the same field of view. The scans were then analyzed without and with manual correction (*i.e.* suppression) in lungs area (**Fig. 4**).

Study 4: Validation of μ CT for the follow-up of fat mass increase in longitudinal study

Twelve male mice were randomized into 2 groups (n=6 each) received normal (ND) or high fat diet (HFD) for 15 weeks. All animals had free access to food and water. Animals were weighed and submitted to *in vivo* μ CT scans as described above, before and after 15 weeks of diet. All measurements were performed at the same time of day. The proportion of global FM (%) was determined for each animal at each time and the mean differences between the beginning and the end of the diet were compared.

Statistical analysis

Results are given as mean \pm SD. Correlations between the different parameters were studied using linear regression analysis. Uncertainty of BIS and μ CT measurements are presented as coefficients of variation (CV), defined as the standard deviation (SD) divided by the mean of the measures and multiplied by hundred. In Study 4, changes in body weight and FM were analyzed by 2-way analysis of variance (with diet and time as factors) (GraphPad Prism 6.0 software, La Jolla, United States of America). The significance level of the results was set at $\alpha = 0.05$.

Results

Determination of fat density

For all the different measurements, the mean fat density was 0.92 ± 0.01 mg/mL. There were no significant differences between abdominal fat density and subcutaneous fat density (0.92 vs 0.92 mg/mL respectively, $p=0.999$).

Study 1: Test-test reliability

The results for test-test reliability are presented in **Table 1**. The CV for all the measurements of total adipose tissue (3 mice, 15 values/mouse at different times and days) ranged between 15.3% and 20.3% for BIS and between 3.5% and 7.4% for μ CT.

The variation of the measure, after repositioning of the animal during the same day, is weaker with μ CT than with BIS ($4.1\pm 3.0\%$ vs $13.6\pm 7.0\%$ respectively, $p=0.10$). Similarly, when comparing the variation of the two methods while measuring at the same time (morning, noon or evening) along 5 days, the CV was three times lower for μ CT than for BIS ($1.2\pm 0.3\%$ vs $3.5\pm 2.2\%$ respectively, $p=0.15$).

Study 2: Comparison of total body fat determined by BIS, μ CT and autopsy

For each animal ($n=21$), adipose tissue proportions estimated by BIS and μ CT were plotted against body weight (**Fig. 5a**) and against weight of harvested fat (**Figs. 5b and 5d**). There was a significant correlation between the body mass (g) of the mice and the total FM (%), be it estimated by BIS or μ CT ($r=0.55$ and $p<0.05$ for both methods). The correlation coefficient between *ex vivo* fat mass (g) and the proportion of FM was slightly higher when estimated by μ CT compared to BIS ($r= 0.86$ and 0.81 respectively; $p<0.001$ for both). For both methods, the calculated theoretical fat weight was significantly correlated to the weight of harvested adipose tissue (**Figs. 5c and 5e**) but was always overestimated; when using μ CT, the Pearson correlation coefficient was however largely higher and the overestimation was less than with BIS.

Comparing the two methods, proportions of total adipose tissue estimated by μ CT and BIS were strongly correlated ($r=0.94$, $p<0.001$; **Fig. 5f**). However, the slope of regression line was >1.0 indicating that FM values assessed by BIS were slightly higher than those estimated by μ CT.

Study 3: Comparison of ungated and gated scans

There was no statistically significant difference between the proportions of adipose tissue in the thoracic region measured by μ CT with or without respiratory-gating and before and after manual lungs area correction (see **Table 2**). Values ranged from $22.95 \pm 4.01 \%$ to $25.04 \pm 3.73 \%$, with a maximal error of $2.1 \pm 0.7\%$.

Study 4: Validation of μ CT for the follow-up of fat mass increase in longitudinal study

There was no significant differences in initial body weight (27.3 ± 2.2 g vs 26.2 ± 0.8 g for ND and HFD groups, respectively) and in FM ($17.3\pm 2.3\%$ vs $19.8\pm 3.3\%$ for ND and HFD groups, respectively) among the two groups (**Fig. 6**). After 15 weeks, mice fed with ND displayed no significant increase of body weight or FM (+1.5 g and +2.5% respectively, $p>0.05$ versus T0). Inversely, body weight increased significantly in the HFD group (+16.2 g, $p<0.05$); this was associated with a significant increase in FM (+23.4%) measured by μ CT.

Discussion

In this study, we compared for the first time the accuracy and uncertainty of BIS and μ CT, two methods allowing the assessment of the proportion of adipose tissue in mice. Indeed, BIS and CT are the translational methods the most frequently used in human beings (43–45) as well as in rodent models (30–40) in longitudinal studies on adiposity and obesity. In clinical research, only two studies have compared these two methods (46,47). Both reported strong correlations between the different methods. However, Park *et al* (46) showed significant overestimation of visceral adipose tissue by dual-BIA in the larger ranges of values of fat mass. Surprisingly, no direct comparison of μ CT and BIS was reported yet in mice.

First, we developed a semi-automated method for the segmentation and quantification of adipose tissues by μ CT. Discrimination of fat from other tissues is achieved by applying a threshold in Hounsfield units that isolates density voxels of fat tissue from the others. Consequently, reliability of fat mass measurements relies on the choice of the most appropriate threshold. In our experiments, the threshold value was determined by matching the mass of a sample of harvested fat to the volume calculated by μ CT and converted into mass using 0.92 mg/mL as fat density value. This value was measured with our density meter and is the same as that used by others (48,49). The main interest of this first work is to have developed a semi-automated method for the segmentation which is independent of the operator. We also ensured that the total adipose tissue volume determined using our procedure was not overestimated by the respiratory movements of the animals and the presence of air within lung tissues. Approaches to limit miscategorizing of lung air as adipose tissue are (i) to perform respiratory-gated acquisitions or (ii) to perform manual segmentation around the lung area. After analyzing our data with and without synchronization and for each case, with and without manual

segmentation, we did not observe any significant differences in the measured proportion of total adipose tissue in the thoracic region. The maximal error between the different conditions was about 2%, which is within the range of variability of the μ CT procedure (1.2-5.6%). These data suggest that both corrections, which are time consuming and considerably lengthen the duration of the whole μ CT procedure, are not required in mice. Since duration is usually regarded as a major limit of the method, this result may represent a strong argument favoring the use of μ CT in mice.

To validate the accuracy of μ CT and BIS in mice and compare the two methods, total adipose tissue was evaluated by μ CT or BIS and values were matched to the mass of adipose tissue resected at autopsy of the animals.

FM proportions estimated by μ CT and BIS over a large range of values were strongly correlated ($r=0.94$); of note, BIS values were slightly (3%) higher than μ CT values and, more importantly, were more fluctuating than μ CT values. Hence, for a FM measured by μ CT settled at 20%, BIS displayed FM values varying from 14% to 22% (-30% to +10%); in contrast, for a FM measured by BIS settled at 20%, μ CT values varied from -10% to +15% only. Total FM obtained by μ CT or BIS was also highly correlated with the weight of harvested adipose tissue ($r=0.86$ and $r=0.81$, respectively). This is in agreement with previous studies which validated μ CT measurement of adipose tissue against partially (30–32) and completely (33,34) resected adipose tissue weights or compared the mass of total adipose tissue obtained by BIS with that obtained by chemical analysis carcass (36). In all cases, very good correlations were reported, with correlation coefficients ranging from 0.91 to 0.99. However, when calculating a theoretical fat mass from the BIS or μ CT data and animals body weight, we noticed that both methods overestimated the fat mass, especially in the smallest animals, and that overestimation was amplified with BIS compared to μ CT (theoretical fat mass ranging from 3.5-6g and 3.2-4.2g for BIS and μ CT respectively, in mice with 1.8g of fat measured at autopsy). Similar findings were reported previously (34,36). One possible explanation may reside in the difficulty of harvesting all the fat, particularly in the abdominal region, leading to underestimation of the total fat mass in animals. This, however, holds true for both methods and can therefore not account for the differences observed between BIS and μ CT. A plausible explanation for this difference is the higher variability of the BIS measurements. While assessing the reliability of the two methods, we found coefficients of variation three times higher for BIS than for μ CT. This can be explained by the fact that the value given by BIS, unlike μ CT, is extremely dependent on the hydration animal status, the position of the animal and the placement of the

needle electrodes (36). In agreement, FM values varied considerably over 15 independent measurements (3x/day, 5 consecutive days), with a coefficient of variation of 17%. Our data show that the time of measurement represents the most important factor of variability (CV=13.6±7.0% for data obtained at morning, noon and afternoon), most probably reflecting changes in the nutrition and hydration status of animal along the day. Thus, performing BIS evaluation always at the same time seems crucial to improve reliability. The influence of the time of measurements is much less pronounced for μ CT. Based on our results we cannot reject the importance of measuring at the same time although for μ CT. In the BIS procedure, accuracy in the determination of the distance between B and C electrodes also plays a key role. This length, together with age and body mass of the animal, is used for the calculation of the different parameters given by the device. Small differences in the measurement of this distance may produce large fluctuations in the calculated FM, accounting for high variations of the BIS method. Moreover, accuracy of the distance measurement likely decreases in small animals, which could contribute to the enhanced variability in this particular population. Finally, we noticed that intrinsic variability of BIS is much higher in animals with low FM: coefficients of variation within one session (30 continuous measurements during 30 seconds) were 8.6 to 19% in animals with low FM (13-15%) versus 2.7 to 6.7% in animals with high FM (35-38%). Although not fully understood, this observation may also partly explain why BIS overestimation was enhanced in small animals. In their studies using μ CT, Hillebrand *et al* (33) and Lubura *et al* (34) noticed CV values of the same range than ours (4.5 and 2.2% vs 1.2 to 5.6%, respectively). Looking at BIS variability, a day-to-day variation of 3.5% has been reported (37), in accordance with the CV obtained in the present study (3.5±2.2). In contrast, Smith *et al* (36) found a CV of 5.4% on 2 successive sessions performed on the same day, after repositioning the needle electrodes, compared to our value of 13.6% on 3 successive scans. This large discrepancy may be explained by the fact that in their study, animals were not awakened between the two successive sessions, while in our study, animals were allowed to recover from anesthesia during several hours and were placed in their own cage with full access to food and water before repeating the measurement.

Finally, animal body weight and FM estimated by BIS and μ CT were significantly correlated. However, the calculated coefficients of correlation were relatively low ($r=0.55$ for both methods) and, for a same given body weight, the proportions of total fat mass varied greatly (even from single to double in some cases), irrespective of the method used. These data confirm that body weight *per se* is not a good prognostic factor for the presence of obesity (50–52). In

order to validate μ CT as a valuable tool for the long-term follow-up of mice, we designed a study in which animals were prone to develop obesity through enriched diet. In all animals, the proportion of FM was evaluated on one day at the same time, *i.e.*, in conditions which were set as the most reliable ($CV=1.2\pm 0.3\%$). As expected in adult mice under normal diet, the proportion of FM increased only moderately over the 15 weeks (+2.5%), but the difference was beyond the detection threshold of the μ CT. In contrast, enriched diet induced a 2-fold increase in total FM. These data confirm that μ CT represents a precise and suitable tool for detecting moderate as well as large increases in FM in mice over a long period of time. In addition and in agreement with our conclusion, Upadhyay *et al* (53) demonstrated that μ CT is also valuable to highlight small (<10%) reductions in the amount of white adipose tissue induced by pharmacological treatments.

In summary, our data show that BIS and μ CT are two valid methods to assess the proportion of fat mass in mouse models of obesity or metabolic syndrome. However, BIS values display a much greater variability, limiting its sensitivity. Hence, as far as subtle (*i.e.*, < 5-10%) differences between groups or changes within one group are awaited, μ CT may appear as the most reliable method for determination of FM. μ CT, unlike BIS, will also allow to qualitatively and quantitatively differentiate between subcutaneous and visceral adipose tissues, which is of major importance in studies on adiposity and its complications.

Acknowledgments

The authors thank Isabelle Chery, Alexandre Zahariev and Stephane Blanc (Département d'Ecologie, Physiologie, et Ethologie, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS, University of Strasbourg, France) for the BIS device and their technical assistance.

References

1. Reaven GM. Banting lecture 1988 Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595–607.
2. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33(2):351–75.
3. Maggi S, Noale M, Gallina P, Bianchi D, Marzari C, Limongi F, et al. Metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease in an elderly Caucasian cohort: the Italian Longitudinal Study on Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(5):505–510.
4. Lee CMY, Huxley RR, Woodward M, Zimmet P, Shaw J, Cho NH, et al. Comparisons of Metabolic Syndrome Definitions in Four Populations of the Asia-Pacific Region. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008;6(1):37–46.
5. Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US*: Metabolic syndrome: A harmonious definition. *J Diabetes*. 2010;2(3):180–93.
6. Simmons D, Thompson CF. Prevalence of the metabolic syndrome among adult New Zealanders of Polynesian and European descent. *Diabetes Care*. 2004;27(12):3002–4.
7. Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Reynolds R, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *The Lancet*. 2005;365(9468):1398–405.
8. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabet Med*. 1998;15(7):539–553.
9. Balkau B, Charles M-A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. *Diabet Med*. 1999;16(5):442–443.
10. Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, Handelsman Y, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract*. 2003;9:5–21.

11. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J, Group IETF, others. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*. 2005;366(9491):1059–1062.
12. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640–5.
13. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med*. 2006;355(8):763–778.
14. Jee SH, Sull JW, Park J, Lee S-Y, Ohrr H, Guallar E, et al. Body-mass index and mortality in Korean men and women. *N Engl J Med*. 2006;355(8):779–787.
15. Despres J-P, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1990;10(4):497–511.
16. Pouliot M-C, Després J-P, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, et al. Visceral obesity in men: associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes*. 1992;41(7):826–834.
17. Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2002;282(3):E657–63.
18. Goodpaster BH, Krishnaswami S, Resnick H, Kelley DE, Haggerty C, Harris TB, et al. Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care*. 2003;26(2):372–379.
19. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2004;53(8):2087–94.

20. Haffner SM. Abdominal Adiposity and Cardiometabolic Risk: Do We Have All the Answers? *Am J Med.* 2007;120(9):S10–6.
21. Despres J-P, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(6):1039–49.
22. Mattsson S, Thomas BJ. Development of methods for body composition studies. *Phys Med Biol.* 2006;51(13):R203–28.
23. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gómez J, et al. Bioelectrical impedance analysis—part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr.* 2004;23(6):1430–53.
24. Mulasi U, Kuchnia AJ, Cole AJ, Earthman CP. Bioimpedance at the Bedside Current Applications, Limitations, and Opportunities. *Nutr Clin Pract.* 2015;30(2):180–193.
25. Ida M, Hirata M, Odori S, Mori E, Kondo E, Fujikura J, et al. Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction: Monitoring Abdominal Adiposity Changes by Dual BIA. *Obesity.* 2013;E350–3.
26. Garcia C, Rosetta L, Ancel A, Lee PC, Caloin M. Kinetics of stable isotope and body composition in olive baboons (*Papio anubis*) estimated by deuterium dilution space: a pilot study. *J Med Primatol.* 2004;33(3):146–151.
27. Simmen B, Bayart F, Rasamimanana H, Zahariev A, Blanc S, Pasquet P. Total Energy Expenditure and Body Composition in Two Free-Living Sympatric Lemurs. White CR, editor. *PLoS ONE.* 2010 Mar 25;5(3):e9860.
28. Reed DR, Bachmanov AA, Tordoff MG. Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol Behav.* 2007;91(5):593–600.
29. Taicher GZ, Tinsley FC, Reiderman A, Heiman ML. Quantitative magnetic resonance (QMR) method for bone and whole-body-composition analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2003;377(6):990–1002.

30. Luu YK, Lublinsky S, Ozcivici E, Capilla E, Pessin JE, Rubin CT, et al. In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model. *Med Eng Phys.* 2009;31(1):34–41.
31. Lublinsky S, Luu YK, Rubin CT, Judex S. Automated Separation of Visceral and Subcutaneous Adiposity in In Vivo Microcomputed Tomographies of Mice. *J Digit Imaging.* 2009;22(3):222–31.
32. Judex S, Luu YK, Ozcivici E, Adler B, Lublinsky S, Rubin CT. Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. *Methods.* 2010;50(1):14–9.
33. Hillebrand JGG, Langhans W, Geary N. Validation of Computed Tomographic Estimates of Intra-abdominal and Subcutaneous Adipose Tissue in Rats and Mice. *Obesity.* 2010;18(4):848–53.
34. Lubura M, Hesse D, Neumann N, Scherneck S, Wiedmer P, Schürmann A. Non-Invasive Quantification of White and Brown Adipose Tissues and Liver Fat Content by Computed Tomography in Mice. Hennige AM, editor. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e37026.
35. Yokoi K, Lukaski HC, Uthus EO, Nielsen FH. Use of bioimpedance spectroscopy to estimate body water distribution in rats fed high dietary sulfur amino acids. *J Nutr.* 2001;131(4):1302–1308.
36. Smith Jr DL, Johnson MS, Nagy TR. Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. *Int J Body Compos Res.* 2009;7(1):21.
37. Hu L, Maslanik T, Zerebeckyj M, Plato CF. Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2012;65(2):75–82.
38. Shen C-L, Zhu W, Gao W, Wang S, Chen L, Chyu M-C. Energy-restricted diet benefits body composition but degrades bone integrity in middle-aged obese female rats. *Nutr Res.* 2013;33(8):668–76.
39. Chapman ME, Hu L, Plato CF, Kohan DE. Bioimpedance spectroscopy for the estimation of body fluid volumes in mice. *AJP Ren Physiol.* 2010;299(1):F280–3.

40. Rutter K, Hennoste L, Ward LC, Cornish BH, Thomas BJ. Bioelectrical impedance analysis for the estimation of body composition in rats. *Lab Anim.* 1998;32(1):65–71.
41. Density meter for solids [Internet]. [cited 2016 Oct 17]. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed071p681>
42. Allen T.H., Krzywicki H.J., Roberts J.E. Density of fat, water and solids in freshly isolated tissues. *Journal of applied physiology.* 1959;1005–8.
43. Seidell JC, Oosterlee A, Thijssen MA, Burema J, Deurenberg P, Hautvast JG, et al. Assessment of intra-abdominal and subcutaneous abdominal fat: relation between anthropometry and computed tomography. *Am J Clin Nutr.* 1987;45(1):7–13.
44. Brandberg J. Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in Determination of Human Body Composition [Internet]. [University of Gothenburg]; 2009 [cited 2016 Sep 18]. Available from: <http://hdl.handle.net/2077/19048>
45. Pietrobelli A, Rubiano F, St-Onge M-P, Heymsfield SB. New bioimpedance analysis system: improved phenotyping with whole-body analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(11):1479–84.
46. Park KS, Lee D-H, Lee J, Kim YJ, Jung KY, Kim KM, et al. Comparison between two methods of bioelectrical impedance analyses for accuracy in measuring abdominal visceral fat area. *J Diabetes Complications.* 2016;30(2):343–9.
47. Yamakage H, Ito R, Tochiya M, Muranaka K, Tanaka M, Matsuo Y, et al. The utility of dual bioelectrical impedance analysis in detecting intra-abdominal fat area in obese patients during weight reduction therapy in comparison with waist circumference and abdominal CT. *Endocr J.* 2014;61(8):807–819.
48. Watts GF, Chan DC, Barrett PHR. Adipose tissue compartments and the kinetics of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in non-obese men. *Metabolism.* 2002;51(9):1206–10.
49. Hill AM, LaForgia J, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Estimating abdominal adipose tissue with DXA and anthropometry. *Obesity.* 2007;15(2):504–504.

50. Björntorp P. Classification of obese patients and complications related to the distribution of surplus fat. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 1990;6(2):131–7.
51. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and-resistant rats. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(1):R231–R237.
52. Tamashiro KL, Hegeman MA, Nguyen MM, Melhorn SJ, Ma LY, Woods SC, et al. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol Behav.* 2007;91(4):440–448.
53. Upadhyay SK, Eckel-Mahan KL, Mirbolooki MR, Tjong I, Griffey SM, Schmunk G, et al. Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(24):E2239–48.

Legends of figures:

Fig. 1: Scheme of the use of the density meter

The density meter comprises a graduated tube connected to a tank, filled with an inert liquid (kerosene) (41,42). (a) A sample of mouse fat is weighed and placed slowly in the tank. (b) The fat sample overflows the kerosene that falls into the graduated tube. (c) The volume of kerosene (mL \pm 0.05mL) that has flowed into the graduated tube is measured and is equal to the volume of fat.

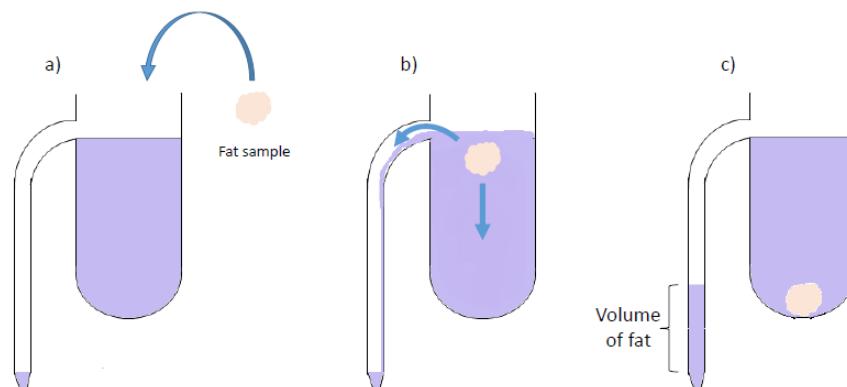


Fig. 2: Placement of bioimpedance spectroscopy electrodes on a mouse

Four 25G needles are placed subcutaneously along the midline of the back and serve to connect the electrodes to the animal. The B electrode (blue) is placed at the intersection between the median line and the line between the ears. The A electrode (black) is placed 1 cm from B towards the muzzle. The C electrode (yellow) is placed between the median line and that joining the thigh muscles. The D electrode (red) is placed 1 cm backwards at the base of the tail. The length between B and C needle electrodes is measured; this parameter, as well as the age and weight of the animal, is required by the software to calculate the proportion of fat mass.

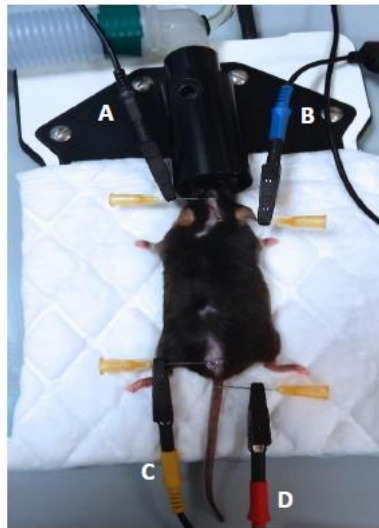


Fig. 3: The different steps for quantification of total adipose tissue by micro-computed tomography

Anesthetized mice are placed in a supine position in an imaging cell; three-dimensional x-ray images are acquired on the CT part of a μ SPECT- μ CT (eXplore speCZT Vision 120, GE, Waukesha, USA). Volumes are reconstructed with a voxel size equal to $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$; reconstructed images are filtered with a Gaussian filter to reduce noise. (a) Whole body scan. (b) Selection of whole body volume. (c) Choice of threshold level based on fat pad (FP). (d) Representation of total adipose tissue with subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue (VAT). (e) Isosurface representation of whole body in grey and fat in yellow.

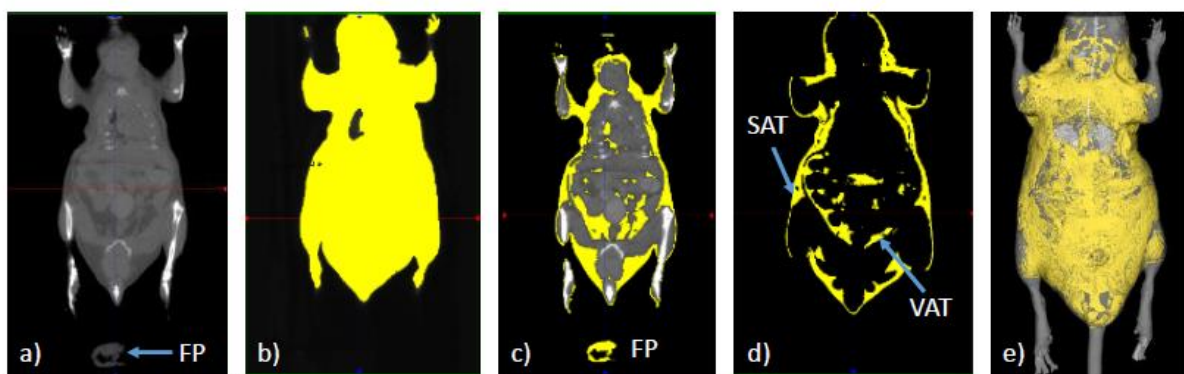


Fig. 4: The different steps for lung manual correction on fat volumes on micro-computed tomography scans

Micro-CT scans were performed in 10 mice, with and without respiratory-gated conditions, on the same field of view (thoracic region). (a) 3D representation of the region of interest around the lungs. (b) One slice of representation of total adipose tissue with lung selection through a region of interest (in orange dotted line). (c) Suppression of lung region on the same slice.

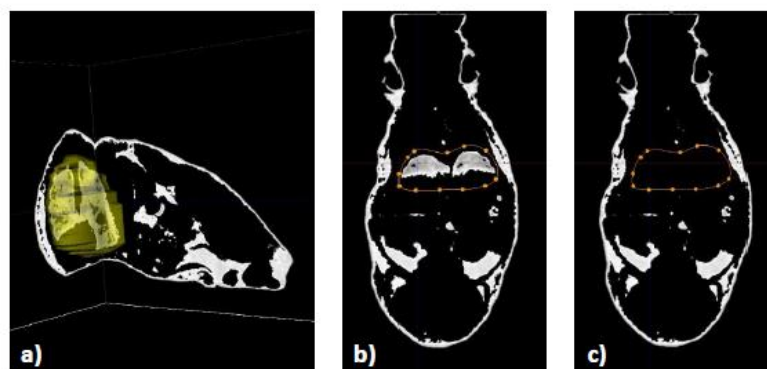


Fig. 5: Relationships between the different methods of determination of total adipose tissue

Thirty mice (body weight ranging from 26 to 36g) were used. In each animal, the proportion of adipose tissue was measured with bioimpedance spectroscopy (BIS), micro-computed tomography (μ CT) and by direct post-mortem tissue weigh as described in Material and Methods. Theoretical adipose tissue weight was calculated from body weight and BIS or μ CT data. (a) Correlation between the body weight of animals and the proportion of total fat mass estimated by BIS and μ CT. (b-e) Correlations between the weight of harvested adipose tissue and the proportion of fat mass estimated by BIS (b) or μ CT (d) and between the weight of harvested adipose tissue and the theoretical calculated adipose tissue weight obtained by BIS (c) or μ CT (e). (f) Correlation between total adipose tissue estimated by BIS and μ CT. r is the Pearson correlation coefficient.

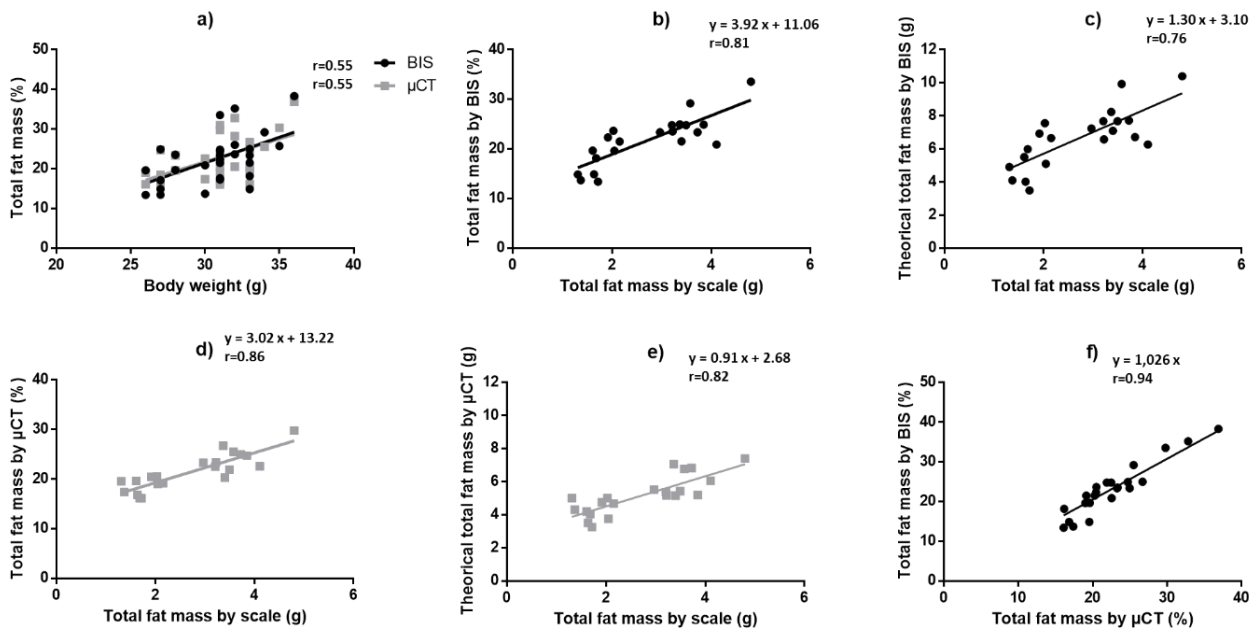


Fig. 6: Effect of a normal or high fat diet on body weight and proportion of total fat mass estimated by micro-computed tomography in mice

Mice received normal (ND) or high fat (HFD) diet for 15 weeks. Animals were weighed and the proportion of total fat mass (FM, %) was determined by micro-computed tomography (μ CT) scans as described above before (T0) and at the end (T15) of the treatment period. Evolution of (a) body weight and (b) FM over time. (c) Mean increases in body weight and total FM after 15 weeks of diet.

Data are represented as the mean \pm standard deviation of 6 animals in each group. Differences in body weight and FM were analyzed by 2-way analysis of variance (with diet and time as factors) (GraphPad Prism 6.0 software). *: $p < 0.05$ HFD *versus* ND. \$: $p < 0.05$ T15 *versus* T0 within the same group.

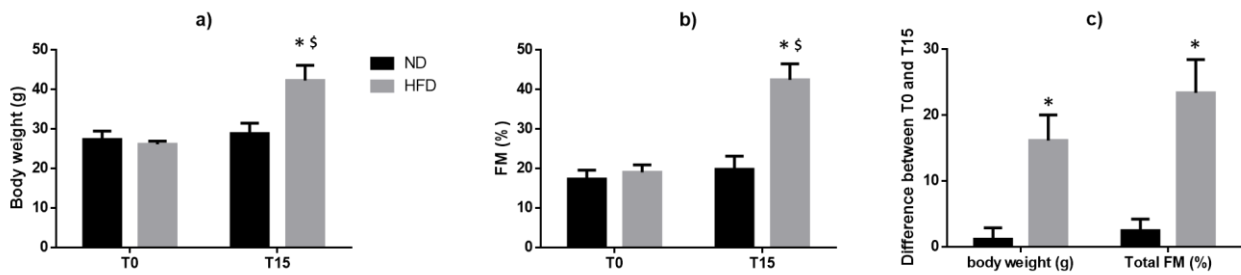


Table 1: Coefficients of variation of total adipose tissue measurements by bioimpedance spectroscopy and micro-computed tomography.

Body composition measurements were performed with bioimpedance spectroscopy (BIS) and micro-computed tomography (μ CT) methods on 3 mice, three times a day (morning, noon and evening), during five consecutive days. For each method and each animal, coefficients of variation (CV) were computed between all measurements (n=15 values/animal), between the time of measurements on the same day (n=5 values/animal) and between the days of measurements at the same time (n=3 values/animal). CV are defined as (standard deviation/mean) x100. Data are presented as mean of the 3 mice \pm SD. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA analysis and a p<0.05 was considered significant. *: p<0.05 μ CT *versus* BIS.

Coefficients of variation (%)			
	All measurements (n=15 values/animal)	Over time at the same day (n=5 values/animal)	Over day at the same time (n=3 values/animal)
BIS	17.2 \pm 2.7	13.6 \pm 7.0	3.5 \pm 2.2
μCT	5.6 \pm 1.9 *	4.1 \pm 3.0	1.2 \pm 0.3

Table 2: Proportion of total adipose tissue in thoracic region

Micro-CT scans were performed in 10 mice, with and without respiratory-gated conditions, on the same field of view (thoracic region). Scans were then analyzed with and without manual correction in lungs area. Data are presented as mean \pm SD of the 10 mice. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA analysis.

Proportion of total adipose tissue in thoracic region (mean \pm SD)			
	Without manual lungs area correction	With manual lungs area correction	p
Ungated scan	25.04 \pm 3.73 %	23.36 \pm 3.91 %	0.34
Gated scan	24.14 \pm 3.82 %	22.95 \pm 4.01 %	0.51

III. Conclusion

Dans cette première partie nous avons cherché à mettre au point pour notre laboratoire une méthode pertinente et adaptée aux petits rongeurs permettant l'accès à la proportion de masse grasse totale pour nos travaux sur le syndrome métabolique. Dans ce but, nous avons comparé deux méthodes, peu ou pas invasives et utilisées également chez l'Homme : le μ TDM et l'impédancemétrie.

Si ces deux méthodes permettent rapidement d'obtenir des données, l'un des inconvénients majeurs du μ TDM réside dans le traitement de celles-ci qui peut nécessiter beaucoup de temps. Nous avons donc tout d'abord cherché à optimiser ce traitement d'analyse en mettant en place une méthode de seuillage semi-automatique grâce à l'utilisation d'un échantillon de tissu adipeux placé à proximité de l'animal et servant d'étalon. Ainsi, le seuillage est effectué sur cet échantillon (dont la masse volumique a été déterminée au préalable) permettant de s'affranchir des variations inter-opérateur. Puis nous avons évalué la surestimation potentielle de tissu adipeux induite par les mouvements respiratoires de l'animal et la présence d'air dans les poumons. En effet cette surestimation peut être réduite par le biais d'acquisitions synchronisées à la respiration et à la correction manuelle des images (suppression de la région pulmonaire considérée à tort comme du tissu adipeux) mais va allonger à la fois le temps d'acquisition des images et le temps de traitement des données. La comparaison des différentes valeurs obtenues pour un même individu (avec et sans synchronisation respiratoire ; avec et sans correction manuelle des images) ne montre pas de différence significative. L'erreur maximale commise est même inférieure à l'erreur de mesure du μ TDM (2% d'erreur maximale vs des coefficients de variation du μ TDM compris entre 1,2 et 5,6%) permettant donc de s'affranchir de ces contraintes consommatrice de temps.

Par la suite, nous avons comparé la μ TDM avec l'impédancemétrie pour vérifier si les résultats obtenus sur des souris étaient similaires avec l'une ou l'autre méthode. Ces deux méthodes présentent un excellent coefficient de corrélation ($r = 0,94$; $p < 0,001$; figure 5f) donc d'un premier abord ces deux techniques peuvent être utilisées de façon indifférenciées.

Nous avons également mis en évidence que l'obtention de la proportion de masse grasse totale par ces deux méthodes étaient corrélées à la quantité totale de tissu adipeux, prélevé et pesé après leur mise à mort des animaux (figure 5b et c), permettant de valider l'utilisation de ces méthodes. Nous avons par contre remarqué que, pour ces deux méthodes, nous retrouvons une

surestimation de la quantité de masse grasse totale par rapport à celle retrouvée après le sacrifice, phénomène qui est amplifié avec la taille d'autant plus faible des animaux. Ceci peut s'expliquer par la difficulté à prélever manuellement tout le tissu adipeux dans l'organisme.

Enfin, nous nous sommes intéressés à mesurer la variabilité de ces deux méthodes. Il ressort de notre étude que l'impédancemétrie, si elle donne en moyenne des résultats similaires au μ TDM, est beaucoup plus variable avec des coefficients de variations environ trois fois plus importants (cf tableau 1 du manuscrit). Cette différence s'explique par la sensibilité de la méthode au placement des électrodes sur la souris et au statut hydrique de l'animal. Ce dernier paramètre étant variable au cours de la journée, les résultats obtenus par impédancemétrie vont varier pour un même animal au cours de la journée.

Au vu des résultats de cette étude, nous avons conclu que :

- Ces deux méthodes sont utilisables pour évaluer la masse grasse chez le rongeur.
- Dans la poursuite de nos travaux, et notamment pour ceux présentés dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous attendons à de faibles effets sur la proportion de masse grasse entre nos différents groupes. Par conséquent, il nous semble plus légitime d'utiliser la méthode présentant la variabilité la plus faible, soit le μ TDM.
- Enfin, et comme précisé dans la revue bibliographique, la localisation du tissu adipeux est importante lorsqu'on s'intéresse à l'obésité ou au syndrome métabolique. En effet, à proportion de masse grasse identique, un individu avec une majorité de tissu adipeux viscéral est plus à risque de complications cardiovasculaires et métaboliques qu'un sujet avec une majorité de tissu adipeux sous-cutané. Par conséquent, et comme il n'existe pas d'appareil d'impédancemétrie permettant de différencier ces deux types de tissu adipeux chez le rongeur, le μ TDM nous semble une fois encore la méthode la plus adaptée.

Partie II : Hyperactivité sympathique chronique et syndrome métabolique

I. Etude de l'influence d'une hyperactivité sympathique chronique sur le développement d'un syndrome métabolique

A. Introduction

Dans ce chapitre, nous avons voulu déterminer si une hyperactivité sympathique chronique peut être à l'origine d'un ou plusieurs symptômes du syndrome métabolique. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux régulations cardiovasculaires et métaboliques dans un modèle murin génétiquement modifié, présentant une hyperactivité sympathique constitutive : des souris dont le gène codant pour le transporteur NET a été invalidé partiellement ou totalement, appelées souris NET.

Les souris NET ont été développées dans l'équipe du Dr Marc G. Caron (Dr. Marc G. Caron, Duke University, Durham, Etats-Unis) et décrites pour la première fois en 1999 par Wang *et al* (Wang et al., 1999). L'invalidation du gène codant pour le transporteur NET a été obtenue par recombinaison homologue de cellules souches embryonnaires conduisant à l'inactivation de l'exon 2 de la séquence codante (insertion d'un vecteur cible au dans l'exon 2 conduisant à une interruption précoce de la transcription et une absence de traduction). Comme attendu par leur équipe, l'étude de l'homéostasie de la NA au niveau cérébral a montré que les souris avec une invalidation totale du gène NET (souris knock-out ou KO que nous noterons par la suite souris NET -/-) présentent des stocks en NA à l'intérieur des corps cellulaires des neurones significativement diminués par rapport aux souris wild-type et au contraire, des taux extracellulaires significativement augmentés (Xu et al., 2000).

Historiquement l'équipe du Pr. Caron a développé ces souris comme modèle d'étude de la dépression, le transporteur NET étant la cible de certains antidépresseurs et de psychostimulants (Gainetdinov et al., 2002; Gainetdinov and Caron, 2003; Xu et al., 2000), et il n'y a pas d'étude

utilisant ces souris comme modèle d'hyperactivité sympathique chronique. Le phénotypage de ces animaux sur le plan cardiovasculaire a permis de montrer que les souris NET^{-/-} présentent au repos une augmentation significative de leur pression artérielle moyenne de l'ordre de 15 mmHg associée à une augmentation significative des taux de NA plasmatique, ainsi qu'une augmentation de la fréquence cardiaque (Keller, 2004). Toutefois, il n'existe pas à l'heure actuelle de phénotypage de ces souris sur le plan métabolique.

En partant de notre hypothèse selon laquelle l'hyperactivité sympathique serait la cause du développement de troubles métaboliques, l'objectif de cette partie est de voir si une hypersympathicotonie chronique est un facteur suffisant pour induire des dérégulations métaboliques dans notre modèle murin.

B. Animaux et méthodes

1. Modèle expérimental

Pour cette première partie, nous avons utilisé des souris transgéniques, invalidées pour le transporteur de recapture de la NA (NET), obtenues gracieusement auprès de l'équipe du Pr Marc G. Caron (Pr. Marc G. Caron, Duke University, Durham, Etats-Unis). Nous avons ensuite assuré l'élevage dans notre animalerie et le génotypage de tous les individus de façon à obtenir les trois génotypes possibles : wild-type (+/+), hétérozygotes (+/-) et knock-out (-/-) (protocole de génotypage : cf annexe 1). Pour notre protocole, seules les souris mâles sont incluses dès l'âge de 5 semaines.

L'ensemble des expériences réalisées sur notre modèle animal a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès du ministère avec le numéro APAFIS #5383-2016 051711333485V4.

2. Etude de la sensibilité des récepteurs adrénergiques

Comme les récepteurs adrénergiques, et notamment les récepteurs β -adrénergiques, ont tendance à se désensibiliser en cas de stimulation importante par les catécholamines, nous avons tout d'abord vérifié l'existence ou non d'une désensibilisation des récepteur β -adrénergiques dans notre modèle murin d'hyperactivité sympathique. Ainsi, la sensibilité des récepteurs α - et

β -adrénergiques ont été évaluées par la réponse fonctionnelle obtenue suite à l'administration d'agonistes α et β -adrénergiques.

a) Etude *ex vivo* de la sensibilité des récepteurs α_1 et β_2 -adrénergiques

L'étude de la sensibilité des récepteurs α_1 et β_2 -adrénergiques a été réalisée grâce à une étude fonctionnelle sur organes isolés et plus particulièrement sur des anneaux d'aorte et de trachée de souris NET.

Juste après la mise à mort des animaux âgés de 25 semaines, les anneaux d'aorte et de trachées de souris NET +/- (n=6) et +/+ (n=4) sont prélevés et montés dans des cuves à organe isolé contenant une solution physiologique (liquide de Krebs) maintenue à 37°C. Une tension de 1g est ensuite appliquée sur les anneaux d'aorte et de trachée.

Dans les cuves contenant les anneaux d'aorte, des doses croissantes de phényléphrine (concentrations finales allant de 10^{-10} à 10^{-4} mol/L) sont ajoutées dans la cuve afin de provoquer la contraction des anneaux et donc d'étudier la sensibilité des récepteurs α_1 -adrénergiques.

Dans les cuves contenant les anneaux de trachée, une concentration de 10^{-6} mol/L de carbachol a tout d'abord été ajoutée de façon à provoquer la contraction de ceux-ci. Puis, des concentrations croissantes d'isoprénaline (concentrations finales allant de 10^{-10} à 10^{-4} mol/L) ont été ajoutées dans les cuves de façon à étudier la relaxation des anneaux de trachées et donc la sensibilité des récepteurs β_2 -adrénergiques.

b) Etude *in vivo* de la sensibilité des récepteurs β_1 -adrénergiques

Pour étudier la sensibilité des récepteurs β_1 -adrénergiques, situés principalement au niveau du cœur, nous avons suivi les variations de la fréquence cardiaque de souris NET après injection iv de dobutamine.

Après anesthésie des souris NET +/+ (n=5) et NET +/- (n=5) au pentobarbital (60 mg/kg de pentobarbital sodique à 6%, Ceva), la fréquence cardiaque est mesurée par pléthysmographie en continu pendant toute la durée de l'expérience. Après 5 minutes de stabilisation, une injection iv de sérum physiologique (50 μ L) est effectuée de façon à déterminer l'effet d'une injection iv sur la fréquence cardiaque. Après 5 minutes supplémentaires de stabilisation, une injection iv de dobutamine (5 μ g/kg de dobutamine à 2,5 μ g/mL, Panpharma) est réalisée et la fréquence cardiaque est suivie jusqu'à disparition totale de l'effet.

3. Suivi expérimental

Les souris sont hébergées dans l'animalerie de la Faculté de Médecine avec un cycle jour/nuit de 12h. Elles ont un accès *ad libitum* à la nourriture (régime normal, A03, SAFE, Augy, France) et à la boisson.

Pendant toute la durée du protocole, soit 35 semaines, les souris sont pesées une fois par semaine. Par ailleurs, différents examens sont réalisés à intervalles réguliers (à l'inclusion puis à l'âge de 10 semaines, 20 semaines, 25 semaines et 40 semaines) et sont résumés dans le schéma ci-dessous (figure 10).

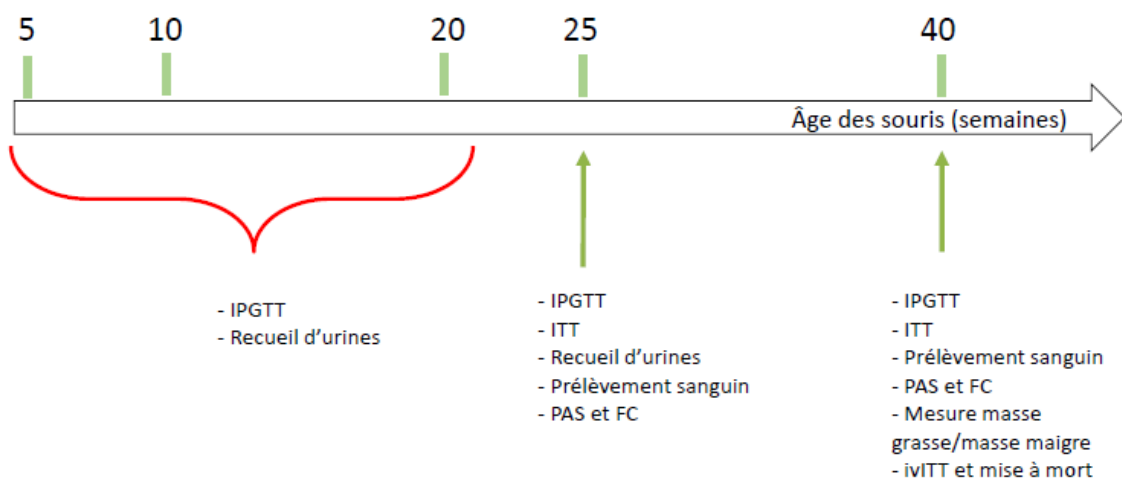


Figure 10 : Schéma du protocole expérimental

FC : fréquence cardiaque ; IPGTT : test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale ; ITT : test de sensibilité à l'insuline par voie intrapéritonéale ; ivITT : test de sensibilité à l'insuline par voie intraveineuse ; PAS : pression artérielle systolique.

4. Recueil d'urines et dosage des catécholamines urinaires

Les souris sont placées durant 12 heures dans des cages métaboliques équipées à leur base d'un dispositif de recueil d'urines dans un tube Eppendorf, préalablement acidifié avec 10 μ L d'acide chlorhydrique 10N. Le pH est vérifié à l'issue de ces 12 heures et doit être inférieur à 5 pour éviter la dégradation des catécholamines, puis les échantillons sont centrifugés, les surnageants récupérés et congelés à -20°C. Le dosage des catécholamines urinaires (NA, adrénaline et dopamine) est réalisé ultérieurement par chromatographie liquide haute

performance (CLHP) au Plateau Technique de Biologie (PTB) du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg.

5. Test de tolérance au glucose

Afin de suivre la cinétique d'apparition des troubles glucidiques, un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale (IPGTT) est réalisé régulièrement au cours du temps : sur souris vigiles à l'âge de 5, 10, 20, et 25 semaines, et sur souris anesthésiées à l'âge de 40 semaines.

Les souris sont mises à jeun pendant 5 heures avant le début de la procédure. Après anesthésie locale avec de la lidocaïne (lidocaïne, Xylovet® en application externe), une petite incision à l'extrémité de la queue est réalisée pour permettre les mesures régulières de glycémie. Une solution de glucose (dose = 2g/kg) est injectée par voie intrapéritonéale (ip) chez l'animal vigile et l'évolution de la glycémie est suivie pendant 2h aux temps : 0 (avant injection), 15, 30, 45, 60, et 120 minutes). La mesure de la glycémie s'effectue grâce à une goutte de sang déposée sur une bandelette et grâce à un lecteur de glycémie (Accu-Check Performa, Roche Diagnostics, France).

A l'âge de 40 semaines, le test d'IPGTT se fait chez des souris préalablement anesthésiées au pentobarbital (60 mg/kg de pentobarbital sodique à 6%, Ceva). L'injection de la solution de glucose est identique ainsi que les différentes mesures de glycémie. Toutefois, des prélèvements sanguins (20µL) par voie rétro-orbitaire (voir paragraphe I.B.6) seront réalisés en parallèle des mesures de glycémie aux temps 0, 15, 30 et 45 minutes de façon à doser l'insulinémie.

6. Test de sensibilité à l'insuline

Les souris sont mises à jeun pendant 5 heures avant le début de la procédure. Une solution d'insuline (0,1 UI/ml) est injectée par voie ip à la dose de 0,5 UI/kg et l'évolution de la glycémie est suivie pendant les 2 heures suivantes. La mesure de la glycémie est réalisée de la même manière que dans le cadre d'une IPGTT aux différents temps de mesure suivants : 0, 30, 45, 60 et 120 minutes.

7. Prélèvements sanguins

Les souris sont mises à jeun pendant 5 heures avant le début de la procédure. Elles sont ensuite anesthésiées par une injection ip de 60 mg/kg de pentobarbital sodique à 6% (Ceva) puis placées sous une lampe chauffante. Un capillaire hépariné est introduit dans l'espace rétro-orbitaire. Le sang (environ 100µL) est prélevé et placé dans un tube hépariné (2µL d'Héparine Choay 25000UI/5mL, Sanofi-Aventis) avant d'être centrifugé (10 000 trs/min, 15 min) afin de récupérer le plasma qui est ensuite congelé à -80°C dans l'attente de la réalisation des différents dosages biochimiques : cholestérol total (dosés par colorimétrie avec le kit *Total Cholesterol Assay*, (Cell Biolabs, inc., San Diego, USA)), triglycérides (dosage colorimétrique avec le kit *EnzyChrom™* (BioAssay Systems, Hayward, USA)), insuline (dosage Elisa avec le kit *Mouse Insulin ELISA* (MercoDIA, Uppsala, Suède)) et calcul de l'HOMA-IR selon la formule suivante :

$$HOMA - IR = \frac{Glycémie \left(\frac{mmol}{L}\right) \times insulinémie \left(\frac{mUI}{L}\right)}{22,5}$$

8. Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque

La mesure de la pression artérielle systolique est réalisée chez l'animal vigile avec l'appareil Visitech BP-2000. La mesure de la pression systolique est effectuée à la queue de la souris par compression d'un manchon gonflable et la fréquence cardiaque (FC) est obtenue par détection infra-rouge. En pratique, les souris sont placées dans une boîte de contention (durée maximale de contention de 20 minutes pour toute la durée de la procédure) posée sur une plateforme préchauffée à 37°C avant le début des expériences de façon à augmenter le flux sanguin au niveau de l'artère caudale et donc d'améliorer la détection du pouls. La mesure est effectuée dans une salle ayant une température moyenne de 25°C. Dix mesures préliminaires sont réalisées et par la suite vingt autres mesures seront retenues pour les données de l'expérience. Ces mesures sont considérées comme valables si elles présentent un écart-type inférieur à 10 mmHg. Pour garantir la fiabilité des résultats, les souris sont habituées pendant les 2 jours précédents le début des expériences.

9. Mesure de la masse grasse et de la masse maigre par microtomodensitométrie

Suite aux résultats obtenus dans la partie I de ce travail, nous avons décidé d'utiliser la méthode par μ TDM pour l'analyse de la composition corporelle, c'est-à-dire la proportion de masse grasse et de masse maigre de nos animaux mais également la répartition des différents tissus adipeux dans l'organisme.

Après anesthésie gazeuse par isoflurane (2%), les souris sont placées dans une cellule dédiée, chauffée à 37°C et permettant le maintien de l'anesthésie gazeuse. La durée totale de l'examen n'excède pas 15 minutes par animal pour obtenir une image corps entier. Le protocole d'acquisition des données employé est le protocole d'imagerie standard destiné aux acquisitions in vivo, fourni par le fabricant du μ TDM (eXplore speCZT Vision120, GE, Waukesha, USA) et décrit dans la partie I.

L'étude de la répartition du tissu adipeux dans l'organisme a été réalisée sur les images de masse grasse totale en dessinant une région d'intérêt autour de la cavité abdominale comme présenté dans la figure ci-dessous. Les volumes de tissu adipeux sous-cutané et viscéral ont ensuite été rapportés au volume total de masse grasse pour permettre une comparaison des différents animaux entre eux.

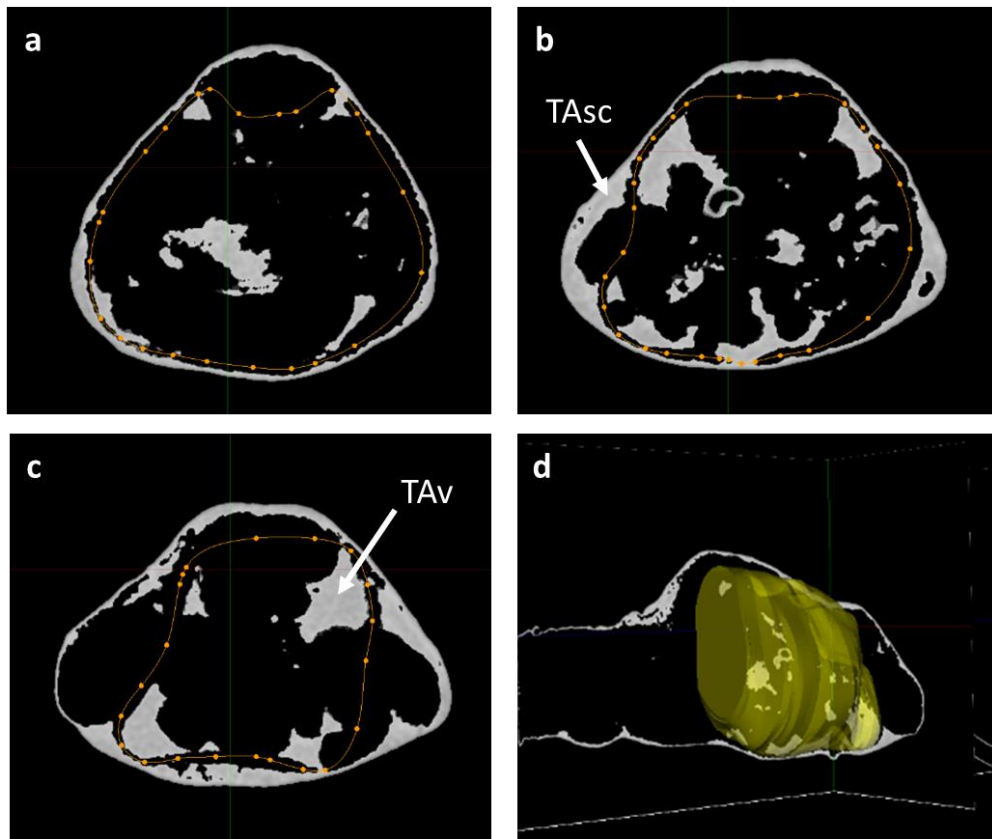


Figure 11 : Segmentation du tissu adipeux abdominal du tissu adipeux sous-cutané par μ TDM.

a), b) et c) Tracé de la région d'intérêt autour de la cavité abdominale sur plusieurs coupes transversales. d) Représentation de la région d'intérêt en 3 dimensions. TAv : tissu adipeux viscéral ; TAsc : tissu adipeux sous-cutané ; μ TDM : micro-tomodensitométrie.

10. Mesures en fin d'étude

Les souris sont mises à jeun pendant 5 heures avant le début de la procédure puis sont anesthésiées par injection ip de 60 mg/kg de pentobarbital sodique à 6% (Ceva) et placées sous une lampe chauffante. Une solution d'insuline (0,1 UI/mL) est injectée par voie intraveineuse à la dose de 0,5UI/kg via la veine caudale. La mesure de la glycémie est réalisée par bandelette sur une goutte de sang obtenue par incision légère à la pointe de la queue avant puis 10 minutes après l'injection d'insuline ; ce temps et la voie d'administration (IV) ont été retenus sur la base de travaux antérieurs (Weiss et al., 2015).

Après la mesure de la glycémie au bout de 10minutes, un prélèvement sanguin terminal est réalisée par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue préalablement héparinée (Héparine

Choay 25000UI/5mL, Sanofi-Aventis). Le sang recueilli (environ 1mL) est transféré dans un tube Eppendorf contenant 15µL d'héparine et 20µL de métabisulfite de sodium avant d'être centrifugé (10 000 trs/min, 15 min) afin de récupérer le plasma qui est ensuite congelé à -80°C. Le dosage des catécholamines plasmatiques (NA, adrénaline et dopamine) est réalisé ultérieurement par CLHP au PTB du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg.

Enfin, la souris est sacrifiée par injection létale de pentobarbital (200 mg/kg IV) et les organes clés de la régulation cardio-métabolique (cerveau, cœur, pancréas, tissu adipeux, foie, muscle squelettique) sont prélevés pour des expérimentations complémentaires *in vitro* (histologie, analyse protéomique et génomique).

11. Etude de la signalisation cellulaire de l'insuline

a) Dans le tissu pancréatique

Nous nous sommes tout d'abord intéressé aux effets que pourrait avoir une hyperactivité sympathique sur la sécrétion pancréatique d'insuline. Pour cela, les pancréas des souris (n= 10 pour les souris NET +/+ et n= 8 pour les souris NET +/-) ont été récupérés lors de l'expérience terminale et fixés dans de la formaline 10%. Ces échantillons ont été envoyés dans le département d'histologie de l'Institut Clinique de la Souris où ils ont été inclus dans la paraffine, coupés puis colorés avec de l'hématoxyline/éosine pour comparer le nombre d'îlots de Langerhans ainsi que leur surface. En parallèle un immuno-marquage avec des anticorps anti-insuline (anticorps primaire monoclonal de souris dilué au 1/1000^{ème}, ref. I2018, Sigma-Aldrich, France ; révélation avec un anticorps secondaire de chèvre anti-mouse marqué à l'HCA 488 et dilué au 1/500^{ème}, ref. A11029, Invitrogen, Etats-Unis) et anti-GLUT2 (anticorps primaire polyclonal de lapin, 07-1402, Millipore, France ; révélation avec un anticorps secondaire de chèvre anti-rabbit marqué à l'Alexa 488 et dilué au 1/500^{ème}, ref. A21429, Invitrogen, Etats-Unis) a été réalisé de façon à étudier le contenu de ces îlots en insuline ainsi que la densité des transporteurs GLUT2 au glucose présents au niveau de la membrane. Le comptage des îlots ainsi que leur délimitation a été effectué grâce au logiciel NDP.view2 (NDP.view2 Viewing Software, Hamamatsu Photonics, Japan) au grossissement 20x. La densité du marquage en insuline et en GLUT2 a été effectuée grâce au logiciel Image J. Pour cette partie, nous avons mesuré la densité (en insuline ou en GLUT2) sur 10 îlots représentatifs d'une coupe de pancréas en plaçant une région d'intérêt identique au centre de ceux-ci.

b) Dans le tissu hépatique

La fixation de l'insuline sur ses récepteurs présents sur la membrane plasmique des tissus cibles (dont le tissu hépatique) déclenche une cascade de réactions tissulaires dont la phosphorylation de la protéine kinase B ou AKT permettant la translocation des transporteurs du glucose. Dans le but d'étudier l'existence d'une insulino-résistance sur les réponses tissulaires à l'insuline, nous avons étudié la phosphorylation d'AKT dans le tissu hépatique après stimulation par l'insuline grâce à la technique du Western-Blot (voir annexe 1). Les tissus hépatiques prélevés 10 minutes après injection iv d'insuline (lors de l'ivITT) ont été broyés sur glace dans du tampon de lyse (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 2% triton, pH=7,5) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche, France), puis centrifugés pendant 10 minutes à 10000g et 4°C. Le surnageant de chaque échantillon a été récupéré et la concentration en protéines totales dosées avant l'analyse par Western-Blot des protéines AKT et AKT phosphorylé. Le tableau 2 présente les caractéristiques des différents anticorps utilisés. Les protéines réactives ont été détectées et quantifiées en utilisant le système Chemidoc BioRad. L'activation d'AKT a été évaluée en calculant le rapport AKT phosphorylé/AKT. Toutes les valeurs de ces ratios ont été normalisées par rapport à un même témoin positif utilisé dans chaque expérience (lysate de cellules HepG2 stimulées par de l'insuline 10nM pendant 10 minutes). Par ailleurs, chaque échantillon a été analysé deux fois pour s'assurer de la concordance des résultats obtenus.

Tableau 2 : Caractéristiques des anticorps anti-AKT et AKT phosphorylé utilisés en Western-Blot.

<i>Anticorps</i>	<i>Hôtes</i>	<i>Espèces réactives</i>	<i>Taille protéines</i>	<i>Dilutions</i>	<i>Temps d'exposition</i>	<i>Référence</i>	
<i>AKT</i>	Primaire, polyclonal	Lapin	Homme, rat, souris, cochon...	60 kDa	1/1000 + BSA (TBS-Tween)	Durant la nuit à 4°C	9272S / Cell Signaling
<i>AKT phosphorylé (Ser473)</i>	Primaire, polyclonal	Lapin	Homme, rat, souris, cochon...	60 kDa	1/1000 + BSA (TBS-Tween)	Durant la nuit à 4°C	9271S / Cell Signaling
<i>secondaire</i>	Secondaire, IgG peroxidase	Chèvre	Lapin	/	1/10 000 (lait 10%, TBS-Tween)	1h à température ambiante	A9169 / Sigma

12. Analyse statistique des données

Les données sont présentées sous la forme de moyenne plus ou moins l'écart-type à la moyenne (SEM). La comparaison entre les trois génotypes est effectuée en utilisant un test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour les comparaisons à un temps donné. Lorsque les paramètres métaboliques des différents groupes sont comparés tout au long de l'étude, une analyse de variance (ANOVA) à deux paramètres (génotype et âge) pour valeurs non appariées a été réalisée. Lorsque celle-ci permet de mettre en évidence une différence, elle est suivie soit d'un test de Sidak (comparaison de 2 groupes), soit d'un test de Tukey (comparaison de plus de 2 groupes). La comparaison des variations des taux d'insuline lors de l'IPGTT sur souris anesthésiées s'est faite en réalisant une régression linéaire entre les différents temps de prélèvements, puis en comparant les pentes des droites obtenues. Enfin, nous avons utilisé un test non paramétrique de Mann-Whitney pour comparer les données obtenues en histologie et l'activation d'AKT après stimulation par injection iv d'insuline.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad (GraphPad Prism 6.0 software). Une différence est considérée comme statistiquement significative pour des valeurs $p < 0,05$.

C. Résultats

1. Etude de la sensibilité des récepteurs adrénergiques

a) Sensibilité des récepteurs α_1 - et β_2 -adrénergiques

Après application de concentrations croissantes de phényléphrine sur les anneaux d'aorte (2 anneaux par animal et 4 souris au total) (figure 12a), on ne constate aucune différence de contraction des anneaux provenant des souris NET $+/+$ par rapport aux anneaux provenant de souris NET $+/-$ ($CE_{50} = 33,1$ nmol/L et $E_{max} = 330$ mg pour les deux groupes, $p > 0,05$). Il n'y a donc pas de diminution de la sensibilité des récepteurs α_1 chez les souris NET $+/-$.

Lorsqu'on s'intéresse aux anneaux de trachée, l'ajout d'isoprénaline permet la relaxation de ceux-ci après contraction initiale au carbachol (figure 12b). Toutefois, on observe une différence significative sur les anneaux de trachée des souris NET $+/-$ qui présentent une meilleure sensibilité des récepteurs β_2 par rapport à celle des souris NET $+/+$ aussi bien sur les

valeurs de CE_{50} ($CE_{50} = 1 \mu\text{mol/L}$ vs $0,1 \mu\text{mol/L}$ pour les souris NET $+/+$ vs NET $+/-$ respectivement, $p < 0,05$) qu'une forte tendance sur l'effet maximal ($E_{\text{max}} = 24\%$ vs 56% pour les souris NET $+/+$ vs NET $+/-$ respectivement, $p = 0,11$).

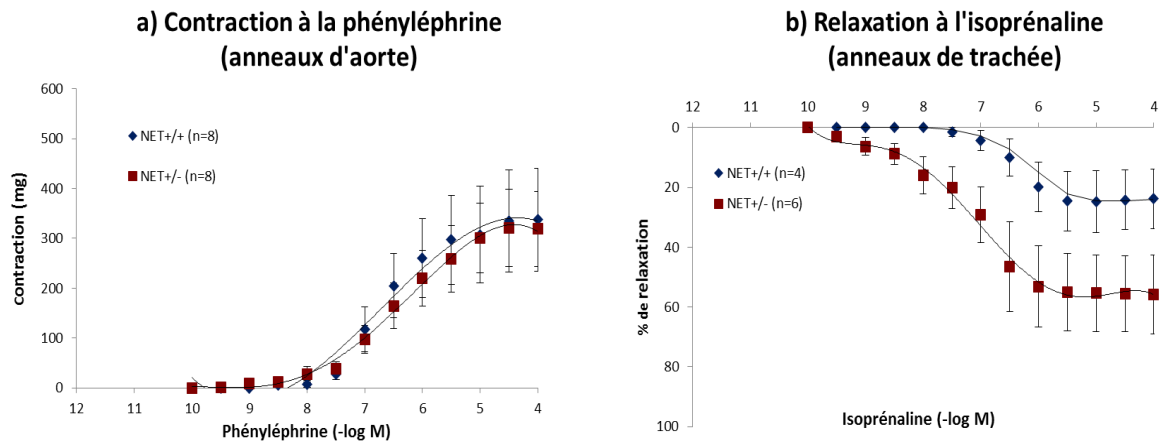


Figure 12 : Etude fonctionnelle de la sensibilité des récepteurs a) α_1 -adrénergiques et b) β_2 -adrénergiques chez les souris NET.

Mesure de la réponse des anneaux d'aorte (2 anneaux/animal et 4 souris au total) et de trachée (1 anneau de trachée/animal) après application de concentrations croissantes de a) phényléphrine et b) isoprénaline. Valeurs moyennes \pm SEM.

b) Sensibilité des récepteurs β_1 -adrénergiques

La figure 13 présente les résultats obtenus chez les souris NET $+/+$ et $+/-$ après injection iv de dobutamine. Après injection iv d'une dose de $5\mu\text{g/kg}$ de dobutamine, les souris NET $+/+$ présente une augmentation rapide de la fréquence cardiaque de $+ 41\pm 8\%$. On retrouve une augmentation similaire chez les souris NET $+/-$ de l'ordre de $+ 33\pm 8\%$ ($p > 0,05$; test de Mann-Whitney). Par ailleurs cet effet maximal a lieu après le même délai suivant l'injection quel que soit le groupe considéré. On peut conclure de ces résultats qu'il n'y a pas de désensibilisation des récepteurs β_1 -adrénergiques dans notre modèle murin d'hyperactivité sympathique chronique.

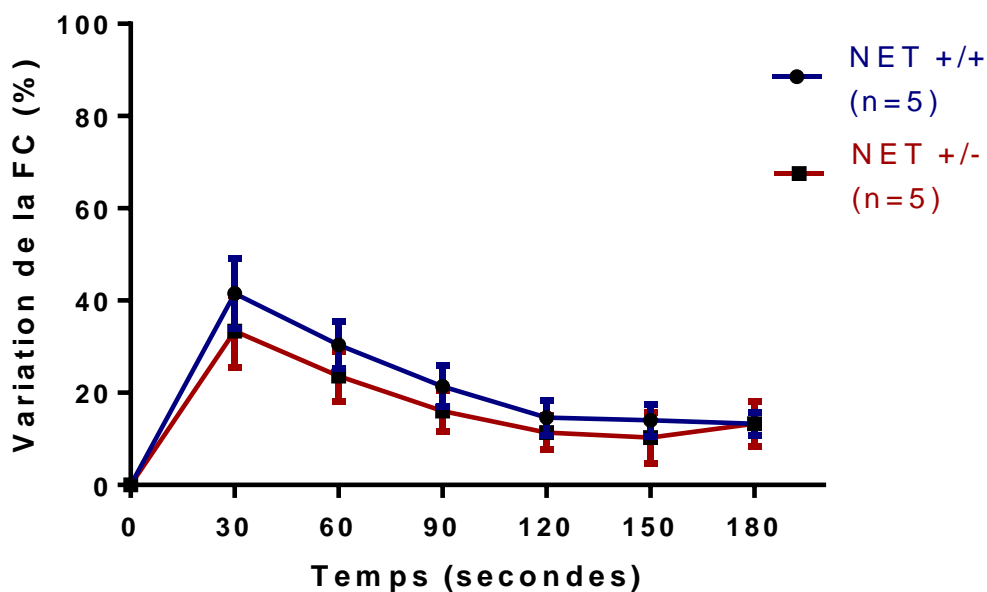


Figure 13 : Variation de la fréquence cardiaque après injection de dobutamine chez les souris NET.

Valeurs moyennes \pm SEM ; FC : fréquence cardiaque. $p > 0,05$; test de Mann-Whitney.

2. Suivi de la masse corporelle des animaux et de la consommation alimentaire

Le suivi de la masse corporelle des animaux, du suivi de la consommation en boisson et nourriture est présenté dans la figure 14. On n'observe pas de différence de masse corporelle entre les souris NET +/+ et NET +/- tout au long de l'étude. Par contre, les souris NET -/- ont une masse corporelle significativement inférieure à celle des deux autres génotypes (différence de masse corporelle -15% entre les souris NET -/- et les autres génotypes, $p < 0,05$; test de Tukey) entre les âges de 5 à 30 semaines. Au-delà de 30 semaines, la masse corporelle des NET-/- a l'air d'augmenter pour rattraper celle des autres génotypes à 40 semaines. Au niveau de la consommation de nourriture et de boisson, on n'observe pas de différences entre les trois génotypes.

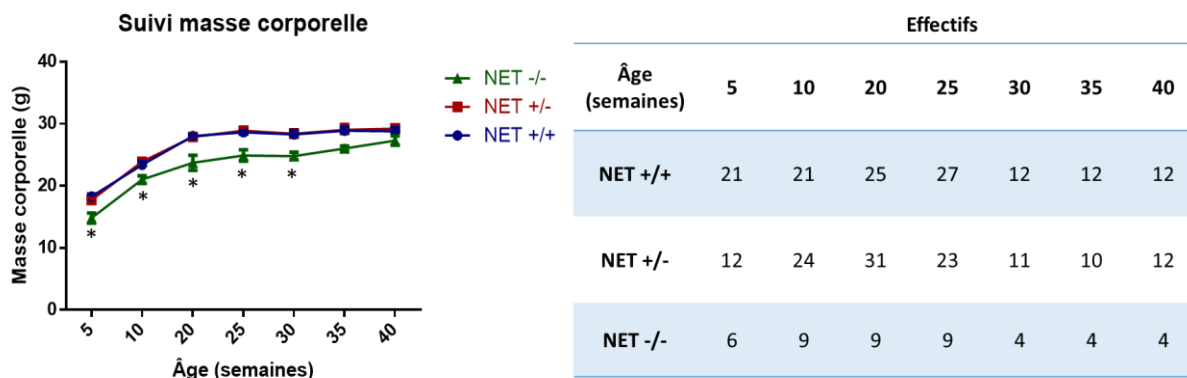


Figure 14 : Suivi de la masse corporelle des souris NET au cours du temps.

Valeurs moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$ entre les souris NET -/- et les souris NET +/+ et +/- ; test de Tukey.

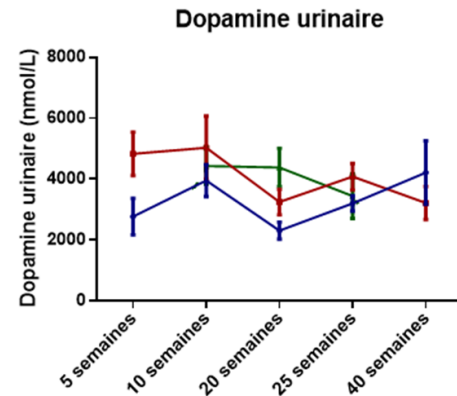
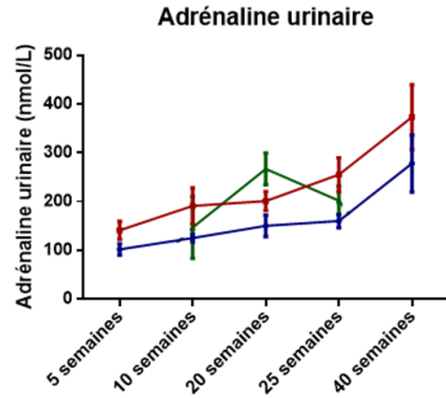
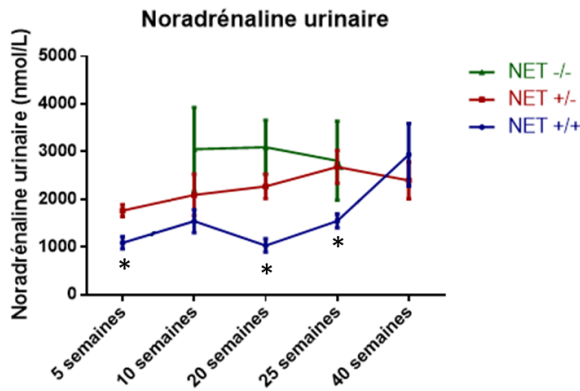
3. Evaluation de l'activité sympathique

La figure 15 présente l'évolution des taux de NA, d'adrénaline et de dopamine urinaires au cours du temps. Ces taux de catécholamines n'ont pas pu être déterminés à l'âge de 5 semaines et de 40 semaines chez les souris NET -/- en raison de difficultés à récupérer les urines.

Comme attendu, on observe bien une augmentation significative des taux de NA chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+ dès l'âge de 5 semaines. Cette observation se confirme avec le vieillissement des souris jusqu'à l'âge de 25 semaines. Toutefois, les taux de NA urinaire augmentent significativement chez les souris NET +/+ à l'âge de 40 semaines, les ramenant au même niveau d'activation sympathique que les souris NET +/- . Les taux de NA entre les souris NET +/- et -/- ne sont pas significativement différents quel que soit l'âge considéré. Enfin, concernant les taux d'adrénaline et de dopamine, on observe une tendance à l'augmentation des taux chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+.

La figure 16 compare les résultats du dosage des concentrations de NA plasmatique entre les trois génotypes de souris NET. On observe une tendance à l'augmentation des taux de NA plasmatiques chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+, tendance qui est d'autant plus marquée chez les souris NET -/.

Ces premiers résultats confirment l'utilisation des souris NET -/- mais également des souris NET +/- comme modèle d'hyperactivité sympathique chronique.



Âge (semaines)	5	10	20	25	40
NET +/+	10	10	15	18	10
NET +/-	8	7	20	18	7
NET -/-	0	2	8	6	0

Figure 15 : Evolution des catécholamines urinaires des souris NET en fonction du génotype.

Valeurs moyennes \pm SEM ; * $p < 0,05$ entre le groupe NET +/+ et les deux autres groupes pour un âge donné ; test de Kruskal-Wallis. Le tableau présente les effectifs pour le dosage des catécholamines aux différents âges.

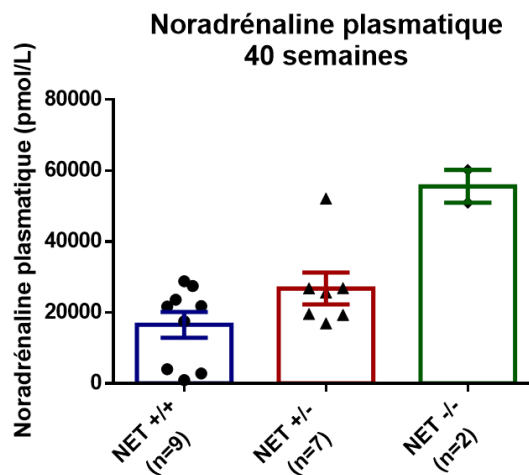


Figure 16 : Taux de NA plasmatique à 40 semaines des souris NET en fonction du génotype.

Valeurs moyennes \pm SEM

4. Effet de l'hyperactivité sympathique sur les paramètres lipidiques

A l'âge de 25 semaines, on n'observe pas d'effet de l'hyperactivité sympathique sur les taux de cholestérol total ($85,04 \pm 4,68$ vs $81,51 \pm 3,08$ vs $83,28 \pm 6,79$ mg/dL pour les souris NET +/+, NET +/- et NET -/- respectivement) et de TG ($52,45 \pm 2,64$ vs $56,56 \pm 3,74$ vs $41,73 \pm 2,58$ mg/dL pour les souris NET +/+, NET +/- et NET -/- respectivement) quel que soit le génotype considéré (figure 17).

Cette constatation ne change pas avec le vieillissement des souris, puisqu'à l'âge de 40 semaines, les taux de cholestérol total et de TG restent similaires à ceux observés à l'âge de 25 semaines pour un génotype considéré mais également entre les trois génotypes.

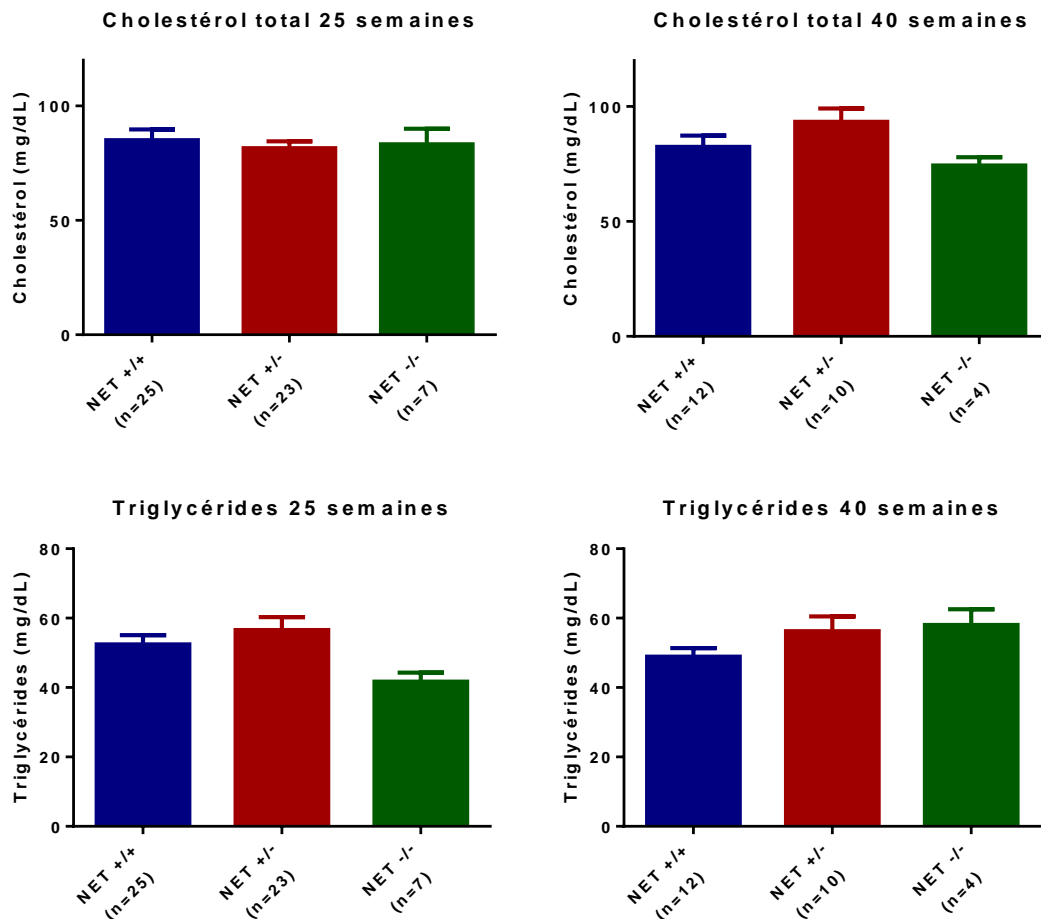


Figure 17 : Paramètres lipidiques des souris NET au cours du temps.

Valeurs moyennes \pm SEM.

5. Effet de l'hyperactivité sympathique sur les paramètres cardiovasculaires

Comme pour les paramètres lipidiques, nous n'observons pas d'effet de l'hyperactivité sympathique sur la PAS et la FC, et ceci aussi bien chez les souris NET +/- que chez les souris NET -/- par rapport aux NET +/+ (figure 18).

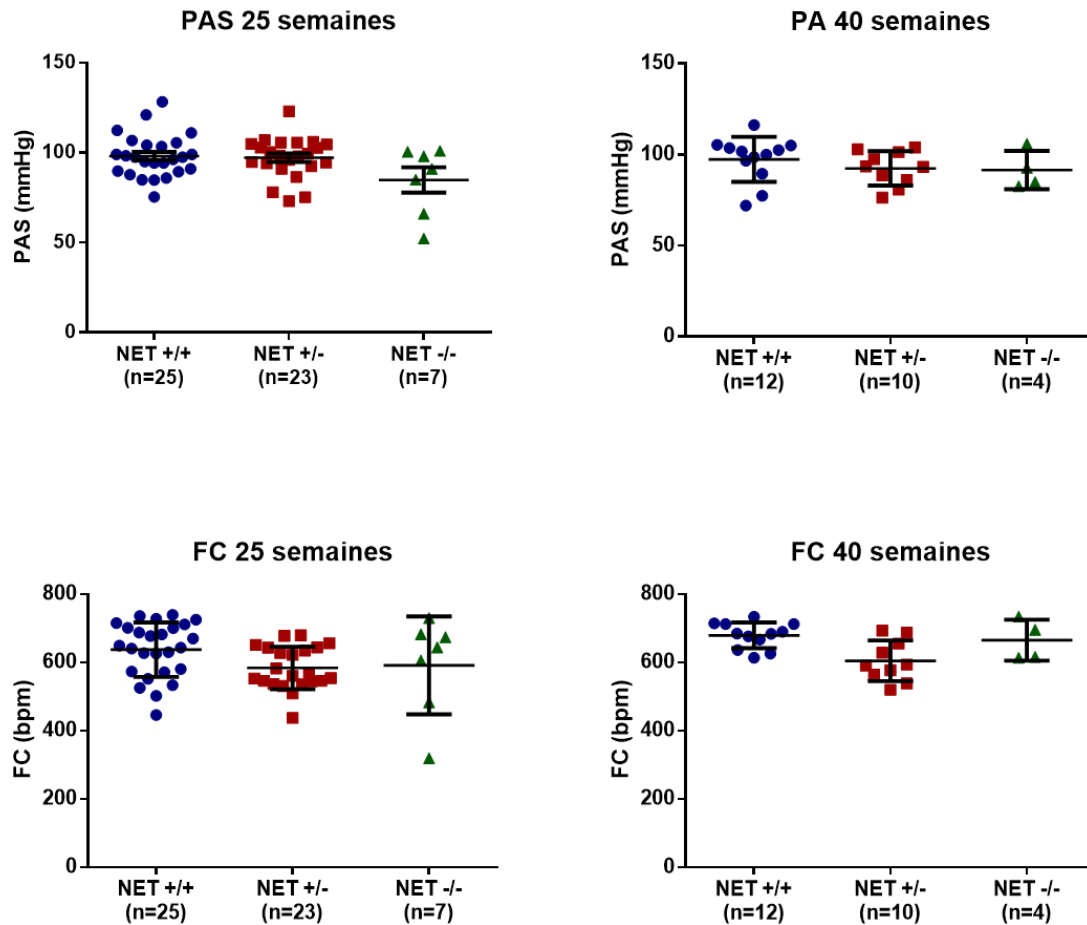


Figure 18 : Paramètres cardiovasculaires des souris NET au cours du temps.

Valeurs moyennes \pm SEM.

6. Effet de l'hyperactivité sympathique sur la proportion de masse grasse et la répartition du tissu adipeux

Le tableau 3 compare la proportion de masse grasse totale, déterminée par μ TDM, entre les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} ainsi le rapport masse grasse sur masse maigre. On observe une tendance à l'augmentation de la proportion de masse grasse totale et du rapport masse grasse/masse maigre en cas d'hyperactivité sympathique. Par contre, on ne retrouve pas de différence dans la proportion de tissu adipeux viscéral entre les deux groupes, ce qui souligne que la tendance à l'augmentation de masse grasse chez les souris NET^{+/-} se fait de façon homogène sur tous les tissus adipeux blancs.

Tableau 3 : Analyse de la masse grasse chez les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} à l'âge de 40 semaines (Moyennes \pm SEM)

<i>Paramètres</i>	<i>NET^{+/+} (n=5)</i>	<i>NET^{+/-} (n=7)</i>	<i>Valeur de p (Mann-Whitney)</i>
<i>Masse grasse totale (%)</i>	17,55 \pm 0,99	21,44 \pm 1,39	0,11
<i>Rapport masse grasse/masse maigre</i>	0,24 \pm 0,02	0,32 \pm 0,03	0,13
<i>Tissu adipeux viscéral (% de masse grasse totale)</i>	25,00 \pm 1,41	26,42 \pm 1,29	0,20

7. Effet de l'hyperactivité sympathique sur les paramètres glucidiques

a) Bilan glucidique à jeun : glycémie, insulïnémie et HOMA-IR

Le tableau 4 présente les glycémies à jeun des trois groupes d'animaux au cours de l'étude. On n'observe pas de différence entre les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} tout au long du suivi. Par contre, les souris NET^{-/-} présentent une glycémie plus basse à l'âge de 5 semaines par rapport aux deux autres groupes.

Tableau 4 : Dosage de la glycémie à jeun chez les souris NET en fonction de leur âge.Valeurs moyennes \pm SEM, * $p < 0,05$ vs NET +/+ (Kruskal-Wallis)

	Âge des souris	NET +/+	NET +/-	NET -/-	Valeur de p
Glycémie à jeun (mmol/L)	5 semaines	10,27 \pm 0,33	9,95 \pm 0,23	7,63 \pm 0,57*	0,004
	10 semaines	9,95 \pm 0,19	10,46 \pm 0,16	10,22 \pm 0,21	> 0,05
	20 semaines	9,36 \pm 0,24	9,58 \pm 0,23	8,70 \pm 0,39	> 0,05
	25 semaines	9,29 \pm 0,23	9,47 \pm 0,27	8,98 \pm 0,57	> 0,05
	40 semaines	9,70 \pm 0,38	9,68 \pm 0,44	10,98 \pm 0,33	> 0,05

Concernant l'insulinémie à jeun (voir figure 19), on observe une légère augmentation de l'insulinémie à jeun chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+ à l'âge de 25 semaines (1,12 vs 0,82 $\mu\text{g/L}$ respectivement, $p < 0,05$, test de Tukey). Cette augmentation est d'autant plus marquée chez les souris NET -/- par rapport aux deux autres groupes (1,84 vs 0,82 et 1,12 $\mu\text{g/L}$ pour les souris NET -/-, +/+ et +/- respectivement, $p < 0,001$, test de Tukey). A l'âge de 40 semaines, on n'observe pas d'effet du vieillissement chez les souris avec une hyperactivité sympathique (1,12 vs 1,21 et 1,84 vs 2,08 $\mu\text{g/L}$ respectivement pour les souris NET +/- et NET -/-, $p > 0,05$, test de Sidak) alors que les souris normales voient leur insulinémie à jeun augmentée (0,82 vs 1,17 $\mu\text{g/L}$ à l'âge de 25 et 40 semaines respectivement, $p = 0,02$, test de Sidak). D façon logique, il n'existe plus de différence entre les souris NET +/+ et NET +/- à l'âge de 40 semaines (1,17 vs 1,21 $\mu\text{g/L}$, respectivement, $p > 0,05$), alors que les souris NET -/- présentent toujours une insulinémie à jeun significativement supérieure aux deux autres groupes (1,17 vs 1,21 et 2,08 pour les souris NET +/+, +/-, -/- respectivement, $p < 0,05$, test de Tukey).

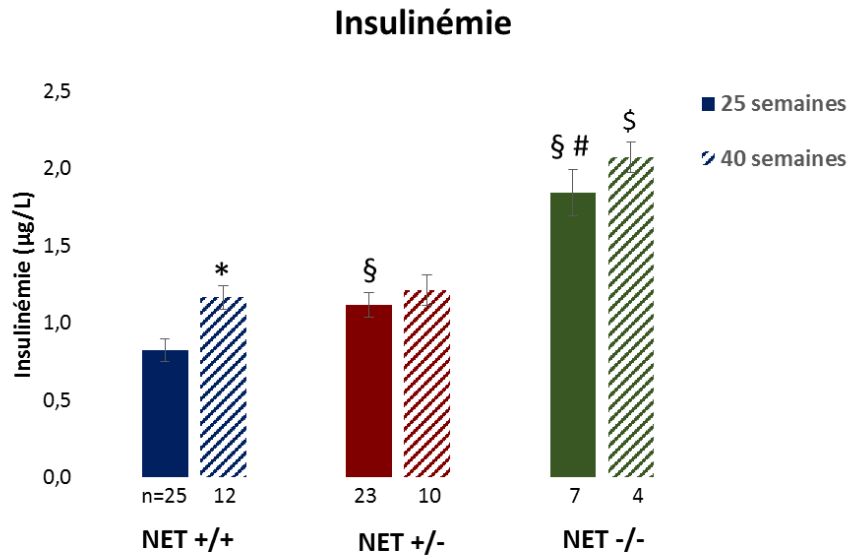


Figure 19 : Insulinémie à jeun des souris NET au cours du temps.

Valeurs moyennes \pm SEM, * $p < 0,05$ entre NET +/+ à 25 semaines et 40 semaines (test de Sidak) ; § $p < 0,05$ entre les souris NET +/+ et les souris NET +/- et -/- à l'âge de 25 semaines ; # $p < 0,05$ entre les souris NET +/- et les souris NET -/- à l'âge de 25 semaines ; § $p < 0,05$ entre les souris NET -/- et les souris NET +/+ et +/- à l'âge de 40 semaines (test de Tukey)

Enfin, lorsqu'on calcule l'indice HOMA-IR, on retrouve la même tendance que pour l'insulinémie à jeun (voir figure 20), à savoir, une augmentation importante de cet indice d'insulinorésistance chez les souris NET -/- par rapport aux autres groupes, quel que soit l'âge considéré. On observe également une augmentation de l'HOMA-IR chez les souris NET +/- par rapport aux souris contrôles à l'âge de 25 semaines mais qui n'est plus retrouvée à l'âge de 40 semaines du fait de l'augmentation de cet indice avec l'âge chez les souris NET +/+.

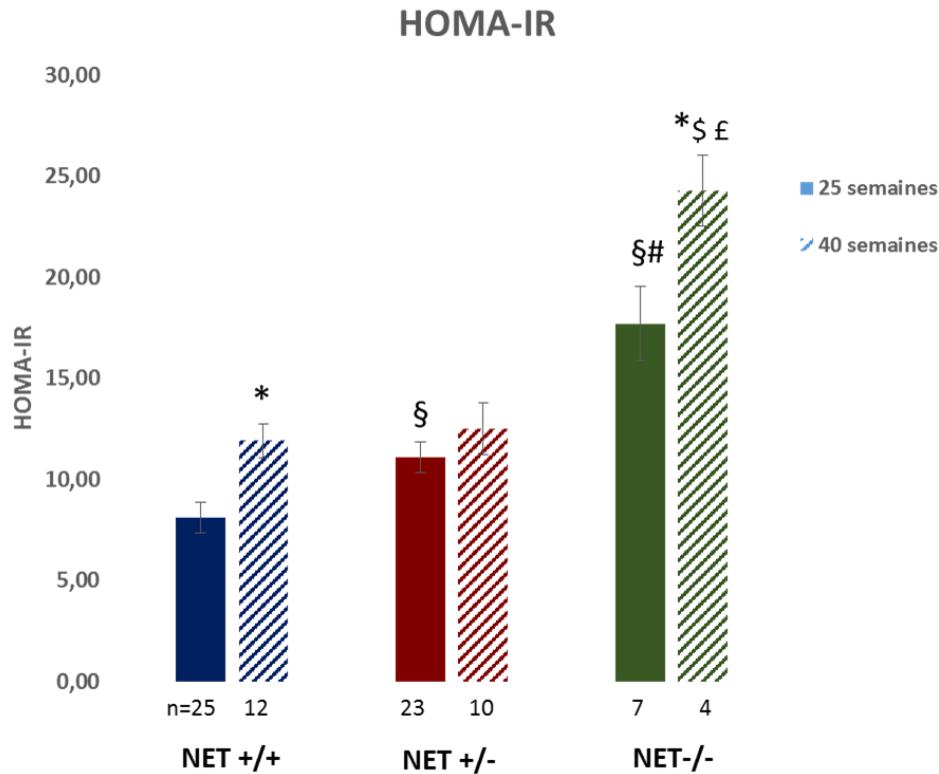


Figure 20 : HOMA-IR des souris NET au cours du temps.

Valeurs moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$ pour un même génotype entre 25 semaines et 40 semaines (test de Sidak) ; § $p < 0,05$ entre les souris NET +/+ et les souris NET +/- et -/- à l'âge de 25 semaines ; # $p < 0,05$ entre les souris NET +/- et les souris NET -/- à l'âge de 25 semaines ; \$ $p < 0,05$ entre les souris NET +/+ et les souris NET -/- à l'âge de 40 semaines (test de Tukey)

b) Test de tolérance au glucose

Les résultats des IPGTT sont toujours présentés sous la forme de courbe d'évolution de la glycémie (en mmol/l) en fonction du temps. Pour le calcul des AUC, les glycémies à jeun avant injection de glucose ($t = 0$ min) ont été normalisées pour chaque individu et fixée à 100% pour s'affranchir d'une éventuelle variation basale.

Lors du test de tolérance au glucose réalisé à l'âge de 5 semaines (figure 21a), les souris NET +/- présentent une diminution de la tolérance au glucose par rapport aux souris NET +/+ avec une augmentation significative du pic de glycémie qui est également décalé dans le temps (à 30 minutes pour les souris NET +/- vs 15 minutes chez les souris NET +/+). Ce trouble glucidique précoce se confirme aux différents âges étudiés (10, 20 et 25 semaines : figure 21b, c, et d) et

lorsqu'on calcule les aires sous la courbes (AUC) (figure 21e). On observe également une différence significative des réponses à l'IPGTT entre les souris NET $-/-$ et les souris NET $+/+$ au cours du temps. Par contre, aucune différence significative n'est retrouvée entre les souris NET $+/-$ et NET $-/-$.

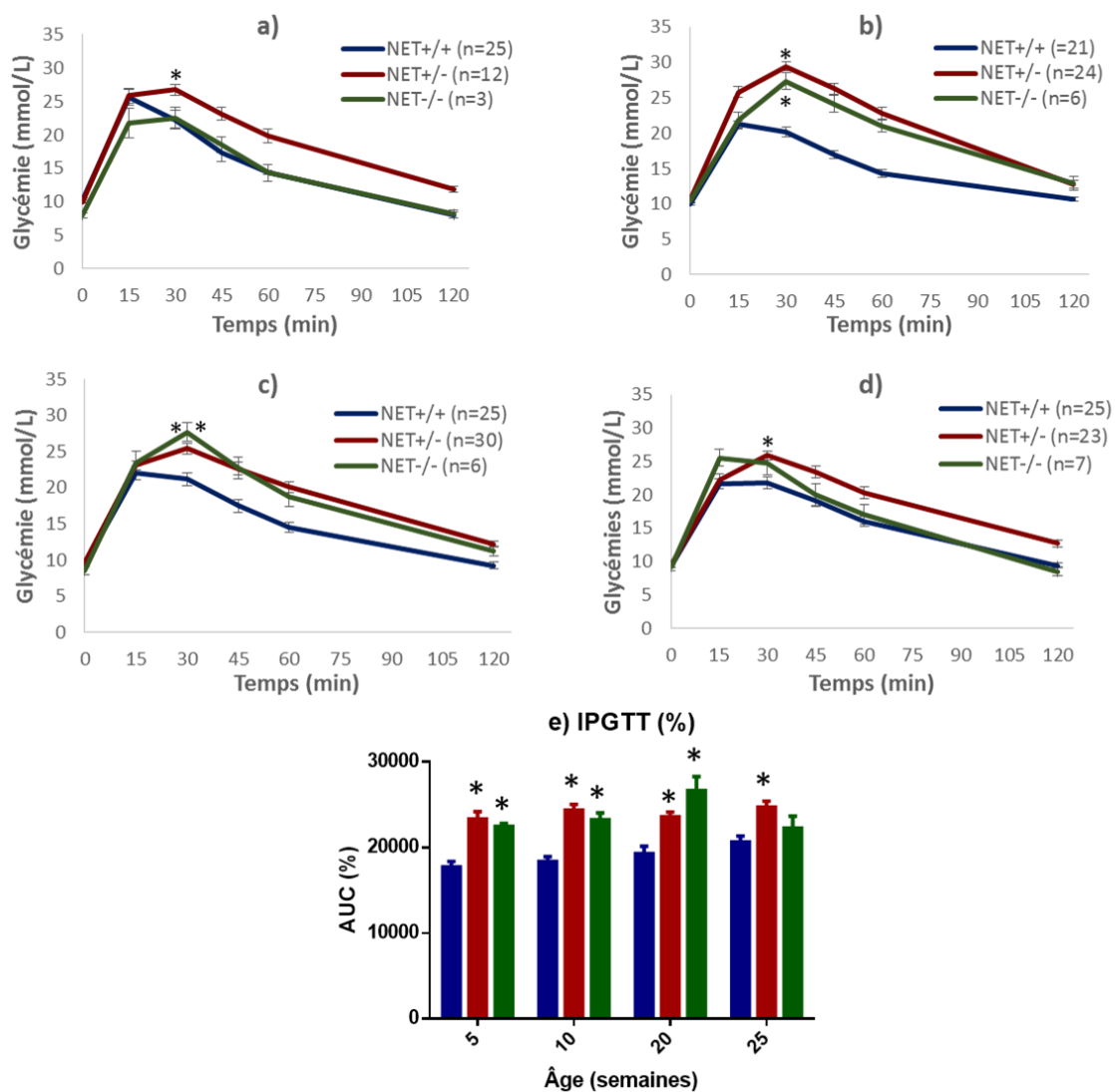


Figure 21 : Test de tolérance au glucose (IPGTT) des souris NET.

a) à 5 semaines ; b) 10 semaines ; c) 20 semaines ; d) 25 semaines e) Aire sous la courbe (AUC) des IPGTT aux différents âges. * $p < 0,05$ par rapport aux souris NET $+/+$, test de Tukey.

A l'âge de 40 semaines, la tolérance au glucose des souris NET +/- et NET -/- est toujours significativement augmentée (AUC = 18185 ± 616 vs 22837 ± 1041 vs 21749 ± 629 pour les souris NET +/+, +/- et -/- respectivement, $p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis).

Par ailleurs, lorsqu'on suit la sécrétion d'insuline au cours des différents temps de l'IPGTT (figure 22), on s'aperçoit qu'il existe un délai de 15 minutes avant la sécrétion d'insuline chez les souris présentant une hyperactivité sympathique (pente des courbes d'insuline entre 0 et 15 minutes non différentes de zéro pour les souris NET +/- et NET -/-, $p > 0,05$ en comparant les pentes). Les souris NET +/+ présentent au contraire une sécrétion d'insuline immédiate après injection du glucose en ip (pente de la courbe d'insuline entre 0 et 15 minutes significativement différente de zéro, $p < 0,05$ en comparant les pentes). Puis, entre 15 et 45 minutes, il n'existe plus de différences de sécrétion d'insuline entre les trois groupes de souris (pentes des courbes d'insuline (15 à 45 minutes) = $0,12$ vs $0,09$ vs $0,06$ pour les souris NET +/+, +/- et -/-, $p > 0,05$ en comparant les pentes, régression linéaire).

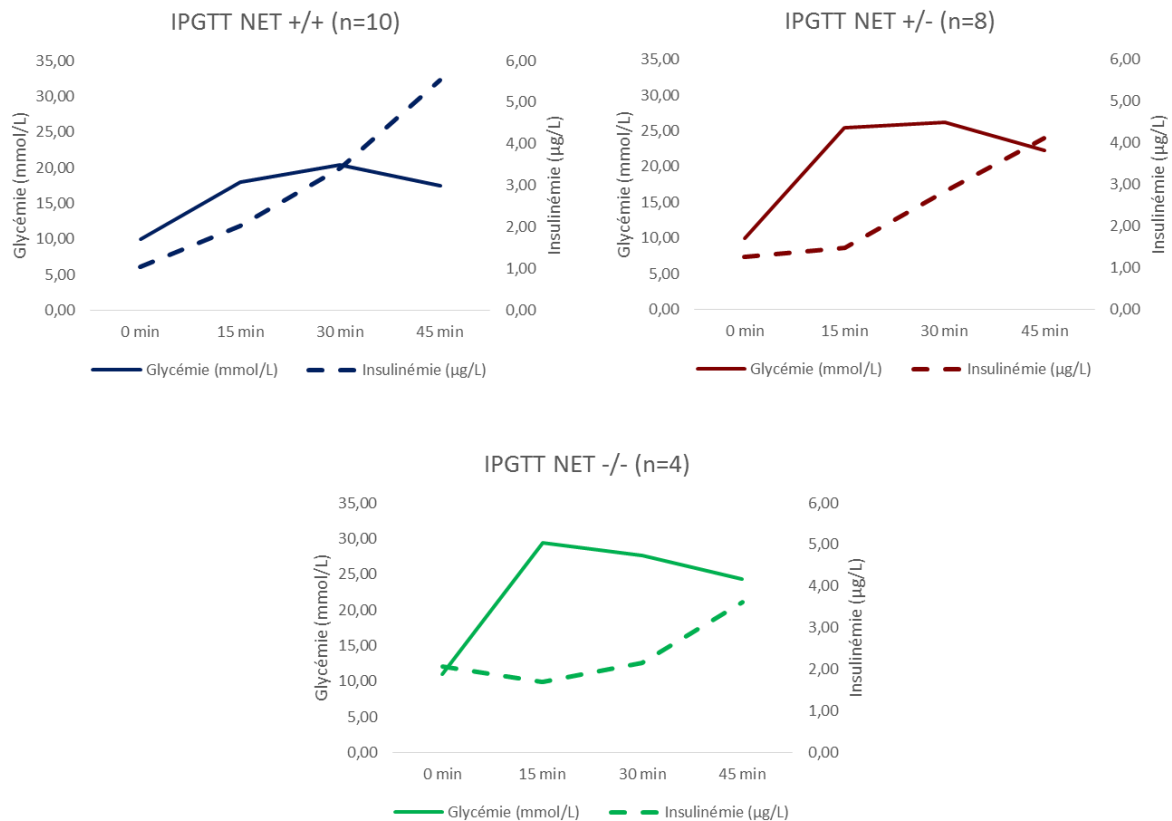


Figure 22 : Test de tolérance au glucose et sécrétion d'insuline des souris NET à 40 semaines.

c) Test de sensibilité à l'insuline

Les résultats des ITT sont présentés de la même façon que ceux des IPGTT : courbe d'évolution de la glycémie (en mmol/l) en fonction du temps (min), et AUC exprimées en % après normalisation des glycémies basales.

Concernant les résultats de l'ITT, on retrouve une légère diminution de la sensibilité à l'insuline chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+ à l'âge de 25 semaines (figure 23). Ceci se traduit aussi bien sur le nadir de glycémie après injection d'insuline en ip ($5,41 \pm 0,22$ vs $7,05 \pm 0,31$ mmol/L pour les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis), que dans le calcul de l'AUC ($9543,76 \pm 212,37$ vs $10379,94 \pm 225,83\%$ pour les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis). Les souris NET -/-, quant-à-elles, présentent un profil de sensibilité à l'insuline similaire aux souris NET +/+.

Toutefois, à l'âge de 40 semaines, on ne retrouve plus aucune différence entre les trois groupes de souris.

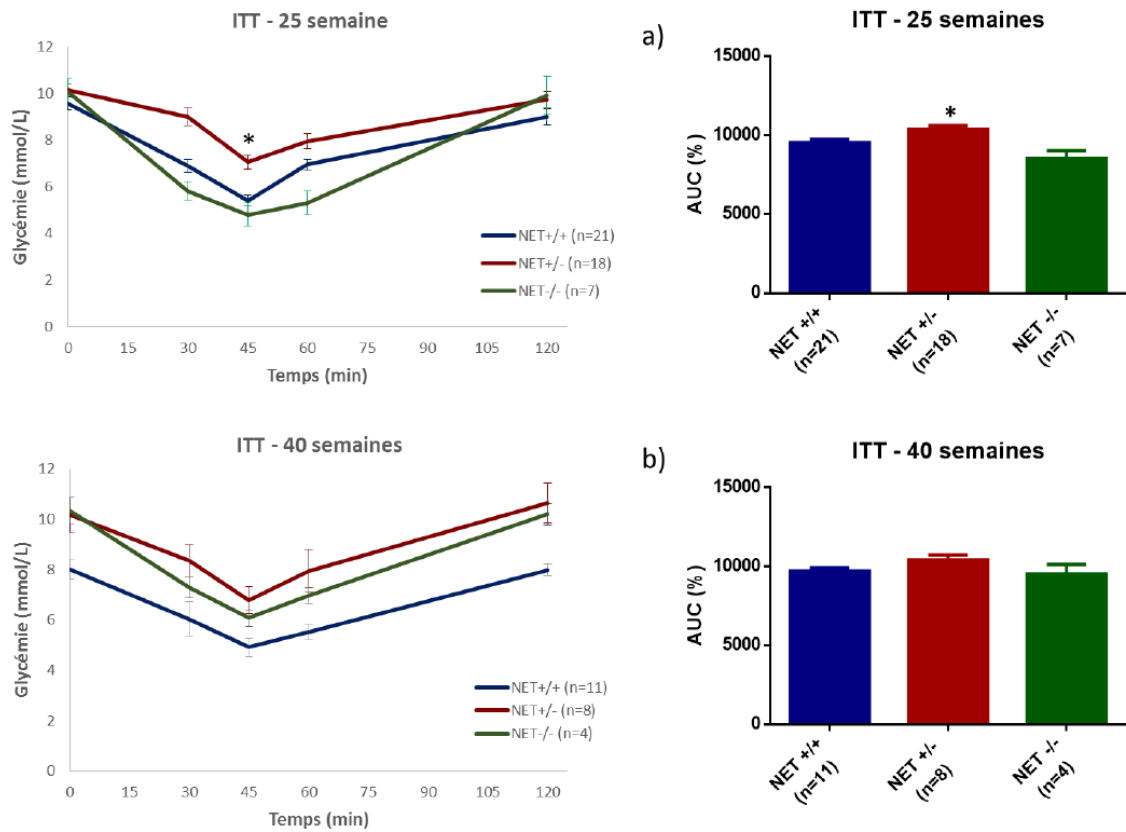


Figure 23 : Test de sensibilité à l'insuline (ITT) des souris NET.

a) à 25 semaines, présentation de la courbe de glycémie en fonction du temps et du calcul des AUC correspondantes, b) à 40 semaines, présentation de la courbe glycémie en fonction du temps et du calcul des AUC correspondantes. Valeurs moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$ entre les souris NET +/- et les souris NET +/+ et NET -/-.

8. Effet de l'hyperactivité sympathique sur la signalisation cellulaire de l'insuline

a) Dans le tissu pancréatique

Pour chaque animal, les îlots de Langerhans ont été comptés sur deux coupes successives et leur surface a été mesurée avant de faire la moyenne pour chaque animal. Si le nombre d'îlots

de Langerhans est similaire entre les souris NET $+/+$ et les souris NET $+/-$ ($20,5 \pm 2,0$ vs $18,5 \pm 1,8$ respectivement, $p > 0,05$; test de Mann-Whitney), la surface des îlots est presque divisée par deux chez les souris NET $+/-$ (10094 ± 1147 vs $5796 \pm 987 \mu\text{m}^2$ pour les souris NET $+/+$ et NET $+/-$ respectivement, $p < 0,05$; test de Mann-Whitney).

Au niveau du contenu des îlots en insuline, les souris NET $+/-$ présentent une densité significativement plus importante en insuline par rapport aux souris NET $+/+$ (voir figure 24). Par contre, lorsqu'on s'intéresse à la présence des transporteurs GLUT2 au glucose, on s'aperçoit que les souris NET $+/-$ ont tendance à avoir moins de GLUT2 sur la membrane cellulaire des îlots pancréatiques (voir figure 25).

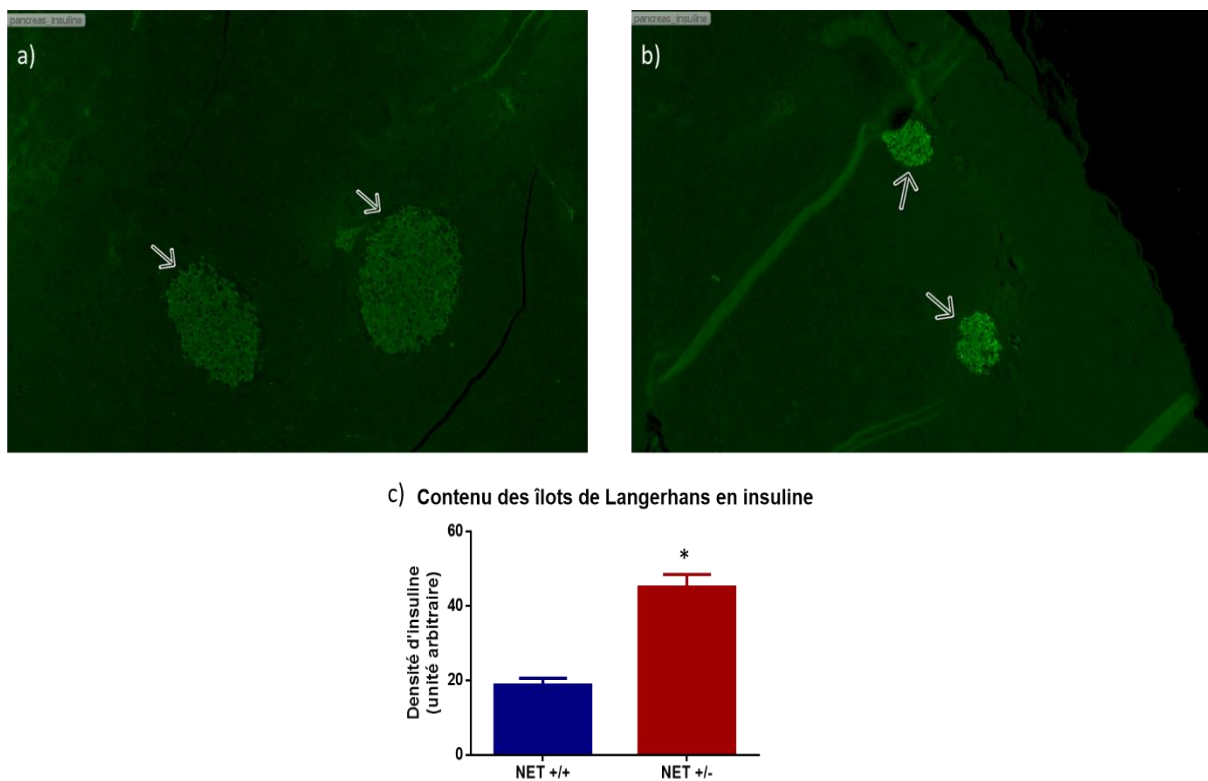


Figure 24 : Analyse du contenu en insuline des îlots de Langerhans par immunohistochimie.

a) Chez les souris NET $+/+$, b) chez les souris NET $+/-$, c) Analyse du contenu en insuline des îlots de Langerhans.

Valeurs moyennes \pm SEM correspondant à la densité mesurée grâce à une région d'intérêt identique pour 10 îlots par animal. * $p < 0,05$, test de Mann-Whitney

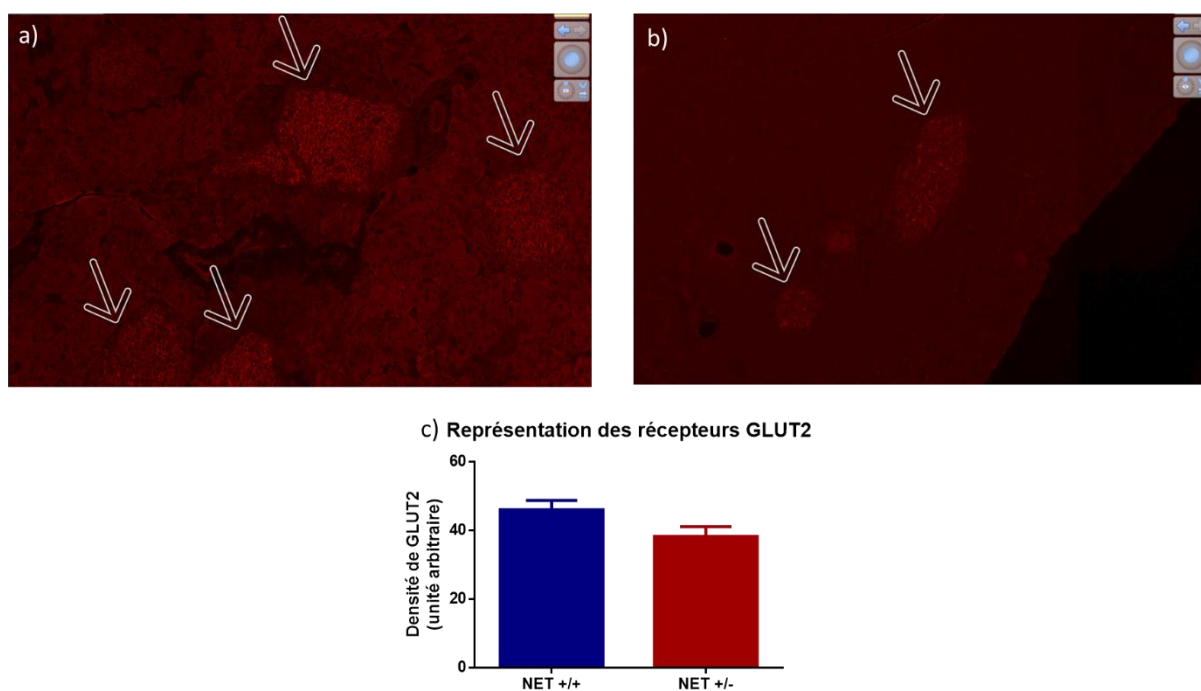


Figure 25 : Analyse de la présence des transporteurs GLUT2 dans les îlots de Langerhans par immuno-histochimie.

a) Chez les souris NET +/+, b) chez les souris NET +/-, c) Analyse des transporteurs GLUT2 sur la membrane des îlots de Langerhans.

Valeurs moyennes \pm SEM correspondant à la densité mesurée grâce à une région d'intérêt identique pour 10 îlots par animal.

b) Dans le tissu hépatique

Pour chaque échantillon de lysat hépatique, nous avons calculé le rapport AKT phosphorylé/AKT. La figure suivante représente les moyennes et les SEM de ces rapports, normalisés par rapport au témoin positif.

On constate une légère augmentation de la phosphorylation d'AKT chez les souris NET +/-, après stimulation par l'insuline (rapport AKT phosphorylé/AKT = 1,24 vs 2,01 chez les souris NET +/+ et +/- respectivement, $p < 0,05$, Mann-Whitney). Dans nos conditions expérimentales, ceci témoigne d'une action accrue de l'insuline au niveau du tissu hépatique en présence d'une l'hyperactivité sympathique.

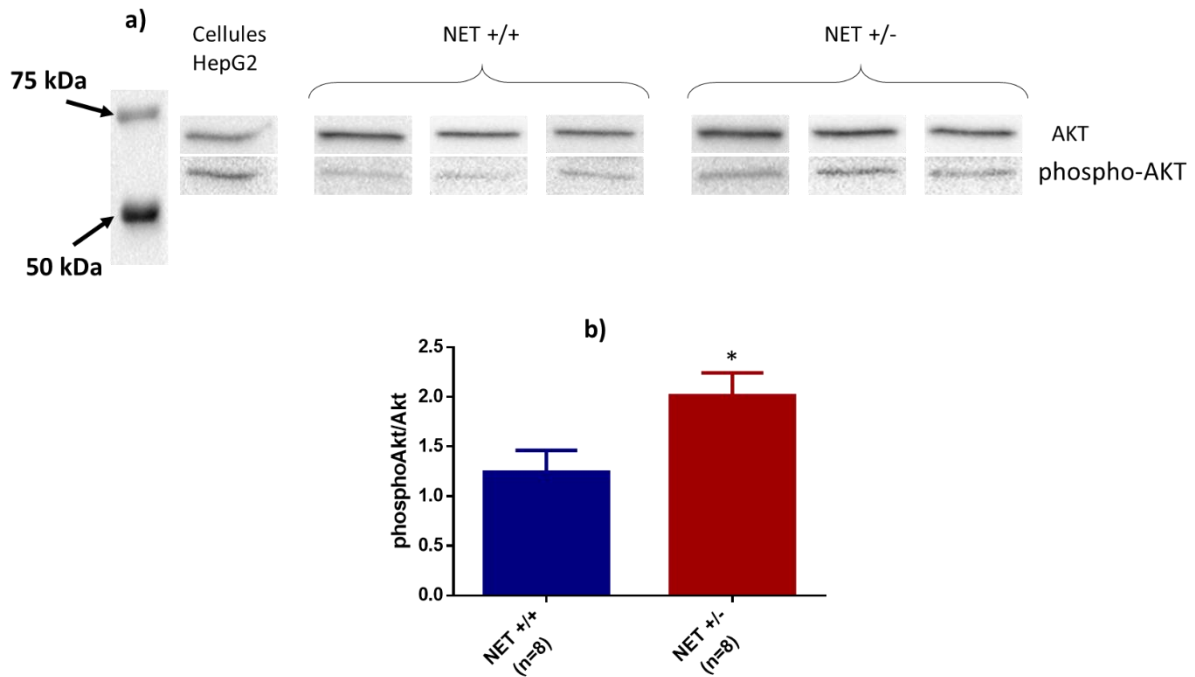


Figure 26 : Rapport AKT phosphorylé/AKT dans les tissus hépatiques de souris NET +/+ et NET +/-, après stimulation à l'insuline.

a) Western Blot illustrant les bandes d'intérêt (60kDa) correspondant à l'expression d'AKT et AKT-phosphorylé. Un contrôle positif du rapport AKT phosphorylé/AKT a été utilisé, il s'agit d'un lysat de cellules HepG2 stimulées par de l'insuline 10nM pendant 10 minutes. b) Représentation des ratios AKT phosphorylé/AKT, après normalisation par rapport au contrôle positif. Valeurs moyennes \pm SEM correspondant à 3 expériences successives par échantillon.

* $p < 0.05$, test de Mann-Whitney.

D. Conclusion

Dans cette première partie, nous avons cherché à voir si une hyperactivité sympathique constitutive pouvait avoir été une condition suffisante pour induire un syndrome métabolique. Hormis une masse corporelle inférieure chez les jeunes souris NET -/- par rapport aux autres génotypes, nous n'avons pas observé dans cette étude de différence au niveau paramètres cardiovasculaires (PAS et FC), et lipidiques (taux de cholestérol total et de triglycérides, quantité totale de masse grasse et quantité de tissu adipeux viscéral) entre les trois génotypes de souris. L'hyperactivité sympathique constitutive et isolée des souris NET +/- et NET -/- n'a pas donc d'influence sur le développement de troubles cardiovasculaires et lipidiques.

Par contre, nos expériences montrent que dès l'âge de 5 semaines, les souris NET +/- présentent une intolérance au glucose au contraire des souris NET +/+. Cette intolérance au glucose précoce évolue peu avec l'âge chez les souris NET +/- alors qu'elle tend à augmenter chez les souris NET +/+ (augmentation de 17% entre 5 et 25 semaines, $p < 0,05$). Chez les souris NET -/-, le niveau d'activité sympathique est légèrement et non significativement supérieur à celui des souris NET +/- (taux urinaires de noradrénaline = 2810 ± 2030 vs 2682 ± 1449 nmol/L respectivement à l'âge de 25 semaines) sans majoration des troubles glucidiques. Nous avons en plus observé que cette intolérance au glucose est due à un défaut de sécrétion d'insuline qui met plus de temps à être libérée dans la circulation générale après l'injection de glucose.

Par ailleurs, cette intolérance au glucose est associée une augmentation de l'insulinémie à jeun chez les souris NET -/- et NET +/- par rapport aux animaux NET +/+, mais sans hyperglycémie, ce qui conduit à une augmentation de l'index de résistance à l'insuline HOMA-IR.

L'hyperactivation sympathique semble donc bien engendrer des troubles du métabolisme glucidique qui sont précoces et indépendants de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, des taux de lipides, de la quantité et de la répartition de masse grasse.

II. Etude de l'effet d'un régime enrichi associé à une hyperactivité sympathique chronique sur le développement d'un syndrome métabolique

A. Introduction

Nous avons montré dans la partie précédente qu'une hyperactivité sympathique chronique était une condition suffisante pour induire des troubles glucidiques chez nos souris. Toutefois, nous n'avons pas retrouvé d'incidence de l'hypersympathicotonie sur le développement des autres troubles faisant partis de la définition du syndrome métabolique (obésité, HTA, dyslipidémies). Une explication possible serait que l'hyperactivité sympathique chronique isolée ne suffit pas au développement d'un syndrome métabolique complet mais serait un facteur aggravant en présence de conditions environnementales et notamment alimentaires.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons soumis notre modèle murin d'hyperactivité sympathique à un régime enrichi. Classiquement, l'un des premiers régimes auquel on pense pour induire le développement d'un syndrome métabolique est le régime hyperlipidique ou *high fat diet*. Toutefois, une étude précédente effectuée dans notre laboratoire sur ce modèle de souris NET a mis en évidence un problème de tolérance des animaux au régime hyperlipidique avec perte de poids, lésions dermatologiques et cachexie. Par conséquent, nous avons décidé de nous tourner vers un autre type de régime pouvant induire un syndrome métabolique : le régime enrichi en fructose. En effet, la consommation excessive en fructose est une cause du développement de la stéatose hépatique non alcoolique mais peut également engendrer un surpoids, une obésité, une insulino-résistance, du diabète de type 2 et même un syndrome métabolique (Lim et al., 2010; Nomura and Yamanouchi, 2012; Yerlikaya et al., 2017).

Plusieurs études ont montré l'apparition de troubles métaboliques chez la souris C57/BL6J (fond génétique des souris NET) après un régime enrichi en fructose :

- ❖ Cannizzo *et al* ont ainsi observé une augmentation des taux de cholestérol total après 8 semaines de régime enrichi en fructose à 10% dans l'eau de boisson, sans effet sur la glycémie ou les TG (Cannizzo et al., 2012).
- ❖ Schultz *et al* ont, eux, mis leurs souris pendant 4 mois sous régime enrichi en fructose à 34% dans les croquettes. Ils ont retrouvé une augmentation significative des AUC après la réalisation d'une ITT et d'une OGTT, ainsi qu'une augmentation significative de la glycémie, de l'insulinémie, des taux de cholestérol total et de TG mais pas d'obésité (Schultz et al., 2013). Ishimoto *et al* retrouvent également des résultats assez proches avec un enrichissement à 15 et 30% de fructose (Ishimoto et al., 2012)
- ❖ Enfin, un régime enrichi à 60% de fructose engendre une augmentation des taux de cholestérol total, de LDL-cholestérol et de la proportion de masse grasse totale mais n'a pas d'effet sur l'insulinémie (DeBosch et al., 2012, 2013).

Au vu de ces différentes publications, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un régime enrichi en fructose à 30% dans l'eau de boisson pendant 15 semaines.

Nous comparerons donc dans cette partie les effets induits par ce régime sur des souris wild-type et des souris présentant une hyperactivité sympathique à nos souris témoins du même âge (souris NET $+/+$ et NET $+/-$ âgées de 40 semaines présentées dans l'étude précédente), afin de voir si l'hyperactivité sympathique peut constituer un facteur aggravant du syndrome métabolique.

B. Animaux et méthode

1. Modèle expérimental

Dans cette deuxième partie, nous avons utilisé le même modèle de souris transgéniques que dans la première partie. Comme les souris NET $-/-$ ne présentent pas de troubles glucidiques beaucoup plus marqués que les souris NET $+/-$, nous n'avons utilisé que des souris hétérozygotes pour l'expression du transporteur NET et leurs littermates wild-type pour cette

deuxième série d'expériences. Les souris, mâles, sont incluses dans notre protocole à l'âge de 25 semaines et mises soit sous régime normal, soit sous régime enrichi en fructose à 30% dans l'eau de boisson.

L'ensemble des expériences réalisées sur notre modèle animal a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès du ministère avec le numéro APAFIS #5383-2016 051711333485V4.

2. Suivi expérimental

Les souris sont hébergées dans l'animalerie de la Faculté de Médecine avec un cycle jour/nuit de 12h. Elles ont un accès *ad libitum* à la nourriture (régime normal, A03, SAFE, Augy, France) et à la boisson (eau du robinet ou 30% (v/v) de fructose dans l'eau du robinet).

Pendant toute la durée du protocole, soit 15 semaines, la consommation de nourriture et de boisson ainsi que la masse corporelle des souris sont suivies une fois par semaine. A partir de ces consommations, nous avons également calculé la consommation énergétique moyenne sur les 15 semaines de régime à partir de la formule :

$\text{Consommation énergétique moyenne (kCal/kg/j)} =$ $\text{Moyenne (Quantité de croquettes} \times \text{Energie des croquettes} + \text{Quantité de boisson} \times \text{Energie de la boisson)}$

où :

- la quantité de croquette est exprimée en g/kg de masse corporelle/j
- la valeur énergétique apportée par les croquettes = 3,395 kCal/g
- la quantité de boisson est exprimée en mL/kg de masse corporelle/j
- la valeur énergétique de l'eau est de 0 kCal/mL
- la valeur énergétique du fructose à 30% est de 1,197 kCal/mL

Les différents examens, identiques à la première étude, sont réalisés avant le début du régime puis au bout des 15 semaines et sont résumés dans la figure ci-dessous.

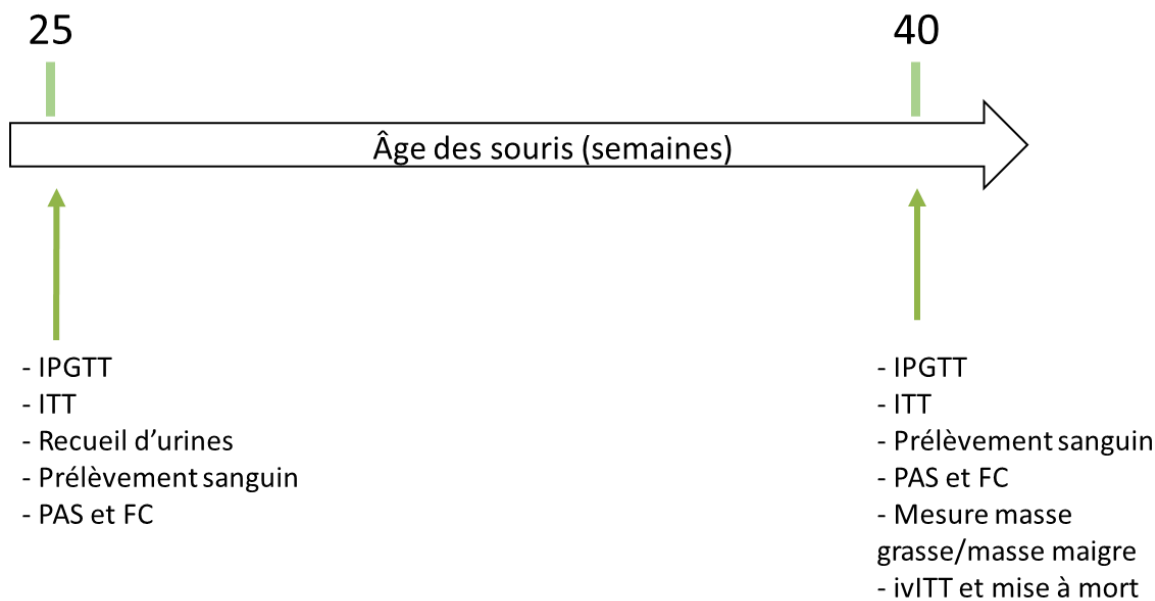


Figure 27 : Schéma du protocole expérimental

FC : fréquence cardiaque ; IPGTT : test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale ; ITT : test de sensibilité à l'insuline par voie intrapéritonéale ; ivITT : test de sensibilité à l'insuline par voie intraveineuse ; PAS : pression artérielle systolique.

3. Analyses statistiques des données

Les données sont présentées sous la forme de moyenne plus ou moins l'écart-type de la moyenne (SEM). La comparaison entre les deux groupes soumis au régime enrichi en fructose est effectuée en utilisant un test de Student lorsque les effectifs sont suffisants ou un test non paramétrique de Mann-Whitney lorsque les effectifs sont insuffisants. En cas de comparaison aux groupes contrôles sous régime normal, nous avons utilisé une ANOVA à un paramètre lorsque la taille des échantillons est suffisante ou un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Tukey (comparaison des groupes entre eux).

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad (GraphPad Prism 6.0 software). Une différence est considérée comme statistiquement significative pour des valeurs $p < 0,05$.

C. Résultats

1. Suivi de la masse corporelle et de la consommation de nourriture et de boisson

Le suivi de la masse corporelle des animaux, du suivi de la consommation en boisson et nourriture est présenté dans la figure 28. Les souris NET +/+ et NET +/- sous régime enrichi en fructose présentent un léger gain de masse corporelle qui apparaît dès l'âge de 30 semaines par rapport à l'âge de 25 semaines (augmentation de la masse corporelle de +3,3g et +2,8g entre 25 et 40 semaines chez les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p < 0,05$; test de Tukey). Toutefois, au bout de ces 15 semaines de régime, il n'existe pas de différence de masse corporelle entre les souris sous régime normal et les souris sous régime enrichi en fructose, quel que soit le génotype considéré.

Si la prise de boisson est similaire entre les 4 groupes, la prise de nourriture est significativement inférieure chez les souris sous régime enrichi en fructose par rapport aux souris sous régime normal avec une consommation moyenne de $77,7 \pm 1,1$ et $86,2 \pm 1,1$ g/kg chez les souris NET +/+ et +/- sous régime enrichi en fructose contre $132,2 \pm 1,8$ et $127,9 \pm 1,1$ g/kg chez les souris NET +/+ et NET +/- sous régime normal ($p < 0,05$; test de Tukey).

Si on s'intéresse à la consommation énergétique moyenne des souris sur les 15 semaines d'étude, on observe que les souris sous régime enrichi ont une augmentation de celle-ci, légère pour chez les souris NET +/+ et une forte pour les souris NET +/- ($449,0 \pm 6,1$ vs $462,6 \pm 5,4$ kCal/kg/j pour les souris NET +/+ sous régime normal et enrichi respectivement, $p = 0,10$ et $434,3 \pm 3,7$ vs $513,6 \pm 4,4$ kCal/kg/j pour souris NET +/- sous régime normal et enrichi respectivement, $p < 0,05$; test de Tukey). Les souris NET +/- sous régime enrichi en fructose ont d'ailleurs une consommation énergétique moyenne significativement supérieure à tous les groupes.

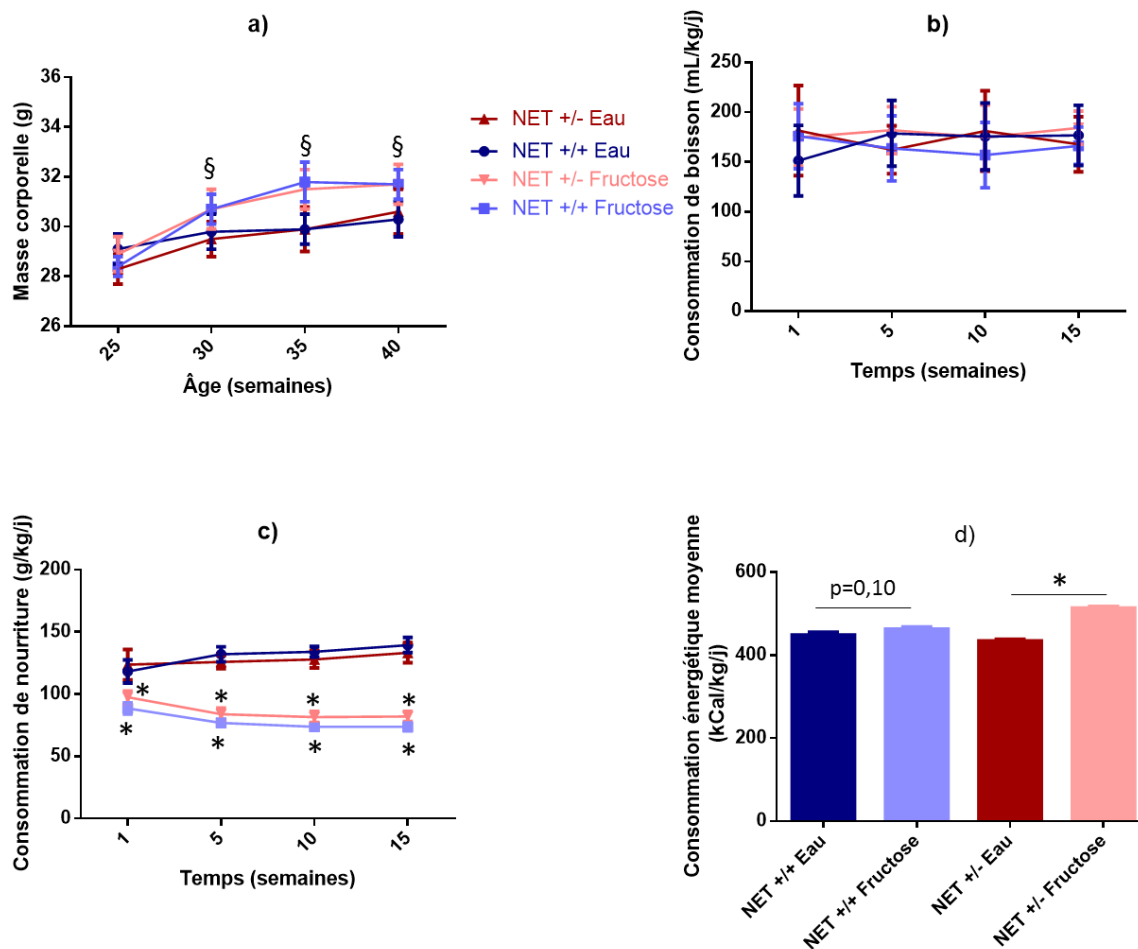


Figure 28 : Suivi de l'évolution des souris NET +/+ et +/- sous régime normal et enrichi en fructose.

a) Suivi de la masse corporelle, b) Suivi de la consommation de boisson, c) Suivi de la consommation de nourriture. d) Consommation énergétique moyenne sur les 15 semaines de régime. Valeurs moyennes \pm SEM ; § : $p < 0,05$ par rapport à l'âge de 25 semaines ; * $p < 0,05$ entre les souris sous régime normal et les souris sous régime enrichi en fructose, test de Tukey.

2. Evaluation de l'activité sympathique

La figure suivante compare les résultats du dosage des taux de NA plasmatique entre les quatre groupes de souris. On observe une tendance à l'augmentation des taux de NA plasmatiques chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+ quel que soit le régime mis en place. Ce dernier n'a pas d'influence sur le taux de NA plasmatique chez les souris NET+/. La grande variabilité des taux de NA plasmatique chez les souris NET+/> sous régime

enrichi ne permet pas de voir l'action du régime mais il semble diminuer le niveau d'activité sympathique.

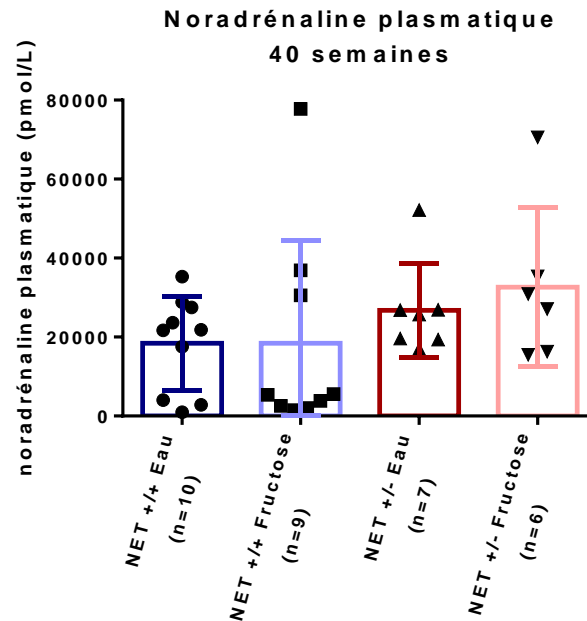


Figure 29 : Taux de NA plasmatique à 40 semaines.
Valeurs moyennes \pm SEM

3. Effets du régime sur les paramètres cardiovasculaires

Au bout des 15 semaines de suivi, nous n'avons pas observé d'effet du régime enrichi en fructose sur les paramètres cardiovasculaires (PAS et FC) entre les souris NET +/+ et entre les souris NET +/- (figure 30). Les résultats sont également similaires entre les souris NET +/+ et NET +/- sous régime enrichi en fructose que l'on considère la PAS moyenne ($90,3 \pm 3,1$ vs $92,2 \pm 4,4$ mmHg pour les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p > 0,05$) ou la FC moyenne ($633,7 \pm 13,2$ vs $597,9 \pm 14,3$ bpm pour les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p > 0,05$).

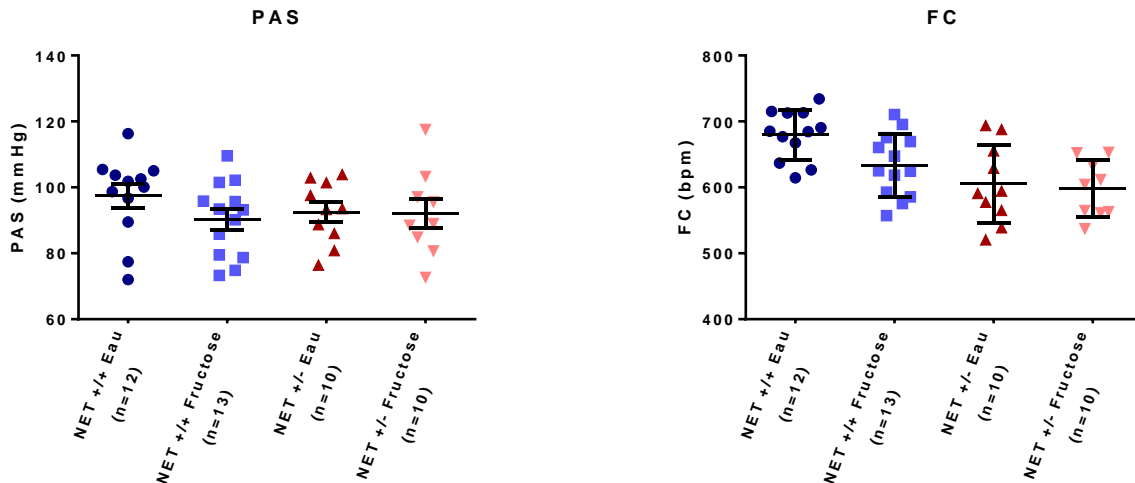


Figure 30 : Paramètres cardiovasculaires au bout des 15 semaines de régime.

Valeurs moyennes \pm SEM. FC : Fréquence cardiaque ; PAS : pression artérielle systolique

4. Effets du régime sur le bilan lipidique

Les valeurs du cholestérol total et des triglycérides à la fin des 15 semaines de suivi sont présentées dans le tableau 5. On n'observe aucune différence significative entre les souris NET +/+ et NET +/- à la fin des 15 semaines de régime enrichi en fructose que l'on considère les taux de cholestérol total ou de TG.

Tableau 5 : Bilan lipidique des souris NET +/+ et NET +/- après 15 semaines de régime normal ou enrichi en fructose.

Valeurs moyennes \pm SEM.

	<i>NET +/+</i>	<i>NET +/-</i>	<i>p</i>
	<i>Régime fructose</i>	<i>Régime fructose</i>	
<i>Cholestérol total</i> <i>(mg/dL)</i>	96,9 \pm 4,6	103,7 \pm 8,3	> 0,05
<i>Triglycérides</i> <i>(mg/dL)</i>	47,3 \pm 4,5	60,5 \pm 3,8	> 0,05

Par contre, au bout des 15 semaines de régime enrichi en fructose, on observe une augmentation significative de 35% du cholestérol total chez les souris NET +/- (76,9± 3,1 mg/dL vs 103,7 ± 8,2 mg/dL avant et après le régime enrichi en fructose respectivement, $p < 0,05$; test de Student). Chez les souris NET +/+, on retrouve une augmentation de 12% du cholestérol total (86,2 ± 4,7 vs 96,9 ± 4,6 mg/dL avant et après le régime enrichi respectivement) qui n'est pas significative. Concernant les TG, on observe une légère augmentation (non significative) chez les souris NET +/- (+9% entre le début (voir figure 17) et la fin du régime, $p > 0,05$) alors que les souris NET +/+ ont tendance à voir leur taux de TG légèrement diminué (-14% entre le début (voir figure 17) et la fin du régime, $p = 0,14$). Enfin on n'observe pas de différences significatives avec les taux de cholestérol total et de TG des souris sous régime normal à la fin de l'étude (voir figure 31).

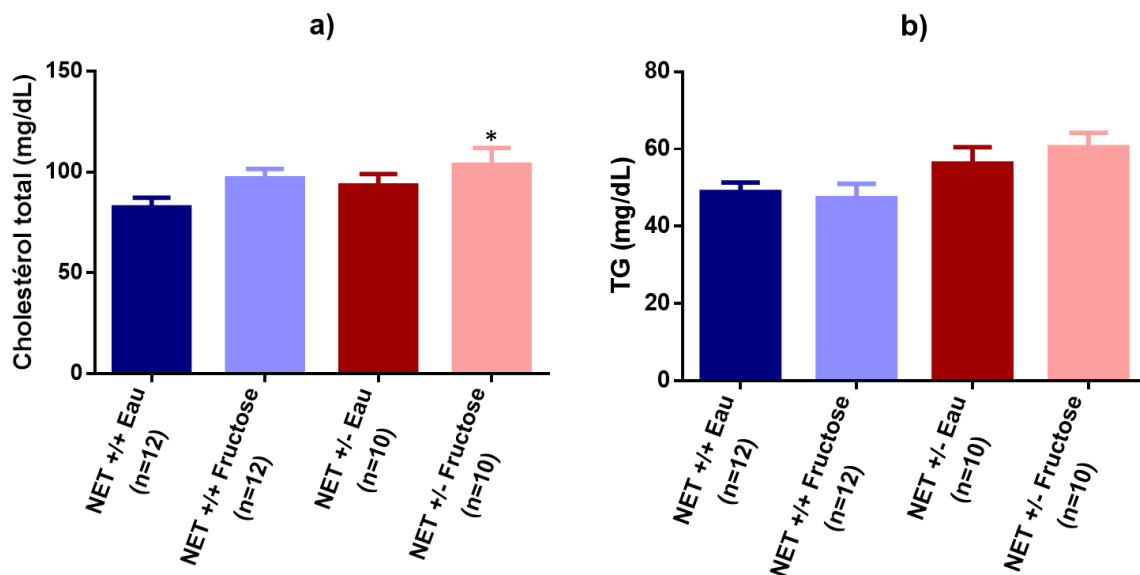


Figure 31 : Variation des taux de a) cholestérol total et b) triglycérides après les 15 semaines de régime.

Valeurs moyennes ± SEM. * augmentation significative entre le début et la fin du régime ($p < 0,05$)

5. Effet du régime sur la proportion de masse grasse et la répartition du tissu adipeux

Le tableau 6 compare la proportion de masse grasse totale, déterminée par μ TDM, entre les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} ainsi que le rapport masse grasse sur masse maigre et la proportion de tissu adipeux viscéral. On n'observe pas de différences significatives de ces trois paramètres chez les souris NET^{+/+} par rapport aux souris NET^{+/-} soumises à un régime enrichi en fructose.

Tableau 6 : Analyse de la masse grasse chez les souris NET^{+/+} et NET^{+/-} après 15 semaines de régime enrichi en fructose (Moyennes \pm SEM)

<i>Paramètres</i>	<i>NET^{+/+} (n=6)</i>	<i>NET^{+/-} (n=8)</i>	<i>Valeur de p (Mann-Whitney)</i>
<i>Masse grasse totale (%)</i>	23,19 \pm 2,11	20,07 \pm 1,05	0,23
<i>Rapport masse grasse/masse maigre</i>	0,36 \pm 0,04	0,30 \pm 0,02	0,30
<i>Tissu adipeux viscéral (% de masse grasse totale)</i>	32,19 \pm 1,80	27,42 \pm 1,04	0,23

Par ailleurs, si l'on s'intéresse à l'effet du régime enrichi par rapport au régime normal, on observe une tendance à l'augmentation de masse grasse totale chez les souris NET^{+/+} (17,55 \pm 0,99 vs 23,19 \pm 2,11 % entre le régime normal et le régime fructose respectivement, $p = 0,052$; test de Mann-Whitney), qui semble surtout concerner le tissu adipeux viscéral (25 \pm 1,41 vs 32,19 \pm 2,80 % entre le régime normal et le régime fructose respectivement, $p = 0,13$; test de Mann-Whitney). Par contre, on n'observe pas d'effet du régime enrichi en fructose chez les souris NET^{+/-} qui présentent des valeurs très similaires tant au niveau de la quantité de masse grasse totale que de la proportion de tissu adipeux viscéral (voir figure 32).

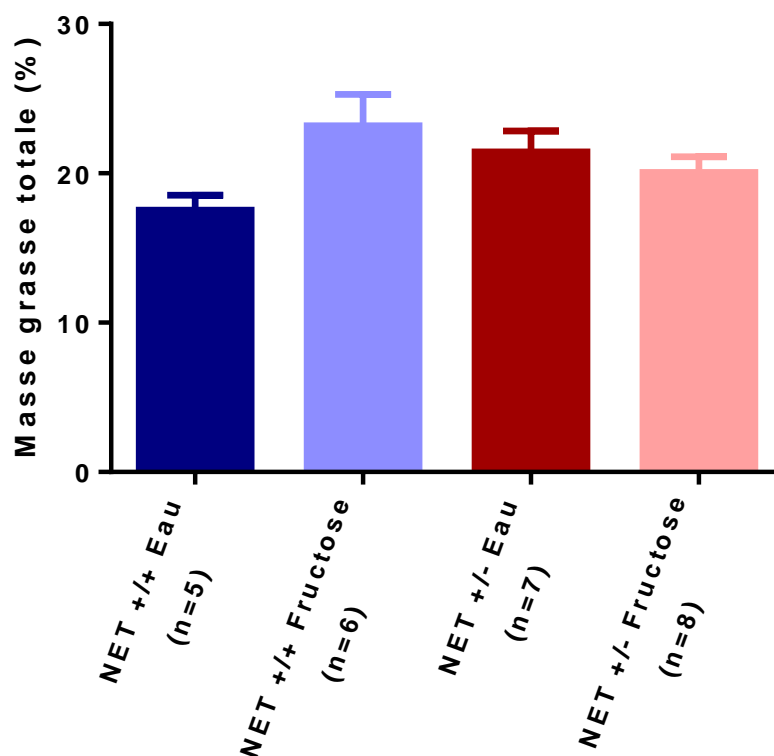


Figure 32 : Proportion de masse grasse totale chez les souris NET +/+ et NET +/- en fonction du régime.

Valeurs moyennes \pm SEM

6. Effet du régime sur les paramètres glucidiques

a) Bilan glucidique à jeun : glycémie, insulinémie et HOMA-IR

Le tableau 7 présente les résultats du bilan glucidique à jeun des souris NET +/+ et NET +/- après 15 semaines de régime normal ou enrichi en fructose.

Les glycémies à jeun des quatre groupes d'animaux sont similaires. Notre régime enrichi en fructose n'induit donc pas de diabète chez nos souris qu'elles présentent ou non une hyperactivité sympathique.

Par contre, ce régime enrichi en fructose provoque une augmentation significative de l'insulinémie à jeun et de l'HOMA-IR chez les souris présentant une hyperactivité sympathique.

Tableau 7 : Bilan glucidique des souris NET +/+ et +/- après 15 semaines de régime normal ou enrichi en fructose.

Valeurs moyennes \pm SEM ; eau : régime normal ; fructose : régime enrichi en fructose ;

* $p < 0,05$, test de Tukey.

	<i>NET +/+ eau</i> (n=12)	<i>NET +/+ fructose</i> (n=12)	<i>NET +/- eau</i> (n=10)	<i>NET +/- fructose</i> (n=10)	<i>p</i>
<i>Glycémie à jeun</i> (mmol/L)	9,70 \pm 0,38	10,42 \pm 0,39	9,68 \pm 0,44	9,69 \pm 0,51	> 0,05
<i>Insulinémie à jeun</i> (μ g/L)	1,17 \pm 0,08	1,14 \pm 0,09	1,21 \pm 0,10	1,81 \pm 0,22*	0,002
<i>HOMA-IR</i>	11,92 \pm 0,85	12,62 \pm 1,16	12,50 \pm 1,08	18,3 \pm 1,97*	0,006

Si on s'intéresse plus particulièrement à l'évolution de l'HOMA-IR (figure 33), on observe une augmentation significative de celui-ci chez les souris NET +/+ de façon indépendante du régime mis en place. Cette augmentation, due au vieillissement des souris contrôles, ramène le niveau de l'HOMA-IR à celui des souris NET +/- avant le début du régime (HOMA-IR = 11,92 \pm 0,85 vs 12,62 \pm 1,16 vs 11,10 \pm 0,77 pour les souris NET +/+ après 15 semaines de régime normal ou enrichi en fructose ou pour les souris NET +/- avant le début du régime respectivement, $p > 0,05$). Pour les souris NET +/-, il n'y a pas d'effet du vieillissement après 15 semaines de régime normal. Par contre, on observe une forte augmentation significative de l'HOMA-IR lorsque les souris NET +/- sont soumises à un régime enrichi en fructose. Ce résultat témoigne d'une sensibilité au développement d'une insulino-résistance des souris avec une hyperactivité sympathique en présence d'un régime enrichi.

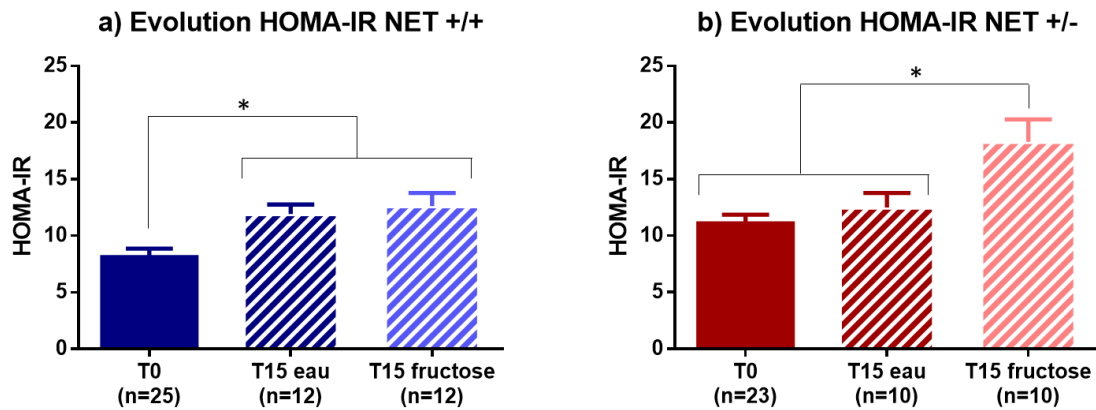


Figure 33 : Evolution de l'HOMA-IR chez les souris a) NET +/+ et b) NET +/- avant et à la fin du régime normal ou enrichi en fructose.

Valeurs moyennes \pm SEM ; eau : régime normal ; fructose : régime enrichi en fructose ;

* $p < 0,05$, test de Tukey.

b) Test de tolérance au glucose

Lors du test de tolérance au glucose réalisé après 15 semaines de régime, les souris NET +/- sous régime enrichi en fructose présentent une diminution de la tolérance au glucose par rapport aux autres groupes, avec une augmentation significative du pic de glycémie (figure 31 a). Le régime enrichi en fructose induit par ailleurs une augmentation de 11,4% de l'AUC chez les souris NET +/+ (AUC (%) = $18185,2 \pm 616,1$ vs $20328,0 \pm 490,4$ pour les souris NET+/+ sous régime normal et enrichi respectivement, $p > 0,05$, test de Tukey) et de 24,3% chez les souris NET +/- (AUC (%) = $22836,8 \pm 1040,8$ vs $28378,3 \pm 1151,2$ pour les souris NET +/- sous régime normal et enrichi respectivement, $p < 0,05$; test de Tukey). Enfin, si on compare les deux groupes de souris sous régime enrichi en fructose, on observe également une augmentation significative de l'AUC des souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+ (voir figure 34b).

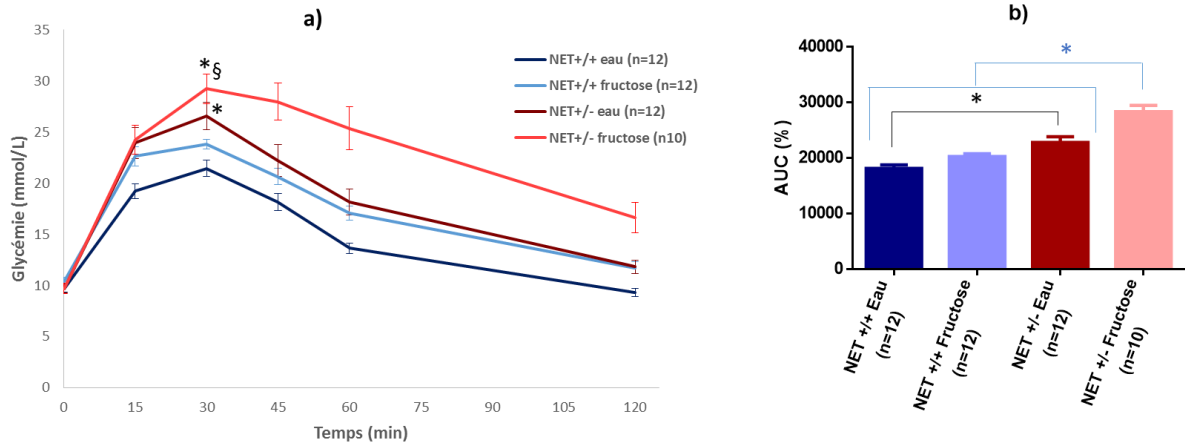


Figure 34 : Test de tolérance au glucose (IPGTT) des souris NET après 15 semaines de régime.

a) Courbe de la glycémie en fonction du temps ; b) AUC (%) des IPGTT. * $p < 0,05$ par rapport aux souris NET +/+ sous régime normal ; § : $p < 0,05$ par rapport aux souris NET +/+ sous régime enrichi en fructose, test de Tukey.

Par ailleurs, lorsqu'on suit la sécrétion d'insuline au cours des différents temps de l'IPGTT (figure 35), on s'aperçoit qu'il existe un délai de 15 minutes avant la sécrétion d'insuline chez les souris sous régime enrichi en fructose quel que soit le génotype considéré (pente des courbes d'insuline entre 0 et 15 minutes non différentes de zéro pour les souris NET +/+ et NET +/- sous fructose, $p > 0,05$ en comparant les pentes). Puis, entre 30 et 45 minutes, il n'existe plus de différences de sécrétion d'insuline entre les trois groupes de souris (pentes des courbes d'insuline (15 à 45 minutes) = 0,14 vs 0,09 vs 0,13 pour les souris NET +/+ sous régime normal, +/+ sous fructose et +/- sous fructose, $p > 0,05$ en comparant les pentes). Par contre, on n'observe pas de différence entre les souris NET +/+ et NET +/- sous régime enrichi en fructose concernant la sécrétion d'insuline.

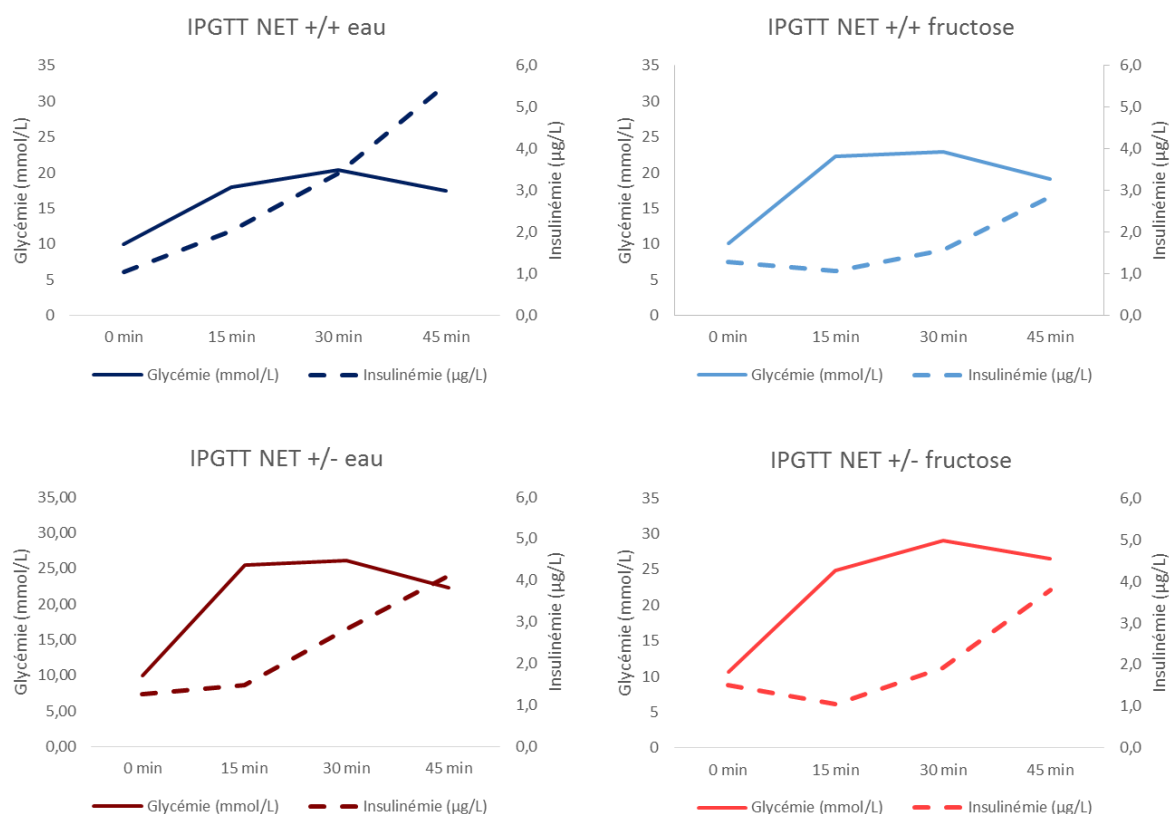


Figure 35 : Test de tolérance au glucose et sécrétion d'insuline des souris NET après 15 semaines de régime.

c) Test de sensibilité à l'insuline

Concernant les résultats de l'ITT après 15 semaines de régime, on ne retrouve pas de différence entre les souris NET +/+ soumises ou non au régime enrichi (figure 36). De la même manière, après 15 semaines de régime enrichi en fructose, les souris NET +/- présentent une sensibilité à l'insuline similaire à celle des souris NET +/- sous régime normal. Par ailleurs, nous n'observons pas de différence entre les souris NET +/+ et NET +/- sous régime enrichi ($10162,4 \pm 172,3$ vs $10279,1 \pm 283,9$ pour les souris NET +/+ et +/- respectivement, $p > 0,05$; test de Mann-Whitney). Ces résultats impliquent que le régime enrichi en fructose n'a pas d'effet sur la sensibilité à l'insuline lors d'une stimulation aiguë de l'organisme.

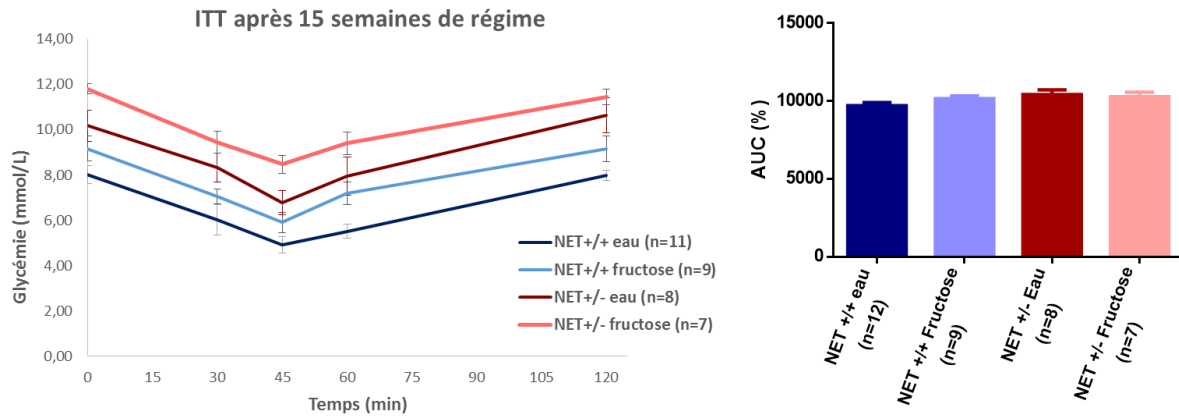


Figure 36 : Test de sensibilité à l'insuline (ITT) des souris NET après 15 semaines de régime.

Valeurs moyennes \pm SEM ; eau : régime normal ; fructose : régime enrichi en fructose

7. Effet du régime sur la signalisation intracellulaire de l'insuline

Comme pour la première partie, nous avons calculé le rapport AKT phosphorylé/AKT de chaque échantillon de lysat hépatique des souris soumises au régime enrichi en fructose. Puis nous comparé ces ratios entre eux et avec les résultats obtenus pour les souris sous régime normal. La figure 37 représente les moyennes et les SEM de ces rapports, normalisés par rapport au témoin positif.

On ne retrouve pas d'effet du régime enrichi en fructose que ce soit sur les souris NET +/+ ($1,30 \pm 0,19$ vs $1,55 \pm 0,26$ pour les souris sous régime normal ou sous fructose respectivement, $p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis) ou sur les souris NET +/- ($2,03 \pm 0,23$ vs $2,31 \pm 0,74$ pour les souris sous régime normal ou sous fructose respectivement, $p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis). Par ailleurs, nous ne constatons pas non plus de différence significative entre les souris NET +/+ et +/- sous régime enrichi en fructose alors que les souris NET +/- ont un rapport AKT phosphorylé/AKT légèrement supérieur.

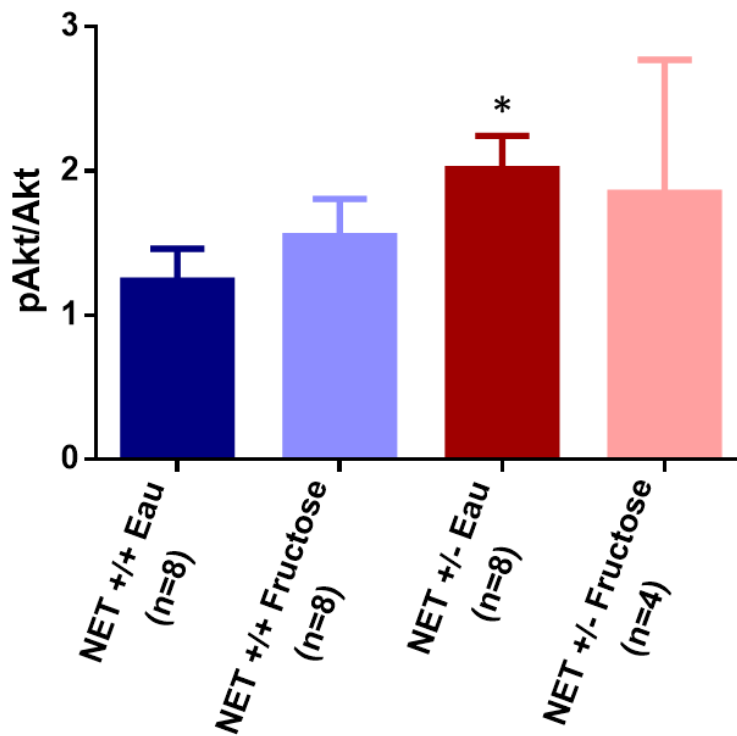


Figure 37 : Rapport AKT-phosphorylé/AKT dans les tissus hépatiques de souris NET +/+ et NET +/- après 15 semaines de régime et stimulation à l'insuline.

Valeurs moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$.

D. Conclusion

Dans ce deuxième chapitre, nous avons cherché à savoir si une hyperactivité sympathique chronique pouvait constituer un facteur aggravant lorsqu'elle est associée à un régime enrichi.

Le tableau suivant résume les différents résultats trouvés chez les souris sous régime en fructose sous forme de valeurs brutes et de variation entre le début et la fin du régime.

Tableau 8 : Résumé des résultats obtenus sur les différents paramètres entre les souris contrôles (NET+/+) et les souris avec une hyperactivité sympathique (NET+/-) soumises à un régime enrichi en fructose à 30% dans l'eau de boisson .

Valeurs moyennes obtenues à la fin du régime et variation des paramètres obtenus à la fin du régime par rapport à ceux mesurés avant la mise en place de celui-ci. $p < 0,05$ est considéré comme significatif ; test de Student.

	<i>Valeurs à la fin des 15 semaines de régime enrichi en fructose</i>			<i>Variation des paramètres entre le début et la fin du régime enrichi en fructose</i>		
	NET +/+ (n=12)	NET +/- (n=10)	p	NET +/+ (n=12)	NET +/- (n=10)	p
<i>Glycémie à jeun (mmol/L)</i>	10,42	9,72	> 0,05	+ 5%	-3%	> 0,05
<i>Insulinémie à jeun (µg/L)</i>	1,14	1,81	< 0,05	+ 48%	+ 66%	> 0,05
<i>HOMA-IR</i>	12,62	18,30	< 0,05	+ 54%	+ 59%	> 0,05
<i>IPGTT (AUC %)</i>	20328	28378	< 0,05	- 0,9%	+ 16%	< 0,05
<i>ITT (AUC %)</i>	10162	10279	> 0,05	+ 3%	+ 2%	> 0,05
<i>Cholestérolémie (mg/dL)</i>	96,92	103,73	> 0,05	+ 12%	+ 35%	= 0,11
<i>Triglycéridémie (mg/dL)</i>	47,31	60,48	> 0,05	- 14%	+ 9%	= 0,09
<i>Pression artérielle (mmHg)</i>	89,4	92,2	> 0,05	- 12%	- 5%	> 0,05
<i>Fréquence cardiaque (bpm)</i>	635	598	> 0,05	- 1%	+ 4%	> 0,05

Après 15 semaines, le régime enrichi fructose semble bien induire des troubles glucidiques majorés chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET +/+ :

- intolérance au glucose (évaluée par l'AUC de l'IPGTT) multipliée par 1,16 vs 0,99 respectivement
- insulinémie à jeun multipliée par 1,66 vs 1,48 respectivement
- HOMA-IR multiplié par 1,58 vs 1,54 respectivement

Si on obtient bien un petit effet (non significatif) du régime enrichi en fructose sur la prise de masse corporelle, les taux de cholestérol total et de TG, celui-ci semble dépendant de l'activité sympathique puisque les souris NET +/- présentent une variation entre les taux initiaux et finaux plus importante. Il faut souligner que cet effet reste faible puisqu'on ne retrouve pas de différence globale entre les souris sous régime normal et celles sous régime enrichi. Par contre, nous n'avons pas retrouvé d'effet ni du régime seul, ni de l'association régime et hyperactivité sympathique sur paramètres cardiovasculaires (pression artérielle systolique et fréquence cardiaque).

Comme précédemment, nous nous sommes intéressés à la cinétique de sécrétion d'insuline au cours de l'IPGTT. Il en ressort que le régime enrichi en fructose induit des troubles de sécrétions pancréatiques d'insuline chez les souris NET +/+ (pente de variation de l'insuline entre 0 et 15 min significativement inférieure chez les NET +/+ sous régime enrichi en fructose par rapport aux NET +/+ sous régime normal, non différente entre 15 et 45 min) mais sans modification de l'activité de l'insuline (pas de différence significative entre les variations de glycémie entre 30 et 45min entre les deux groupes). Cet effet sur les souris NET +/+ semble identique à ce qui a été observé chez les souris NET +/- sous régime normal (pas de variations significatives). Toutefois, on n'observe pas d'effet supplémentaire du fructose chez les souris NET +/- (profils cinétiques de sécrétions d'insuline non statistiquement différents chez les souris NET +/- quel que soit le régime).

Enfin, nous avons étudié l'influence du régime enrichi en fructose sur les voies de signalisation de l'insuline (phosphorylation d'AKT) au niveau des tissus hépatiques. Nous ne retrouvons pas d'effet du régime enrichi en fructose sur la phosphorylation d'AKT, quel que soit le génotype considéré ce qui va à l'encontre des données de la littérature.

III. Discussion générale des résultats et perspectives

A. Choix du modèle et de la méthode de mesure de l'hyperactivité sympathique

1. Choix des animaux

a) Souris NET

Dans ce travail, nous avons voulu étudier les effets d'une hyperactivité chronique du système nerveux sympathique sur le développement de troubles associés au syndrome métabolique. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin d'hypersympathicotomie constitutive : des souris dont le gène codant pour le transporteur de la NA a été invalidé (souris NET). Ces souris ont initialement été développées comme modèle d'étude dans la dépression, avec un comportement similaire à des souris wild-type sous antidépresseurs (Xu et al., 2000). Par conséquent, il existe peu d'études sur les effets périphériques de la délétion de NET et notamment sur le plan cardiovasculaire et métabolique.

Comme cette lignée n'est pas disponible dans le commerce, l'obtention des souris NET utilisées dans notre étude s'est faite à partir de croisement de couples hétérozygotes au sein de notre animalerie. Si les différents génotypes wild-type (+/+), hétérozygotes (+/-) et KO (-/-) sont censés naître dans des proportions mendéliennes, nous n'avons obtenu que peu de souris NET -/- à cause, entre autres raisons, d'une mortalité après la naissance des animaux.

Chez les souris NET -/-, les taux de NA urinaires sont significativement augmentés par rapport aux souris NET +/- ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Thèse de C. Doras, 2011; Keller et al, 2004). Nous avons également retrouvé des taux urinaires de NA significativement augmentés chez les souris NET +/- par rapport aux souris contrôles et ceci de façon à peu près similaire aux souris NET -/-. Ce résultat n'était pas retrouvé dans l'étude de Keller *et al* mais nous a permis de considérer le génotype hétérozygote comme un modèle d'hyperactivité sympathique. Par ailleurs, et comme discuté ultérieurement, le phénotypage cardio-métabolique des souris NET +/- s'est avéré proche de celui des souris NET -/- nous

permettant de compenser en partie le peu d'animaux -/- obtenus lors de la reproduction. Par ailleurs, on retrouve une tendance à l'augmentation des taux d'adrénaline et de dopamine urinaires mais non significative. Ceci peut s'expliquer facilement du fait de la nature de la mutation qui touche exclusivement le NET, plus spécifique de la NA et de l'adrénaline mais avec une vitesse de recapture plus importante pour la NA (Bönisch and Brüss, 2006). La dopamine peut quant à elle être recapturée par son transporteur spécifique : le DAT. Concernant les catécholamines plasmatiques, on retrouve aussi une augmentation des taux de NA mais non significative du fait de la grande variabilité des résultats chez les souris NET +/-.

Enfin, l'un des problèmes pouvant résulter d'une augmentation des concentrations en NA est la désensibilisation des récepteurs adrénergiques. En effet, il est connu qu'une stimulation aiguë et répétée des récepteurs adrénergiques provoque la désensibilisation de ceux-ci par un mécanisme de phosphorylation (Bünemann et al., 1999). Les tests fonctionnels *ex vivo* (récepteurs α et β_2) et *in vivo* (récepteurs β_1) réalisés sur nos souris nous ont permis de vérifier que ces récepteurs n'étaient pas désensibilisés. Au vu de ces résultats, les effets observés pourront donc être imputés à une stimulation sympathique et non pas à une absence d'effet de celle-ci.

On observe même une augmentation de la sensibilité des récepteurs β_2 (voir figure 12b) avec une diminution significative de la CE_{50} et une tendance à l'augmentation de l' E_{max} . Cette observation est toutefois à moduler :

- il s'agit d'une étude purement fonctionnelle donc on ne peut pas savoir si cette augmentation apparente de la fonction est bien réelle ou si elle provient en fait d'une quantité supérieure de récepteurs β_2 -adrénergique à la membrane des cellules. Nous pourrions en effet avoir une petite désensibilisation de ces récepteurs compensée par un nombre accru. Il serait donc judicieux d'explorer ces mécanismes soit via la quantité d'ARNm de ces récepteurs (par RT-PCR), soit par la quantité de protéines (par Western-Blot) soit par des études de binding.
- Nous avons choisi de réaliser cette étude sur des anneaux de trachées pour pouvoir étudier le sous-type β_2 sans interférence avec la présence des sous-types β_1 et β_3 en partant de l'hypothèse que nous pourrions extrapoler les résultats à l'ensemble de l'organisme et notamment au pancréas. Les cellules β -pancréatiques expriment majoritairement à leur surface des récepteurs α_2 post-synaptiques qui inhibent la sécrétion d'insuline et des récepteurs β_2 qui stimulent la sécrétion d'insuline. A l'état

basal, c'est normalement l'effet α_2 qui prédomine (affinité pour la NA supérieure par rapport aux récepteurs β_2). Or chez nos souris NET +/- (et NET -/-) nous pourrions donc avoir un effet prédominant sur les récepteurs β_2 (concentrations plasmatiques en NA suffisantes pour stimuler ce sous-type de récepteurs et augmentation de la sensibilité) et donc une stimulation de la sécrétion d'insuline même à l'état basal, expliquant l'insulinémie à jeun supérieure par rapport aux souris NET +/+.

b) Autre modèle génétiquement modifié d'hyperactivité sympathique : les souris invalidées pour les gènes des récepteurs α_2

Hormis le transporteur NET, la sécrétion de NA et l'adrénaline peut être inhibée par les récepteurs α_2 -adrénergiques présynaptiques et plus particulièrement par les sous-types α_{2A} et α_{2C} qui vont agir comme un rétrocontrôle négatif. Tout comme les souris NET, les $\alpha_{2A}^{-/-}$ ont la particularité d'avoir des taux plasmatiques et urinaires en NA plasmatiques significativement plus élevés que leurs contrôles C57/Bl6 (Altman et al., 1999; Brede et al., 2003; Hein et al., 1999; Niederhoffer et al., 2004). Cette augmentation de l'activité sympathique est associée à une diminution du baroréflexe, une tachycardie au repos (Niederhoffer et al., 2004), une diminution de la glycémie à jeun et une tendance à l'augmentation de l'insulinémie à jeun (Altman et al., 1999; Fagerholm et al., 2004). Au contraire, les souris $\alpha_{2C}^{-/-}$ présentent des taux élevés en adrénaline plasmatique et urinaire mais pas de modifications des taux de NA. Ceci s'explique par le fait que le récepteur α_{2C} inhibe la sécrétion d'adrénaline par les cellules chromaffines de la médullosurrénale en exerçant un rétrocontrôle négatif à ce niveau (Brede et al., 2003). L'augmentation de ces taux d'adrénaline provoque également une tachycardie chez les souris $\alpha_{2C}^{-/-}$ mais sans hypertension, alors que les souris $\alpha_{2C}^{+/-}$ présentent une susceptibilité accrue de développer une hypertrophie cardiaque pouvant aller jusqu'à l'insuffisance cardiaque (Gilsbach et al., 2007). Enfin, les souris dont les gènes de ces deux récepteurs ont été invalidés (souris $\alpha_{2AC}^{-/-}$) présentent également une augmentation significative des concentrations plasmatiques en NA et en adrénaline ce qui conduit à une hypertrophie cardiaque associée à une fibrose (Gilsbach et al., 2010). Ainsi ces différents modèles de souris présentent une hyperactivité sympathique qui se répercute notamment par des troubles cardiaques. Concernant le métabolisme, on retrouve des modifications de l'homéostasie glucidique avec une diminution de la glycémie à jeun (souris $\alpha_{2A}^{-/-}$ et $\alpha_{2AC}^{-/-}$) et une augmentation de

l'insulinémie à jeun ($\alpha_{2AC}^{-/-}$) (Ruohonen et al., 2012). Ces résultats s'expliquent par le fait que l'effet principal du SNS sur les cellules pancréatiques met en jeu les récepteurs α_{2A} et α_{2C} au niveau post-synaptique, responsables de l'inhibition de la sécrétion d'insuline. Les effets observés chez ces souris seraient donc plutôt la conséquence de l'invalidation des récepteurs post-synaptiques que dus à l'augmentation des concentrations plasmatiques en NA et en adrénaline. De ce fait, ces modèles de souris apparaissent moins pertinents pour étudier l'effet d'une hyperactivité sympathique (médiée par l'augmentation des catécholamines plasmatiques) sur le développement de troubles appartenant au syndrome métabolique alors que l'un des récepteurs adrénergiques impliqués dans les effets ne sera plus exprimé à la surface des organes d'intérêts (pancréas et tissu adipeux).

Chez les souris NET $-/-$, au contraire, la mutation concerne le transporteur de recapture ce qui a pour conséquence des modifications importantes de l'homéostasie noradrénergique. En effet Xu *et al* ont montré que l'invalidation du gène NET induisait une augmentation de la synthèse intra-neuronale de NA pour compenser la diminution des réserves de ce neuromédiateur due à l'absence de recapture. En effet, l'invalidation du gène NET entraîne une diminution de la clairance en NA de l'espace synaptique d'environ six fois, clairance qui se fait finalement par diffusion de la NA sécrétée dans la circulation sanguine (Xu et al., 2000). Concernant les récepteurs α_2 , la délétion de NET a plutôt tendance à augmenter leur expression et leur activité quel que soit la localisation : dans la moelle épinière, où cela conduit même à une augmentation de l'effet analgésique de la morphine chez les souris NET $-/-$ (Bohn et al., 2000), comme dans les autres régions du SNC (Gilsbach et al., 2006; Vizi, 2004).

2. Choix de la mesure de l'activité sympathique

Dans notre étude, nous avons choisi d'évaluer le niveau d'activité sympathique par la mesure des catécholamines urinaires (de l'âge de 5 semaines à l'âge de 25 semaines) et plasmatiques (à 40 semaines, lors de l'expérience terminale). La première raison expliquant ce choix tient à notre modèle d'hyperactivité sympathique. En effet, celui-ci repose sur une augmentation des concentrations plasmatiques en NA, et dans une moindre mesure en adrénaline, qui vont donc pouvoir stimuler tous les récepteurs adrénergiques de l'organisme, et non pas sur une augmentation de l'activité électrique nerveuse. La deuxième raison repose sur la relative simplicité mise en œuvre et la possibilité de procéder à un suivi régulier des animaux, surtout pour le dosage des catécholamines urinaires. Si nous avons retrouvé des taux en NA

augmentés chez nos animaux hétérozygotes et KO, ces deux méthodes ne constituent qu'une mesure indirecte de l'activité sympathique. En effet, elles sont dépendantes des capacités de clairance plasmatique (pour la mesure des catécholamines plasmatiques) et de filtration glomérulaire (pour la mesure des catécholamines urinaires) et ne sont pas prédictives du niveau d'activation sympathique à l'échelle d'un organe donné. Par ailleurs, et même si des mesures répétées ainsi que l'utilisation de la CLHP ont permis de diminuer la variabilité intra-individuelle (Hjemdahl, 1993), la mesure des concentrations plasmatiques en NA est moins reproductible et moins sensible que d'autres méthodes de mesure directe comme la microneurographie (Grassi et al., 1997).

Il existe plusieurs méthodes de mesure directe de l'activité sympathique. L'une d'entre elle est la scintigraphie à la [123 I]-méta-iodo-benzyl-guanidine (MIBG). La MIBG est un analogue de la NA mais également de la guanéthidine, un substrat du transporteur NET qui après entrée dans la cellule nerveuse, est stockée dans les vésicules synaptique et diminue la sécrétion de NA. De la même manière, après injection, la [123 I]-MIBG va être transportée activement via le NET et stocké comme la NA dans les granules des neurones post-ganglionnaires et dans la médullosurrénale. A ce titre, la scintigraphie à la [123 I]-MIBG est indiquée entre autre dans le diagnostic des tumeurs adrénérgiques comme les phéochromocytomes ou les neuroblastomes qui expriment le transporteur NET en grandes quantités (Sisson et al., 1981; Wieland et al., 1980, 1984). En plus de ces indications oncologiques, la scintigraphie à la [123 I]-MIBG a montré son intérêt dans l'appréciation de l'innervation sympathique cardiaque (Flotats and Carrió, 2004; Wieland et al., 1981). Du fait de ce mécanisme particulier passant par le transporteur NET, cette méthode était peu adaptée à la mesure de l'activité sympathique dans notre modèle murin invalidé pour ce transporteur. Par ailleurs et même si cette méthode permet d'avoir une idée plus précise de l'activité sympathique cardiaque, elle ne permet pas d'avoir accès à celle des autres organes du fait d'une fixation insuffisante pour la distinguer du bruit de fond.

Une autre méthode de mesure de l'activité sympathique est la microneurographie qui permet d'accéder directement à l'activité électrique nerveuse au niveau des efférences post-ganglionnaires. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Hagbarth et Vallbo dans les années 1960 (Hagbarth and Vallbo, 1968) et consiste en l'insertion d'une microélectrode en tungstène au niveau des fibres sympathiques efférentes du nerf fibulaire. Si cette méthode est beaucoup plus sensible que le dosage des catécholamines urinaires et plasmatiques, elle est également plus invasive. Par ailleurs, si le suivi régulier est possible chez le lapin et le rat, il est beaucoup plus difficile chez la souris. Enfin, notre modèle de souris NET permet de mimer une

hyperactivité sympathique du fait de l'augmentation des catécholamines circulantes mais ne constitue pas un modèle d'hyperactivité sympathique électrique nerveuse. Dans ces conditions, nous n'observerions certainement pas de différence entre nos souris contrôles et les souris NET.

Enfin, la dernière méthode est celle du « spillover » de la NA. Elle consiste en la perfusion de petites quantités de NA tritiée et au suivi de la clairance tissulaire de celle-ci et de la NA non marquée depuis le secteur plasmatique à l'équilibre (Esler, 2011). Le grand intérêt de cette technique est de pouvoir accéder aussi bien à l'activité générale du SNS que de façon plus spécifique à celle d'un organe donné grâce à la formule :

$$\textit{spillover régional de NA} = [(Cv - Ca) + Ca \times E] \times PF$$

Où Cv est la concentration veineuse en NA ; Ca la concentration artérielle en NA ; E la fraction d'extraction de la NA tritiée à travers l'organe ; et PF le flux plasmatique.

Toutefois l'application de cette méthode de dilution du radio-isotope nécessite des temps de prélèvement des échantillons sanguins à partir de l'organe étudié réguliers et une administration du traceur dans le plasma unidirectionnelle. Enfin le relargage de la NA tritiée dans le plasma après sa recapture neuronale doit être insignifiante. Par ailleurs cette méthode nécessite l'utilisation de tritium, et est difficilement reproductible plusieurs fois pour le suivi d'un même animal au cours du temps.

Pour conclure, l'évaluation de l'activité sympathique par la mesure des catécholamines plasmatiques et urinaires, même si elle n'est pas parfaite, nous a semblé être la méthode la plus adaptée à notre modèle d'augmentation des concentrations circulantes en catécholamines, ce qui va mimer une hyperactivité sympathique.

3. Choix du régime enrichi

Comme souligné dans l'introduction de notre deuxième partie sur l'hyperactivité sympathique, le choix du régime enrichi s'est porté sur le fructose à cause d'une meilleure tolérance escomptée pour les animaux. Même si ce type de régime donne des résultats moins importants qu'un régime *high fat*, les données de la littérature montrent qu'il induit à lui seul des troubles glucidiques et lipidiques voire même un syndrome métabolique.

Le premier effet de ce régime constaté chez nos souris NET +/+ est une prise modérée de masse corporelle au bout des 15 semaines de régime. Ce résultat n'est pas étonnant car seule l'étude d'Ishimoto *et al* avait retrouvé une augmentation significative de celle-ci au bout de 25 semaines de régime enrichi à 15 et 30% (Ishimoto et al., 2012). De façon plus déroutante, nos souris NET +/- présentent la même tendance à la prise de masse corporelle (+3,3g vs 2,8g pour les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p > 0,05$) alors que leur consommation énergétique est plus importante. L'une des explications possibles serait une dépense énergétique accrue de nos souris NET +/- qui compenserait les apports. Xu *et al* ont étudié l'activité exploratrice des souris NET-/- avec le test de l'open field. Celui a révélé que les souris NET-/- s'habituent plus rapidement à un nouvel environnement que les animaux contrôles (Xu et al., 2000). Toutefois, cette augmentation n'est qu'apparente puisque les souris contrôles ont récupéré une locomotion identique à celle des souris NET -/- une fois acclimatée au nouvel environnement. Les souris NET-/- se comportent finalement comme des animaux traités par des antidépresseurs avec une augmentation de l'activité. Ce dernier point n'a, à l'heure actuelle, pas été mesuré dans nos différents groupes de souris. Il serait donc intéressant de compléter nos données avec une mesure de la dépense énergétique.

Concernant les paramètres cardiovasculaires, nous n'avons pas observé d'effet du régime quel que soit le génotype considéré. Ceci est plutôt en accord avec les études d'Ishimoto *et al* et de Debosh *et al* qui ont également mesuré la pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque par pléthysmographie (DeBosch et al., 2013; Ishimoto et al., 2012).

Enfin, l'effet du régime observé sur les lipides chez nos souris contrôles reste assez modéré et limité au cholestérol total. Par ailleurs, il ne conduit pas au développement de troubles lipidiques par rapport aux mêmes souris sous régime normal. Ceci peut peut-être s'expliquer par une durée d'exposition au fructose de 15 semaines qui serait trop courte par rapport à d'autres études qui laissent leurs animaux entre 20 et 25 semaines sous fructose. Nos souris NET +/- semblent un peu plus sensible à ce régime avec une augmentation du cholestérol total et une petite augmentation des TG au bout des 15 semaines, les deux paramètres restant globalement similaires aux résultats trouvés pour les souris NET +/- sous régime normal.

B. Hyperactivation sympathique et développement de troubles métaboliques

Ce travail avait pour but de valider l'une des hypothèses de notre laboratoire à savoir qu'une hyperactivité sympathique chronique serait impliquée dans la genèse des différents troubles associés au syndrome métabolique.

Le tableau 9 présente de façon résumée les différentes observations faites grâce à notre modèle murin par rapport aux souris contrôles.

Tableau 9 : Résumé des résultats obtenus sur les différents paramètres pour les souris avec une hyperactivité sympathique (NET+/- et NET-/-) par rapport aux souris NET+/- à l'âge de 25 semaines.

Valeurs moyennes obtenues sur les souris NET+/- et tendances comparatives pour les souris NET+/- et -/-. + : petite augmentation ; ++ forte augmentation ; = valeur similaire ; - : petite diminution ; / : test non réalisé ; (*) : $p < 0,05$ et (**): $p < 0,01$ selon test de Kruskal-Wallis ; (#) : $p < 0,05$ et (##) : $p < 0,01$ selon test de Mann-Whitney ;^{\$} mesure réalisée chez des animaux âgés de 40 semaines.

	NET +/+	NET +/-	NET -/-
Noradrénaline urinaire (<i>pmol/L</i>)	1547	+ (*)	+
Glycémie basale (<i>mmol/L</i>)	9,3	=	=
IPGTT (AUC %)	20637	++ (**)	+ (*)
ITT (AUC %)	9544	+ (*)	=
Insulinémie basale (<i>µg/L</i>)	0,82	+ (*)	++ (*)
HOMA-IR	8,27	+ (*)	++ (**)
Nombre d'îlots de Langerhans par coupe ^{\$}	20,5	=	/

<i>Surface des îlots de Langerhans (μm^2)[§]</i>	10094	- (#)	/
<i>Contenu en insuline des îlots de Langerhans (unité arbitraire)[§]</i>	18,8	+++ (##)	/
<i>Contenu en GLUT2 des îlots de Langerhans (unité arbitraire)[§]</i>	46,1	-	/
<i>AKT phosphorylé/AKT (lysats hépatiques)</i>	1,24	+ (#)	/
<i>Cholestérolémie (mg/dL)</i>	85,0	=	=
<i>Triglycéridémie (mg/dL)</i>	52,4	=	=
<i>Masse grasse totale (%)[§]</i>	17,6	+	/
<i>Pression artérielle (mmHg)</i>	93,1	=	=
<i>Fréquence cardiaque (bpm)</i>	596,0	=	=

1. Effets sur les lipides et le tissu adipeux

Dans notre modèle, l'hyperactivité sympathique constitutive et isolée ne semble pas avoir d'effet sur les taux de cholestérol total ou de TG. Par ailleurs la mise en place du régime enrichi en fructose induit une légère augmentation des taux de cholestérol total qui semble plus marquée en présence d'hyperactivité sympathique (+12% vs +35% chez les souris NET +/- et +/- sous régime enrichi en fructose, respectivement, $p = 0,11$). Pour les taux de TG, on observe également une légère augmentation de +9% chez nos souris NET +/- au bout de 15 semaines de régime enrichi alors que les souris NET +/- sous le même régime ont tendance à avoir une

baisse des taux de TG (-14%). Toutefois, ces augmentations ne sont pas suffisantes pour pouvoir parler d'hypercholestérolémie ou d'hypertriglycéridémie car on n'observe aucune différence entre les taux de cholestérol total et de triglycérides par rapport aux groupes de souris NET +/+ et NET +/- sous régime normal.

On peut donc s'interroger sur la pertinence de notre modèle au niveau du profil lipidique. L'une des explications peut provenir de l'âge des animaux. En effet, nous avons arrêté notre phénotypage à l'âge de 40 semaines soit chez des adultes encore assez jeunes. Les effets de l'hypersympathicotomie sur les paramètres lipidiques sont peut-être moins sensibles et ne se manifestent que plus tardivement dans la vie de l'animal. En effet, malgré les résultats sur le profil lipidique, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la masse grasse totale chez les souris NET +/- par rapport aux souris contrôles à l'âge de 40 semaines (+22% de masse grasse totale chez les souris NET +/- ; $p = 0,10$) même si leur masse corporelle est équivalente (30,3g vs 30,6g chez les souris NET +/+ et NET +/- respectivement, $p > 0,05$). L'autre explication pourrait provenir du fait que nos animaux ne sont pas obèses. En effet, sous régime enrichi en fructose, la masse corporelle de nos souris NET +/- est similaire à celle des souris NET +/+ alors que leur consommation énergétique est supérieure (voir figure 29). De plus, le régime enrichi en fructose induit une augmentation de la proportion de masse grasse totale chez les NET +/+ (23,19 vs 17,55% sous régime normal et enrichi en fructose respectivement, $p=0,052$) alors qu'on n'a pas du tout d'effet chez les souris NET +/- . Ces résultats pourraient laisser supposer une certaine « protection » de notre modèle contre le développement d'une obésité. Les arguments en faveur de cette hypothèse sont :

- (1) nos souris NET -/- comme celle de l'étude de Xu *et al* (Xu et al., 2000) ont une masse corporelle inférieure à celle des autres génotypes
- (2) l'administration d'un inhibiteur sélectif du NET, le LY368975 entraîne une diminution de la prise alimentaire chez des rats privés auparavant de nourriture (Gehlert et al., 1998)
- (3) Les souris $\alpha_{2A}^{-/-}$ et $\alpha_{2AC}^{-/-}$ ont également un profil de souris non obèse et ne présentent pas non plus de variations des paramètres lipidiques (Ruohonen et al., 2012).

Cette relative « protection » contre l'obésité expliquerait par ailleurs la différence de résultats observés entre nos souris NET non obèses et les autres résultats de notre laboratoire sur des animaux en surpoids ou obèses. En effet, le traitement de rats « spontaneously hypertensive, heart failure » (rats SHHF), qui présentent une augmentation de l'activité sympathique, par un inhibiteur sympathique sélectif des récepteurs I₁ des imidazolines entraîne une diminution

significative des taux de cholestérol total associée à la diminution de l'activité sympathique (Fellmann et al., 2013). Une autre étude réalisée chez le rat Zucker, un modèle de « syndrome métabolique » sans hyperglycémie à jeun, avec le même traitement pendant 12 semaines a conduit à une diminution significative des taux de cholestérol total et de TG par rapport aux rats non traités (données non publiées).

Pour conclure, le niveau d'activation sympathique est un facteur important dans la régulation lipidique en présence d'obésité. En cas d'absence d'obésité, les dyslipidémies sont plutôt la conséquence de l'insulinorésistance. Or dans notre modèle de souris NET, les animaux ne sont pas obèses et ne présentent qu'une faible insulinorésistance basale (voir paragraphe 3) ce qui est une explication possible de notre absence d'effets sur les lipides. Afin d'étudier l'hyperactivité sympathique chronique sur le développement de troubles lipidiques, il pourrait être intéressant de croiser nos souris NET^{-/-} avec un modèle d'obésité comme les souris db/db ou les souris ob/ob.

2. Effets sur les paramètres cardiovasculaires

La pression et la fréquence cardiaque ne sont pas modifiées entre les trois génotypes, ni lors de l'ajout de fructose au régime. L'hyperactivité sympathique aurait donc peu de répercussions cardiovasculaires dans notre modèle. Dans leur étude, Keller *et al* n'observaient pas non plus de différences phénotypiques entre les souris NET^{+/+} et NET^{+/-}. Toutefois, l'absence totale de NET provoquait une légère augmentation de la pression artérielle lorsque les souris étaient en période d'activité (Keller, 2004). Cette divergence de résultat peut s'expliquer par la méthode de mesure. En effet, la mesure par pléthysmographie que nous avons utilisé présente l'inconvénient d'être moins sensible que la mesure par télémétrie. Par ailleurs, elle nécessite d'avoir des animaux calmes, dans un environnement non stressant pour obtenir des valeurs interprétables avec une faible variabilité. Les mesures ont en outre été réalisées au cours de la journée sur des animaux qui ne sont pas en cycle inversé. De ce fait, il s'agit plus d'une mesure des paramètres cardiovasculaires au repos qu'en activité ce qui peut expliquer les résultats obtenus.

3. Effets sur les paramètres glucidiques

De façon basale, nous avons montré que notre modèle murin d'hyperactivité sympathique chronique présentait, à l'âge de 25 semaines, une augmentation de l'insulinémie à jeun (légère chez les hétérozygotes et plus marquée chez les KO) sans hyperglycémie associée. Ce phénomène s'accroît avec l'âge en cas de déficit total en NET ou alors lorsqu'un régime enrichi en fructose est mis en place (insulinémie à jeun = 1,21 et 1,81 vs 2,08 $\mu\text{g/L}$ chez les souris NET +/- sous régime normal, sous régime enrichi en fructose et chez les souris NET -/- respectivement, $p < 0,05$). Dans l'autre modèle d'augmentation des concentrations plasmatiques en NA, les souris $\alpha_{2AC}^{-/-}$, Ruohonen *et al* observent également une hyperinsulinémie à jeun (1,55 vs 0,47 $\mu\text{g/L}$ chez les souris $\alpha_{2AC}^{-/-}$ et leurs contrôles respectivement, $p < 0,01$) qui conduit dans ce cas à une légère diminution de la glycémie à jeun (Ruohonen *et al.*, 2012). Dans notre modèle de souris NET, l'hyperinsulinémie à jeun n'entraîne pas, à l'inverse des souris $\alpha_{2AC}^{-/-}$, de baisse de la glycémie ce qui induit une légère insulino-résistance basale chez les souris NET +/- sous régime enrichi et chez les souris NET -/- sous régime normal (augmentation significative de l'HOMA-IR dans ces deux groupes et légère augmentation, non significative, de l'AUC lors de l'ITT chez les souris NET +/- sous régime normal). Cette différence repose sur le fait que la délétion des récepteurs α_2 sur la membrane des cellules pancréatiques lève l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par la stimulation sympathique. En effet, les récepteurs α_{2A} et α_{2C} sont nécessaires au niveau pancréatique pour inhiber la sécrétion d'insuline (Peterhoff *et al.*, 2003). Le mécanisme cellulaire mis en jeu implique à la fois l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase mais également l'inhibition d'un récepteur particulier appartenant à la famille des canaux calciques, le *transient receptor potential melastatin 2* ou TRPM2 (Ito *et al.*, 2017). Dans notre modèle, les récepteurs α_2 sont présents sur la membrane plasmique des îlots pancréatiques donc l'augmentation de l'insulinémie à jeun ne peut pas être expliquée par ce mécanisme. Par contre, les concentrations plasmatiques importantes en NA chez nos souris peuvent stimuler les récepteurs β -adrénergiques qui vont induire une stimulation de la sécrétion pancréatique d'insuline.

En condition aiguë lors de la stimulation de nos animaux avec une injection ip de glucose, on observe une forte intolérance au glucose chez nos souris avec une hyperactivité sympathique par rapport au souris contrôles (AUC = 18185 vs 22837 et 21749% pour les souris NET +/+, +/- et -/- respectivement à l'âge de 40 semaines, $p < 0,05$) et qui se développe très tôt, dès l'âge

de 5 semaines. Celle-ci est par ailleurs encore aggravée chez les souris NET +/- lors de la mise en place d'un régime enrichi en fructose (AUC = 27781%, $p < 0,05$ par rapport aux autres groupes). Cette intolérance ne semble pas liée à une diminution de la sensibilité de l'insuline puisque nous n'observons pas d'augmentation significative de l'AUC chez nos souris NET +/- et NET -/- lors des tests de tolérance à l'insuline réalisés au même âge. Au niveau des voies de signalisation cellulaire de l'insuline, on observe même une petite augmentation significative de la phosphorylation hépatique d'AKT (rapport AKT phosphorylé/AKT = 1,24 vs 2,01 chez les souris NET ++ et NET +/- respectivement, $p < 0,05$) chez les souris sous régime normal. Par ailleurs, lorsque le régime enrichi en fructose est mis en place, il n'induit pas non plus de développement de l'insulinorésistance que ce soit chez les souris NET ++ ou NET +/. Toutefois ces résultats sur la phosphorylation d'AKT ne semblent pas incohérents avec le reste de nos observations. En effet, lors de l'IPGTT, l'augmentation de l'AUC s'explique surtout par un pic de glycémie beaucoup plus important chez nos souris NET +/- (avec ou sans régime enrichi) par rapport aux souris contrôles qui est à mettre en parallèle de l'augmentation plus tardive des concentrations en insuline. Par contre, une fois l'insuline sécrétée, son action semble similaire puisque la cinétique de diminution de la glycémie est identique entre les groupes. Il nous a donc semblé que l'hyperactivité sympathique dans notre modèle induisait plutôt un retard de sécrétion pancréatique d'insuline qu'un problème d'activité de cette dernière sur ses tissus cibles.

Des études sur le mécanisme cellulaire de la sécrétion pancréatique d'insuline ont montré que l'inhibition de celle-ci induite par une stimulation sympathique via les récepteurs $\alpha 2$ réduisait le remplissage des vésicules contenant de l'insuline ainsi que leur adressage à la membrane mais n'avait aucun rôle dans la synthèse d'insuline (A. Zhao et al., 2010; Y. Zhao et al., 2010). L'analyse des pancréas de nos souris semble cohérente avec leurs résultats puisque nous n'observons pas de diminution du contenu en insuline chez nos souris NET +/- par rapport aux souris NET ++ mais plutôt une augmentation (contenu en insuline multiplié par 2,4 chez les souris NET +/- par rapport aux souris NET ++). A l'inverse de ce qui est observé sur le contenu pancréatique en insuline, il semble qu'il y ait moins de transporteurs GLUT2 sur la membrane plasmique des îlots pancréatiques de Langerhans chez les souris NET +/- que chez les souris contrôles (densité en GLUT2 (unité arbitraire) = 46,1 vs 38,3 pour les souris NET++ et +/- respectivement, $p = 0,10$). Ainsi l'injection d'une même quantité de glucose en ip stimulerait moins les cellules β -pancréatiques expliquant le retard de sécrétion d'insuline et l'augmentation du contenu en insuline pourrait être un phénomène de compensation. Toutefois le mécanisme

expliquant cette augmentation du contenu reste encore à expliquer, par exemple en dosant la pro-insuline : une augmentation de la pro-insuline pourrait dans ce cas témoigner d'une augmentation de la synthèse chez nos souris NET +/- . Enfin nous observons une diminution de la taille des îlots de Langerhans sans changement de leur nombre total. Ce phénomène pourrait être expliqué soit par une apoptose des cellules β -pancréatiques due à l'excès de NA, soit à un défaut survenant lors du développement embryonnaire des souris NET +/- et surtout -/-. En effet, la déplétion totale en NA chez les souris *Dbh*^{-/-} induit une mort in utero des embryons à moins de les supplémenter en dihydroxyphenylserine, convertie ensuite en NA suite à l'action de la *L- aromatic amino acid decarboxylase* (Thomas et al., 1995). Le transporteur NET joue également un rôle prépondérant dès les premiers stades du développement embryonnaire, aussi bien dans le SNC (Sieber-Blum and Ren, 2000) que dans des tissus périphériques comme l'épithélium olfactif, le système cardiovasculaire, les reins, les bourgeons pulmonaires ou l'intestin dont dérive le pancréas (Ren et al., 2003). Nous avons donc voulu voir si le génotype de la mère (NET +/+ ou NET +/-) pouvait avoir une influence sur les résultats des tests de tolérance au glucose. L'analyse en sous-groupe des IPGTT des souris NET +/+ et +/- en fonction du génotype de la mère ne montre aucune différence, l'augmentation des catécholamines maternelles ne doit donc pas avoir beaucoup d'influence sur l'embryogénèse. Par conséquent, l'effet potentiel sur l'embryogénèse proviendrait directement de l'excès de catécholamines circulantes embryonnaires qui perturberait la différenciation cellulaire dans le tissu pancréatique conduisant à un déficit en cellules β -pancréatiques. Ceci expliquerait peut-être en partie le nombre relativement faible des portées issues des souris NET +/- et -/- (environ 5 petits en moyenne par portée) et la mortalité plus importante des souris NET -/- dans les jours suivants la naissance. Comme les taux de NA commencent à être détectables après 10,5 jours de vie embryonnaire (Thomas et al., 1995), il pourrait donc être intéressant d'aller étudier la morphologie des pancréas des embryons obtenus après césarienne à 15 et 20 jours de vie embryonnaire.

Pour faire suite au travail réalisé, l'exploration des mécanismes cellulaires pouvant expliquer la diminution du nombre de transporteurs GLUT2 sur les cellules pancréatiques nous semble indispensable. Pour cela, il serait intéressant de reproduire les effets de l'hyperactivité sympathique sur des cellules β -pancréatiques observés *in vivo* sur un modèle *in vitro* de culture cellulaire (comme les RIN-m5F) stimulé de façon chronique avec des agonistes α et β -adrénergiques. La réversion de ces effets par l'application d'antagonistes des récepteurs α_2 et

β_2 -adrénergiques permettrait également de s'assurer que les observations réalisées sont bien dues à une action catécholaminergique.

Pour finir, même si nous n'avons pas montré de résistance à l'insuline au niveau de la phosphorylation d'AKT, il serait intéressant de continuer à explorer les voies de signalisation de l'insuline. En effet, l'hyperactivité sympathique agit peut-être sur l'une des protéines situées en aval d'AKT comme la glycogène-synthase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) ou encore, et surtout au vu des résultats obtenus dans le pancréas, sur la translocation des GLUT.

Conclusion

Bien que de plus en plus de données précliniques et cliniques laissent à penser que l'hyperactivité sympathique pourrait être la cause, et non pas une conséquence, du développement des différents troubles cardio-métaboliques entrant dans la définition du syndrome métabolique, la relation de causalité entre syndrome métabolique et hyperactivité sympathique est toujours sujette à débat. En partant de l'hypothèse que l'hyperactivité sympathique était bien la cause de développement de troubles métaboliques à savoir HTA, insulino-résistance et obésité, nous avons étudié les effets d'une hypersympathicotomie constitutive sur le développement de ces différents troubles.

Nos travaux ont permis de montrer que :

- 1) Une augmentation de l'hyperactivité sympathique est un facteur suffisant pour le développement de troubles glucidiques précoces avec le développement d'une intolérance au glucose associée à une hyperinsulinémie basale sans hyperglycémie. De façon très intéressante, et inattendue, nous avons observé que l'apparition de ces troubles ne serait pas due à une diminution de la sensibilité à l'insuline (pas de diminution de la phosphorylation d'AKT au niveau hépatique).
- 2) Les désordres glucidiques observés seraient dus à un défaut des capacités de sécrétion pancréatique d'insuline suite à une augmentation rapide de la glycémie. En effet nous avons tout d'abord observé *in vivo* qu'en cas d'hyperactivité sympathique, il existait un délai avant l'augmentation de l'insulinémie après injection de glucose lors de l'IPGTT. Par contre, une fois celle-ci sécrétée, son action est similaire dans les deux groupes NET +/- et NET +/+. L'analyse *ex vivo* en histologie et immuno-histochimie des pancréas de nos animaux montrent que les cellules β -pancréatiques des souris NET +/- ont tendance à posséder moins de transporteurs GLUT2 à leur surface. Par contre, leur contenu en insuline est significativement supérieur à celui des souris contrôles et ceci malgré des îlots de Langerhans plus petits. Il semble donc qu'en présence d'une hyperactivité sympathique, les cellules β -pancréatiques présentent un défaut de stimulation par une même quantité de glucose expliquant une sécrétion retardée d'insuline. Les réserves plus importantes en insuline seraient un moyen de compenser, au moins en partie, ce défaut de stimulation.
- 3) L'hyperactivité sympathique constitue également un facteur aggravant lorsqu'un régime enrichi est mis en place avec une accentuation notable de l'intolérance au glucose, de l'augmentation de l'insulinémie basale et de faibles augmentations des taux

de cholestérol total et de triglycérides. Toutefois, les mécanismes cellulaires sous-tendant le développement de ces troubles ne mettent pas jeu la phosphorylation d'AKT.

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux nous a permis de poser l'hypothèse que le système nerveux sympathique a un rôle majeur dans l'homéostasie glucidique, notamment dans le contrôle de la sécrétion pancréatique d'insuline lors d'une augmentation rapide de glycémie (voir schéma suivant). Cet effet semble très sensible au niveau d'activité sympathique et est observé en l'absence d'obésité, d'hypertension artérielle ou de dyslipidémies. Par ailleurs, une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique joue le rôle d'un facteur aggravant des troubles glucidiques lorsque les apports énergétiques deviennent trop élevés.

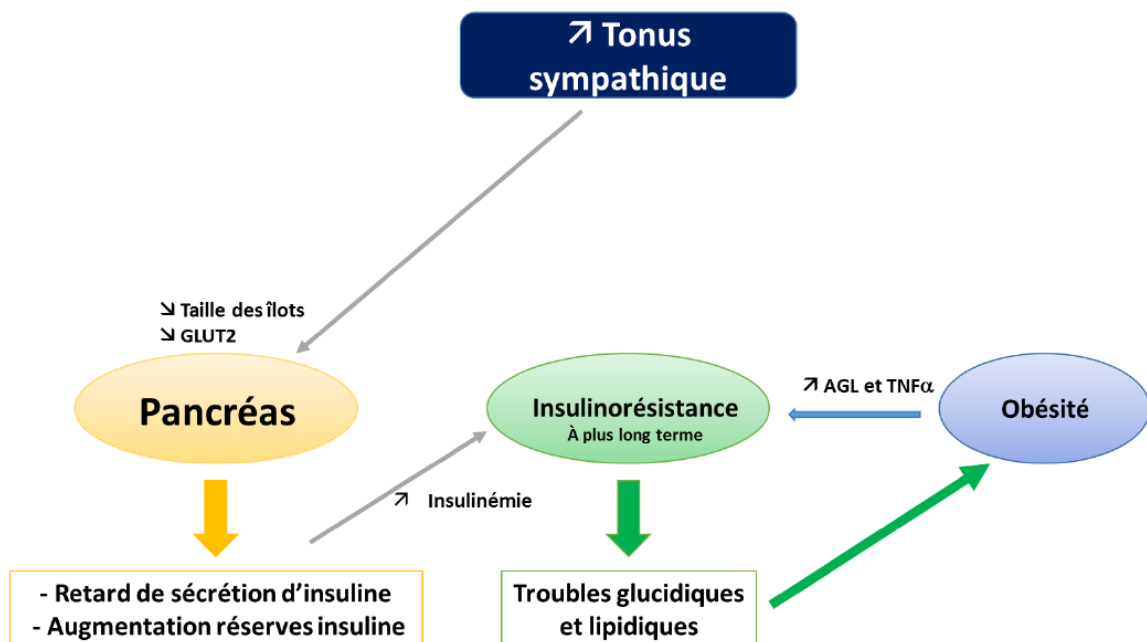


Figure 38 : Hypothèse de l'action de l'hyperactivité sympathique dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

Enfin, d'un point de vue clinique, l'hypothèse mécanistique de la physiopathologie du diabète de type 2 repose actuellement sur le développement d'une insulinorésistance qui conduit dans un premier temps à une hyperinsulinémie compensatrice de façon à maintenir une glycémie normale (état de pré-diabète), puis dans un second temps, lorsque les capacités de compensation du pancréas sont dépassées, à une hyperglycémie à jeun et au diagnostic de diabète. Sur la base de nos travaux, nous proposons que bien avant le développement de l'insulinorésistance, la

présence d'une hyperactivité sympathique chronique modifierait la morphologie du pancréas (diminution de la taille des îlots de Langerhans) avec une diminution du nombre de transporteurs GLUT2 sur la surface des cellules β -pancréatiques. Ces phénomènes auraient pour conséquence une diminution de la cinétique de sécrétion d'insuline lors d'apports importants et brefs de glucose d'où une intolérance au glucose. L'apparition de l'insulinorésistance ne surviendrait qu'en aval de ces troubles pour conduire finalement au développement d'un diabète de type 2.

Nos résultats pourraient donc aboutir à l'identification d'un facteur pronostic (une hyperactivité sympathique chronique) permettant le diagnostic précoce de patients à risque de développer des troubles glucidiques et au développement de nouvelles molécules pour retarder l'apparition du diabète de type 2.

Références bibliographiques

A

- Adams, K.F., Schatzkin, A., Harris, T.B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., Leitzmann, M.F., (2006). Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Engl. J. Med.* *355*, 763–778.
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., White, M.F., (2002). Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J. Biol. Chem.* *277*, 1531–1537.
- Ahren, B., Ericson, L.E., Lundquist, I., Lorén, I., Sundler, F., (1981). Adrenergic innervation of pancreatic islets and modulation of insulin secretion by the sympatho-adrenal system. *Cell Tissue Res.* *216*, 15-30.
- Ahrén, B., Jârhult, J., Lundquist, I., (1981). Insulin secretion induced by glucose and by stimulation of β 2-adrenoceptors in the rat. Different sensitivity to somatostatin. *Acta Physiol.* *112*, 421–426.
- Ahrén, B., Lundquist, I., (1981). Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* *71*, 93–104.
- Ahren, B., Veith, R.C., Taborsky JR, G.J., (1987). Sympathetic nerve stimulation versus pancreatic norepinephrine infusion in the dog: 1) Effects on basal release of insulin and glucagon. *Endocrinology* *121*, 323–331.
- Alberti, K.G.M., Zimmet, P., Shaw, J., Group, I.E.T.F.C., others, (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet* *366*, 1059–1062.
- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C., (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* *120*, 1640–1645.
- Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P.Z., (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabet. Med.* *15*, 539–553.
- Allen T.H., Krzywicki H.J., Roberts J.E, (1959). Density of fat, water and solids in freshly isolated tissues. *J. Appl. Physiol.* *14*, 1005–1008.
- Altman, J.D., Trendelenburg, A.U., MacMillan, L., Bernstein, D., Limbird, L., Starke, K., Kobilka, B.K., Hein, L., (1999). Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.* *56*, 154–161.

- Alvarez, G.E., (2004). Subcutaneous obesity is not associated with sympathetic neural activation. *AJP Heart Circ. Physiol.* 287, H414–H418.
- Alvarez, G.E., (2002). Sympathetic Neural Activation in Visceral Obesity. *Circulation* 106, 2533–2536.
- Anderson, E.A., Hoffman, R.P., Balon, T.W., Sinkey, C.A., Mark, A.L., (1991). Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J. Clin. Invest.* 87, 2246–2252.
- Anderson, E.A., Sinkey, C.A., Lawton, W.J., Mark, A.L., (1989). Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension* 14, 177–183.
- Arone, L.J., Mackintosh, R., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Hirsch, J., (1995). Autonomic nervous system activity in weight gain and weight loss. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269, R222–R225.
- Axelrod J, (1971). Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. *Science* 173, 598–606.

B

- Balkau, B., Charles, M.-A., (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. *Diabet. Med.* 16, 442–443.
- Bartness, T.J., Song, C.K., (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J. Lipid Res.* 48, 1655–1672.
- Bartness, T.J., Song, C.K., Shi, H., Bowers, R.R., Foster, M.T., (2005). Brain–adipose tissue cross talk. *Proc. Nutr. Soc.* 64, 53–64.
- Bell-Reuss, E., Trevino, D.L., Gottschalk, C.W., (1976). Effect of renal sympathetic nerve stimulation on proximal water and sodium reabsorption. *J. Clin. Invest.* 57, 1104–1107.
- Beltrán-Sánchez, H., Harhay, M.O., Harhay, M.M., McElligott, S., (2013). Prevalence and Trends of Metabolic Syndrome in the Adult U.S. Population, 1999–2010. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 697–703.
- Benmohammed, K., Valensi, P., Balkau, B., Lezzar, A., (2016). Metabolic syndrome in adolescents: definition based on regression of IDF adult cut-off points. *Public Health* 141, 88–94.
- Berne, C., Fagius, J., Pollare, T., Hjemdahl, P., (1992). The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* 35, 873–879.

- Berthault, M.F., Morin, J., Dubar, M., Ktorza, A., Ferré, P., Pénicaud, L., (1996). Effects of rilmenidine on rats made insulin resistant and hypertensive by a high fructose diet. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 89, 1103–1106.
- Berthelsen, S., Pettinger, W., (1977). A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptors. *Life Sci.* 21, 595–606.
- Beuers, U., Beckh, K., Jungermann, K., (1986). Control of ketogenesis in the perfused rat liver by the sympathetic innervation. *Eur. J. Biochem.* 158, 19–24.
- Björntorp, P., (1990). Classification of obese patients and complications related to the distribution of surplus fat. *Nutrition.* 6, 131–137.
- Bohn, L.M., Xu, F., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., (2000). Potentiated opioid analgesia in norepinephrine transporter knock-out mice. *J. Neurosci.* 20, 9040–9045.
- Bönisch, H., Brüss, M., (2006). The norepinephrine transporter in physiology and disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 485–524.
- Bowers, R.R., (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R1167–R1175.
- Brandberg J, (2009). Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in Determination of Human Body Composition. (Thesis), University of Gothenburg, Gothenburg, p60.
- Brede, M., Nagy, G., Philipp, M., Sørensen, J.B., Lohse, M.J., Hein, L., (2003). Differential Control of Adrenal and Sympathetic Catecholamine Release by α_2 -Adrenoceptor Subtypes. *Mol. Endocrinol.* 17, 1640–1646.
- Brindle, N.P., Ontko, J.A., (1988). α -Adrenergic suppression of very-low-density-lipoprotein triacylglycerol secretion by isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 250, 363–368.
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S., (1986). Beta 1-and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* 59, 297–309.
- Brodde, O.-E., Bruck, H., Leineweber, K., (2006). Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 323–337.
- Brown, A.M., Saum, W.R., Tuley, F.H., (1976). A comparison of aortic baroreceptor discharge in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 39, 488–496.
- Bruce, R., Godsland, I., Walton, C., Crook, D., Wynn, V., (1994). Associations between insulin sensitivity, and free fatty acid and triglyceride metabolism independent of uncomplicated obesity. *Metabolism* 43, 1275–1281.
- Buijs, R.M., la Fleur, S.E., Wortel, J., van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T.C., Kalsbeek, A., Nagai, K., Nijijima, A., (2003). The suprachiasmatic nucleus balances

sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J. Comp. Neurol.* *464*, 36–48.

Bünemann, M., Lee, K.B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A.G., Hosey, M.M., (1999). Desensitization of G-Protein-Coupled Receptors in the Cardiovascular System. *Annu. Rev. Physiol.* *61*, 169–192.

Burnette, W.B., Bailey, M.D., Kukoyi, S., Blakely, R.D., Trowbridge, C.G., Justice, J.B., (1996). Human norepinephrine transporter kinetics using rotating disk electrode voltammetry. *Anal. Chem.* *68*, 2932–2938.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U, (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* *46*, 121–136.

C

Cameron, A.J., Shaw, J.E., Zimmet, P.Z., (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *33*, 351–375.

Campfield, L.A., Smith, F.J., (1983). Neural control of insulin secretion: interaction of norepinephrine and acetylcholine. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *244*, R629–R634.

Canale, M.P., Manca di Villahermosa, S., Martino, G., Rovella, V., Noce, A., De Lorenzo, A., Di Daniele, N., (2013). Obesity-Related Metabolic Syndrome: Mechanisms of Sympathetic Overactivity. *Int. J. Endocrinol.* *2013*, 1–12.

Cannizzo, B., Luján, A., Estrella, N., Lembo, C., Cruzado, M., Castro, C., (2012). Insulin Resistance Promotes Early Atherosclerosis via Increased Proinflammatory Proteins and Oxidative Stress in Fructose-Fed ApoE-KO Mice. *Exp. Diabetes Res.* *2012*, 1–8.

Carr, D.B., Utzschneider, K.M., Hull, R.L., Kodama, K., Retzlaff, B.M., Brunzell, J.D., Shofer, J.B., Fish, B.E., Knopp, R.H., Kahn, S.E., (2004). Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* *53*, 2087–2094.

Cassaglia, P.A., Hermes, S.M., Aicher, S.A., Brooks, V.L., (2011). Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats: Insulin acts in the arcuate nucleus to increase LSNA baroreflex gain. *J. Physiol.* *589*, 1643–1662.

Chan, S.L.F., Perrett, C.W., Morgan, N.G., (1997). Differential expression of alpha 2-adrenoceptor subtypes in purified rat pancreatic islet A- and B-cells. *Cell. Signal.* *9*, 71–78.

- Chapman, M.E., Hu, L., Plato, C.F., Kohan, D.E., (2010). Bioimpedance spectroscopy for the estimation of body fluid volumes in mice. *AJP Ren. Physiol.* 299, F280–F283.
- Chazova, I., Almazov, V.A., Shlyakhto, E., (2006). Moxonidine improves glycaemic control in mildly hypertensive, overweight patients: a comparison with metformin. *Diabetes Obes. Metab.* 8, 456–465.
- Chazova, I., Schlaich, M.P., (2013). Improved Hypertension Control with the Imidazoline Agonist Moxonidine in a Multinational Metabolic Syndrome Population: Principal Results of the MERSY Study. *Int. J. Hypertens.* 2013, 1–9.
- Chen, Z., Minneman, K.P., (2005). Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 1281–1287.

D

- Daiguji, M., Meltzer, H.Y., U'Prichard, D.C., (1981). Human platelet α_2 -adrenergic receptors: Labeling with 3H-yohimbine, a selective antagonist ligand. *Life Sci.* 28, 2705–2717.
- D'Allaire, F., Atgié, C., Mauriège, P., Simard, P.M., Bukowiecki, L.J., (1995). Characterization of beta 1- and beta 3-adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 114, 275–282.
- De Luca, C., Olefsky, J.M., (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582, 97–105.
- De Luca, N., Izzo, R., Fontana, D., Iovino, G., Argenziano, L., Vecchione, C., Trimarco, B., (2000). Haemodynamic and metabolic effects of rilmenidine in hypertensive patients with metabolic syndrome X. A double-blind parallel study versus amlodipine. *J. Hypertens.* 18, 1515–1522.
- DeBosch, B.J., Chen, Z., Finck, B.N., Chi, M., Moley, K.H., (2013). Glucose transporter-8 (GLUT8) mediates glucose intolerance and dyslipidemia in high-fructose diet-fed male mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 1887–1896.
- DeBosch, B.J., Chi, M., Moley, K.H., (2012). Glucose transporter 8 (GLUT8) regulates enterocyte fructose transport and global mammalian fructose utilization. *Endocrinology* 153, 4181–4191.
- Delalande, J.-M., Milla, P.J., Burns, A.J., (2004). Hepatic nervous system development. *Anat. Rec.* 280A, 848–853.
- Delporte, M.-L., Funahashi, T., Takahashi, M., Matsuzawa, Y., Brichard, S.M., (2002). Pre- and post-translational negative effect of β -adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem. J.* 367, 677–685.
- Despres, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodes-Cabau, J., Bertrand, O.F., Poirier, P., (2008). Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome:

- Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1039–1049.
- Despres, J.-P., Moorjani, S., Lupien, P.J., Tremblay, A., Nadeau, A., Bouchard, C., (1990). Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 10, 497–511.
- Doras, C., (2011). Effets de la modulation du système nerveux sympathique sur le développement de l'athérosclérose expérimentale (Thèse de doctorat). Université de Strasbourg, Strasbourg, p324.
- Dunbar, J.C., Hu, Y., Lu, H., (1997). Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes* 46, 2040–2043.
- Duvnjak, L., Duvnjak, M., (2009). The metabolic syndrome - an ongoing story. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60, 19–24.

E

- Ebinç, H., Ozkurt, Z.N., Ebinç, F.A., Ucardag, D., Caglayan, O., Yilmaz, M., (2008). Effects of sympatholytic therapy with moxonidine on serum adiponectin levels in hypertensive women. *J. Int. Med. Res.* 36, 80–87.
- Eikelis, N., Esler, M., (2005). The neurobiology of human obesity: The neurobiology of human obesity. *Exp. Physiol.* 90, 673–682.
- Einhorn, D., Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, Handelsman Y, Hellman R, Jellinger PS, Kendall D, Krauss RM, Neufeld ND, Petak SM, Rodbard HW, Seibel JA, Smith DA, Wilson PW, (2003). American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr. Pract.* 9, 5–21.
- Eisenhofer, G., (2001). The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol. Ther.* 91, 35–62.
- Emorine LJ, Marullo S, Briend-Suren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD, (1989). Molecular Characterization of the Human (Beta) 3-Adrenergic Receptor. *Science* 245, 1118–1121.
- Ernsberger, P., Ishizuka, T., Liu, S., Farrell, C.J., Bedol, D., Koletsky, R.J., Friedman, J.E., (1999). Mechanisms of antihyperglycemic effects of moxonidine in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat (SHROB). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 139–147.
- Esler, M., (2011). The sympathetic nervous system through the ages: from Thomas Willis to resistant hypertension: The sympathetic nervous system through the ages. *Exp. Physiol.* 96, 611–622.

- Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Willett, I., Dudley, F., Hasking, G., Anderson, W., Lambert, G., (1988). Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension* *11*, 3–20.
- Esler, M., Lambert, G., Jennings, G., (1989). Regional norepinephrine turnover in human hypertension. *Clin. Exp. Hypertens. A* *11*, 75–89.
- Esler, M., Straznicky, N., Eikelis, N., Masuo, K., Lambert, G., Lambert, E., (2006). Mechanisms of Sympathetic Activation in Obesity-Related Hypertension. *Hypertension* *48*, 787–796.
- Euler, U.S. v., (1946). A Specific Sympathomimetic Ergone in Adrenergic Nerve Fibres (Sympathin) and its Relations to Adrenaline and Nor-Adrenaline. *Acta Physiol. Scand.* *12*, 73–97.
- Euler, U. von, (1971). Adrenergic neurotransmitter functions. *Science* *173*, 202–206.

F

- Fagerholm, V., Grönroos, T., Marjamäki, P., Viljanen, T., Scheinin, M., Haaparanta, M., (2004). Altered glucose homeostasis in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* *505*, 243–252.
- 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*, 142–146.
- Fellmann, L., Regnault, V., Greney, H., Gasparik, V., Muscat, A., Max, J.-P., Gigou, L., Oréa, V., Chetrite, G., Pizard, A., Niederhoffer, N., Julien, C., Lacolley, P., Fève, B., Bousquet, P., (2013). A new pyrroline compound selective for I1-imidazoline receptors improves metabolic syndrome in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *346*, 370–380.
- Fève, B., Emorine, L.J., Briend-Sutren, M.M., Lasnier, F., Strosberg, A.D., Pairault, J., (1990). Differential regulation of beta 1-and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *J. Biol. Chem.* *265*, 16343–16349.
- Fève, B., Emorine, L.J., Lasnier, F., Blin, N., Baude, B., Nahmias, C., Strosberg, A.D., Pairault, J., (1991). Atypical beta-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. Pharmacological and molecular relationship with the human beta 3-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *266*, 20329–20336.
- Flatmark, T., (2000). Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol. Scand.* *168*, 1–18.
- Floras, J.S., Hara, K., (1993). Sympathoneural and haemodynamic characteristics of young subjects with mild essential hypertension. *J. Hypertens.* *11*, 647–655.

- Florian, J.P., Pawelczyk, J.A., (2010). Non-esterified fatty acids increase arterial pressure via central sympathetic activation in humans. *Clin. Sci.* *118*, 61–69.
- Flotats, A., Carrió, I., (2004). Cardiac neurotransmission SPECT imaging. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* *11*, 587–602.
- Ford, E.S., Li, C., Zhao, G., (2010). Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US*: Metabolic syndrome: A harmonious definition. *J. Diabetes* *2*, 180–193.
- Friedman, S., Kaufman, S., (1965). 3, 4-Dihydroxyphenylethylamine P-hydroxylase. *J Biol Chem* *240*, 4763–4773.
- Fu, L., Isobe, K., Zeng, Q., Suzukawa, K., Takekoshi, K., Kawakami, Y., (2007). β -adrenoceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor- α expression in adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* *569*, 155–162.
- Furman, B., Ong, W.K., Pyne, N.J., (2010). Cyclic AMP signaling in pancreatic islets. *Adv. Exp. Med. Biol.* *654*, 281–304.

G

- Gadegbeku, C.A., Dhandayuthapani, A., Sadler, Z.E., Egan, B.M., (2002). Raising lipids acutely reduces baroreflex sensitivity. *Am. J. Hypertens.* *15*, 479–485.
- Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., (2003). Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *43*, 261–284.
- Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D., Caron, M.G., (2002). Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. *Trends Pharmacol. Sci.* *23*, 367–373.
- Garcia, C., Rosetta, L., Ancel, A., Lee, P.C., Caloin, M., (2004). Kinetics of stable isotope and body composition in olive baboons (*Papio anubis*) estimated by deuterium dilution space: a pilot study. *J. Med. Primatol.* *33*, 146–151.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.-N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.-L., Le Marec, H., (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* *102*, 1377.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marec, H., (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* *98*, 556.
- Gehlert, D.R., Dreshfield, L., Tinsley, F., Benvenga, M.J., Gleason, S., Fuller, R.W., Wong, D.T., Hemrick-Luecke, S.K., (1998). The selective norepinephrine reuptake inhibitor, LY368975, reduces food consumption in animal models of feeding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *287*, 122–127.

- Germack, R., Starzec, A.B., Vassy, R., Perret, G.Y., (1997). β -Adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* *120*, 201–210.
- Gilsbach, R., Brede, M., Beetz, N., Moura, E., Muthig, V., Gerstner, C., Barreto, F., Neubauer, S., Vieiracoelho, M., Hein, L., (2007). Heterozygous α 2C-adrenoceptor-deficient mice develop heart failure after transverse aortic constriction. *Cardiovasc. Res.* *75*, 728–737.
- Gilsbach, R., Faron-Gorecka, A., Rogoz, Z., Bruss, M., Caron, M.G., Dziedzicka-Wasylewska, M., Bonisch, H., (2006). Norepinephrine transporter knockout-induced up-regulation of brain α 2A/C-adrenergic receptors. *J. Neurochem.* *96*, 1111–1120.
- Gilsbach, R., Hein, L., (2012). Are the pharmacology and physiology of α 2 adrenoceptors determined by α 2-heteroreceptors and autoreceptors respectively?: α 2-auto- versus heteroreceptors. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 90–102.
- Gilsbach, R., Schneider, J., Lothar, A., Schickinger, S., Leemhuis, J., Hein, L., (2010). Sympathetic α (2)-adrenoceptors prevent cardiac hypertrophy and fibrosis in mice at baseline but not after chronic pressure overload. *Cardiovasc. Res.* *86*, 432–442.
- González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Jacques-Camarena, O., Hernández-González, S.O., Valera-González, I.G., Ramos-Zavala, M.G., (2006). Prevalence of metabolic syndrome in adults with excess of adiposity: comparison of the Adult Treatment Panel III criteria with the International Diabetes Federation definition. *Acta Diabetol.* *43*, 84–86.
- Goodpaster, B.H., Krishnaswami, S., Resnick, H., Kelley, D.E., Haggerty, C., Harris, T.B., Schwartz, A.V., Kritchevsky, S., Newman, A.B., (2003). Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care* *26*, 372–379.
- Grassi, G., (1998). Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J. Hypertens.* *16*, 1979–1987.
- Grassi, G., Bolla, G., Seravalle, G., Turri, C., Lanfranchi, A., Mancia, G., (1997). Comparison between reproducibility and sensitivity of muscle sympathetic nerve traffic and plasma noradrenaline in man. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *92*, 285–289.
- Grassi, G., Cattaneo, B.M., Seravalle, G., Lanfranchi, A., Mancia, G., (1998). Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* *31*, 68–72.
- Grassi, G., Dell’Oro, R., Facchini, A., Trevano, F.Q., Bolla, G.B., Mancia, G., (2004). Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J. Hypertens.* *22*, 2363–2369.
- Grassi, G., Mark, A., Esler, M., (2015). The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circ. Res.* *116*, 976–990.
- Grassi, G., Seravalle, G., Bertinieri, G., Turri, C., Dell’Oro, R., Stella, M.L., Mancia, G., (2000). Sympathetic and reflex alterations in systo-diastolic and systolic hypertension of the elderly. *J. Hypertens.* *18*, 587–593.

- Grundy, S.M., (2005). Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112, 2735–2752.
- Gu, D., Reynolds, K., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Reynolds, R., Whelton, P., He, J., InterASIA Collaborative Group, (2005). Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *The Lancet* 365, 1398–1405.
- Guarino, R.D., Perez, D.M., Piascik, M.T., (1996). Recent advances in the molecular pharmacology of the α 1-adrenergic receptors. *Cell. Signal.* 8, 323–333.
- Guimaraes, S., Moura, D., (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol. Rev.* 53, 319–356.
- Gutierrez, D.A., Puglisi, M.J., Hasty, A.H., (2009). Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr. Diab. Rep.* 9, 26–32.

H

- Haffner, S.M., (2007). Abdominal Adiposity and Cardiometabolic Risk: Do We Have All the Answers? *Am. J. Med.* 120, S10–S16.
- Hagbarth, K.-E., Vallbo, A.A.B., (1968). Pulse and respiratory grouping of sympathetic impulses in human muscle nerves. *Acta Physiol. Scand.* 74, 96–108.
- Hawrylyshyn, K.A., Michelotti, G.A., Cogé, F., Guénin, S.-P., Schwinn, D.A., (2004). Update on human α 1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 449–455.
- Hein, L., (2001). The alpha 2-adrenergic receptors: molecular structure and in vivo function. *Z. Kardiol.* 90, 607–612.
- Hein, L., Altman, J.D., Kobilka, B.K., (1999). Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402, 181–184.
- Henriksen, E.J., Jacob, S., Fogt, D.L., Youngblood, E.B., Gödicke, J., (1997). Antihypertensive agent moxonidine enhances muscle glucose transport in insulin-resistant rats. *Hypertens.* 30, 1560–1565.
- Hertting, G., Axelrod, J., (1961). Fate of Tritiated Noradrenaline at the Sympathetic Nerve-Endings. *Nature* 192, 172–173.
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenberg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR Jr, (1995). International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.* 47, 267–270.

- Hill, A.M., LaForgia, J., Coates, A.M., Buckley, J.D., Howe, P.R., (2007). Estimating abdominal adipose tissue with DXA and anthropometry. *Obesity 15*, 504–504.
- Hillebrand, J.J.G., Langhans, W., Geary, N., (2010). Validation of Computed Tomographic Estimates of Intra-abdominal and Subcutaneous Adipose Tissue in Rats and Mice. *Obesity 18*, 848–853.
- Himms-Hagen, J., (1967). Sympathetic regulation of metabolism. *Physiol. Rev. 19*, 367–461.
- Hjemdahl, P., (1993). Plasma catecholamines--analytical challenges and physiological limitations. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 7*, 307–353.
- Hu, L., Maslanik, T., Zerebeckyj, M., Plato, C.F., (2012). Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods 65*, 75–82.

I

- Ida, M., Hirata, M., Odori, S., Mori, E., Kondo, E., Fujikura, J., Kusakabe, T., Ebihara, K., Hosoda, K., Nakao, K., (2013). Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction: Monitoring Abdominal Adiposity Changes by Dual BIA. *Obesity 21*, E350–E353.
- IDF, (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
- Ishimoto, T., Lanaspa, M.A., Le, M.T., Garcia, G.E., Diggle, C.P., MacLean, P.S., Jackman, M.R., Asipu, A., Roncal-Jimenez, C.A., Kosugi, T., Rivard, C.J., Maruyama, S., Rodriguez-Iturbe, B., Sanchez-Lozada, L.G., Bonthron, D.T., Sautin, Y.Y., Johnson, R.J., (2012). Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. 109*, 4320–4325.
- Ito, K., Dezaki, K., Yoshida, M., Yamada, H., Miura, R., Rita, R.S., Ookawara, S., Tabei, K., Kawakami, M., Hara, K., Morishita, Y., Yada, T., Kakei, M., (2017). Endogenous α 2A-Adrenoceptor–Operated Sympathoadrenergic Tones Attenuate Insulin Secretion via cAMP/TRPM2 Signaling. *Diabetes 66*, 699–709.

J

- Jang, Y.J., Ryu, H.J., Choi, Y.O., Kim, C., Leem, C.H., Park, C.S., 2002. Improvement of insulin sensitivity by chelation of intracellular Ca²⁺ in high-fat fed rats. *Metabolism 51*, 912–918.
- Jee, S.H., Sull, J.W., Park, J., Lee, S.-Y., Ohrr, H., Guallar, E., Samet, J.M., (2006). Body-mass index and mortality in Korean men and women. *N. Engl. J. Med. 355*, 779–787.

- Johnson, A.M.F., Olefsky, J.M., (2013). The Origins and Drivers of Insulin Resistance. *Cell* 152, 673–684.
- Judex, S., Luu, Y.K., Ozcivici, E., Adler, B., Lublinsky, S., Rubin, C.T., (2010). Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. *Methods* 50, 14–19.
- Julius, S., Krause, L., Schork, N.J., Mejia, A.D., Jones, K.A., van de Ven, C., Johnson, E.H., Sekkarie, M.A., Kjeldsen, S.E., Petrin, J., (1991). Hyperkinetic borderline hypertension in Tecumseh, Michigan. *J. Hypertens.* 9, 77–84.
- Julius, S., Valentini, M., (1998). Consequences of the increased autonomic nervous drive in hypertension, heart failure and diabetes. *Blood Pressure.* 3, 5–13.
- Jungermann, K., Gardemann, A., Beuers, U., Ballé, C., Sannemann, J., Beckh, K., Hartmann, H., (1987). Regulation of liver metabolism by the hepatic nerves. *Adv. Enzyme Regul.* 26, 63–88.

K

- Kaufman S, Levenberg B, (1959). Further studies on the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *J. Biol. Chem.* 234, 2683–2688.
- Keller, N.R., (2004). Norepinephrine Transporter-Deficient Mice Exhibit Excessive Tachycardia and Elevated Blood Pressure With Wakefulness and Activity. *Circulation* 110, 1191–1196.
- Kirchheim, H., Ehmke, H., Persson, P., (1989). Sympathetic modulation of renal hemodynamics, renin release and sodium excretion. *Klin. Wochenschr.* 67, 858–864.
- Kitamura, T., Onishi, K., Dohi, K., Okinaka, T., Isaka, N., Nakano, T., (2000). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, 786–790.
- Koletsky, R.J., (2003). The Role of I1-Imidazoline Receptors and α 2-Adrenergic Receptors in the Modulation of Glucose and Lipid Metabolism in the SHROB Model of Metabolic Syndrome X. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 251–261.
- Koshimizu, T., Tanoue, A., Hirasawa, A., Yamauchi, J., Tsujimoto, G., (2003). Recent advances in α 1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 98, 235–244.
- Krentz, A.J., Freedman, D., Greene, R., McKinley, M., Boyle, P.J., Schade, D.S., (1996). Differential effects of physiological versus pathophysiological plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine on ketone body metabolism and hepatic portal blood flow in man. *Metabolism* 45, 1214–1220.
- Kruszynska, Y.T., Worrall, D.S., Ofrecio, J., Frias, J.P., Macaraeg, G., Olefsky, J.M., (2002). Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 226–234.

Kuschnir, M.C.C., Bloch, K.V., Szklo, M., Klein, C.H., Barufaldi, L.A., Abreu, G. de A., Schaan, B., Veiga, G.V. da, Silva, T.L.N. da, Vasconcellos, M.T.L. de, Moraes, A.J.P. de, Oliveira, A.M.A. de, Tavares, B.M., Oliveira, C.L. de, Cunha, C. de F., Giannini, D.T., Belfort, D.R., Santos, E.L., Leon, E.B. de, Oliveira, E.R.A., Fujimori, E., Borges, A.L., Magliano, E. da S., Vasconcelos, F. de A.G., Azevedo, G.D., Brunken, G.S., Guimarães, I.C.B., Faria Neto, J.R., Oliveira, J.S., Carvalho, K.M.B. de, Gonçalves, L.G. de O., Monteiro, M.I., Santos, M.M., Muniz, P.T., Jardim, P.C.B.V., Ferreira, P.A.M., Montenegro Jr, R.M., Gurgel, R.Q., Vianna, R.P., Vasconcelos, S.M., Martins, S.M.S., Goldberg, T.B.L., (2016). ERICA: prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adolescents. *Rev. Saúde Pública* 50, 1S-13S.

Kyle, U.G., Bosaeus, I., De Lorenzo, A.D., Deurenberg, P., Elia, M., Manuel Gómez, J., Lilienthal Heitmann, B., Kent-Smith, L., Melchior, J.-C., Pirlich, M., Scharfetter, H., M.W.J Schols, A., Pichard, C., (2004). Bioelectrical impedance analysis—part II: utilization in clinical practice. *Clin. Nutr.* 23, 1430–1453.

L

La Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Buijs, R.M., (2000). Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res.* 871, 50–56.

Lafontan, M., Berlan, M., (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34, 1057–1091.

Lam, T.K.T., Schwartz, G.J., Rossetti, L., (2005). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat. Neurosci.* 8, 579–584.

Landry, Y., Gies, J.-P., (2014). *Pharmacologie - 3e édition: Des cibles à la thérapeutique.* Dunod.

Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P., Brown, T.G., (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214, 597–598.

Landsberg, L., (2001). Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J. Hypertens.* 19, 523–528.

Langer S.Z., (1974). Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* 23, 1793–1800.

Langin, D., Portillo, M.P., Saulnier-Blache, J.-S., Lafontan, M., (1991). Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.* 199, 291–301.

- Lee, C.M.Y., Huxley, R.R., Woodward, M., Zimmet, P., Shaw, J., Cho, N.H., Kim, H.R., Viali, S., Tominaga, M., Vistisen, D., Borch-Johnsen, K., Colagiuri, S., (2008). Comparisons of Metabolic Syndrome Definitions in Four Populations of the Asia-Pacific Region. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 6, 37–46.
- Lee, M.-J., Fried, S.K., (2009). Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *AJP Endocrinol. Metab.* 296, E1230–E1238.
- Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., (2000). Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and-resistant rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R231–R237.
- Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S, (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 148, 1–8.
- Li, H., Ma, S.K., Hu, X.P., Zhang, G.Y., Fei, J., (2001). Norepinephrine transporter (NET) is expressed in cardiac sympathetic ganglia of adult rat. *Cell Res.* 11, 317–320.
- Licht, C.M.M., de Geus, E.J.C., Penninx, B.W.J.H., (2013). Dysregulation of the Autonomic Nervous System Predicts the Development of the Metabolic Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2484–2493.
- Lim, J.S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J.-M., Lustig, R.H., (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 251–264.
- Lönnqvist, F., Krief, S., Strosberg, A.D., Nyberg, B., Emorine, L.J., Arner, P., (1993). Evidence for a functional β_3 -adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.* 110, 929–936.
- Lopes, H.F., Stojiljkovic, M.P., Zhang, D., Goodfriend, T.L., Egan, B.M., (2001). The pressor response to acute hyperlipidemia is enhanced in lean normotensive offspring of hypertensive parents. *Am. J. Hypertens.* 14, 1032–1037.
- Lublinsky, S., Luu, Y.K., Rubin, C.T., Judex, S., (2009). Automated Separation of Visceral and Subcutaneous Adiposity in In Vivo Microcomputed Tomographies of Mice. *J. Digit. Imaging* 22, 222–231.
- Lubura, M., Hesse, D., Neumann, N., Scherneck, S., Wiedmer, P., Schürmann, A., (2012). Non-Invasive Quantification of White and Brown Adipose Tissues and Liver Fat Content by Computed Tomography in Mice. *PLoS ONE* 7, e37026.
- Luu, Y.K., Lublinsky, S., Ozcivici, E., Capilla, E., Pessin, J.E., Rubin, C.T., Judex, S., (2009). In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model. *Med. Eng. Phys.* 31, 34–41.

M

- MacPherson, M., de Groh, M., Loukine, L., Prud'homme, D., Dubois, L., (2016). Prevalence of metabolic syndrome and its risk factors in Canadian children and adolescents: Canadian Health Measures Survey Cycle 1 (2007-2009) and Cycle 2 (2009-2011). *Health Promot. Chronic Dis. Prev. Can. Res. Policy Pract.* *36*, 32-40.
- Maggi, S., Noale, M., Gallina, P., Bianchi, D., Marzari, C., Limongi, F., Crepaldi, G., (2006). Metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease in an elderly Caucasian cohort: the Italian Longitudinal Study on Aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *61*, 505–510.
- Manolis, A.J., Poulimenos, L.E., Kallistratos, M.S., Gavras, I., Gavras, H., (2014). Sympathetic overactivity in hypertension and cardiovascular disease. *Curr. Vasc. Pharmacol.* *12*, 4–15.
- Marie, L.S., Palmiter, R.D., (2003). Norepinephrine and Epinephrine-Deficient Mice Are Hyperinsulinemic and Have Lower Blood Glucose. *Endocrinology* *144*, 4427–4432.
- Mark, A.L., Agassandian, K., Morgan, D.A., Liu, X., Cassell, M.D., Rahmouni, K., (2009). Leptin Signaling in the Nucleus Tractus Solitarius Increases Sympathetic Nerve Activity to the Kidney. *Hypertension* *53*, 375–380.
- Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., El Mestikawy, S., (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* *51*, 439–464.
- Masuo, K., Mikami, H., Ogihara, T., Tuck, M., (1997). Sympathetic Nerve Hyperactivity Precedes Hyperinsulinemia and Blood Pressure Elevation in a Young, Nonobese Japanese Population. *Am. J. Hypertens.* *10*, 77–83.
- Mattsson S, Thomas BJ, (2006). Development of methods for body composition studies. *Phys. Med. Biol.* *51*, R203–R228.
- Mizuno, K., Ueno, Y., (2017). Autonomic Nervous System and the Liver: Autonomic nervous system and the liver. *Hepatol. Res.* *47*, 160–165.
- Moreira, M.C. dos S., Pinto, I.S. de J., Mourão, A.A., Fajemiroye, J.O., Colombari, E., Reis, Â.A. da S., Freiria-Oliveira, A.H., Ferreira-Neto, M.L., Pedrino, G.R., (2015). Does the sympathetic nervous system contribute to the pathophysiology of metabolic syndrome? *Front. Physiol.* *6*, 1-11.
- Morrow AL, Creese I, (1986). Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB4104 and [3H]prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* *29*, 321–330.
- Moss, N.G., Colindres, R.E., Gottschalk, C.W., (2011). Neural Control of Renal Function, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Mulasi, U., Kuchnia, A.J., Cole, A.J., Earthman, C.P., (2015). Bioimpedance at the Bedside Current Applications, Limitations, and Opportunities. *Nutr. Clin. Pract.* 30, 180–193.

Muntzel, M.S., Morgan, D.A., Mark, A.L., Johnson, A.K., (1994). Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. *Am. J. Physiol.* 267, R1350-1355.

N

Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S., (1964). Tyrosine hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239, 2910–2917.

NCEP, (2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 285, 2486–2497.

Niederhoffer, N., Hein, L., Starke, K., (2004). Modulation of the baroreceptor reflex by α_{2A} -adrenoceptors: a study in α_{2A} knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 141, 851–859.

Nomura, K., Yamanouchi, T., (2012). The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* 23, 203–208.

O

O’Dea, K., Esler, M., Leonard, P., Stockigt, J.R., Nestel, P., (1982). Noradrenaline turnover during under-and over-eating in normal weight subjects. *Metabolism* 31, 896–899.

P

Palatini, P., Vriz, O., Nesbitt, S., Amerena, J., Majahalme, S., Valentini, M., Julius, S., (1999). Parental hyperdynamic circulation predicts insulin resistance in offspring: The Tecumseh Offspring Study. *Hypertens. Dallas Tex* 33, 769–774.

Paolisso, G., Manzella, D., Rizzo, M.R., Ragno, E., Barbieri, M., Varricchio, G., Varricchio, M., (2000). Elevated plasma fatty acid concentrations stimulate the cardiac autonomic nervous system in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 723–730.

- Park, K.S., Lee, D.-H., Lee, J., Kim, Y.J., Jung, K.Y., Kim, K.M., Kwak, S.H., Choi, S.H., Park, K.S., Jang, H.C., Lim, S., (2016). Comparison between two methods of bioelectrical impedance analyses for accuracy in measuring abdominal visceral fat area. *J. Diabetes Complications* 30, 343–349.
- Pathak, A., Girerd, X., Azizi, M., Benamer, H., Halimi, J.-M., Lantelme, P., Lefevre, T., Sapoval, M., (2012). Dénervation rénale pour le traitement de l’hypertension artérielle. *Consens. D’expert Société Fr. D’hypertension Artérielle* 1–8.
- Peart, W.S., (1949). The nature of splenic sympathin. *J. Physiol.* 108, 491.
- Perseghin, G., Ghosh, S., Gerow, K., Shulman, G.I., (1997). Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes* 46, 1001–1009.
- Peterhoff, M., Sieg, A., Brede, M., Chao, C.-M., Hein, L., Ullrich, S., (2003). Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur. J. Endocrinol.* 149, 343–350.
- Philipp, M., Brede, M., Hein, L., (2002). Physiological significance of α_2 -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R287–R295.
- Piasecki, M.T., Perez, D.M., (2001). α_1 -Adrenergic Receptors: New Insights and Directions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 403–410.
- Pietrobelli, A., Rubiano, F., St-Onge, M.-P., Heymsfield, S.B., (2004). New bioimpedance analysis system: improved phenotyping with whole-body analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 1479–1484.
- Porte, D., (1967). Beta adrenergic stimulation of insulin release in man. *Diabetes* 16, 150–155.
- Porte, D., Jr, Williams, R., (1966). Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. *Science* 152, 1248–1250.
- Pouliot, M.-C., Després, J.-P., Nadeau, A., Moorjani, S., Prud’Homme, D., Lupien, P.J., Tremblay, A., Bouchard, C., (1992). Visceral obesity in men: associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41, 826–834.
- Prinz, R.A., El Sabbagh, H., Adrian, T.E., Bloom, S.R., Gardner, I., Polak, J.M., Inokuchi, H., Bishop, A.E., Welbourn, R.B., (1983). Neural regulation of pancreatic polypeptide release. *Surgery* 94, 1011–1018.

R

- Rahmouni, K., Morgan, D.A., (2007). Hypothalamic Arcuate Nucleus Mediates the Sympathetic and Arterial Pressure Responses to Leptin. *Hypertension* 49, 647–652.

- Rahmouni, K., Morgan, D.A., Morgan, G.M., Liu, X., Sigmund, C.D., Mark, A.L., Haynes, W.G., (2004). Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *J. Clin. Invest.* *114*, 652–658.
- Reaven, G.M., (1988). Banting lecture 1988 Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* *37*, 1595–1607.
- Reed, D.R., Bachmanov, A.A., Tordoff, M.G., (2007). Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol. Behav.* *91*, 593–600.
- Ricci, M.R., (2004). Isoproterenol decreases leptin release from rat and human adipose tissue through posttranscriptional mechanisms. *AJP Endocrinol. Metab.* *288*, E798–E804.
- Robertson, D., Flattem, N., Tellioglu, T., Carson, R., Garland, E., Shannon, J.R., Jordan, J., Jacob, G., Blakely, R.D., Biaggioni, I., (2001). Familial orthostatic tachycardia due to norepinephrine transporter deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *940*, 527–544.
- Ross, R., Aru, J., Freeman, J., Hudson, R., Janssen, I., (2002). Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *282*, E657–E663.
- Rozec, B., Erfanian, M., Laurent, K., Trochu, J.-N., Gauthier, C., (2009). Nebivolol, a Vasodilating Selective β 1-Blocker, Is a β 3-Adrenoceptor Agonist in the Nonfailing Transplanted Human Heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* *53*, 1532–1538.
- Rozec, B., Gauthier, C., (2006). β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.* *111*, 652–673.
- Ruffolo RR Jr, Waddell JE, Yaden EL, (1982.) Heterogeneity of postsynaptic Alpha adrenergic receptors in mammalian aortas. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *221*, 309–314.
- Ruffolo RR Jr, Yaden EL, Waddell JE, (1980). Receptor interactions of imidazolines. V. clonidine differentiates postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes in tissues from the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *213*, 557–561.
- Ruohonen, S.T., Ruohonen, S., Gilsbach, R., Savontaus, E., Scheinin, M., Hein, L., (2012). Involvement of α 2-adrenoceptor subtypes A and C in glucose homeostasis and adrenaline-induced hyperglycaemia. *Neuroendocrinology* *96*, 51–59.
- Rutter, K., Hennoste, L., Ward, L.C., Cornish, B.H., Thomas, B.J., (1998). Bioelectrical impedance analysis for the estimation of body composition in rats. *Lab. Anim.* *32*, 65–71.

S

- Sanjuliani, A.F., de Abreu, V.G., Francischetti, E.A., (2006). Selective imidazoline agonist moxonidine in obese hypertensive patients. *Int. J. Clin. Pract.* *60*, 621–629.

- Schlaich, M.P., (2016). What we need to know about renal nerve ablation for treatment of hypertension and other states of sympathetic overactivity. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *311*, F1267–F1270.
- Schlaich, M.P., Lambert, E., Kaye, D.M., Krozowski, Z., Campbell, D.J., Lambert, G., Hastings, J., Aggarwal, A., Esler, M.D., (2004). Sympathetic Augmentation in Hypertension: Role of Nerve Firing, Norepinephrine Reuptake, and Angiotensin Neuromodulation. *Hypertension* *43*, 169–175.
- Schultz, A., Neil, D., Aguila, M., Mandarim-de-Lacerda, C., (2013). Hepatic Adverse Effects of Fructose Consumption Independent of Overweight/Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 21873–21886.
- Seidell, J.C., Oosterlee, A., Thijssen, M.A., Burema, J., Deurenberg, P., Hautvast, J.G., Ruijs, J.H., (1987). Assessment of intra-abdominal and subcutaneous abdominal fat: relation between anthropometry and computed tomography. *Am. J. Clin. Nutr.* *45*, 7–13.
- Seydoux, J., Brunsmann, M.J., Jeanrenaud, B., Girardier, L., (1979). alpha-Sympathetic control of glucose output of mouse liver perfused in situ. *Am. J. Physiol.* *236*, E323-327.
- Shattil SJ, McDonough M, Turnbull J, Insel PA, (1980). Characterization of Alpha-Adrenergic Receptors in Human Platelets Using [3H]Clonidine. *Mol. Pharmacol.* *19*, 179–183.
- Shen, C.-L., Zhu, W., Gao, W., Wang, S., Chen, L., Chyu, M.-C., (2013). Energy-restricted diet benefits body composition but degrades bone integrity in middle-aged obese female rats. *Nutr. Res.* *33*, 668–676.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., Flier, J.S., (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *116*, 3015–3025.
- Shimazu, T., (1996). Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition* *12*, 65–66.
- Sieber-Blum, M., Ren, Z., (2000). Norepinephrine transporter expression and function in noradrenergic cell differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* *212*, 61–70.
- Simmen, B., Bayart, F., Rasamimanana, H., Zahariev, A., Blanc, S., Pasquet, P., (2010). Total Energy Expenditure and Body Composition in Two Free-Living Sympatric Lemurs. *PLoS ONE* *5*, e9860.
- Simmons, D., Thompson, C., (2004). Prevalence of the metabolic syndrome among adult New Zealanders of Polynesian and European descent. *Diabetes Care* *27*, 3002–3004.
- Sisson, J.C., Frager, M.S., Valk, T.W., Gross, M.D., Swanson, D.P., Wieland, D.M., Tobes, M.C., Beierwaltes, W.H., Thompson, N.W., (1981). Scintigraphic localization of pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* *305*, 12–17.
- Skeberdis, V.A., Gendviliene, V., Zablockaitė, D., Treinys, R., Macchienskienė, R., Bogdelis, A., Jurevičius, J., Fischmeister, R., (2008). β_3 -adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current. *J. Clin. Invest.* *118*, 3219-3227.

- Skoglund, G., Lundquist, I., Ahren, B., (1988). Selective α_2 -adrenoceptor activation by clonidine: effects on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux and insulin secretion from isolated rat islets. *Acta Physiol.* *132*, 289–296.
- Smith Jr, D.L., Johnson, M.S., Nagy, T.R., (2009). Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. *Int. J. Body Compos. Res.* *7*, 21–26.
- Smith, M.M., Minson, C.T., (2012). Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity: Adipokines and sympathetic outflow. *J. Physiol.* *590*, 1787–1801.
- Starke, K., (2001). Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on α_2 -adrenoceptors. *J. Neurochem.* *78*, 685–693.
- Straub, S.G., Sharp, G.W.G., (2012). Evolving insights regarding mechanisms for the inhibition of insulin release by norepinephrine and heterotrimeric G proteins. *AJP Cell Physiol.* *302*, C1687–C1698.
- Szot, P., Ashliegh, E.A., Kohen, R., Petrie, E., Dorsa, D.M., Veith, R., (1993). Norepinephrine transporter mRNA is elevated in the locus coeruleus following short- and long-term desipramine treatment. *Brain Res.* *618*, 308–312.

T

- Taher, J., Farr, S., Adeli, K., (2017). Central nervous system regulation of hepatic lipid and lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* *28*, 32–38.
- Taicher, G.Z., Tinsley, F.C., Reiderman, A., Heiman, M.L., (2003). Quantitative magnetic resonance (QMR) method for bone and whole-body-composition analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* *377*, 990–1002.
- Tamashiro, K.L., Hegeman, M.A., Nguyen, M.M., Melhorn, S.J., Ma, L.Y., Woods, S.C., Sakai, R.R., (2007). Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol. Behav.* *91*, 440–448.
- Tanoue A, Koshimizu TA, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, Tsujimoto G, (2003). Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *TRENDS Endocrinol. Metab.* *14*, 107–113.
- Tavares, F.L., Seelaender, M.C.L., (2008). Hepatic denervation impairs the assembly and secretion of VLDL-TAG. *Cell Biochem. Funct.* *26*, 557–565.
- Tentolouris, N., Argyrakopoulou, G., Katsilambros, N., (2008). Perturbed Autonomic Nervous System Function in Metabolic Syndrome. *NeuroMolecular Med.* *10*, 169–178.
- Thomas, S.A., Matsumoto, A.M., Palmiter, R.D., (1995). Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* *374*, 643–646.

- Thomas, S.A., Palmiter, R.D., (1997). Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* 387, 94–97.
- Thorp, A.A., Schlaich, M.P., (2015). Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. *J. Diabetes Res.* 1–11.
- Treinyas, R., Zablockaitė, D., Gendvilienė, V., Jurevičius, J., Skeberdis, V.A., (2014). β 3-Adrenergic Regulation of L-Type Ca^{2+} Current and Force of Contraction in Human Ventricle. *J. Membr. Biol.* 247, 309–318.

U

- Ulken, V., Püschel, G.P., Jungermann, K., (1991). Increase in glucose and lactate output and perfusion resistance by stimulation of hepatic nerves in isolated perfused rat liver: role of alpha 1-, alpha 2-, beta 1- and beta 2-receptors. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 372, 401–409.
- Upadhyay, S.K., Eckel-Mahan, K.L., Mirbolooki, M.R., Tjong, I., Griffey, S.M., Schmunk, G., Koehne, A., Halbout, B., Iadonato, S., Pedersen, B., Borrelli, E., Wang, P.H., Mukherjee, J., Sassone-Corsi, P., Chandy, K.G., (2013). Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E2239–E2248.
- U'Prichard DC, Bechtel WD, Rouot BM, Snyder SH, (1979). Multiple apparent alpha-noradrenergic receptor binding sites in rat brain: effect of 6-hydroxydopamine. *Mol. Pharmacol.* 16, 47–60.
- U'Prichard DC, Greenberg DA, Snyder SH, (1976). Binding characteristics of a radiolabeled agonist and antagonist at central nervous system alpha noradrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* 13, 454–473.

V

- Vanlancker, T., Schaubroeck, E., Vyncke, K., Cadenas-Sanchez, C., Breidenassel, C., González-Gross, M., Gottrand, F., Moreno, L.A., Beghin, L., Molnár, D., Manios, Y., Gunter, M.J., Widhalm, K., Leclercq, C., Dallongeville, J., Ascensión, M., Kafatos, A., Castillo, M.J., De Henauw, S., Ortega, F.B., Huybrechts, I., (2017). Comparison of definitions for the metabolic syndrome in adolescents. The HELENA study. *Eur. J. Pediatr.* 176, 241–252.
- Varghese, P., Harrison, R.W., Lofthouse, R.A., Georgakopoulos, D., Berkowitz, D.E., Hare, J.M., (2000). β 3-Adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J. Clin. Invest.* 106, 697–703.

- Vaz, M., Jennings, G., Turner, A., Cox, H., Lambert, G., Esler, M., (1997). Regional Sympathetic Nervous Activity and Oxygen Consumption in Obese Normotensive Human Subjects. *Circulation* 96, 3423–3429.
- Vicennati, V., Vottero, A., Friedman, C., Papanicolaou, D.A., (2002). Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int. J. Obes.* 26, 905-911.
- Vizi, E.S., (2004). Uptake and Release of Norepinephrine by Serotonergic Terminals in Norepinephrine Transporter Knock-Out Mice: Implications for the Action of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *J. Neurosci.* 24, 7888–7894.
- Vollenweider, P., Tappy, L., Randin, D., Schneiter, P., Jéquier, E., Nicod, P., Scherrer, U., (1993). Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J. Clin. Invest.* 92, 147-154.

W

- Wakade, A.R., Wakade, T.D., Poosch, M., Bannon, M.J., (1996). Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are controlled by dexamethasone and nerve growth factor. *J. Physiol.* 494, 67–75.
- Wang, Y.-M., Xu, F., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., (1999). Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biol. Psychiatry* 46, 1124–1130.
- Watts, G.F., Chan, D.C., Barrett, P.H.R., (2002). Adipose tissue compartments and the kinetics of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in non-obese men. *Metabolism* 51, 1206–1210.
- Weiss, M., Bouchoucha, S., Aiad, F., Ayme-Dietrich, E., Dali-Youcef, N., Bousquet, P., Grenay, H., Niederhoffer, N., (2015). Imidazoline-like drugs improve insulin sensitivity through peripheral stimulation of adiponectin and AMPK pathways in a rat model of glucose intolerance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 309, E95–E104.
- Welle, S., Schwartz, R.G., Statt, M., (1991). Reduced metabolic rate during β -adrenergic blockade in humans. *Metabolism* 40, 619–622.
- W.H.O, (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1. p65
- Wieland, D.M., Brown, L.E., Rogers, W.L., Worthington, K.C., Wu, J.L., Clinthorne, N.H., Otto, C.A., Swanson, D.P., Beierwaltes, W.H., (1981). Myocardial imaging with a radioiodinated norepinephrine storage analog. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 22, 22–31.

Wieland, D.M., Mangner, T.J., Inbasekaran, M.N., Brown, L.E., Wu, J.L., (1984). Adrenal medulla imaging agents: a structure-distribution relationship study of radiolabeled aralkylguanidines. *J. Med. Chem.* *27*, 149–155.

Wieland, D.M., Wu, J., Brown, L.E., Mangner, T.J., Swanson, D.P., Beierwaltes, W.H., (1980). Radiolabeled adrenergi neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with [¹³¹I]iodobenzylguanidine. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *21*, 349–353.

X

Xu, F., Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Bohn, L.M., Miller, G.W., Wang, Y.M., Caron, M.G., (2000). Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat. Neurosci.* *3*, 465–471.

Y

Yakubu-Madus, F.E., Johnson, W.T., Zimmerman, K.M., Dananberg, J., Steinberg, M.I., (1999). Metabolic and hemodynamic effects of moxonidine in the Zucker diabetic fatty rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* *48*, 1093–1100.

Yamakage, H., Ito, R., Tochiya, M., Muranaka, K., Tanaka, M., Matsuo, Y., Odori, S., Kono, S., Shimatsu, A., Satoh-Asahara, N., (2014). The utility of dual bioelectrical impedance analysis in detecting intra-abdominal fat area in obese patients during weight reduction therapy in comparison with waist circumference and abdominal CT. *Endocr. J.* *61*, 807–819.

Yamamoto, T., Iwai, M., Kimura, S., Shimazu, T., (1995). The Mechanism of Action of Hepatic Sympathetic Nerves on Ketone-Body Output from Perfused Rat Liver. *FEBS J.* *234*, 466–471.

Yamauchi, T., Iwai, M., Kobayashi, N., Shimazu, T., (1998). Noradrenaline and ATP decrease the secretion of triglyceride and apoprotein B from perfused rat liver. *Pflugers Arch.* *435*, 368–374.

Yerlikaya, A., Dagele, T., King, C., Kuwabara, M., Lanaspá, M.A., Andres-Hernando, A., Covic, A., Manitius, J., Sag, A.A., Kanbay, M., (2017). Dietary and commercialized fructose: Sweet or sour? *Int. Urol. Nephrol.* 1-10.

Yi, C.-X., la Fleur, S.E., Fliers, E., Kalsbeek, A., (2010). The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1802*, 416–431.

Yokoi, K., Lukaski, H.C., Uthus, E.O., Nielsen, F.H., (2001). Use of bioimpedance spectroscopy to estimate body water distribution in rats fed high dietary sulfur amino acids. *J. Nutr.* 131, 1302–1308.

Youngstrom, T.G., Bartness, T.J., (1995). Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 268, R744–R751.

Z

Zanchetti, A.S., (1977). Neural regulation of renin release: experimental evidence and clinical implications in arterial hypertension. *Circulation* 56, 691–698.

Zhao, A., Ohara-Imaizumi, M., Brissova, M., Benninger, R.K.P., Xu, Y., Hao, Y., Abramowitz, J., Boulay, G., Powers, A.C., Piston, D., Jiang, M., Nagamatsu, S., Birnbaumer, L., Gu, G., (2010). Go Represses Insulin Secretion by Reducing Vesicular Docking in Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 59, 2522–2529.

Zhao, Y., Fang, Q., Straub, S.G., Lindau, M., Sharp, G.W.G., (2010). Noradrenaline inhibits exocytosis via the G protein $\beta\gamma$ subunit and refilling of the readily releasable granule pool via the $\alpha_{i1/2}$ subunit: Inhibition of exocytosis and the refilling of the RRP by noradrenaline. *J. Physiol.* 588, 3485–3498.

Zhao, Y., Fang, Q., Straub, S.G., Sharp, G.W.G., (2007). Both Gi and Go Heterotrimeric G Proteins Are Required to Exert the Full Effect of Norepinephrine on the β -Cell KATP Channel. *J. Biol. Chem.* 283, 5306–5316.

Zhu, M.Y., Ordway, G.A., (1997). Down-regulation of norepinephrine transporters on PC12 cells by transporter inhibitors. *J. Neurochem.* 68, 134–141.

Zierath, J.R., Houseknecht, K.L., Gnudi, L., Kahn, B.B., (1997). High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes* 46, 215–223.

Annexes

Annexe 1 : Protocole de génotypage

Extraction de l'ADN :

Suite à l'identification des animaux à l'âge de 7 jours par amputation des extrémités digitées, l'ADN est extrait à partir de celles-ci grâce à un kit (Red extract tissue PCR kit, Sigma-Aldrich, France).

Protocole de PCR :

De façon à amplifier les deux séquences d'intérêt, une PCR classique est ensuite effectuée selon la procédure suivante et à l'aide des trois primers :

NET1 5' - ctg cca tga gag aaa gaa gt - 3'

NET2 5' - ttg cct gag gaa agg aaa ggc - 3'

NET3 5' - tgg atg tgg aat gta tgc gag - 3'

1. Réalisation d'un mélange pour PCR grâce au kit iTaq DNA Pol Biorad (ref : 170-8870, Biorad)

Par échantillon :

2,50 µL	PCR Buffer 10X
0,75 µL	MgCl ₂
1 µL	dNTP Mix (10mM)
0,125 µL	iTaq DNA polymerase
0,1875 µL	Primer Mix
18,1875 µL	Eau DNase et RNase free
1,25 µL	échantillon d'ADN

2. Préparer le mélange de PCR pour tous les échantillons.

3. Répartir 23,75 µL par tube de PCR.

4. Ajouter les échantillons

5. Protocole du thermocycleur :

Dénaturation initiale : 94°C – 1 min30

Dénaturation : 93°C – 30 secondes

Hybridation : 56°C – 30 secondes

Extension : 65°C – 3 min

Extension finale : 65°C – 7 min

Maintien : 4°C

} 40 cycles

Electrophorèse des échantillons :

Les échantillons d'ADN amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans du TAE 1x. Après illumination du gel sous lumière UV (Gel Doc™ EZ Imager, Biorad, France), la bande correspondant à l'allèle sauvage (800 pb) et celle correspondant à l'allèle KO (400 pb) peuvent être identifiés comme sur la figure suivante.

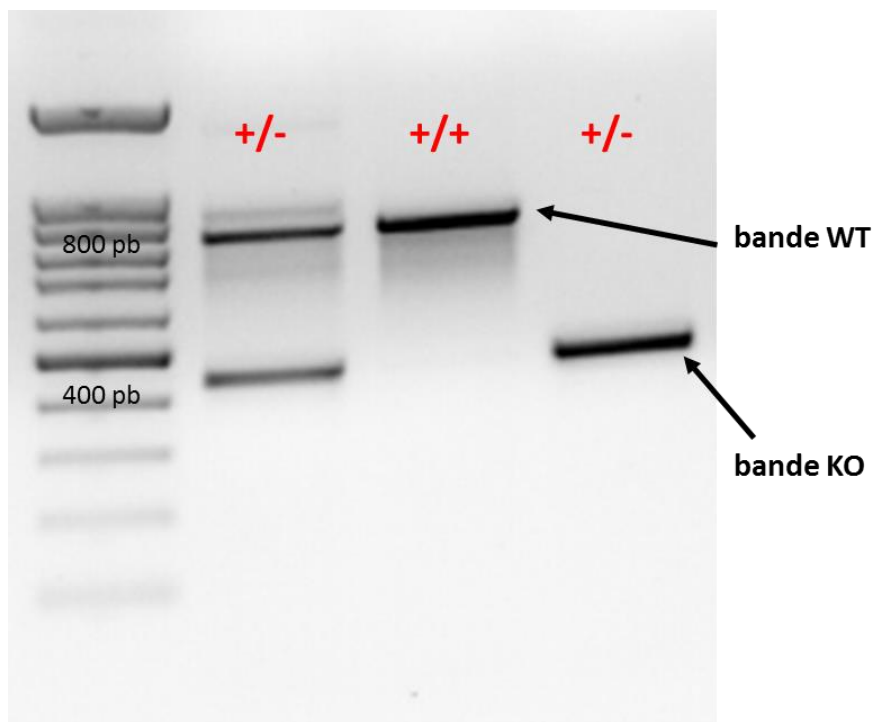


Figure 39 : Photo d'un gel d'électrophorèse illuminé par lumière UV.

Les bandes wild-type (WT) et knock-out (KO) correspondent aux fragments d'ADN identifiés par le bromure d'éthidium qui ont migré selon leur nombre de paires de bases (pb).

Annexe 2 : Protocole de Western-Blot du LNPCV

Préparation des échantillons et extraction protéique

Les échantillons de tissu hépatiques sont prélevés 10 minutes après injection iv d'insuline aux souris. Ils sont congelés immédiatement dans l'azote liquide avant d'être broyés dans un potter, avec 100µL/100mg de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases, sur glace ; ils sont ensuite centrifugés (10000g, 10 minutes, 4°C) pour culotter les débris cellulaires. Le surnageant protéique récupéré est congelé à -80°C.

Dosage de protéines par la méthode de Bradford

L'étalon pour le dosage des protéines est l'albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin, BSA). Une gamme d'étalonnage de 0 à 10 µg est réalisée et les échantillons protéiques hépatiques sont dilués (au 1/1500^{ème} et au 1/2000^{ème}). La méthode de Bradford permet de doser par colorimétrie la concentration protéique d'un échantillon donné. Son principe est basé sur l'utilisation du bleu de Coomassie, colorant qui se lie aux protéines, et forme un complexe bleu absorbant à 595 nm. Pour chaque échantillon (gamme et solution à doser), 100 µL sont ajoutés à 1000 µL du réactif de Bradford, puis on évalue la concentration protéique par lecture d'absorbance au spectrophotomètre à 595 nm (iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad)).

Technique du Western Blot

Le Western Blot est une technique d'immunodétection utilisant des anticorps spécifiques, pour rechercher et quantifier une protéine spécifique dans un échantillon biologique. Elle comporte différentes étapes :

- (1) L'électrophorèse des protéines (15µg/échantillon) (dénaturées préalablement par action d'agents chimiques (SDS et β-mercaptoethanol) et d'une température à 95°C) sur gel de polyacrylamide, permettant de séparer les protéines chargées en fonction de leur poids moléculaire, a été réalisée à 90 mA pendant 60 min.
- (2) Le transfert des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose a été réalisé en milieu semi-liquide grâce au système Trans-Blot®Turbo™ de Bio-Rad, à 25V en 10 minutes.

- (3) Le blocage des sites aspécifiques de la membrane de nitrocellulose a été réalisé pendant 1 heure à température ambiante, dans une solution de lait 10% (lait écrémé en poudre) en présence d'un détergent (tampon TBS-Tween 1x contenant 0,01% de TweenR20).
- (4) Addition de l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine d'intérêt), dilué dans un tampon TBS-Tween 1x, sur la membrane de nitrocellulose avec une exposition *overnight* sous agitation à 4°C.
- (5) Immunodétection et la révélation du complexe « anticorps primaire-anticorps secondaire-peroxydase » par chimiluminescence : puis rinçage de la membrane avec la solution de lavage et addition de l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, dirigé contre l'IgG de l'espèce produisant l'anticorps primaire pendant 1 heure. Après rinçage avec la solution de lavage, la détection des protéines totales par échantillon est réalisée après exposition de la membrane aux UV. Puis la révélation du complexe est réalisée par addition du substrat de la peroxydase (Kit ECL Luminata™, Millipore) permettant de mesurer son activité par chimiluminescence.

Publications et communications

Publications :

1) Les anticoagulants oraux directs chez le sujet âgé : point de vue du pharmacologue ». Ayme-Dietrich E, **Aubertin-Kirch G**, Monassier L. Cah. Année Gérontol. (2015) 7: 88-97.

2) “Targeting myocardial reperfusion injuries with cyclosporine in the CIRCUS Trial pharmacological reasons for failure”. Monassier L, Ayme-Dietrich E, **Aubertin-Kirch G**, Pathak A. Fundam Clin Pharmacol 2016; 30 (2): 191-193.

3) « Quand l’ésoméprazole induit une résistance à la fluindione : une interaction méconnue ». Ayme-Dietrich E, **Aubertin-Kirch G**, Andrès E, Monassier L. Thérapie 2016; 71 (3): 337-341.

4) “Cardiovascular remodeling and the peripheral serotonergic system”. Ayme-Dietrich E, **Aubertin-Kirch G**, Maroteaux L, MonassierL. Arch Cardiovasc Dis 2017; 110 (1): 51-59.

5) “New therapeutic opportunities for 5-HT₂ receptor ligands”. Maroteaux L, Ayme-Dietrich E, **Aubertin-Kirch G**, Banas, Quentin E, Lawson R, Monassier L. Pharmacol Ther 2017; 170: 14-36.

6) Publication soumise (PlosOne) :

“Comparison of bioimpedance spectroscopy and X-ray micro-computed tomography for total fat volume measurement in mice”. **Aubertin G**, Sayeh A, Dillenseger JP, Ayme-Dietrich E, Choquet P, Niederhoffer N.

7) Publication en cours de soumission :

“Effects of a type 1 imidazoline receptor ligand in fa/fa Zucker rats”. **Aubertin G**, Weiss M (co-first author), Traversi F, Sigrist S, Dali-Youssef N, Choquet P, Pons F, Monassier L, Bousquet P, Niederhoffer N.

Communication orale :

“The role of the sympathetic hyperactivity in the modulation of glucose metabolism.” **Aubertin G**, Weiss M, Bousquet P, Monassier L, Niederhoffer N. Congrès de la Société française de pharmacologie et thérapeutique, 19-21 Avril 2016, Centre Prouvé, Nancy. *Fundamental and Clinical Pharmacology 2016, 30, Issue Supplement S1, p20.*

Communications affichées :

1) “Imidazoline I1 receptor ligands activate hepatic adiponectin pathways and thus improve insulin sensitivity.” Weiss M, Benameur D, **Aubertin G**, Bousquet P, Niederhoffer N, Greney H. Printemps de la Cardiologie, Recherche Fondamentale et Clinique (9ème édition), 24-25 Avril 2014, Palais des Congrès, Strasbourg. *Archives of cardiovascular diseases supplements (2014) 26.*

2) “Involvement of the sympathetic nervous system in the development of metabolic disorders.” **Aubertin-Kirch G**, Weiss M, Traversi F, Bousquet P, Monassier L, Niederhoffer N. Printemps de la Cardiologie, Recherche Fondamentale et Clinique (10ème édition), 2-3 Avril 2015, Centre de Congrès Pierre Baudis, Toulouse. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements (2015) 7, p139.*

3) “Comparison of bioimpedance and X-ray micro-computed tomography (μ CT) for total fat volume measurement in mice in vivo.” **Aubertin-Kirch G**, Sayeh A, Goetz C, Dillenseger JP, Chery I, Zahariev A, Blanc S, Monassier L, Niederhoffer N, Choquet P. Printemps de la Cardiologie, Recherche Fondamentale et Clinique (10^{ème} édition), 2-3 Avril 2015, Centre de Congrès Pierre Baudis, Toulouse. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements (2015) 7, p139.*

4) “Involvement of the sympathetic nervous system in the development of carbohydrate metabolism disorders”. **Aubertin-Kirch G**, Weiss M, Bousquet P, Monassier L, Niederhoffer N. Printemps de la Cardiologie, Recherche Fondamentale et Clinique (11^{ème} édition), 7-8 Avril 2016, Centre de Congrès, Dijon. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements (2016) 8, p210.*

5) “The Imidazoline-like drug LNP509 improves lipid metabolism in hepatic cells through an action on the cellular energy sensor AMPK”. Weiss M, **Aubertin-Kirch G**, Greney H, Monassier L, Bousquet P, Niederhoffer N. Printemps de la Cardiologie, Recherche Fondamentale et Clinique (11ème édition), 7-8 Avril 2016, Centre de Congrès, Dijon. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements (2016) 8, p214.*

6) “The role of the sympathetic hyperactivity in the modulation of glucose metabolism”. **Aubertin G**, Weiss M, Bousquet P, Monassier L, Niederhoffer N. Doctoral School Day 2016, 14-15 Mars 2016, Collège Doctoral Européen, Strasbourg.

Gaëlle AUBERTIN-KIRCH

Rôle de l'hyperactivité sympathique dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Résumé :

« Rôle de l'hyperactivité sympathique dans la physiopathologie du syndrome métabolique »

L'existence d'une relation entre les troubles cardio-métaboliques composant le syndrome métabolique et une hyperactivité sympathique est bien admise dans la littérature sans que la relation causale entre ces deux entités soit clairement définie. Nos travaux sur un modèle murin d'hyperactivité sympathique constitutive (délétion partielle et/ou complète du transporteur de recapture de la noradrénaline) ont permis de mettre en évidence le rôle de celle-ci dans le développement de troubles glucidiques : 1) Une augmentation de l'activité sympathique est un facteur suffisant pour le développement de troubles glucidiques précoces associant une intolérance au glucose à une hyperinsulinémie basale sans hyperglycémie. 2) Ces désordres seraient dus à un retard de sécrétion d'insuline en réponse au glucose, probablement consécutif à une sous-expression du transporteur GLUT2. Ces résultats montrent que l'hyperactivité sympathique chronique pourrait constituer un facteur pronostic permettant le diagnostic précoce de patients à risque de développer des troubles de l'homéostasie glucidique et ouvre des perspectives dans le traitement du diabète de type 2.

Mots clés : Hyperactivité sympathique, NET, syndrome métabolique, intolérance au glucose, insulinosécrétion

Abstract:

“Involvement of sympathetic hyperactivity in the pathophysiology of the metabolic syndrome”

Several studies have established an association between cardiometabolic disorders composing the metabolic syndrome and sympathetic hyperactivity. The causal relationship is however not clearly defined. Our work on a murine model of constitutive sympathetic hyperactivity (partial and / or complete deletion of the norepinephrine reuptake transporter) highlights its role in the development of carbohydrate disorders: 1) An increase in the sympathetic activity is a sufficient factor for early carbohydrate disorders associating glucose intolerance with basal hyperinsulinemia without hyperglycemia. 2) These disorder are thought to be due to a delay in insulin secretion in response to glucose stimulation, probably consecutive to a decreased expression of the GLUT2 transporter. These results show that chronic sympathetic hyperactivity may constitute a prognostic factor allowing the early diagnosis of patients at risk to develop glucose homeostasis disorders and opens perspectives in the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Key words: sympathetic hyperactivity, NET, metabolic syndrome, glucose intolerance, insulin secretion