



**La microalgue *Odontella aurita* prévient
l'insulino-résistance et l'inflammation hépatiques
induites par un régime hyper-lipidique : mise en
évidence des mécanismes insulino-sensibilisateurs des
acides gras polyinsaturés omega-3 au niveau neuronal.**

Hamza Amine

► **To cite this version:**

Hamza Amine. La microalgue *Odontella aurita* prévient l'insulino-résistance et l'inflammation hépatiques induites par un régime hyper-lipidique : mise en évidence des mécanismes insulino-sensibilisateurs des acides gras polyinsaturés omega-3 au niveau neuronal.. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE); Université Hassan II (Casablanca, Maroc). Faculté des Sciences, 2016. Français. NNT : 2016SACLS050 . tel-01722423

HAL Id: tel-01722423

<https://theses.hal.science/tel-01722423>

Submitted on 4 Mar 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.

NNT : 2016SACLS050

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 568 BIOSIGNE
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

M. Hamza Amine

Impact de la microalgue *Odontella aurita* sur la prévention de l'insulino-résistance et l'inflammation hépatique induites par un régime hyper-lipidique ; mise en évidence des mécanismes insulino-sensibilisateurs des acides gras polyinsaturés oméga-3 au niveau neuronal.

Thèse présentée et soutenue à « Orsay », le « 03/03/2016 » :

Composition du Jury :

Mme Guiochon-Mantel Anne	PU-PH Université Paris-Saclay	Président
Mme Guerre-Millo Michèle	DR1 INSERM U782	Rapporteur
M. Jockers Ralf	DR1 INSERM U1016	Rapporteur
M. Lagarde Michel	PU INSA Lyon	Examineur
M. Lestunff Hervé	PU Université Paris-Saclay	Examineur
M. Taouis Mohammed	PU Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Mme Meskini Nadia	PU Université Hassan II Casablanca	Co-directeur de thèse

Titre : Impact de la microalgue *Odontella aurita* sur la prévention de l'insulino-résistance et l'inflammation hépatique induites par un régime hyper-lipidique ; mise en évidence des mécanismes insulino-sensibilisateurs des acides gras polyinsaturés oméga-3 au niveau neuronal.

Mots clés : insulino-résistance, résistine, récepteur TLR4, acides gras.

Résumé : Le syndrome métabolique est caractérisé par de nombreuses perturbations métaboliques comprenant : la dyslipidémie, l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline et l'hypertension. Ces perturbations constituent des facteurs de risques pour le développement du diabète de type-2. Les acides gras polyinsaturés de la famille des oméga-3 (AGPI oméga-3) ont plusieurs effets bénéfiques en modulant les facteurs de risques du syndrome métabolique par l'intermédiaire de multiples mécanismes. Cependant, leurs impacts sur la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont encore inconnus.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet de *Odontella aurita* (OA), une microalgue riche en EPA (AGPI oméga-3) et antioxydants, sur la prévention de l'obésité et la résistance à l'insuline induites par un régime riche en acides gras saturés High-Fat (HF). En effet, nous avons montré que le régime HF soumis aux rats pendant 8 semaines favorise la résistance à l'insuline qui se caractérise par une augmentation de l'insulinémie ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur de l'insuline. De plus, le régime HF provoque une diminution de la sensibilité du récepteur à l'insuline en inhibant son activité tyrosine kinase. Le régime HF augmente également l'expression du récepteur TLR4, ce dernier joue un rôle crucial dans l'installation de la résistance à l'insuline par l'intermédiaire de l'activation des voies proinflammatoires via sa liaison avec la résistine et le LPS. En effet, l'augmentation de l'expression de TLR4 est associée avec l'activation des MAPK proinflammatoires JNK et P38. Cependant, l'enrichissement du régime HF avec la microalgue normalise l'insulinémie et les niveaux d'expression du récepteur à l'insuline. Son activité tyrosine kinase est aussi restaurée. Et d'une manière intéressante, la supplémentation du régime HF avec la microalgue réduit l'expression du récepteur TLR4 et inhibe les voies proinflammatoires au niveau hépatique.

Le récepteur TLR4 et l'activation des voies pro-inflammatoires jouent un rôle important dans l'induction de la résistance à l'insuline. Afin d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de TLR4 et déterminer les voies proinflammatoires impliquées dans l'induction de la résistance à l'insuline par les acides gras saturés, ainsi que la mise en évidence des mécanismes insulino-sensibilisateurs des AGPI oméga-3, nous avons utilisé les cellules SH-SY5Y (cellules de neuroblastome humain). En effet, les cellules SHSY5Y ont été exposées pendant 4h à l'acide palmitique (PA, acide gras saturé) ou au DHA (oméga-3) puis traitées avec la résistine. Tout d'abord, nous avons analysé l'effet de la résistine, le PA et le DHA sur les marqueurs de l'inflammation. Seule la résistine est capable d'activer NFkB et augmenter la phosphorylation de Akt et de p38 MAPK. Toutefois, le prétraitement avec le PA augmente l'expression des cytokines inflammatoires (IL6 et TNF α), similaire à la résistine. D'une manière intéressante, le prétraitement au DHA supprime l'effet de PA et la résistine et prévient l'augmentation de l'expression de IL6 et TNF α . Nous avons ensuite étudié la possibilité d'un effet synergique entre la résistine et le PA sur l'expression de TLR4. En effet, le prétraitement avec le PA augmente l'expression de TLR4 alors que le prétraitement au DHA n'a aucun effet. Nous avons montré aussi que le prétraitement au PA potentialise les effets de la résistine en augmentant le recrutement de TLR4 dans les radeaux lipidiques membranaires.

En conclusion, nos résultats montrent que les acides gras polyinsaturés oméga-3 préviennent l'inflammation et la résistance à l'insuline induite par les acides gras saturés via la régulation de la voie de signalisation de TLR4 empêchant ou au moins retardant l'installation de la résistance à l'insuline.



Title : The microalgae *Odontella aurita* prevents insulin resistance and liver inflammation induced by high fat diet ; identification of the insulin-sensitizing mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids at the neuronal level.

Keywords : Insulin resistance, resistin, Toll-like receptor 4, fatty acids.

Abstract : The beneficial effect of polyunsaturated omega-3 fatty acid consumption regarding cardiovascular diseases, insulin resistance and inflammation has been widely reported. Fish oil is considered as the main source of commercialized w-3 FAs, and other alternative sources have been reported such as linseed or microalgae. However, despite numerous reports, the underlying mechanisms of action of w-3 FAs on insulin resistance are still not clearly established, especially those from microalgae. Here, we report that *Odontella aurita*, a microalgae rich in w-3 FAs eicosapentaenoic acid, prevents high fat diet-induced insulin resistance and inflammation in the liver of Wistar rats. Indeed, a high fat diet (HFD) increased plasma insulin levels associated with the impairment of insulin receptor signaling and the up-regulation of toll-like receptor 4 (TLR4) expressions. Importantly, *Odontella aurita*-enriched HFD (HFOA) reduces body weight and plasma insulin levels and maintains normal insulin receptor expression and responsiveness. Furthermore, HFOA decreased TLR4 expression, JNK/p38 phosphorylation and pro-inflammatory factors. In conclusion, we demonstrate for the first time, to our knowledge, that diet supplementation with whole *Odontella aurita* overcomes HFD-induced insulin resistance through the inhibition of TLR4/JNK/p38 MAP kinase signaling pathways.

High circulating levels of saturated free fatty acids such as palmitate promote inflammation and insulin resistance in peripheral tissues. In contrast, polyunsaturated fatty acids such docosahexaenoic acid (DHA) exhibit a protective action. The deleterious effects of palmitate have been attributed to its potential action through Toll-like receptor 4 (TLR4). In addition, resistin, an adipokine, has been also reported to promote inflammation and insulin resistance via TLR4 signaling. In the brain, palmitate and resistin trigger neuroinflammation and insulin resistance. However, the potential link between palmitate and resistin regarding TLR4 signaling at the neuronal level is unknown.

Here, using human SH-SY5Y neuroblastoma cell line we showed that palmitate pretreatment impaired insulin-dependent Akt and Erk phosphorylation whereas DHA maintained or even increased insulin action. Palmitate but not DHA induced TLR4 up-regulation associated with the augmentation of IL6 and TNF α expression. We confirmed that resistin bound to TLR4 leading to the activation of Akt and p38 MAP kinase phosphorylation. Similarly to palmitate, resistin treatment induced the up-regulation of IL6 and TNF α and activated NF κ B. Importantly, palmitate potentiated the resistin action towards the activation of NF κ B; in contrast DHA inhibited resistin action. In addition, palmitate but not DHA increased membrane lipid rafts and TLR4 expression with increased TLR4 recruitment to membrane lipid rafts. Palmitate but not DHA also increased resistin-induced TLR4/MYD88/TIRAP complex formation necessary for TLR4 signaling. In conclusion, palmitate increased TLR4 expression promoting resistin signaling through this receptor and its recruitment to membrane lipid rafts. These effects were prevented when neuronal cells were pretreated with DHA.

Taken together, these results demonstrate that omega-3 fatty acids prevent saturated fat-induced inflammation and insulin resistance through resistin/TLR4 signaling thereby preventing insulin resistance.





Publications :

Amine H, Benomar Y, Haimeur A, Messaouri H, Meskini N, Taouis M. Odontella aurita-enriched diet prevents high fat diet-induced liver insulin resistance. J Endocrinol. 2016 Jan;228(1):1-12.

Amine H, Benomar Y, Gertler A, Taouis M. Palmitic acid enhances TLR4 expression and promotes resistin/TLR4 signaling. Soumis pour publication.

Benomar Y, **Amine H**, Crépin D, Al Rifai S, Riffault L, Gertler A, Taouis M. Central Resistin/TLR4 impairs adiponectin signaling contributing to insulin and FGF21 resistance. Diabetes, 2016 Jan 6. pii: db151029.

Pain A, Ott A, **Amine H**, Rochat T, Boulloc P, Gautheret D. An assessment of bacterial small RNA target prediction programs. RNA Biol. 2015;12(5):509-13.

Crépin D, Benomar Y, Riffault L, **Amine H**, Gertler A, Taouis M. The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. Mol Cell Endocrinol. 2014 Mar 25;384(1-2):1-11.

Communications :

Amine H, Benomar Y, Haimeur A, Messaouri H, Meskini N, Taouis M. *Odontella aurita*-Enriched High-Fat Diet Prevents High-Fat Diet Induced Insulin Resistance. Journée de l'école doctorale « Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie », Faculté de Médecine Paris-Sud, 24 septembre 2013, Le Kremlin Bicêtre, France. Communication affichée.

Amine H, Benomar Y, Haimeur A, Messaouri H, Meskini N, Taouis M. *Odontella aurita*-Enriched High-Fat Diet Prevents High-Fat Diet Induced Insulin Resistance. JIEL 2013, 6^{ème} Journées Internationales d'Etudes des Lipides, 5-7 Décembre 2013, Casablanca, Maroc. Communication orale.

Amine H, Benomar Y, Haimeur A, Messaouri H, Meskini N, Taouis M. *Odontella aurita*-Enriched High-Fat Diet Prevents High-Fat Diet Induced Insulin Resistance. ICE/ENDO 2014, 16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo, 21-24 Juin 2014, Chicago, USA. Communication affichée.

Benomar Y, Solomon G, **Amine H**, Othmane A, Gertler A, Mohammed T. Novel human resistin antagonist (monomeric C6A mutant) reduced body weight gain and restored insulin responsiveness in mice fed high fat diet. ICE/ENDO 2014, 16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo, 21-24 Juin 2014, Chicago, USA. Communication affichée.

Amine H, Benomar Y, Gertler A, Taouis M. Palmitic acid enhances TLR4 expression and promotes resistin/TLR4 signaling. Journée de l'école doctorale « Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie », Faculté de Médecine Paris-Sud, 07 janvier 2015, Le Kremlin Bicêtre, France. Communication affichée.

Amine H, Benomar Y, Gertler A, Taouis M. Palmitic acid enhances TLR4 expression and promotes resistin/TLR4 signaling. ENDO 2015, 97th annual meeting of the Endocrine Society, 5-8 March 2015, San Diego, USA. Communication affichée.

Benomar Y, **Amine H**, Gertler A, Taouis M. Central resistin infusion impairs FGF21/FGFR1/ β -Klotho hypothalamic expression and promotes peripheral FGF21 resistance: involvement of resistin/TLR4 signaling pathway. ENDO 2015, 97th annual meeting of the Endocrine Society, 5-8 March 2015, San Diego, USA. Communication Orale.

Amine H, Benomar Y, Haimeur A, Messaouri H, Meskini N, Taouis M. *Odontella aurita*-Enriched High-Fat Diet Prevents High-Fat Diet Induced Insulin Resistance. ECE 2015, 17th European Congress of Endocrinology, 16-10 Mai 2015, Dublin, Republic of Ireland. Communication orale.

Communications

Benomar Y, **Amine H**, Gertler A, Taouis M. Central Resitin/TLR4 impairs adiponectin signaling contributing to insulin and FGF21 resistance. ECE 2015. 17th European Congress of Endocrinology, 16-10 Mai 2015, Dublin, Republic of Ireland. Communication Orale.

Benomar Y, Solomon G, **Amine H**, Othmane A, Gertler A, Mohammed T. Novel human resistin antagonist (monomeric C6A mutant) reduced body weight gain and restored insulin responsiveness in mice fed high fat diet. ECE 2015. 17th European Congress of Endocrinology, 16-10 Mai 2015, Dublin, Republic of Ireland. Communication affichée.

Amine H, Benomar Y, Gertler A, Meskini N, Taouis M. Impact of the microalga *Odontella aurita* on the prevention of liver insulin resistance and inflammation induced by high fat diet; identification of the insulin-sensitizing mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids at the neuronal level. Journée de l'école doctorale « Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie », Faculté de Médecine Paris-Sud, 15 Octobre 2015, Le Kremlin Bicêtre, France. Communication orale.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie le Pr **Anne Guiochon-Mantel** qui m'a fait honneur en acceptant de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Dr **Michèle Guerre-Millo** et le Dr **Ralf Jockers** pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ces travaux en acceptant d'être rapporteurs et pour l'attention qu'ils porteront à la lecture de ce manuscrit. Je remercie enfin, les Pr **Abdellatif Irhzo**, **Michel Lagarde** et **Hervé Le Stunff**, de me faire bénéficier de leurs grandes compétences en acceptant d'examiner ce travail scientifique.

Mes remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, le Pr **Mohammed Taouis**, qui m'a fait confiance et m'a accueilli dans son laboratoire depuis mon stage de 2^{ème} année de Licence. Merci de m'avoir donné cette opportunité d'initier ma carrière de chercheur. Ton encadrement, tes nombreux conseils scientifiques ainsi que ta disponibilité m'ont permis d'apprendre énormément ainsi que de développer mon sens critique et ma démarche scientifique.

Ma reconnaissance va également au Pr **Nadia Meskini**, pour avoir co-encadré ce travail de thèse. Merci pour ta confiance et ton inconditionnel soutien pendant ces trois années de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr **Yacir Benomar**, toujours disponible et de bonne humeur. Merci pour toutes nos discussions et nos grands moments de délires. Merci beaucoup pour ton écoute. Ton soutien et tes conseils scientifiques m'ont été d'une aide précieuse.

Je tiens également à remercier **Alain Aubourg** pour toutes nos discussions scientifiques et musicales. Merci pour ton écoute et tes nombreux conseils.

Je désire remercier également **Delphine Crépin**, **Ghislaine Poizat** et **Laure Riffault** pour leur disponibilité et leurs conseils techniques.

Je tiens aussi à remercier **Sarah Al Rifai** et **Soraya Doubi-Kadmiri** pour leur amitié et pour tous les bons moments passés ensemble dans ce remarquable repère des étudiants !

Enfin, je remercie tous les membres présents et passés de l'équipe NMPA pour leur gentillesse, leur soutien et leur sympathie.

Je ne peux terminer ces remerciements sans citer évidemment ma famille (mes parents, ma sœur et mon frère). Merci d'avoir toujours cru en moi et de me pousser un peu plus chaque jour. Merci pour votre soutien et votre encouragement pour que je réussisse. Merci à vous d'être toujours à mes côtés.

A ma mère

Table des matières :

Liste des Principales Abréviations :	14
Table des illustrations :	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Le syndrome métabolique	18
1. Introduction	18
2. L'obésité	21
a. Epidémiologie :	21
b. Définition :	21
c. Rappels sur la régulation de la prise alimentaire :	23
i. L'homéostasie énergétique :	23
ii. L'hypothalamus, centre de régulation de la prise alimentaire :	25
iii. Populations neuronales hypothalamiques impliquées dans l'homéostasie énergétique :	27
3. La résistance à l'insuline	29
a. L'insuline :	29
i. Structure et biosynthèse :	29
ii. Source et Sécrétion :	31
b. Récepteur et signalisation de l'insuline :	33
i. Le récepteur de l'insuline :	33
ii. Les voies de signalisations du récepteur de l'insuline (Figure 8) :	39
iii. La voie IRS/PI3K/Akt :	40
iv. Métabolisme glucidique :	41
v. Métabolisme protéique :	43
vi. Métabolisme lipidique :	44
vii. La voie des MAPK :	44
viii. Régulation négative de la signalisation de l'insuline (Figure 10) :	47
c. Résistance à l'insuline et diabète de type 2 :	51
i. Le diabète de type 2 :	51
ii. La résistance à l'insuline :	52
iii. Méthodes de mesure de la résistance à l'insuline :	54
d. Résistance hépatique à l'insuline : Rôle homéostatique du foie	56

e.	Résistance à l'insuline et maladies cardiovasculaires :	57
f.	Résistance à l'insuline et dyslipidémie :	58
4.	Modèles d'études de l'obésité et la résistance à l'insuline chez le rongeur :	58
a.	Modèle génétique :	59
b.	Induction du syndrome métabolique : les agents chimiques :	61
c.	Induction du syndrome métabolique : les régimes alimentaires :	61
i.	Régimes enrichis en glucides :	61
ii.	Régimes enrichis en lipides :	62
II.	L'inflammation : Lien entre obésité et résistance à l'insuline :	65
1.	Le tissu adipeux :	65
a.	Le tissu adipeux blanc :	65
b.	Le tissu adipeux brun :	66
c.	L'inflammation du tissu adipeux et obésité :	69
d.	Fonction endocrine :	75
i.	La leptine :	75
ii.	L'adiponectine :	77
iii.	La resistine :	79
i.	Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) :	85
iv.	L'Interleukine 6 (IL6) :	87
v.	L'interleukine 1 β (IL1 β) :	89
2.	TLR4, lien entre l'inflammation, l'obésité et la résistance à l'insuline :	89
a.	Description des récepteurs Toll-Like :	89
b.	Les ligands du TLR4 :	91
i.	Les ligands exogènes :	91
ii.	Les ligands endogènes :	91
c.	Les voies de signalisation de TLR4 :	93
i.	Les protéines adaptatrices :	93
i.	La voie MyD88 dépendante (Figure 21) :	95
i.	La voie TRIF dépendante (Figure 22) :	97
d.	Rôle de TLR4 dans l'obésité et la résistance à l'insuline :	97
i.	L'endotoxémie métabolique :	99
i.	La resistine :	99
ii.	L'infiltration des macrophages :	99

iii. Les acides gras :	100
III. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga-3 :	101
1. Généralités sur les acides gras :	101
2. Intérêt et sources alimentaires des acides gras oméga-3 :	106
3. Impact des acides gras saturés et les acides gras polyinsaturés sur le développement du syndrome métabolique :	108
a. Effets des acides gras sur les niveaux de lipides plasmatiques :	108
b. Effets des acides gras sur la sensibilité à l'insuline :	110
i. Les acides gras saturés :	110
ii. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 :	113
RESULTATS EXPERIMENTAUX	115
Etude 1 : La microalgue <i>Odontella aurita</i> prévient la résistance à l'insuline et l'inflammation induites par un régime hyperlipidique riches en acides gras saturés au niveau du foie	116
Etude 2 : L'acide palmitique induit l'expression de TLR4 et favorise la signalisation résistine/TLR4 dans les cellules neuronales humaine SH-SY5Y	116
Etude 1 : La microalgue <i>Odontella aurita</i> prévient la résistance à l'insuline et l'inflammation induites par un régime hyperlipidique riches en acides gras saturés au niveau du foie	117
Principaux résultats de l'article 1 :	119
Discussion de l'article 1 :	120
Etude 2 : L'acide palmitique induit l'expression de TLR4 et favorise la signalisation résistine/TLR4 dans les cellules neuronales humaine SH-SY5Y	123
Principaux résultats de l'article 2 :	146
Discussion de l'article 2 :	147
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	150
Conclusion générale :	151
Perspectives :	151
ANNEXES	153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155

Liste des Principales Abréviations :

AGPI :	Acides gras polyinsaturés
AMPc :	Adenosine monophosphate cyclique
ARC :	Arcuate nucleus
CCK :	Cholécystokinine
CRP :	C-reactive protein
DHA :	Docosahexaenoïc acid
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
EPA :	Ecosapentaenoïc acid
FFA :	Free fatty acid
FFAR4 :	Free fatty acid receptor 4
FGF21 :	Fibroblast growth factor 21
GSK3 :	Glycogen synthase kinase 3
IKK :	I κ B kinase
IL1β :	Interleukin 1 β
IL6 :	Interleukin 6
IR :	Insulin receptor
IRS :	Insulin receptor substrate
JNK :	Janus NH ₂ -terminal kinase
LDL :	Low density lipoprotein
LPS :	Lipopolysaccharide
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MCV :	Maladies cardiovasculaires
mTOR :	Mammalian target of rapamycin
MyD88 :	Myeloid differentiation primary response 88
NFκB :	Nuclear factor kappa B
NLRP3 :	NOD-like receptor protein 3
NPY :	Neuropeptide Y
PDK1 :	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K :	Phosphoinositide 3 kinase
POMC :	Proopiomelanocortin
PTEN :	Phosphatase and tensin homolog
PTP1B :	Protein tyrosin phosphatase 1B
SOCS :	Supressor of cytokine signaling
SREBP :	Sterol regulatory element-binding protein
TA :	Tissu adipeux
TG :	Triglycéride
TIRAP :	Toll-Interleukin 1 receptor adapter protein
TLR4 :	Toll-like receptor 4
TNFα :	Tumour necrosis factor α
UCP :	Uncoupling protein

Table des illustrations :

Figure 1: Prévalence de l'obésité dans le monde selon sexe en 2015	20
Figure 2 : Régulation centrale de l'homéostasie énergétique :	22
Figure 3 : Localisation anatomique des différents noyaux hypothalamiques sur une coupe frontale (à gauche) et sagittale (à droite) de cerveau humain.....	24
Figure 4 : Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones de l'Arc.....	26
Figure 5 : Structure de la préproinsuline humaine	28
Figure 6 : Régulation de la sécrétion de l'insuline	30
Figure 7 : Représentation schématique (a) et structure tridimensionnelle du récepteur de l'insuline (b)	32
Figure 8 : Voies de signalisation de l'insuline	38
Figure 9 : Mécanismes moléculaires de la signalisation de l'insuline	42
Figure 10 : Mécanismes de régulation négative de la signalisation de l'insuline	46
Figure 11 : Facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux impliqués dans le développement du diabète de type 2 (Khodabandehloo et al., 2016).	50
Figure 12 : Les différentes populations cellulaires du tissu adipeux blanc	64
Figure 13 : Modulation du tissu adipeux au cours du développement de l'obésité. ...	68
Figure 14 : Structure de NLRP3 et formation de l'inflammasome.....	70
Figure 15 : Phosphorylations des IRS par les Serine / Thréonine kinases	72
Figure 16 : Principaux facteurs sécrétés par le tissu adipeux.....	74
Figure 17 : séquences et structures secondaires de la résistine humaine et murine.	78
Figure 18 : Mécanismes d'action de la résistine humaine.	84
Figure 19 : Mécanismes d'action des cytokines pro-inflammatoires.....	86
Figure 20 : Voies de signalisation du récepteur TLR4	92
Figure 21 : TLR4 et voie de signalisation MyD88 dépendante	94
Figure 22 : TLR4 et voie de signalisation TRIF dépendante.....	96
Figure 23 : La signalisation resistin / TLR4 et résistance à l'insuline au niveau neuronale.....	98
Figure 24 : Biosynthèse des acides gras insaturés	102
Figure 25 : Métabolisme des eicosanoïdes à partir des acides gras polyinsaturés	104
Figure 26 : Effet anti-inflammatoire et insulino-sensibilisateurs de FFAR4.....	112

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le syndrome métabolique

1. Introduction

Le syndrome métabolique est défini comme un ensemble de perturbations métaboliques associant des anomalies morphologiques, physiologiques et biochimiques, en lien avec l'obésité et prédisposant au diabète de type 2 et aux risques cardiovasculaires.

Il a été décrit pour la première fois en 1923 par le physicien suédois Kylin, comme l'association de l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie et l'hyperuricémie (Nilsson, 2001). En 1947, Jean Vague décrit l'obésité androïde comme le type d'obésité le plus souvent associé aux anomalies métaboliques observées dans le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Vague, 1996). C'est finalement en 1988 que Reaven décrit le « syndrome X », aujourd'hui syndrome métabolique (SM). Il suggère que l'hyperinsulinémie observée chez les sujets résistants à l'insuline est responsable d'une stimulation de la production de VLDL par le foie favorisant ainsi une hypertriglycéridémie et une augmentation du risque cardiovasculaire. Ainsi, Reaven propose d'individualiser l'ensemble de ces troubles métaboliques en syndrome, qui regroupe initialement l'intolérance au glucose, l'hyperinsulinémie, l'augmentation des VLDL et des triglycérides (TG) et la baisse du cholestérol HDL, la résistance à l'insuline étant à la base de cette physiopathologie (Reaven, 1988a). Par la suite le rôle de l'obésité dans le développement de ce syndrome avait été mis en évidence (Shirai, 2004).

Le syndrome métabolique a été défini pour la première fois en 1999 par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Depuis, un grand nombre de définitions et de critères pour décrire ce syndrome ont été proposés et varient selon les organismes de santé ou les pays (définition de l'EGIR, « European Group for the study of Insulin resistance » en 1999, du NCEP-ATP III, « National Cholesterol Education Program - Adult Treatment panel III » en 2001, de l'AACE, « American Association of Clinical Endocrinologist » en 2003, de l'AHA, « American Heart Association » en 2004 ou de l'IDF, « International Diabetes Federation » en 2006).

Cependant il y a consensus pour parler de syndrome métabolique dans le cas où au moins trois des facteurs de risques suivants sont associés chez la même personne (Alberti et al., 2009) :

- Une obésité abdominale : dépendante des populations et des pays.
- Un niveau élevé de triglycérides : ≥ 150 mg/dL.
- Un faible taux du cholestérol HDL : < 40 mg/dL chez l'homme et < 50 mg/dL chez la femme.
- Une hypertension artérielle : pression artérielle $\geq 130/85$ mm Hg
- Une hyperglycémie à jeun : ≥ 100 mg/dL.

D'autres facteurs de risques, en plus de ceux décrits ci-dessus pourraient s'ajouter. Par exemple le tabagisme, l'inflammation, une microalbuminurie et un niveau élevé de cholestérol LDL.

Cependant le risque de développer un syndrome métabolique reste étroitement lié à l'obésité et la résistance à l'insuline. En effet, l'obésité est associée à un risque accru de développer une résistance à l'insuline, et ainsi le développement de ces deux pathologies entraînerait les autres signes du syndrome métabolique (Kahn et al., 2006).

L'obésité et l'insulino-résistance sont considérées comme les causes primaires et fondamentales du syndrome métabolique, avec un rôle certain de l'obésité dans l'installation de la résistance à l'insuline. Ces deux pathologies feront l'objet des deux chapitres suivants.

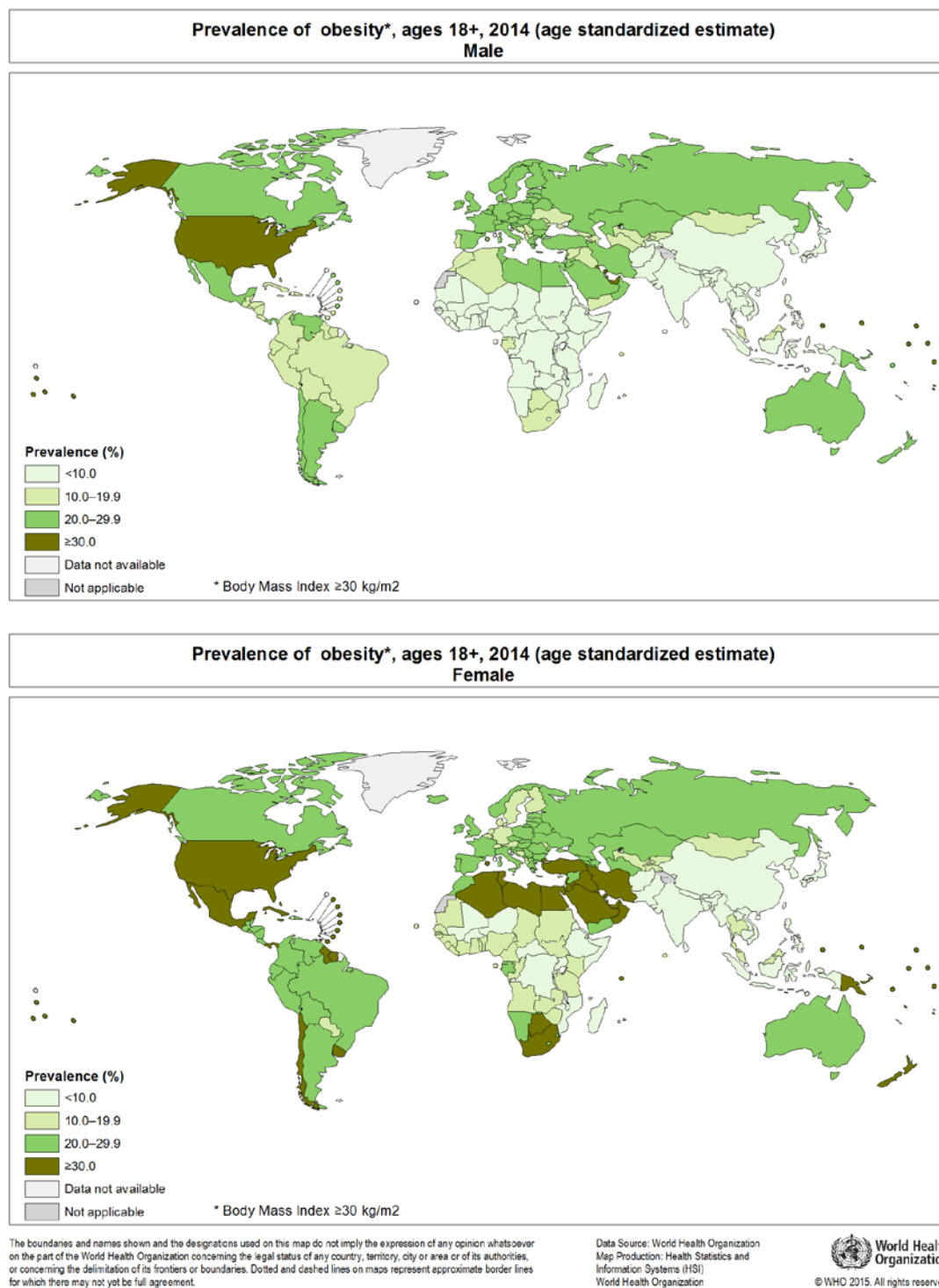


Figure 1: Prévalence de l'obésité dans le monde selon le sexe en 2015

La prévalence de l'obésité est détaillée par pays chez les hommes (carte du haut) et chez les femmes (carte du bas). L'obésité touche principalement les pays industrialisés et en voie de développement. Les Etats Unis d'Amérique sont particulièrement concernés. (WHO, World Health Organization www.who.int)

2. L'obésité

a. Epidémiologie :

Depuis la fin des années 1990, l'obésité a atteint le stade d'épidémie mondiale. L'obésité est le principal facteur de risque du diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et de certaines formes de cancers et de pathologies inflammatoires. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. Globalement, environ 39% de la population adulte mondiale (38% des hommes et 40% des femmes) étaient en surpoids dont 13% (11% des hommes et 15% des femmes) étaient obèses (Figure 1).

La prévalence de l'obésité a plus que doublé au niveau mondial entre 1980 et 2014 et prend des proportions alarmantes chez l'adulte mais également chez les enfants. En 2013, le surpoids et l'obésité concernaient près de 42 millions d'enfants de moins de 5 ans.

En France, l'enquête ObEpi, réalisée tous les 3 ans depuis 1997, par l'Inserm, KANTAR HEALTH et les laboratoires Roche, montre qu'en 2012, 32,3% des Français adultes sont en surpoids et 15% présentent une obésité. Le nombre de personnes obèses a quasiment doublé entre 1997 et 2012 passant de 3.356.000 d'obèses en 1997 à 6.922.000 d'obèses en 2012.

b. Définition :

Selon l'OMS, l'obésité se définit comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé ». La mesure de la masse grasse étant difficile à réaliser en pratique clinique, l'indice de masse corporelle (IMC) ou *body mass index* (BMI) qui est égal au poids (en kilogramme) divisé par la taille (en mètre) au carré est donc fréquemment utilisé pour estimer la surcharge pondérale et définir l'obésité.

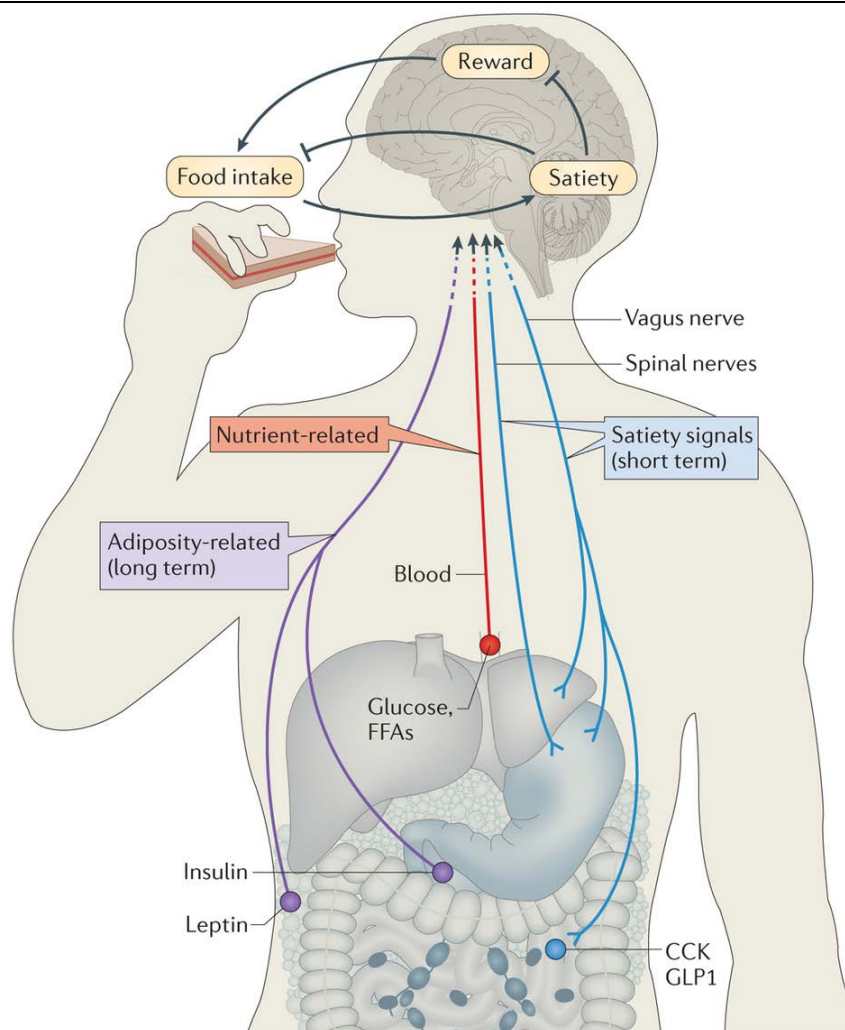


Figure 2 : Régulation centrale de l'homéostasie énergétique :

Le système nerveux central est informé en permanence du statut énergétique de l'organisme via des afférences nerveuses ainsi que des signaux circulants, hormonaux ou métaboliques, provenant de différents organes ou tissus. Dans la situation d'une balance énergétique positive (période postprandiale par exemple), le système nerveux central déclenche un contrôle négatif via des réponses centrales et périphériques (par l'intermédiaire du système nerveux autonome) adaptées limitant la prise alimentaire et favorisant les dépenses énergétiques. Dans la situation d'un déficit énergétique (période préprandiale, jeûne), la prise alimentaire est stimulée et les réserves de substrats énergétiques sont mobilisées pour favoriser les futurs apports d'énergie, alors que les dépenses énergétiques sont freinées. CCK, cholecystokinin ; FFA, free fatty acids ; GLP1, glucagon-like peptide 1 (Morton et al., 2014).

Selon la classification retenue par l'OMS :

- La dénutrition ou famine est définie par : $IMC < 16,5$;
- La maigreur est définie par : $16,5 \leq IMC < 18,5$;
- La normalité est définie par : $18,5 \leq IMC \leq 24,9$;
- Le surpoids est défini par : $25 \leq IMC \leq 29,9$;
- L'obésité est définie par : $IMC \geq 30$;

L'obésité est elle-même divisée en trois classes :

- L'obésité modérée : $30 \leq IMC \leq 34,9$;
- L'obésité sévère : $35 \leq IMC \leq 39,9$;
- L'obésité morbide : $IMC \geq 40$;

Au-delà de ce simple constat d'excès de masse grasse, l'obésité est une pathologie complexe qui résulte de l'interaction de facteurs génétiques, environnementaux (suralimentation et/ou baisse de l'activité physique), psychopathologiques (troubles du comportement alimentaire), et des complications diverses, en particulier endocrino-métaboliques et cardiovasculaires.

c. Rappels sur la régulation de la prise alimentaire :

i. L'homéostasie énergétique :

Le maintien d'un poids corporel stable dépend des interactions entre des signaux périphériques, qui renseignent sur le statut énergétique d'un organisme et différentes voies de signalisation au niveau du système nerveux central, principalement l'hypothalamus et le tronc cérébral. En effet, ces régions du cerveau intègrent le statut énergétique de l'organisme via la perception de ces signaux périphériques, contrôlant ainsi l'homéostasie énergétique. Le système nerveux central est donc informé en permanence des modifications du statut énergétique de l'organisme grâce à des afférences nerveuses provenant de différents organes ou tissus mais également par des signaux hormonaux ou métaboliques circulants (Figure 2). L'intégration de ces signaux au niveau du système nerveux central permet de développer une réponse adaptée aux variations de la disponibilité en nutriments à la fois au niveau du tronc cérébral (régulation directe de la motricité digestive par

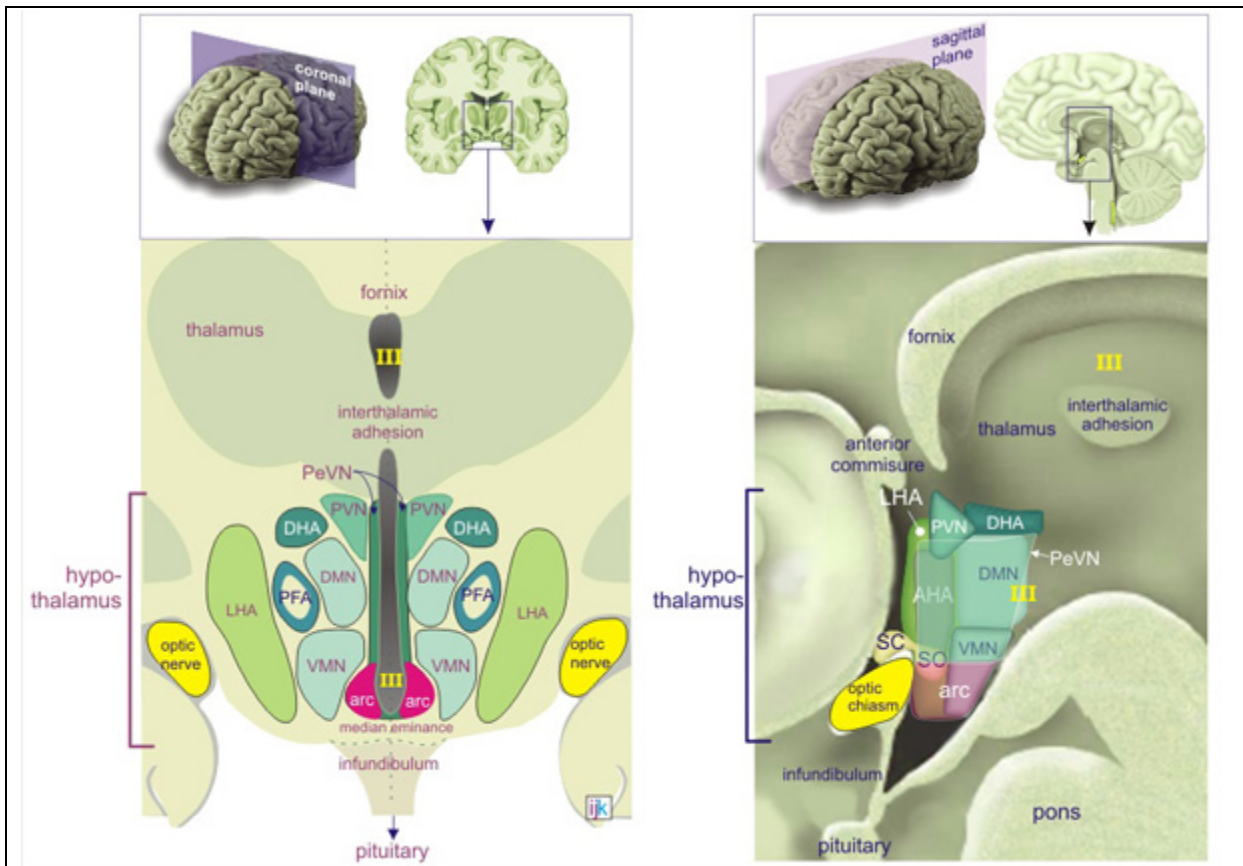


Figure 3 : Localisation anatomique des différents noyaux hypothalamiques sur une coupe frontale (à gauche) et sagittale (à droite) de cerveau humain.

L'hypothalamus est situé à la base du cerveau, au-dessus de l'hypophyse et sous le thalamus. Il est composé de noyaux répartis symétriquement de part et d'autre du 3^{ème} ventricule. Cinq noyaux et aires participent à la régulation de l'homéostasie énergétique : le noyau arqué (Arc), le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau ventro-médian (VMN), le noyau dorso-médian (DMN) et l'aire hypothalamique latérale. Le noyau arqué, de par sa position à la base du troisième ventricule et à proximité de l'éminence médiane, est le premier noyau hypothalamique à détecter les signaux hormonaux périphériques. Arc, arcuate nucleus ; DHA, dorsal hypothalamic area ; DMN, dorsomedial nucleus ; LHA, lateral hypothalamic area ; PeVN, periventricular nucleus ; PFA, perifornic area ; PVN, paraventricular nucleus ; VMN, ventromedial nucleus ; SO, supraoptic nucleus ; SC, suprachiasmatic nucleus (www.cellbiol.net ; Morton et al., 2006)

l'intermédiaire du système nerveux autonome (SNA) et de l'hypothalamus (inhibition/stimulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques) (Morton et al., 2006; Schwartz et al., 2000).

ii. L'hypothalamus, centre de régulation de la prise alimentaire :

Les premières observations d'une éventuelle implication de l'hypothalamus dans la régulation de la prise alimentaire ont été faites par Mohr en 1840. Il décrit le cas d'une patiente qui a vu son état s'aggraver par une prise de poids excessive en peu de temps. Son autopsie a révélé une tumeur au niveau de l'hypothalamus (Mohr, 1993). Cependant il faut attendre les années 1940 afin de démontrer l'implication de l'hypothalamus dans le développement de l'obésité suite à des expériences sur le rat, le chat ainsi que le singe : des lésions ou des stimulations électriques de régions spécifiques de l'hypothalamus modifient la prise alimentaire. Ces expériences ont permis d'identifier un « centre de la satiété » pour l'hypothalamus ventro-médian, dont la lésion induit une hyperphagie chronique aboutissant à l'obésité (Brobeck et al., 1943) alors que sa stimulation entraîne une hypophagie (Anand et al., 1955), et un « centre de la faim » pour l'aire hypothalamique latérale, dont la lésion entraîne l'arrêt spontané de la prise alimentaire associé à une perte de poids rapide alors que sa stimulation induit une hyperphagie associée à une augmentation du poids corporel (Anand and Brobeck, 1951) (Figure 3). Ces notions ont été largement renforcées depuis par diverses approches et ont évolué pour laisser place à une organisation hypothalamique plus complexe, avec l'identification de populations neuronales spécifiques exprimant des neuropeptides spécifiques et modulés par des signaux reflétant le statut énergétique de l'organisme (Schwartz et al., 2000; Williams et al., 2001).

La régulation de l'homéostasie énergétique est complexe et fait intervenir de nombreuses hormones (eg leptine, insuline, adiponectine, ghreline), des signaux métaboliques (glucose, acides gras libres, acides aminés), des signaux du système nerveux autonome provenant de nombreux tissus et organes (du foie, des muscles, du tissu adipeux, du pancréas, de l'estomac etc...) ainsi que des signaux nerveux en provenance d'autres régions cérébrales impliquées dans d'autres fonctions

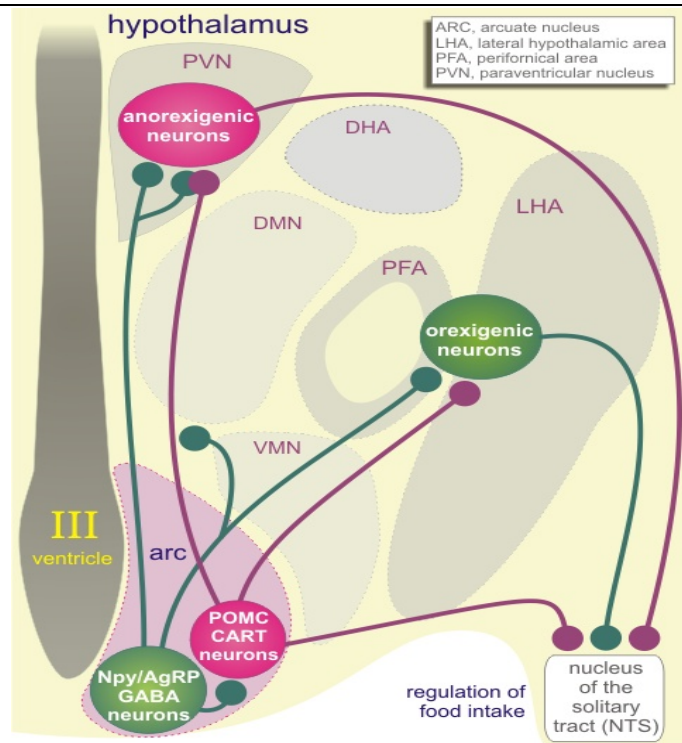


Figure 4 : Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones de l'Arc

Il existe deux populations neuronales dans l'Arc : les neurones AgRP/NPY et POMC/CART. AgRP et NPY sont des neuropeptides qui stimulent la prise alimentaire et diminuent les dépenses énergétiques alors que POMC et CART inhibent la prise alimentaire et stimulent les dépenses énergétiques. Les neurones du noyau arqué sont régulés par les hormones circulantes. Parmi elles, la leptine et l'insuline qui vont inhiber les neurones AgRP/NPY et stimuler les neurones POMC/CART. Les neurones de l'Arc établissent des projections sur le PVN et la LHA. Les neurones du PVN expriment la forme 1 du récepteur au NPY (Y1R) et la forme 4 du récepteur à la mélanocortine (MC4R) qui a pour agoniste l' α -MSH et pour antagoniste l'AgRP. Le PVN est le lieu de synthèse de neuropeptides anorexigènes de second ordre tels que la CRH (Corticotropin Releasing Hormone) ou la TRH (Thyrotropin Releasing Hormone). La LHA exprime des neuropeptides orexigènes que sont les orexines A et B et la MCH (Melanin Concentrating Hormone). La LHA émet des projections vers le tronc cérébral et la moelle épinière, déclenchant des réponses via le système nerveux autonome. POMC, proopiomelanocortin ; CART, cocaine and amphetamine-related transcript ; AgRP, agouti related peptide ; NPY, neuropeptide Y ; GABA, γ -aminobutyric acid (www.cellbiol.net ; Morton et al., 2006)

(olfaction, stress, goût etc...) (Berthoud, 2002). L'hypothalamus est ainsi le lieu d'intégration de ces signaux. En réponse à ces informations, l'hypothalamus agit sur les tissus périphériques via le système nerveux autonome et le complexe hypothalamo-hypophysaire. Il existe donc une boucle de régulation entre le système nerveux central et la périphérie permettant une adaptation précise des apports énergétiques aux besoins de l'organisme (Morton et al., 2006; Schwartz et al., 2000).

iii. Populations neuronales hypothalamiques impliquées dans l'homéostasie énergétique :

Le noyau arqué (ARC) joue un rôle fondamental. Situé dans l'hypothalamus médio-basal entre le 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane, organe circumventriculaire, au niveau duquel il n'y a pas de véritable barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet les capillaires sanguins sont fenêtrés ce qui permet le passage de molécule de petites et moyennes tailles favorisant ainsi une relation directe avec les signaux hormonaux (leptine, insuline, ...) et métaboliques (glucose, acides gras, ...) (Banks, 2010). Le noyau arqué contient deux populations neuronales qui jouent un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire notamment : les neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) *Agouti-related peptide* (AgRP) qui stimulent la prise alimentaire et sont dit orexigènes, et les neurones exprimant la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur de *l'alpha-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH), et du neuropeptide *cocain and amphetamine regulated transcript* (CART) qui inhibent la prise alimentaire et sont dits anorexigènes. Ces deux populations neuronales du noyau arqué sont considérées comme des neurones de 1^{er} ordre dans l'intégration des signaux périphériques et constituent un relai essentiel entre la périphérie et le système nerveux central. Elles interagissent entre elles de manières antagonistes et émettent des projections vers les neurones de 2nd ordre des noyaux paraventriculaires (PVN), du noyau ventromédian (VMN) et de l'aire hypothalamique latérale (Figure 4).

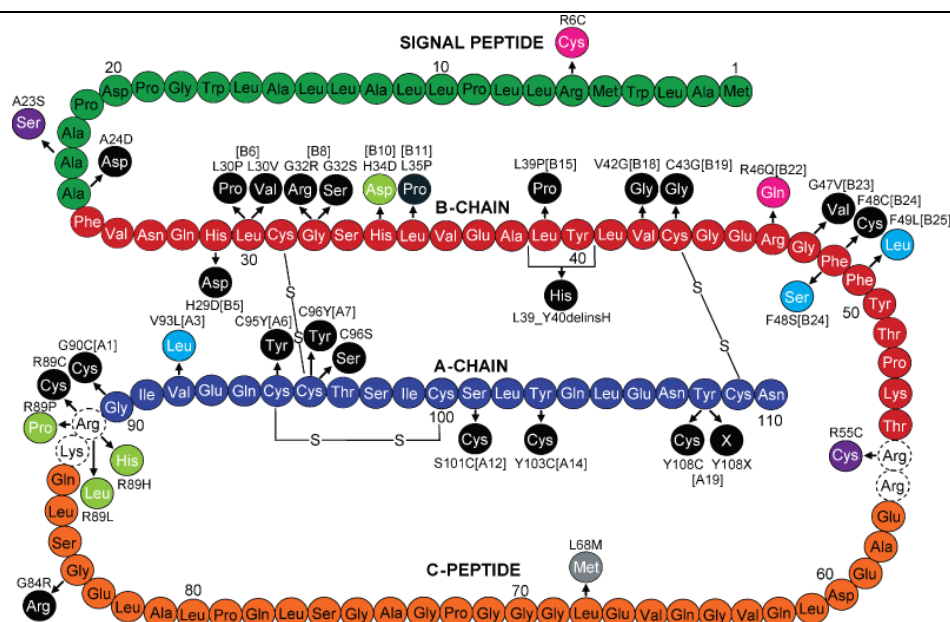


Figure 5 : Structure de la préproinsuline humaine

Les chaînes A et B correspondent respectivement aux chaînes bleu et rouge. Le peptide signal est représenté en vert alors que le peptide C est représenté en orange. Les acides aminés colorés sur les bords indiquent les mutations retrouvées chez des patients diabétiques ou présentant une hyperinsulinémie (Steiner et al., 2009).

3. La résistance à l'insuline

a. L'insuline :

i. Structure et biosynthèse :

En 1951, Frédéric Sanger décrit la structure primaire de l'insuline ce qui lui a valu l'attribution du prix Nobel de chimie en 1958 (Sanger and Thompson, 1953; Sanger and Tuppy, 1951). L'insuline a été ensuite synthétisée par plusieurs groupes indépendamment et sa structure tertiaire a été décrite en 1969 par Dorothy Hodgkin (Adams et al., 1969).

L'insuline est une protéine de 6 kDa produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, composée de 51 acides aminés, dont la structure primaire est très conservée entre les espèces. Chez l'homme, elle est constituée d'une chaîne A (21 acides aminés) et d'une chaîne B (30 acides aminés) reliées par 2 ponts disulfures. Ce monomère d'insuline est la forme active de la protéine, cependant l'insuline est capable de se dimériser spontanément : trois dimères peuvent s'associer entre eux pour former des hexamères qui constituent la principale forme de stockage de l'insuline dans les vésicules de sécrétion (Derewenda et al., 1989) (Figure 5).

Le gène codant pour l'insuline est situé chez l'homme sur le chromosome 11 (Owerbach et al., 1980). Ce gène code pour le précurseur de l'insuline, la pré-pro-insuline, une chaîne polypeptidique unique (110 acides aminés) contenant un peptide signal (24 acides aminés) situé à l'extrémité N-terminale et qui oriente la chaîne vers le réticulum endoplasmique (RE). Ce précurseur subira une protéolyse catalysée par une prohormone convertase spécifique. La pré-pro-insuline est alors transformée en pro-insuline (86 acides aminés) qui contient les chaînes A et B qui donneront l'insuline (51 acides aminés) plus un peptide de connexion ou peptide C (31 acides aminés) reliant la fin de la chaîne A au début de la chaîne B (Steiner and Rubenstein, 1997).

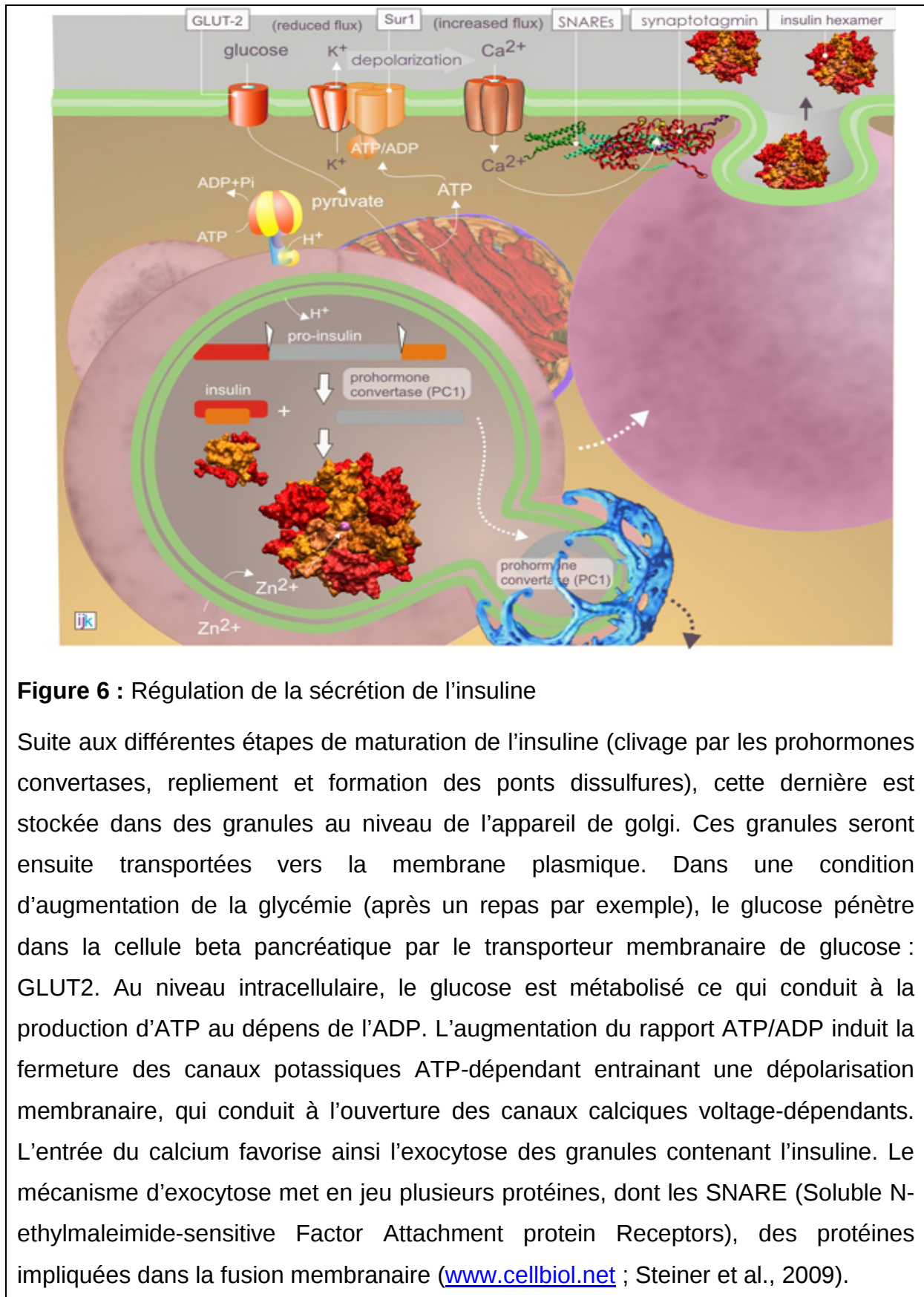


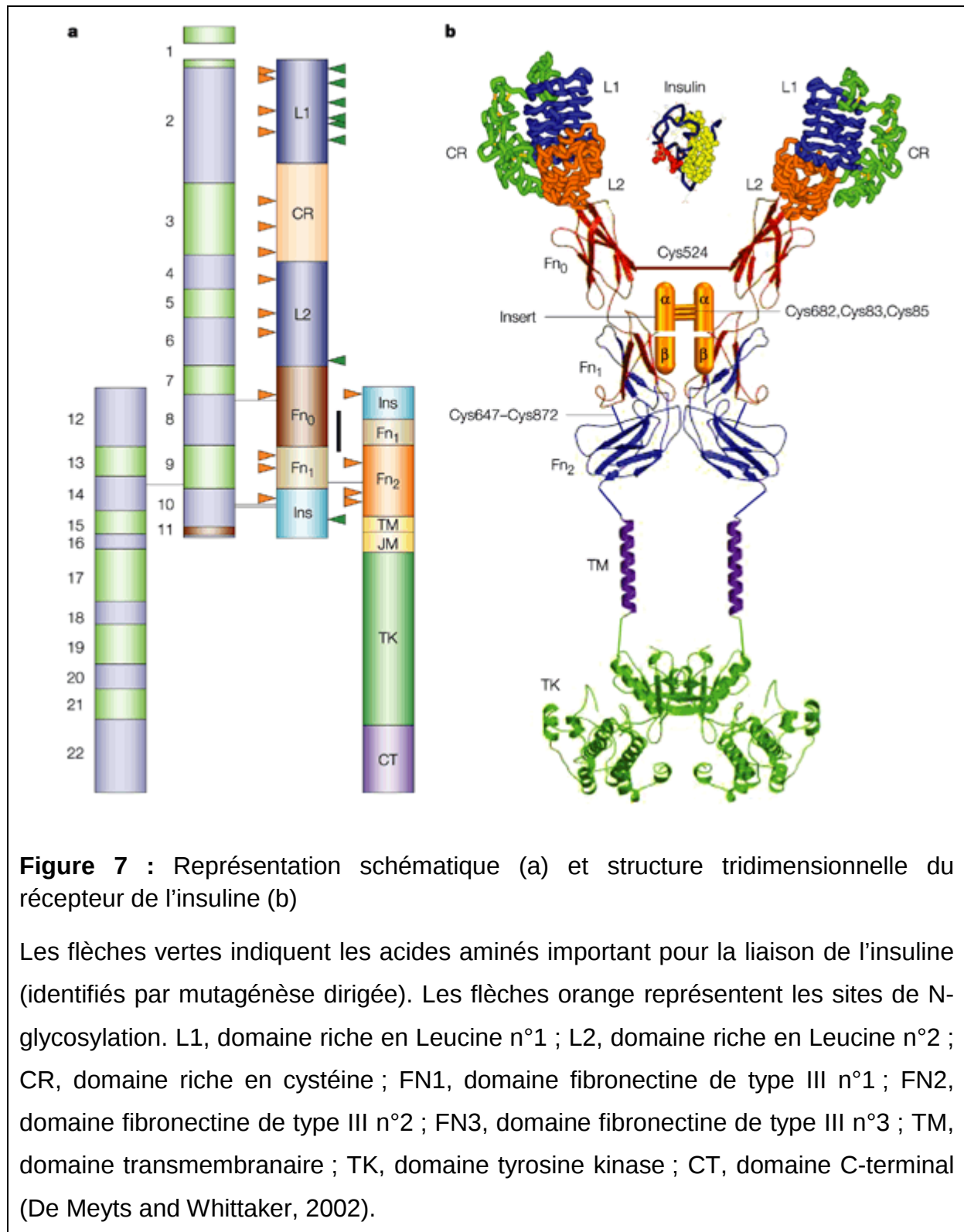
Figure 6 : Régulation de la sécrétion de l'insuline

Suite aux différentes étapes de maturation de l'insuline (clivage par les prohormones convertases, repliement et formation des ponts dissulfures), cette dernière est stockée dans des granules au niveau de l'appareil de golgi. Ces granules seront ensuite transportées vers la membrane plasmique. Dans une condition d'augmentation de la glycémie (après un repas par exemple), le glucose pénètre dans la cellule beta pancréatique par le transporteur membranaire de glucose : GLUT2. Au niveau intracellulaire, le glucose est métabolisé ce qui conduit à la production d'ATP au dépens de l'ADP. L'augmentation du rapport ATP/ADP induit la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendant entraînant une dépolarisation membranaire, qui conduit à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée du calcium favorise ainsi l'exocytose des granules contenant l'insuline. Le mécanisme d'exocytose met en jeu plusieurs protéines, dont les SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment protein Receptors), des protéines impliquées dans la fusion membranaire (www.cellbiol.net ; Steiner et al., 2009).

ii. Source et Sécrétion :

L'insuline est principalement produite par les cellules β du pancréas. Cependant, certaines études font état d'une production extra-pancréatique : l'insuline est produite par le thymus afin d'induire la tolérance du soi et la protection contre le développement d'une auto-immunité et la destruction des cellules β des îlots de Langerhans (Fan et al., 2009). D'autre part, il a été montré que l'insuline pouvait être synthétisée par certaines cellules du foie, de la rate ou encore du tissu adipeux dans différents modèles animaux de diabète (Kojima et al., 2006). D'autres études montrent qu'elle peut être synthétisée par le cerveau en cours de développement, où son récepteur est impliqué dans le guidage axonal (Suckale and Solimena, 2010).

L'insuline est stockée dans des granules de sécrétion qui s'accumulent au niveau de l'appareil de golgi des cellules β pancréatiques (Figure 6). L'augmentation des taux plasmatiques de glucose constitue le principal stimulant de la sécrétion d'insuline. In vitro, le seuil de réponse des cellules β pancréatiques concernant la sécrétion d'insuline se situe entre 3 et 7 mM de glucose et son maximum est compris entre 15 et 30 mM (Henquin et al., 2006). Le glucose est transporté dans les cellules β du pancréas par les transporteurs de glucose de type 2 (GLUT2) d'une manière proportionnelle à la glycémie plasmatique. Dans les cellules β , le glucose est phosphorylé par la glucokinase et métabolisé avec synthèse d'ATP, augmentant ainsi le rapport ATP/ADP. Cette augmentation induit la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendant, ce qui entraîne la dépolarisation de la membrane des cellules β pancréatiques, favorisant ainsi l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée du calcium déclenche l'exocytose des vésicules contenant l'insuline (Weiss et al., 2000). D'autres facteurs jouent aussi un rôle important dans la stimulation de la sécrétion de l'insuline, comme le glucagon, le glucagon-like peptide 1 (GLP-1), la cholécystokinine (CCK) et le gastric inhibitory peptide (GIP), en agissant sur leurs récepteurs situés sur la membrane des cellules β . La sécrétion de l'insuline peut être inhibée par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et la somatostatine (Weiss et al., 2000). Le système nerveux autonome est également impliqué dans la régulation de la sécrétion de l'insuline par l'intermédiaire du système nerveux sympathiques et du système nerveux parasympathiques qui vont avoir des effets opposés.



En effet, une stimulation parasympathique, induite par l'alimentation, favorise la sécrétion de l'insuline par les cellules β -pancréatique alors qu'une stimulation sympathique, induite par le stress, l'inhibe (Kiba, 2004).

L'insuline exerce ses nombreux effets physiologiques et métaboliques en se fixant sur un récepteur membranaire localisé dans les différents tissus cibles. Le récepteur de l'insuline (Insulin Receptor : IR) appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase.

b. Récepteur et signalisation de l'insuline :

i. Le récepteur de l'insuline :

IR appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase qui est subdivisée en plusieurs sous classes structurales, dans chacune, la fixation de l'hormone induit l'autophosphorylation (ou transphosphorylation) des récepteurs pour initier la cascade de signalisation intracellulaire.

Le récepteur de l'insuline appartient à la classe II des récepteurs à activité tyrosine kinase de structure $\alpha 2\beta 2$, qui comprend les récepteurs Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1R) et Insulin Receptor-Related Receptor (IRR). Cette classe est caractérisée par la présence d'un domaine riche en cystéines dans la partie extracellulaire des récepteurs (Figure 7).

L'ADN complémentaire du récepteur de l'insuline a été cloné pour la première fois en 1985 simultanément par deux équipes de recherche (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1985) et la séquence du gène a été déterminée peu de temps après fournissant des données essentielles sur la structure et l'organisation moléculaire du récepteur (Seino et al., 1989).

Le gène du récepteur de l'insuline est localisé sur le bras court du chromosome 19 chez l'homme (Ebina et al., 1985), il est composé de 22 exons et 21 introns (Seino et al., 1989). Deux isoformes du récepteur sont générées par épissage alternatif de l'exon 11 : IR-A et IR-B. Cette différence d'épissage se traduit par la présence de 12 acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale de la sous-unité α de IR-B (Seino and Bell, 1989).

Chez l'homme, ces deux isoformes présentent une distribution tissulaire différente. En effet, IR-B est l'isoforme exprimée dans l'ensemble des tissus adultes qui sont classiquement reconnus pour être sensibles à l'insuline (foie, muscle squelettiques et tissu adipeux) alors que l'isoforme IR-A est surtout exprimée dans les tissus fœtaux, le système nerveux central de l'adulte et certaines tumeurs malignes chez l'homme (De Meyts, 2012; Frasca et al., 1999; Moller et al., 1989). **Dans la suite de ce chapitre, la numérotation des résidus du récepteur de l'insuline sera celle de l'isoforme IR-B (+exon 11).**

Le récepteur de l'insuline est synthétisé sous la forme d'un précurseur monomérique $\alpha\beta$. Le peptide signal de 27 acides aminés en position N-terminale adresse le pré-pro-récepteur au réticulum endoplasmique au sein duquel le peptide signal est clivé. Le pro-récepteur est ensuite glycosylé et dimérisé par l'intermédiaire de la formation de ponts disulfures (Ebina et al., 1985) puis protéolysé par la furine (ou PACE, paired basic amino acid cleaving enzyme, une sérine endoprotéase calcium-dépendante dont le site de protéolyse est constitué d'une séquence basique de la forme : Arg-X-Arg/Lys-Arg) dans l'appareil de golgi et finalement transporté au niveau de la membrane plasmique (Kara et al., 2015). Le récepteur mature est une glycoprotéine hétérotetramérique composée de deux sous-unités α extracellulaires de 130 kDa et de deux sous-unités β transmembranaires de 95 kDa. Les sous-unités α sont reliées entre elles et aux sous-unités β par l'intermédiaire de ponts disulfures (Sbraccia et al., 1990).

De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, chaque hétérodimère $\alpha\beta$ du récepteur comporte 6 domaines différents (Figure 7) :

- L1, domaine riche en Leucine n°1.
- CR, domaine riche en cystéine.
- L2, domaine riche en Leucine n°2.
- FNIII-1, domaine fibronectine de type III n°1.
- FNIII-2, domaine fibronectine de type III n°2.
- FNIII-3, domaine fibronectine de type III n°3.

Les deux domaines L1 et L2 possèdent une structure en feuillet β . Le domaine FNIII-2 contient un large domaine d'insertion (ID) contenant le site de clivage de la

furine qui va générer les chaînes α et β du récepteur mature. L'ID contient aussi une séquence de 16 acides aminés α -CT (positions 704 à 719 en C-terminale de la sous-unité α) capitale pour la fixation de l'insuline (Menting et al., 2013).

Ces domaines sont localisés dans la partie extracellulaire du récepteur (principalement sur la sous-unité α , à l'exception du domaine FNIII-3) et contiennent le site de liaison de l'insuline. En effet, en 2013, le groupe de Lawrence et de Ward ont décrit pour la première fois la structure de l'insuline liée au « site 1 », le site de liaison majeur de l'hormone sur son récepteur, composé du feuillet β centrale du domaine L1 et de la chaîne α de l'extrémité C-terminale (α -CT) de la sous-unité α . La cristallographie de quatre complexes d'insuline avec une région du récepteur impliquée dans l'interaction a permis la comparaison de la structure de ces complexes (analysée par diffraction de rayon X) avec celle de l'insuline et du récepteur séparés. Cette étude a permis de montrer que la liaison de l'insuline sur son récepteur modifie la structure de ces deux molécules se traduisant par un changement de conformation qui pourrait jouer un rôle dans l'activation de la partie intracellulaire du récepteur (Menting et al., 2013).

Les sous-unités β du récepteur sont constituées d'un domaine extracellulaire glycosylé, un court domaine transmembranaire et un long domaine intracellulaire. Ce dernier est lui-même subdivisé en 3 domaines : le domaine juxtamembranaire impliqué dans la reconnaissance des substrats cellulaires et dans l'internalisation du récepteur, le domaine tyrosine kinase qui contient le site de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) et les sites majeurs d'autophosphorylation et le domaine C-terminal qui contient aussi des sites d'autophosphorylation (De Meyts and Whittaker, 2002).

A l'état basal, la sous-unité α exerce un effet inhibiteur sur l'activité kinase du récepteur (Shoelson et al., 1988). La liaison de l'insuline à ce dernier induit des changements de conformation qui conduisent à l'activation de la tyrosine kinase d'une des sous-unités β ce qui conduit à leur trans-phosphorylation (Saltiel and Kahn, 2001). Cette autophosphorylation du récepteur s'effectue sur des résidus tyrosine des domaines intracellulaires du récepteur : la tyrosine 972 (domaine

juxtamembranaire), les tyrosines 1158, 1162 et 1163 (domaine tyrosine kinase) et les tyrosines 1328 et 1334 (domaine C-terminal) (White, 1997).

La phosphorylation des tyrosines du domaine kinase du récepteur (1158, 1162 et 1163) est essentielle pour moduler le niveau d'activation de la kinase du récepteur (White et al., 1988; Wilden et al., 1992). En effet, la mutation d'une, deux ou de ces trois tyrosines entraîne une diminution progressive de l'activité kinase du récepteur induite par une stimulation par l'insuline (Wilden et al., 1992). Ces tyrosines peuvent aussi servir au recrutement de médiateurs tels que SHP2 (Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2) et APS (Adapter protein containing PH and SH2 domain) (Kharitonov et al., 1995; Moodie et al., 1999).

La phosphorylation de la tyrosine 972 du domaine juxtamembranaire est essentielle à la liaison des substrats du récepteur de l'insuline, les IRS (Insulin Receptor Substrates) et SHC (Src Homology and Collagen protein) qui vont se lier au motif NPXpY972 grâce à leur domaine de liaison aux phosphotyrosines PTB (phosphotyrosine-binding domain) (Kaburagi et al., 1995). Une mutation de cette tyrosine inhibe la phosphorylation des substrats du récepteur de l'insuline et affecte la signalisation malgré une activation normale de la kinase du récepteur, ce qui suggère un défaut dans le recrutement des substrats du récepteur (Backer et al., 1991; Kaburagi et al., 1993; Murakami and Rosen, 1991; Shoelson et al., 1988). Le motif NPXpY972 serait également impliqué dans le processus d'internalisation du récepteur (Smith et al., 1996), un processus requis pour la désactivation du récepteur, mais pourrait également participer à certaines actions impliquant le transfert intracellulaire du complexe hormone/récepteur (Dombrowski et al., 2000). En effet, il a été montré chez le rat, que le récepteur de l'insuline avait une activité tyrosine kinase maintenue dans le muscle squelettique après son internalisation, alors qu'il était rapidement désactivé dans les compartiments intracellulaires des cellules adipeuses et hépatiques (Dombrowski et al., 2000).

Le rôle de la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine C-terminale (1328 et 1334) demeure peu connu. La délétion de 82 acides aminés de l'extrémité C-terminale ne semble pas affecter la transmission du signal par le récepteur, cependant on observe une diminution significative de son autophosphorylation, ce

qui suggère que la phosphorylation des tyrosines du domaine C-terminale est plutôt impliquée dans la régulation de l'activité tyrosine kinase que dans le recrutement des substrats du récepteur (Yamamoto-Honda et al., 1993). Il a été également suggéré que la phosphorylation de la tyrosine 1334 contenu dans le motif Y1334XXM permettrait la liaison de la sous-unité p85 de la PI3Kinase sur ce site grâce à son domaine SH2 (Src homology 2 domain) et, donc, son activation. (Levy-Toledano et al., 1994; Van Horn et al., 1994).

L'importance physiologique du récepteur de l'insuline a été mise en évidence dans des modèles animaux invalidés (Knock-out, KO) pour le gène du récepteur de l'insuline. Des souris totalement invalidées pour le récepteur de l'insuline deviennent rapidement diabétiques et présentent de nombreuses anomalies métaboliques qui entraînent généralement leur mort une semaine après leur naissance (Accili et al., 1996). Le KO spécifique du récepteur de l'insuline dans le foie de souris entraîne une résistance à l'insuline sévère caractérisée par une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose ainsi qu'une incapacité de l'insuline à supprimer la production hépatique de glucose (Michael et al., 2000). L'invalidation spécifique du gène du récepteur de l'insuline au niveau des cellules β pancréatiques de souris entraîne l'altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose conduisant à une intolérance au glucose (Kulkarni et al., 1999; Otani et al., 2004). Dans le muscle squelettique, le KO spécifique du récepteur de l'insuline conduit à une altération de la signalisation de l'insuline accompagnée d'une diminution du transport de glucose dans ce tissu (Brüning et al., 1998).

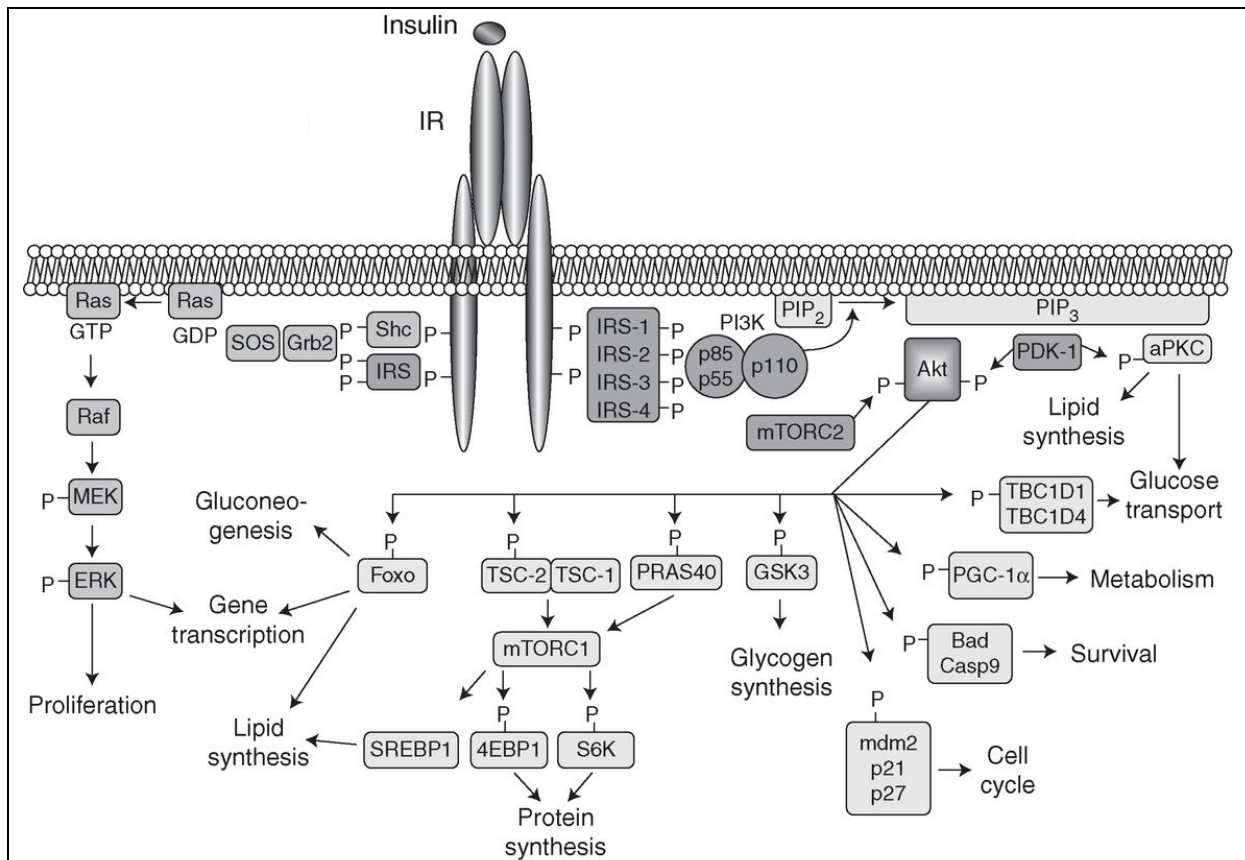


Figure 8 : Voies de signalisation de l'insuline

La fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne l'autophosphorylation et un changement de conformation de ce dernier initiant une cascade d'évènements de phosphorylation. L'activation du récepteur de l'insuline conduit au recrutement et la phosphorylation de ses substrats tels que les protéines IRS et Shc. La protéine Shc active la voie Ras-MAPK tandis que les protéines IRS activent principalement la voie PI3K-Akt, par le recrutement et l'activation de la PI3K, ce qui conduit à la formation de seconds messagers PIP3. Ces derniers, localisés au niveau de la membrane plasmique, active la kinase PDK1, qui à son tour phosphoryle et active Akt et PKC. Une fois activée, Akt joue un rôle dans la synthèse du glycogène, la néoglucogenèse, la transcription des gènes et la synthèse des lipides et des protéines. La voie SHC-Grb2-SOS-Ras-Raf-ERK1/2 est impliquée dans la prolifération cellulaire et la transcription des gènes (Adapté de : Boucher et al., 2014).

ii. Les voies de signalisations du récepteur de l'insuline (Figure 8) :

Au moins neuf substrats du récepteur de l'insuline ont été identifiés jusqu'à présent. Quatre de ces neuf substrats appartiennent à la famille des IRS, IRS1, IRS2, IRS3 et IRS4. Les cinq autres substrats sont : Gab1 (Grb2-associated-binding protein), p62^{Dok} (60 kDa tyrosine phosphorylated protein), Cbl (Casitats B-lineage lymphoma), APS (adapter protein with a PH and SH2 domain) et les différentes isoformes de Shc. Ces substrats servent de protéines adaptatrices et sont impliqués dans l'activation des différentes voies de signalisation du récepteur de l'insuline. En effet, la phosphorylation de ses substrats sur tyrosine par le récepteur va entraîner le recrutement de protéines de signalisation à domaine SH2 (domaine de liaison aux phosphotyrosine) (Saltiel and Kahn, 2001).

Les IRS sont cependant les substrats majeurs du récepteur de l'insuline. IRS1 est le premier à être identifié (Sun et al., 1991; White et al., 1985). Les trois autres IRS (IRS2, IRS3 et IRS4) ont été caractérisés par la suite (Lavan et al., 1997a, 1997b; Miralpeix et al., 1992; Sun et al., 1995). Alors que IRS1 et IRS2 ont une expression ubiquitaire (Sun et al., 1991, 1995), IRS3 n'est exprimé que dans le tissu adipeux, les cellules β pancréatiques, le foie et les poumons (Sciacchitano and Taylor, 1997), alors que l'expression d'IRS4 est limitée au cerveau, estomac, reins et poumons (Fantin et al., 1999). Le rôle de ces différentes IRS a été mis en évidence grâce au développement de modèles animaux d'inactivation pour chacune des IRS. En effet, IRS1 activerait plutôt les voies impliquées dans la croissance cellulaire et la régulation de l'homéostasie glucidique (translocation de GLUT4) au niveau des cellules musculaires (Tamemoto et al., 1994; Yamauchi et al., 1996), alors que IRS2 serait impliqué dans le développement des cellules β pancréatiques, la croissance des cellules neuronales et la médiation des effets métaboliques de l'insuline au niveau hépatique (Higaki et al., 1999; Withers et al., 1998). Cependant, les rôles d'IRS3 et IRS4 restent encore à élucider puisque la génération d'animaux invalidés pour ces deux protéines n'a pas permis de leur attribuer un rôle définitif (Fantin et al., 1999; Sciacchitano and Taylor, 1997).

IRS1 et IRS2 sont phosphorylées par le récepteur de l'insuline suite à leur liaison sur le motif NPXpY972 de ce dernier via leur domaine PTB (Eck et al., 1996; Wolf et

al., 1995). IRS1 et IRS2 possèdent aussi un domaine PH (pleckstrin homology), qui reconnaît les lipides polaires membranaires et sert à la fixation des IRS sur les phosphoinositides membranaires à proximité du récepteur de l'insuline (Voliovitch et al., 1995; Yenush et al., 1996). La phosphorylation des IRS sur tyrosine va créer des points d'ancrage (grâce au motif pYMXM) pour les molécules à domaine SH2 qui après leur recrutement vont permettre la propagation du signal. Parmi les molécules recrutées on peut citer la PI3K, SHP2, Fyn, Grb2, nck et Crkb (Virkamäki et al., 1999; White, 1997).

iii. La voie IRS/PI3K/Akt :

La PI3K est une enzyme qui catalyse la phosphorylation des phosphoinositides en position 3. Il existe plusieurs isoformes de la PI3K qui sont divisées en quatre classes : 1a, 1b, 2 et 3. La classe 1a est celle impliquée dans la signalisation de l'insuline (Shepherd et al., 1998). Sa structure est sous la forme d'un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85 qui va se lier sur les phosphotyrosines des IRS grâce à ses deux domaines SH2 (Saltiel and Kahn, 2001). Au moins huit isoformes de la sous-unité régulatrice ont été identifiées et sont issues de l'expression de trois gènes différents (p85 α , p85 β et p55^{PIK}) et de l'épissage alternatif de p85 α pour produire AS53/p55 α et p50 α . La sous-unité catalytique quant à elle existe sous trois isoformes, p110 α , p110 β et p110 δ , codées par trois gènes différents (Zhao and Vogt, 2008).

L'utilisation d'inhibiteurs (Wortmannine et le LY294002) a permis de mettre en évidence le rôle crucial de la PI3K dans la médiation des effets métaboliques de l'insuline puisque son inactivation (en présence d'un inhibiteur) inhibe le transport du glucose dans des modèles cellulaires suite à stimulation par l'insuline (Shepherd et al., 1998). Suite au recrutement de la PI3K par les IRS, cette dernière est activée et catalyse la phosphorylation en position 3 du phosphatidylinositol 4 phosphate [PI(4)P] et du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate [PI(4,5)P₂] par l'intermédiaire de sa sous-unité catalytique p110 pour produire du phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate [PI(3,4)P₂] et du phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate [PI(3,4,5)P₃]. La production du PI(3,4)P₂ et du PI(3,4,5)P₃ par la PI3K permet le recrutement de l'enzyme PDK1 (3-phosphoinositide dependant protein kinase 1) à la membrane

plasmique via son domaine PH puis son activation (Fruman et al., 1999; Rameh and Cantley, 1999; Toker, 2000; Vanhaesebroeck et al., 2010). Une fois activé, la PDK1 va phosphoryler ses substrats intracellulaires, dont la protéine kinase B (PKB ou Akt) ce qui permet son activation (Anderson et al., 1998).

Akt est une serine/threonine kinase qui existe sous trois isoformes hautement homologues (Akt1, Akt2 et Akt3) composées de trois domaines fonctionnels : un domaine PH en extrémité N-terminale, un domaine serine/threonine kinase et un domaine régulateur en extrémité C-terminale (Whiteman et al., 2002). En absence de stimulation, Akt est inactive par sa séquestration au niveau cytosolique par la protéine Trb3 (Du et al., 2003). En réponse à l'insuline, La protéine adaptatrice APPL1 entre en compétition avec Trb3 pour lier Akt et favorise ainsi son recrutement au niveau de la membrane plasmique (Cheng et al., 2014). Akt se lie au PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3 (produits de la PI3K) via son domaine PH, à l'instar de la PDK1 (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). L'interaction entre le domaine PH et les phosphoinositides membranaires conduit à un changement conformationnel au niveau d'Akt, démasquant ainsi le site Thr308 (pour Akt1) situé dans la boucle d'activation du domaine kinase qui sera phosphorylé par la PDK1 (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Afin d'être complètement active, Akt est ensuite phosphorylée sur le résidu Ser473 (pour Akt1) par le complexe rictor-mTOR (Sarbasov et al., 2005). Une fois activée, Akt va à son tour phosphoryler ses substrats et participe ainsi dans la médiation des effets métaboliques de l'insuline (Figure 9) :

iv. Métabolisme glucidique :

Stimulation de la synthèse de glycogène : La glycogène synthétase est une enzyme nécessaire à la synthèse de glycogène. Elle est régulée négativement par phosphorylation par la GSK3 (Glycogen synthase kinase 3). En phosphorylant la protéine GSK3, Akt module l'activité de cette enzyme et la rend inapte à inhiber la glycogène synthétase, activant ainsi la synthèse de glycogène (Cross et al., 1995).

Stimulation du captage du glucose sanguin dans le muscle squelettique et le tissu adipeux : Les protéines TBC1D1 (TBC1 domain family member 1) et TBC1D4 [TBC1 domain family member 4, appelé aussi AS160 (Akt substrate of 160 kDa)]

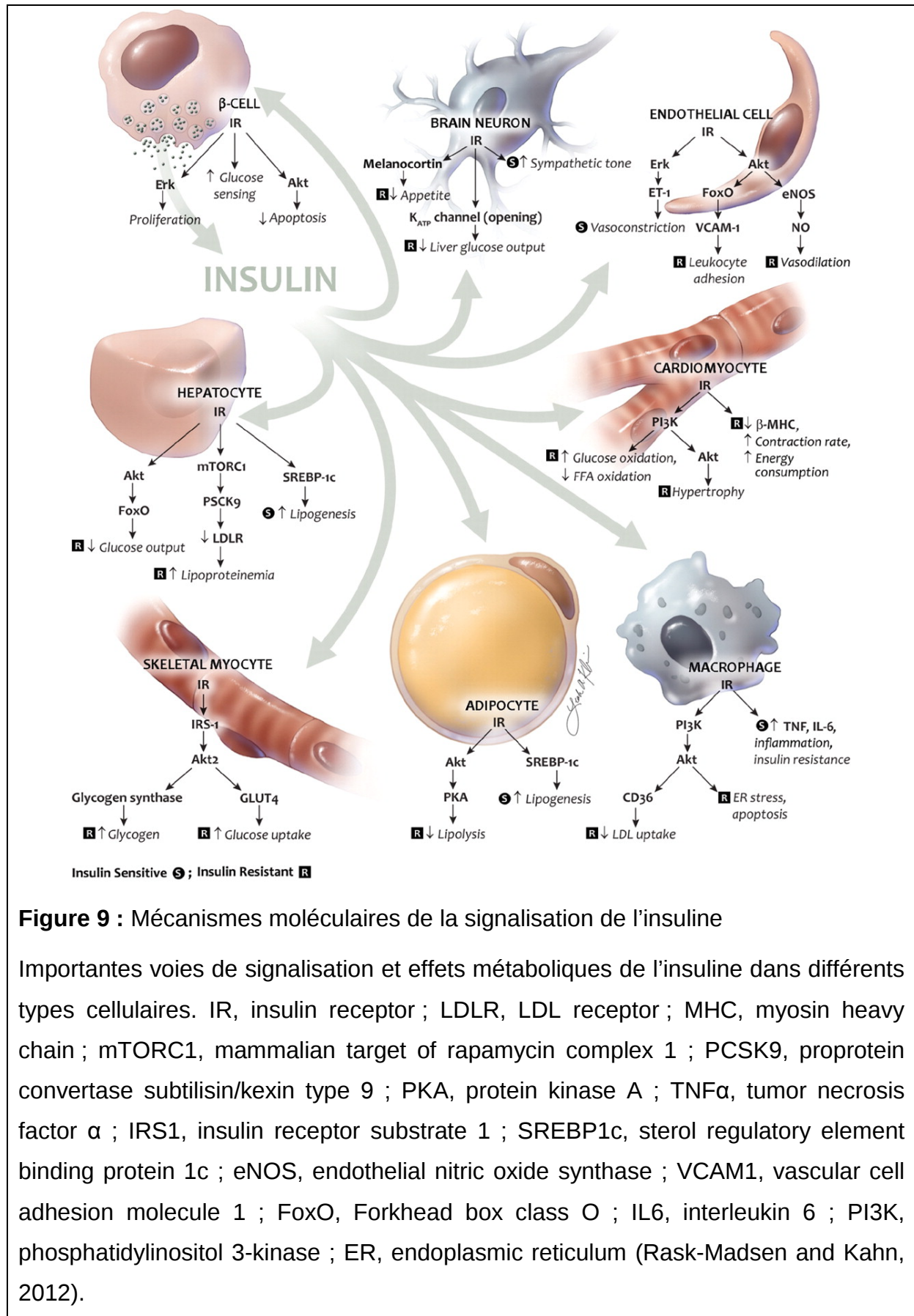


Figure 9 : Mécanismes moléculaires de la signalisation de l'insuline

Importantes voies de signalisation et effets métaboliques de l'insuline dans différents types cellulaires. IR, insulin receptor ; LDLR, LDL receptor ; MHC, myosin heavy chain ; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1 ; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 ; PKA, protein kinase A ; TNF α , tumor necrosis factor α ; IRS1, insulin receptor substrate 1 ; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein 1c ; eNOS, endothelial nitric oxide synthase ; VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1 ; FoxO, Forkhead box class O ; IL6, interleukin 6 ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; ER, endoplasmic reticulum (Rask-Madsen and Kahn, 2012).

exercent un effet inhibiteur sur la translocation des vésicules contenant le transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique (Sakamoto and Holman, 2008). La phosphorylation des protéines TBC1D1 et TBC1D4 par Akt conduit à leur inhibition et active donc la translocation des vésicules contenant les transporteurs de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique favorisant ainsi le transport du glucose circulant vers les tissus où le transport de glucose est insulino-dépendant (Sakamoto and Holman, 2008; Sano et al., 2003).

Inhibition de la néoglucogenèse hépatique : FOXO1 (forkhead box1) est un facteur de transcription localisé au niveau du noyau cellulaire où il active la transcription de deux enzymes clés impliquées dans la voie de la néoglucogenèse : La glucose 6 phosphatase et la PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase) (Nakae et al., 2001; Puigserver et al., 2003). La phosphorylation de FOXO1 par Akt inhibe la translocation de FOX1 du cytoplasme vers le noyau. Ainsi il sera séquestré au niveau cytosolique, où il sera ubiquitiné puis dégradé diminuant ainsi la production de glucose hépatique (Rena et al., 1999).

v. Métabolisme protéique :

Stimulation de la synthèse protéique : Le complexe TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis proteins 1 and 2) est un complexe protéique cytoplasmique impliqué dans certaines voies de signalisation impliquant la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) et intervenant dans la croissance cellulaire (Huang and Manning, 2008). En effet ce complexe régule négativement la synthèse protéique en inhibant l'activation de mTOR (Laplanche and Sabatini, 2009) et sa phosphorylation par Akt conduit à son inhibition (Huang and Manning, 2009; Inoki et al., 2002). mTOR, n'étant plus inhibé, va pouvoir stimuler les voies impliquées dans la synthèse protéique (Laplanche and Sabatini, 2009).

vi. Métabolisme lipidique :

Inhibition de la lipolyse : La lipolyse permet la mobilisation des réserves lipidiques (triglycérides) du tissu adipeux blanc. Elle est principalement stimulée par les catécholamines qui entraînent une élévation de l'AMPc suite à l'activation de leur récepteur couplé aux protéines G (Jocken and Blaak, 2008). L'augmentation des niveaux d'AMPc conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Taylor et al., 2005) qui stimule la HSL (hormone sensitive lipase)(Krintel et al., 2009) qui va alors dégrader les triglycérides en acides gras qui seront ensuite libérés dans la circulation générale couplés à l'albumine. Akt inhibe la lipolyse par l'intermédiaire de la phosphorylation et l'activation de la phosphodiesterase PDE3B qui va entraîner la conversion de l'AMPc en 5'AMP. La quantité d'AMPc intracellulaire étant diminuée, elle conduit à une baisse de l'activité de la PKA et l'inhibition de la lipolyse (Degerman et al., 1998; Kitamura et al., 1999). Cependant, des études récentes montrent que la phosphorylation de PDE3B par Akt n'est pas requise pour inhiber la lipolyse suite à une stimulation par l'insuline. Ces études suggèrent que l'effet anti-lipolyse de l'insuline passerait en partie par une voie Akt-indépendante (Choi et al., 2010; DiPilato et al., 2015).

Stimulation de la lipogénèse : Comme pour la synthèse protéique, la synthèse des lipides est stimulée par l'activation de mTOR. mTOR active le facteur de transcription SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1c) qui stimule l'expression de deux enzymes clés impliquées dans la voie de la lipogénèse : l'ACC (Acétyl CoA Carboxylase) et la FAS (Fatty Acyl Synthase). Akt en phosphorylant le complexe TSC1/2, lève l'inhibition exercée sur mTOR, activant ainsi la lipogénèse (Laplane and Sabatini, 2013).

vii. La voie des MAPK :

A côté de la voie IRS/PI3k/Akt, la voie des MAPK constitue la 2^{ème} voie de signalisation majeure induite par l'insuline. L'activation de cette voie se fait par l'intermédiaire des IRS (Myers et al., 1994; Waters et al., 1993) mais aussi par SHC (Ouwens et al., 1994; Sasaoka et al., 1994). La phosphorylation des IRS et de SHC sur tyrosine par le récepteur de l'insuline est nécessaire leur interaction avec le domaine SH2 de Grb2 (Lowenstein et al., 1992; Skolnik et al., 1993) (Figure 8).

Grb2 possède aussi deux domaines SH3 qui vont lui permettre de se lier et d'activer le facteur d'échange Sos (Son Of Sevenless). L'interaction du complexe Grb2/Sos avec les protéines IRS ou SHC induit la translocation de la protéine Sos du cytosol vers la membrane plasmique, permettant le rapprochement du complexe Grb2/Sos et de Ras, une protéine de la famille des petites protéines G (Cussac et al., 1999; Lowenstein et al., 1992; Ravichandran et al., 1995; Sondermann et al., 2004).

Sos est un facteur d'échange GEF (Guanine nucleotide exchange factor) qui permet l'échange GDP/GTP de l'ensemble des molécules de la super famille Ras (Li et al., 1993). Ce dernier catalyse la conversion de Ras de la forme Ras-GDP inactive vers la forme Ras-GTP active, qui constitue le point de départ d'une cascade de phosphorylations sur des résidus sérine et thréonine impliquant plusieurs protéines kinases (Baltensperger et al., 1993; Egan et al., 1993). En effet, cette cascade de signalisation comprend : Raf (MAPKKK, MAPK extracellular regulated ERK kinase)/MEK (MAPKK, MAPK ERK activating kinase)/ MAPK (Mitogen activated protein kinase) p42 ERK1 et p44 ERK2 (Kyriakis et al., 1992; Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993).

Par conséquent, après la stimulation à l'insuline, p42 ERK1 et p44 ERK2 phosphorylées passent au niveau nucléaire pour activer par phosphorylation de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire (Davis, 1995). Ces facteurs de transcription comprennent Elk1 qui forme un complexe avec SRF (Serum Response Factor) pour se lier à l'élément de réponse SRE (serum response element) du promoteur du gène c-fos (Dalton and Treisman, 1992; Hipkind et al., 1991; Thompson et al., 1994). Le gène c-fos est transcrit en quelques minutes et constitue un des gènes de réponse précoce IEG (Immediate Early Gene). L'ensemble des protéines issues de la transcription des IEG sont eux-mêmes des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Angel and Karin, 1991; Hill and Treisman, 1995; Hurd et al., 2002).

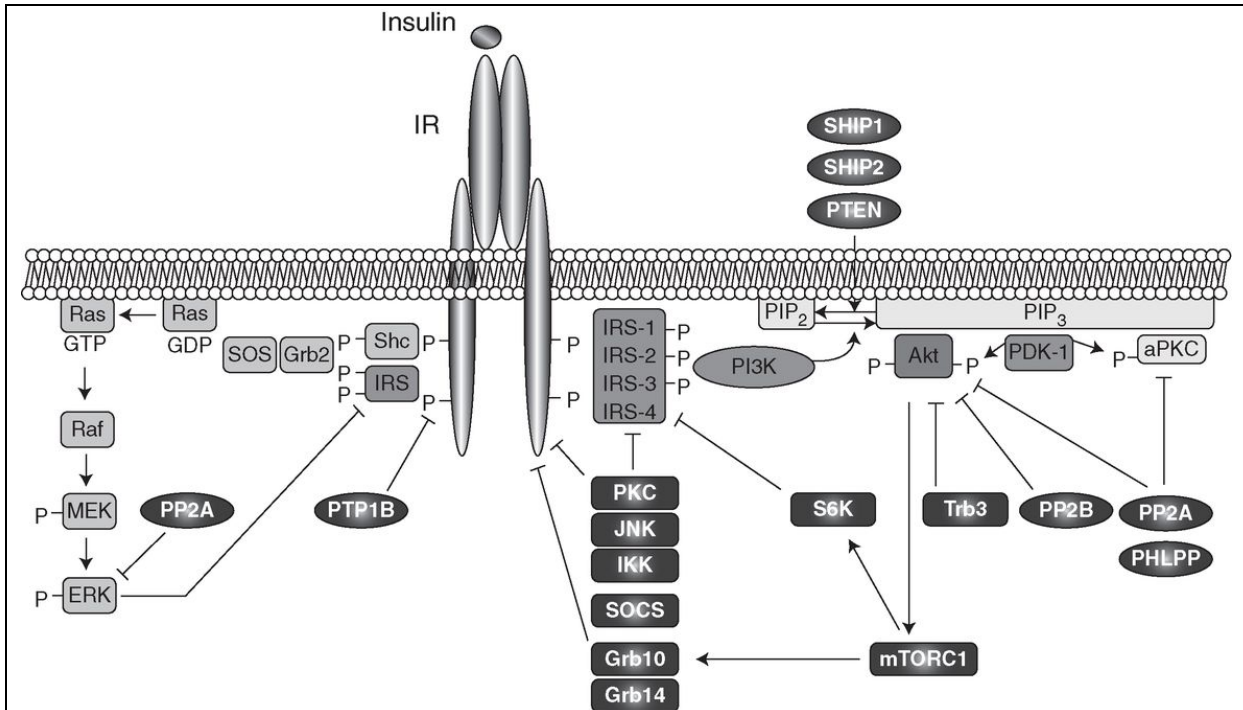


Figure 10 : Mécanismes de régulation négative de la signalisation de l'insuline

La signalisation de l'insuline est atténuée par l'action de plusieurs phosphatases (PTP1B, PTEN, PP2A, PP2B, PHLPP) en déphosphorylant le récepteur de l'insuline, les protéines IRS, la PKCa, les MAP kinases ERK1/2 ou les PIP3. De plus, les serine/thréonine kinases activées en réponse au stress et à l'inflammation telles que JNK, IKK, ERK1/2, PKC ou la S6K, inhibent la signalisation de l'insuline en induisant des phosphorylations inhibitrices sur les résidus serine des protéines IRS. Les protéines SOCS et Grb se lient au récepteur et empêchent la fixation des substrats du récepteur de l'insuline à ce dernier. Trb3 inhibe Akt en la séquestrant en niveau cytosolique (adapté de Boucher et al., 2014)

viii. Régulation négative de la signalisation de l'insuline (Figure 10) :

Plusieurs mécanismes de rétrocontrôle négatif vont permettre l'atténuation de la signalisation de l'insuline afin de retrouver un niveau basal. Ces principaux mécanismes sont l'internalisation du complexe hormone/récepteur, la phosphorylation des IRS sur les résidus sérine et thréonine, la déphosphorylation du récepteur de l'insuline et des IRS sur les résidus tyrosine et la déphosphorylation des PI(3,4,5)P3 par des phosphatases de lipides.

L'internalisation du complexe hormone/récepteur : Un des mécanismes qui permet une atténuation générale du signal insulinémique et qui est commun à l'ensemble des récepteurs membranaires est l'internalisation et la dégradation du complexe Ligand/Récepteur. En effet, la liaison de l'insuline à son récepteur est rapidement suivie de l'internalisation du complexe insuline/récepteur. Après l'endocytose, les récepteurs de l'insuline sont en grande partie recyclés vers la surface cellulaire alors que l'insuline et une fraction des récepteurs sont dirigées vers les endosomes tardifs puis les lysosomes où elles seront dégradées (Di Guglielmo et al., 1998; Fagerholm et al., 2009; McClain, 1992).

La phosphorylation des IRS sur les résidus sérine et thréonine : La phosphorylation des résidus sérine et/ou thréonine des IRS constitue un mécanisme majeur de régulation négative de la signalisation de l'insuline. Les IRS possèdent plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur sérine tels que les serines 24, 270, 307, 318, 612, 632, 789 et 1101 pour IRS1 et les serines 484 et 488 pour IRS2 (Boucher et al., 2014). Cependant, la phosphorylation sur la serine 307 est celle qui a été la plus décrite pour son implication dans l'obésité et la résistance à l'insuline (Aguirre et al., 2002 ; Boucher et al., 2014). Ces phosphorylations entraînent une inhibition des fonctions des IRS et ont pour conséquences :

- L'inhibition de l'association des protéines IRS au récepteur de l'insuline et par conséquent la baisse de leur phosphorylation sur les résidus tyrosines s'accompagne d'une baisse de leur activation (Liu et al., 2001a; Paz et al., 1997).
- Un encombrement des sites de phosphorylations sur les résidus tyrosines des IRS (Mothe and Van Obberghen, 1996).

- Une diminution de la liaison et de l'activation de la PI3K (Mothe and Van Obberghen, 1996; Ravichandran et al., 2001).
- Une relocalisation cellulaire des IRS les éloignant du récepteur de l'insuline (Clark et al., 2000; Tirosh et al., 1999).
- Une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Hotamisligil et al., 1996).
- Une dégradation des IRS par le protéasome (Haruta et al., 2000; Pederson et al., 2001).

Les IRS possèdent plus d'une centaine de sites potentiels de phosphorylation sur les résidus Sérine/Thréonine (Zick, 2005). Plusieurs des kinases impliquées dans la phosphorylation des IRS sur ces sites sont situées en aval dans la voie de signalisation (Liu et al., 2001b). Parmi elles on peut citer la PKC ζ (Lee et al., 2008b; Liu et al., 2001b; Ravichandran et al., 2001), Erk1/2 (De Fea and Roth, 1997; Engelman et al., 2000), mTOR/S6K1 (Um et al., 2004). Cependant, d'autres kinases peuvent être activées par des signaux extracellulaires comme le TNF α (Tumor necrosis factor α), les acides gras et le stress environnemental et vont inhiber l'action de l'insuline par la phosphorylation des IRS sur les résidus sérine/thréonine (Wellen and Hotamisligil, 2005; Zick, 2001). Parmi ces kinases on peut citer JNK (Aguirre et al., 2002; Rui et al., 2001), la GSK3 β (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997; Liberman and Eldar-Finkelman, 2005) et l'IKK (Inhibitor kappa β kinase) (Gao et al., 2002).

La déphosphorylation du récepteur de l'insuline et des IRS sur les résidus tyrosine : Les phosphotyrosines phosphatases (PTP) jouent également un rôle important dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline en déphosphorylant les résidus tyrosines sur le récepteur de l'insuline ainsi que sur les IRS. La famille des PTP comprend plusieurs membres et parmi les principales protéines phosphatases on peut citer PTP1B, LAR (Leukocyte common antigen related), SHP2, PTP α , PTP ϵ et CD45. Cependant, la protéine PTP1B est celle qui a reçu le plus d'attention, son implication dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline a été clairement décrite (Asante-Appiah and Kennedy, 2003; Goldstein et al., 2000; Wang et al., 2001). En effet, les souris KO pour PTP1B présentent une insulino-sensibilité et une phosphorylation accrue du récepteur à l'insuline (Elchebly et al., 1999; Klamman et al., 2000) alors que la surexpression transgénique de PTP1B

dans le muscle ou le foie de souris conduit à une résistance à l'insuline (Haj et al., 2005; Zabolotny et al., 2004).

La déphosphorylation des PI(3,4,5)P3 : La déphosphorylation des phosphoinositides PI(3,4,5)P3 par les lipides phosphatases constitue aussi un des mécanismes de régulation négative de la signalisation de l'insuline. Les deux principales phosphatases de lipides responsables de la dégradation des PI(3,4,5)P3 et impliquées dans l'action de l'insuline sont PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10) et SHIP2 (SH2 containing inositol phosphatase 2). PTEN déphosphoryle les PI(3,4,5)P3 en position 3' menant à la formation de PI(4,5)P2 alors que SHIP2 déphosphoryle les PI(3,4,5)P3 en position 5' produisant ainsi des PI(3,4)P2. La déphosphorylation des phosphoinositides par PTEN et SHIP2 conduit à l'inhibition des effets insulino-dépendants en inhibant l'activation des intermédiaires en aval de la PI3K, dont Akt. En effet, la surexpression de PTEN ou de SHIP2 inhibe l'activation de Akt et entraîne une diminution de la translocation de GLUT4 et du transport de glucose insulino-dépendant alors que leur inhibition produit l'effet inverse (Clément et al., 2001; Nakashima et al., 2000; Wada et al., 2001).

Les « Suppressor Of Cytokine Signaling » SOCS1 et SOCS3 : Les protéines SOCS1 et SOCS3 participent également à la régulation négative de la signalisation de l'insuline. Ces protéines vont inhiber la transmission du signal insulinémique par différents mécanismes :

- Leur liaison directe sur le récepteur de l'insuline qui conduit à un encombrement stérique empêchant donc la fixation d'autres substrats et la phosphorylation des IRS sur tyrosines (Emanuelli et al., 2000; Peraldi et al., 2001; Ueki et al., 2004).
- Leur liaison sur les IRS provoque leur ubiquitination et entraîne leur dégradation par le protéasome (Rui et al., 2002; Shi et al., 2004).

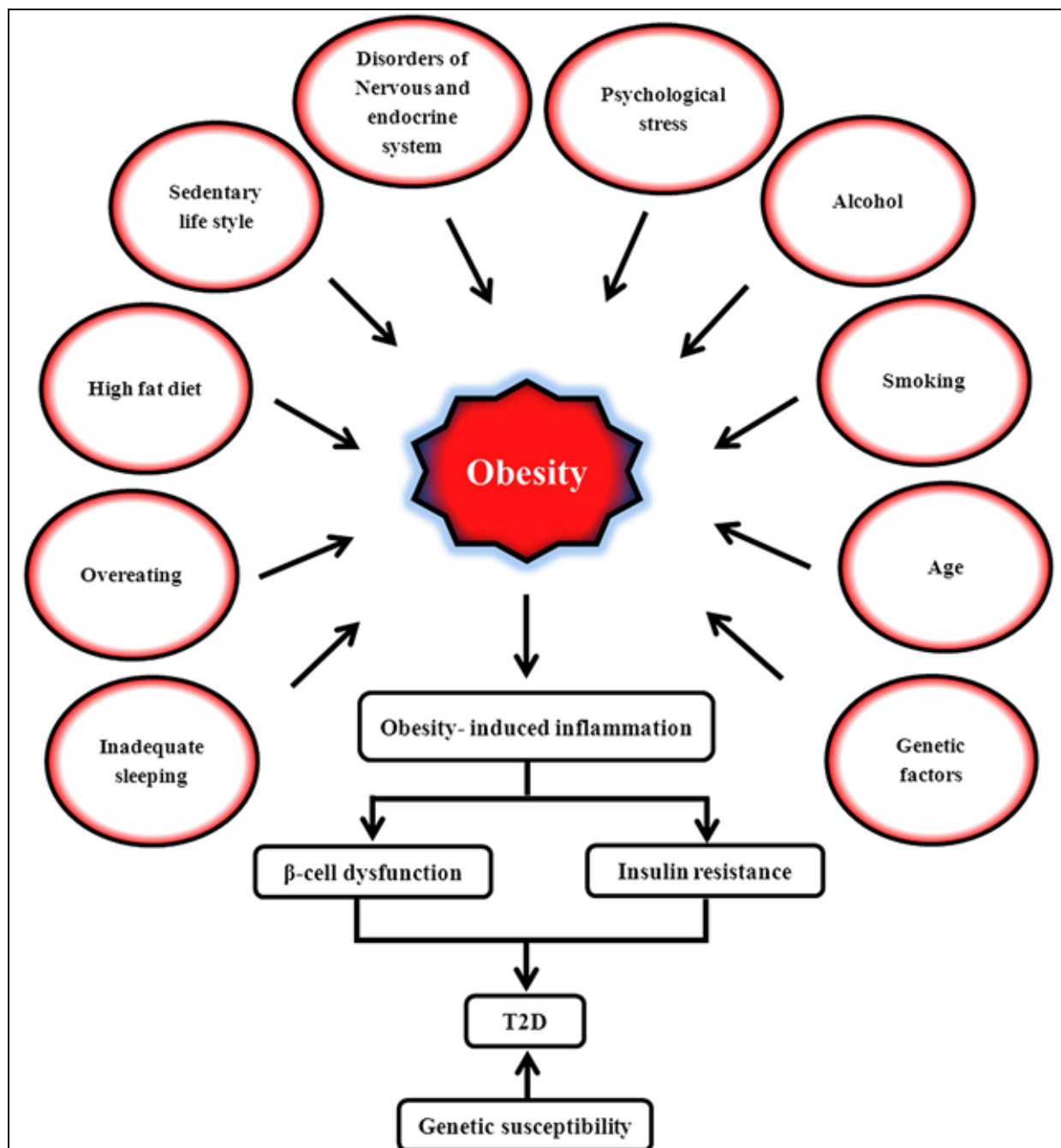


Figure 11 : Facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux impliqués dans le développement du diabète de type 2 (Khodabandehloo et al., 2016).

c. Résistance à l'insuline et diabète de type 2 :

i. Le diabète de type 2 :

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. Il existe plusieurs types de diabète, les plus fréquents sont :

Le diabète de type 1, qui représente 5 à 10% de tous les cas de diabète, est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules β pancréatiques productrices d'insuline. La cause du diabète de type 1 n'est pas encore connue et le traitement nécessite une administration quotidienne d'insuline.

Le diabète de type 2, qui est la forme la plus commune du diabète représente 90% des cas. Il est principalement dû à un état de résistance à l'insuline. En effet, ce dernier survient lorsqu'une personne résistante à l'action de l'insuline ne parvient plus à sécréter suffisamment d'insuline pour compenser l'inefficacité ou l'efficacité réduite de l'hormone. Bien que l'hérédité soit un de facteurs de prédisposition au diabète de type 2, ce dernier est en grande partie le résultat d'un mode de vie sédentaire et d'une alimentation inappropriée notamment hypercalorique (Figure 11).

La prévalence du diabète de type 2 est en constante progression. En 2014, la prévalence mondiale du diabète était estimée à 9% chez les adultes âgés de 18 ans et plus. Cependant, l'OMS prévoit le doublement de la population diabétique en 2030, notamment en raison de la progression du diabète de type 2 dans les pays en voie de développement (source WHO, World Health Organization).

Le diabète de type 2 est une maladie aux conséquences graves pouvant entraîner de sérieuses complications cliniques à long terme allant jusqu'à la mort. En effet, en 2012, on estime que le diabète a été la cause directe de 1,5 millions de décès et en 2030, l'OMS prévoit que le diabète sera la septième cause de décès dans le monde (source WHO, world Health organization).

Le diabète de type 2 n'était habituellement observé que chez l'adulte, mais on le trouve désormais aussi chez l'enfant (Rapaport et al., 2004; Rosenbloom et al.,

1999). L'obésité abdominale de même que le syndrome métabolique font partie des facteurs de risque les plus souvent associés à cette maladie.

ii. La résistance à l'insuline :

La résistance à l'insuline est définie comme étant une incapacité de l'insuline à favoriser le transport du glucose de la circulation sanguine vers les tissus cibles (DeFronzo and Tripathy, 2009). Afin de compenser cette baisse de réponse à l'insuline, les cellules β du pancréas vont produire davantage d'insuline pour contrer l'hyperglycémie progressive. Cependant, si la résistance à l'insuline continue de s'aggraver, les cellules β ne parviendront plus à produire suffisamment d'insuline pour maintenir l'équilibre glycémique et l'intolérance au glucose apparaîtra, pour finalement devenir un diabète de type 2 (Meshkani and Adeli, 2009).

La résistance à l'insuline est une condition physio-pathologique associée à l'apparition de plusieurs complications métaboliques plus importantes, comme les maladies cardiovasculaires, certaines formes de cancer, la stéatose hépatique non alcoolique et le diabète de type 2 (Reaven, 2005).

Les mécanismes moléculaires responsables de la diminution de l'action de l'insuline et à l'origine de la résistance à l'insuline ne sont pas encore entièrement résolus. Cependant plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la résistance à l'insuline, telles que la diminution du nombre de récepteur de l'insuline de la surface membranaire, un défaut de liaison de l'insuline sur son récepteur ou une production anormale d'insuline, mais d'après plusieurs études, la cause majeure de la résistance à l'insuline se situerait au niveau de la signalisation du récepteur de l'insuline et impliquerait les mécanismes de régulation négative de la signalisation de l'insuline détaillés dans le chapitre précédent (Choi and Kim, 2010; Meshkani and Adeli, 2009).

La phosphorylation des IRS sur les résidus sérine/thréonine empêche ainsi la transmission du signal de l'insuline (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2010; Choi and Kim, 2010). La surexpression de la phosphotyrosine phosphatase PTP1B ou celle de SOCS3 peut également induire une résistance à l'insuline. En effet, ces deux molécules constituent des cibles majeures pour le traitement du diabète de type 2

(Asante-Appiah and Kennedy, 2003; Cheng et al., 2002; Drake and Posner, 1998; Goldstein et al., 1998).

Les mécanismes de désensibilisation à l'action de l'insuline impliquent plusieurs facteurs physiologiques. Parmi ces facteurs on peut citer l'obésité abdominale. L'accumulation excessive de tissu adipeux va entraîner une importante réponse inflammatoire (Bastard et al., 2006; Garcia et al., 2010). En effet, le tissu adipeux synthétise et sécrète des adipokines (résistine, leptine, adiponectine ...) de manière anormale ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α et IL6 (interleukine 6) (Antuna-Puente et al., 2008; Bastard et al., 2006; Shoelson et al., 2007; Wang and Nakayama, 2010). Au niveau cellulaire, ce sont ces adipokines et cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les adipocytes et les macrophages (infiltrant le tissu adipeux) qui joueraient un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline en activant les mécanismes de régulation négatifs bloquant ainsi la voie de signalisation de l'insuline (Antuna-Puente et al., 2008; Shoelson et al., 2007; Wellen and Hotamisligil, 2005). Ces mécanismes seront détaillés par la suite dans le chapitre 2.

L'obésité abdominale et la résistance à l'insuline sont également associées à une élévation de la concentration plasmatique en acides gras libres (AGL) et triglycérides. En effet, Il existe un lien direct entre les niveaux élevés des AGL et la résistance à l'insuline. Plusieurs études ont montré l'induction d'une résistance à l'insuline suite à une perfusion d'acides gras. Ces derniers agiraient d'ailleurs au même niveau que les adipokines et les cytokines pro-inflammatoires en exerçant leur effet inhibiteur par l'intermédiaire de la stimulation des mécanismes de régulation négatifs de la voie de l'insuline (Shoelson et al., 2007). Les triglycérides quant à eux seraient responsables de la lipotoxicité dans les tissus non adipeux, comme le foie et le muscle squelettique, dans lesquels ils vont s'accumuler après le dépassement de la capacité de stockage du tissu adipeux et perturberaient ainsi la signalisation de l'insuline dans ces tissus (Magnan and Ktorza, 2005).

Par ailleurs, l'hypoxie du tissu adipeux, le stress au niveau du réticulum endoplasmique peuvent aussi initier des réponses pro-inflammatoires par l'activation des serine/thréonine kinases JNK1 et IKK. Ces kinases en phosphorylant les

facteurs de transcription AP1, activent la transcription d'une série de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, ce qui conduit à une diminution de la sensibilité à l'insuline. Ces kinases peuvent aussi phosphoryler les IRS sur sérine/thréonine et inhiber la voie de signalisation du récepteur de l'insuline. Cependant, la déficience ou l'inhibition de JNK1 ou IKK dans différents modèles murins, permet de prévenir la résistance à l'insuline (Arkan et al., 2005; Solinas et al., 2007).

L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie peuvent également jouer un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline (Shanik et al., 2008). En effet, la sécrétion accrue d'insuline sert à compenser la baisse de réponse à l'insuline. Cependant, une exposition prolongée à de fortes concentrations en insuline peut engendrer une aggravation de la résistance à l'insuline via une désensibilisation homologue de la signalisation insulinémique qui va agir telle une boucle de rétroaction négative (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2010; Kawahito et al., 2009; Shanik et al., 2008).

La résistance à l'insuline est une condition qui, prise en charge rapidement, peut être corrigée. Plusieurs approches se sont avérées efficaces pour ralentir la progression de la résistance à l'insuline et ainsi empêcher ou retarder le développement du diabète de type 2. Parmi elles, une approche nutritionnelle est au premier plan grâce aux nombreuses études effectuées sur la proportion et le type des divers nutriments, dont les glucides à faible indice glycémique, les AGPI n-3 ou les protéines de poisson (Patel et al., 2009).

iii. Méthodes de mesure de la résistance à l'insuline :

Il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer la sensibilité à l'insuline, la plupart étant basées sur la mesure des concentrations plasmatiques en insuline et en glucose à jeun, ou lors de tests dynamiques dont la plupart nécessitent une administration préalable de glucose et/ou d'insuline. Parmi les méthodes les plus utilisées, le clamp euglycémique-hyperinsulinémique, le test de tolérance au glucose (GTT), le test de tolérance à l'insuline (ITT) et le HOMA-IR (homeostasis model

assessment for insulin resistance) (DeFronzo and Matsuda, 2010; Henriksen et al., 2010; Keskin et al., 2005; Tura et al., 2006).

Le clamp euglycémique-hyperinsulinémique est la méthode de référence pour mesurer la résistance à l'insuline (Kim, 2009; Matsuda and DeFronzo, 1999). Cette méthode consiste à administrer de l'insuline en perfusion intra-veineuse à débit constant afin de provoquer une hyperinsulinémie qui va inhiber la production hépatique de glucose et augmenter le transport du glucose dans les tissus insulino-sensibles (Tran et al., 2003). La glycémie est maintenue constante en perfusant du glucose. Le débit de glucose nécessaire pour maintenir l'euglycémie (concentration de glucose mesurée avant le début du test) permet une estimation de l'utilisation de glucose par les tissus périphériques. Plus la quantité de glucose à perfuser pour maintenir l'euglycémie est faible, moins les organes insulino-sensibles captent le glucose et plus le sujet est considéré comme résistant à l'insuline (DeFronzo et al., 1979; Piché et al., 2007). Cependant, du fait de sa complexité de mise en œuvre, cette technique ne peut être applicable en pratique clinique de tous les jours et ne peut être utilisée de manière chronique.

Le test de tolérance au glucose (GTT) est un test simple qui permet d'évaluer la capacité de l'organisme à faire diminuer la glycémie après une hyperglycémie provoquée. En pratique, le test consiste à suivre pendant deux heures les concentrations plasmatiques de glucose après l'hyperglycémie provoquée (Matsuda and DeFronzo, 1999; Stumvoll et al., 2000). L'analyse des résultats se fait par l'étude de l'aire sous la courbe (glycémie en fonction du temps). Cependant, ce test fournit des informations que sur la tolérance au glucose mais pas sur la sensibilité à l'insuline. Cette dernière peut être estimée par le test de tolérance à l'insuline (ITT). En effet, l'ITT permet de calculer un indice qui correspond à la vitesse de diminution de la glycémie entre 0 et 30 min après une injection de 0,1UI/kg d'insuline. Cependant, l'utilisation de ce test reste controversée en raison du risque potentiel d'occasionner des hypoglycémies et d'induire une contre-régulation hormonale, elle-même responsable d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (Bergman et al., 1985; Scheen et al., 1994).

Le HOMA-IR est obtenu à partir des concentrations plasmatiques à jeun d'insuline et de glucose. Cet index est basé sur un modèle mathématique fondé sur les réponses quantitatives des principaux organes impliqués dans la régulation du métabolisme du glucose (Matthews et al., 1985). L'index HOMA est donné par la formule suivante : $\text{HOMA-IR} = (I * G) / 22,5$ où I = insulinémie à jeun (mIU/l) et G = glycémie à jeun (mmol/L). Selon certaines études (Keskin et al., 2005), lorsque cet indice est élevé, indiquant une résistance à l'insuline hépatique, il corrèle bien avec la résistance à l'insuline périphérique mesurée à l'aide d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, ce qui en fait un indice fiable pour les études ne pouvant pas réaliser la mesure du clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Hanson et al., 2000; Muniyappa et al., 2000).

d. Résistance hépatique à l'insuline : Rôle homéostatique du foie

Le foie joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique de l'organisme et de la régulation de la glycémie. En effet, lors de la phase post prandiale, le foie va stocker le glucose en synthétisant un polymère de réserve, le glycogène (glycogénogénèse). Quand les stocks de glycogène sont saturés, le foie va utiliser le glucose pour produire des triglycérides qui vont être libérés dans la circulation sanguine (lipogénèse) sous forme de lipoprotéines. Cependant, en phase post absorptive, le foie va produire du glucose à partir de l'hydrolyse du glycogène (glycogénolyse) et si le jeûne se prolonge, la production de glucose par le foie va s'effectuer via la néoglucogénèse à partir de différents substrats comme les acides aminés, le lactate et le glycérol (Girard et al., 1997)(Girard, 1997).

Au niveau hépatique, l'insuline agit en inhibant la néoglucogénèse et la glycogénolyse tout en favorisant le stockage de glucose sous forme de glycogène (Boden, 2004). La résistance à l'insuline au niveau hépatique peut donc avoir des conséquences majeures sur la balance énergétique et le métabolisme lipidique. En effet, plusieurs études suggèrent que la résistance hépatique à l'insuline est suffisante pour induire plusieurs composantes du syndrome métabolique et favoriser le développement des maladies cardiovasculaires (Meshkani and Adeli, 2009). En revanche, beaucoup de questions restent en suspens concernant les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la résistance hépatique de l'insuline. Cependant, il est maintenant admis que l'inflammation chronique associée à l'obésité

viscérale est impliquée dans l'induction de la résistance hépatique à l'insuline. En effet, l'inflammation chronique est caractérisée par un dérèglement de la production d'adipokines (leptine, résistine, adiponectine) et de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL6) qui vont conduire à l'altération de la signalisation du récepteur à l'insuline. Cette résistance hépatique à l'insuline se traduit par une production excessive de glucose conduisant à une hyperglycémie, ainsi qu'une altération de la synthèse et du stockage hépatique des triglycérides (Meshkani and Adeli, 2009). En effet, les personnes atteintes de diabète de type 2 présentent des taux élevés d'acides gras au niveau hépatique en raison d'une diminution de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et la sécrétion des VLDL (Kraegen et al., 2001; Taghibiglou et al., 2000).

e. Résistance à l'insuline et maladies cardiovasculaires :

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Les MCV entraînant les accidents vasculaires cérébraux et l'infarctus du myocarde sont aujourd'hui la première cause de décès dans les pays industrialisés (WHO, world Health organization). Ces maladies proviennent d'une détérioration des vaisseaux sanguins par des mécanismes tels que l'athérosclérose et l'hypertension artérielle. La résistance à l'insuline est étroitement associée aux MCV. En effet, chez les individus résistant à l'insuline, les MCV sont l'une des causes majeures de la morbidité et la mortalité de ces sujets. Les effets vasodilatateurs de l'insuline de type endothélium-dépendant ont été montrés dans plusieurs études (Muniyappa and Quon, 2007; Steinberg et al., 1994). En effet, la perfusion d'insuline à des doses physiologiques et supra-physiologiques induit une diminution de la pression artérielle, une réduction de la résistance vasculaire périphérique et une augmentation du débit sanguin dans les lits vasculaires de muscles squelettiques (Baron and Brechtel, 1993; Laakso et al., 1990). La résistance à l'insuline provoque ainsi des altérations de la signalisation au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, conduisant à une diminution du débit sanguin, qui à son tour, va aggraver la résistance à l'insuline qui elle-même va contribuer à la dysfonction endothéliale dans un cercle vicieux réciproque.

f. Résistance à l'insuline et dyslipidémie :

L'insuline joue un rôle essentiel sur plusieurs enzymes clés du métabolisme des lipoprotéines. Un état de résistance à l'insuline est donc associé avec une grande fréquence à des anomalies des lipoprotéines. Deux types d'anomalies sont généralement observées : quantitatives et qualitatives (Vergès, 2005). L'hypertriglycémie est le phénomène quantitativement le plus notable. Elle est causée par l'augmentation de la production hépatique de VLDL (Very Low Density Lipoprotein) riches en triglycérides, due à l'abondance des substrats (acides gras libres). Cependant, la réduction du catabolisme des VLDL causée par la diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), due à la résistance à l'insuline contribue également au développement de l'hypertriglycémie (Taghibiglou et al., 2000; Watts and Chan, 2010). La baisse des HDL (High Density Lipoprotein) par un catabolisme accru constitue aussi l'une des principales anomalies quantitatives des lipoprotéines associées à la résistance à l'insuline (Pouliot et al., 1992). Les HDL jouent un rôle important dans le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie et exercent également des effets directs anti-inflammatoires et antioxydants sur l'endothélium vasculaire (Lewis and Rader, 2005; Navab et al., 2005). Les anomalies qualitatives sont quant à elles, dominées par la taille faible et la densité élevée des LDL et leur enrichissement en triglycérides (Packard, 2006; Reaven et al., 1993; Sacks and Campos, 2003) et la glycation des apoprotéines des LDL (Lyons, 1991; Witztum et al., 1982). Ainsi, la glycation de l'apolipoprotéine B des LDL ralentit son catabolisme physiologique ce qui rend les LDL plus sensibles à l'oxydation par radicaux libres (Moro et al., 1999). Cette oxydation des LDL permet leur élimination en accroissant leur capture par les macrophages (Lyons and Jenkins, 1997; Lyons et al., 1987).

4. Modèles d'études de l'obésité et la résistance à l'insuline chez le rongeur :

L'étude de pathologies nécessite souvent la mise en place de modèles animaux développant des symptômes se rapprochant le plus possible de ceux retrouvés chez l'homme. Dans cette optique, de nombreux modèles animaux du syndrome métabolique ont été développés. Ils sont utilisés à la fois pour la compréhension

générale de ces mécanismes ou des désordres métaboliques qui leur sont associés, mais aussi pour tester l'efficacité de traitements potentiels contre ces maladies. De nombreuses études sont réalisées chez les rongeurs car ceux-ci présentent un grand nombre de gènes d'intérêt similaires à ceux retrouvés chez l'homme et sont des animaux faciles à élever en animalerie. Nous détaillerons donc ici quelques modèles de rongeurs fréquemment utilisés dans l'étude de l'obésité et la résistance à l'insuline en distinguant les modèles génétiques des modèles obtenus par « induction » des pathologies étudiées.

a. Modèle génétique :

De nombreux modèles génétiques de rongeurs obèses ou diabétiques sont utilisés en laboratoire. Parmi les modèles les plus utilisés, les souris ob/ob, les souris db/db, les rats Zucker, les rats OLETF et les rats Goto-Kakizaki. La plupart de ces modèles sont caractérisés par des mutations apparues spontanément et sont utilisés depuis des dizaines d'années. Ces modèles sont utiles pour la compréhension de certains mécanismes moléculaires spécifiques impliqués dans le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline. Toutefois, ces modèles animaux ne sont pas représentatifs du syndrome métabolique puisque ce dernier n'est pas dû à une altération monogénique.

Les souris ob/ob font partis des premiers modèles génétiques utilisés pour l'étude du diabète (Enser, 1972). Ces souris sont porteuses d'une mutation autosomique récessive sur le gène de la leptine sur le chromosome 6 (Friedman et al., 1991; Zhang et al., 1994). Elles sont obèses et développent une hyperinsulinémie et hyperglycémie dès leur 4ème semaine de vie (Dubuc, 1976) et une diminution de la tolérance au glucose, une stéatose hépatique et une inflammation après 12 semaines (Bigorgne et al., 2008; Van den Bergh et al., 2008). Cependant, ces souris ne représentent pas un modèle complet du syndrome métabolique, puisqu'elles sont caractérisées par une baisse de la pression artérielle (Mark et al., 1999) et ne développent pas de dyslipidémie (Van den Bergh et al., 2008).

Les souris db/db présentent une mutation autosomique récessive sur le gène du récepteur à la leptine sur le chromosome 4 (Chen et al., 1996). Ces souris présentent un poids corporel plus important que des souris normales dès leur 6ème

semaine suivant la naissance (Dong et al., 2010). Dès 8 semaines, les souris db/db présentent une hyperglycémie, une hypertriglycérémie, une hypercholestérolémie et une augmentation des niveaux d'acides gras non estérifiés (Ae Park et al., 2006). Elles présentent également une hyperinsulinémie et une diminution de la tolérance au glucose dès 12 semaines (Dong et al., 2010; Winzell et al., 2010) et développent par la suite une stéatose hépatique (Dong et al., 2010). Cependant ces souris ne développent pas d'inflammation hépatique (Sahai et al., 2004).

Les rats diabétiques ZDF (Zucker diabetic fatty rats) (fa/fa) sont porteurs de la mutation autosomale récessive *fatty* (fa) sur le gène codant pour récepteur à la leptine (Scarda et al., 2010). En effet, les rats homozygotes (+/+) et hétérozygotes (fa/+) pour la mutation ne présentent pas de phénotypes obèses. Les rats ZDF développent rapidement une hyperglycémie, hyperinsulinémie et une hypertriglycérémie (van den Brom et al., 2009; Mizuno et al., 2002). Ces rats développent également une augmentation de la pression artérielle (Serpillon et al., 2009). En outre, les rats ZDF présentent une élévation de certains marqueurs de l'inflammation caractéristiques de l'obésité comme TNF α et IL1 β (Ferreira et al., 2010).

Les rats OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) présentent une déficience en récepteurs CCK-1 et sont donc insensibles à l'action de la cholécystokinine (CCK) qui se traduit principalement par une absence d'inhibition de la prise alimentaire en réponse à l'ingestion de lipides (Moran and Bi, 2006). Au bout de 20 semaines, les rats OLETF présentent un poids corporel supérieur à celui de leurs contrôles, les rats minces Long-Evans Tokushima Otsuka (Kawano et al., 1994). Ils développent à terme une hyperglycémie, une hypertriglycérémie et une intolérance au glucose (Kawano et al., 1994).

Les rats Goto-Kakizaki sont des porteurs spontanés d'un diabète de type 2 (Yasuda et al., 2002) et sont utilisés pour étudier le syndrome métabolique. Ces animaux non-obèses développent une hyperglycémie précoce associée à une intolérance au glucose (Rees and Alcolado, 2005). Ce modèle est également caractérisé par une résistance à l'insuline et un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques caractéristiques du diabète de type 2 (Rees and Alcolado,

2005). Ces animaux développent aussi plusieurs anomalies cardiovasculaires au bout de 20 semaines (Panchal and Brown, 2011)

b. Induction du syndrome métabolique : les agents chimiques

L'alloxane et la streptozotocine sont des analogues du glucose. En effet, par cette analogie structurale, ces deux molécules pénètrent dans les cellules β pancréatiques par l'intermédiaire du transporteur de glucose GLUT2, induisant ainsi une nécrose sélective des cellules β pancréatiques (Lenzen, 2008; Spadella et al., 2010).

L'utilisation de la streptozotocine chez les rongeurs est fréquente et permet de mimer le diabète de type 1. Cependant, le diabète de type 2 peut être aussi induit par la streptozotocine en injectant de faible dose de cette molécule chez de jeunes rats (Sinzato et al., 2009). En effet, ceci conduit au développement d'une hyperglycémie modérée à l'âge adulte ainsi qu'une résistance à l'insuline associée à une augmentation plasmatique de certains marqueurs de l'inflammation (Sharma and Srinivasan, 2009).

c. Induction du syndrome métabolique : les régimes alimentaires

L'induction de l'obésité ou de la résistance à l'insuline par une approche nutritionnelle chez les rongeurs permet de mimer les pathologies humaines. L'alimentation joue un rôle important dans la croissance et le développement de l'organisme et la composition des différents aliments détermine le statut nutritionnel. En effet, les régimes alimentaires varient par la nature des nutriments apportés. Dans les pays occidentaux, les régimes utilisés sont hypercaloriques, riches en glucides (tels que le fructose et le saccharose) ainsi qu'en acides gras saturés. Cet apport calorique accru est associé à de nombreuses complications induites donc par l'alimentation, y compris le syndrome métabolique. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'installation de l'obésité et du diabète de type 2 induit par les régimes alimentaires, des combinaisons de régimes riches en glucides, riches en acides gras saturés ou les deux ont été utilisées chez les rongeurs pour mimer les signes et symptômes du syndrome métabolique humain.

i. Régimes enrichis en glucides

Le fructose est devenu un ingrédient omniprésent dans les régimes occidentaux (Miatello et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). Au cours des cinquante dernières années, il y a eu une forte augmentation de l'utilisation du fructose dans notre alimentation. Cette dernière est accompagnée par une augmentation proportionnelle de l'incidence de l'obésité (Bray, 2004). Les principales sources de fructose dans l'alimentation sont le saccharose (constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose), le sirop de maïs à haute teneur en fructose, les fruits et le miel.

L'utilisation du fructose chez le rat induit une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose, une hypertension artérielle et une dyslipidémie (Lê and Tappy, 2006; Tran et al., 2009). Cependant, les études divergent en ce qui concerne l'induction de l'obésité (Bocarsly et al., 2010; Panchal et al., 2011). Au niveau du foie, le régime riche en fructose induit une stéatose et une fibrose hépatique ainsi qu'une inflammation lobulaire (Kawasaki et al., 2009). Le fructose conduit également à l'augmentation des acides gras libres, de la leptinémie et de l'adiponectinémie, diminuant ainsi la sensibilité à l'insuline (Alzamendi et al., 2009; Melanson et al., 2008). Le développement d'une résistance à la leptine a aussi été observé (Shapiro et al., 2008).

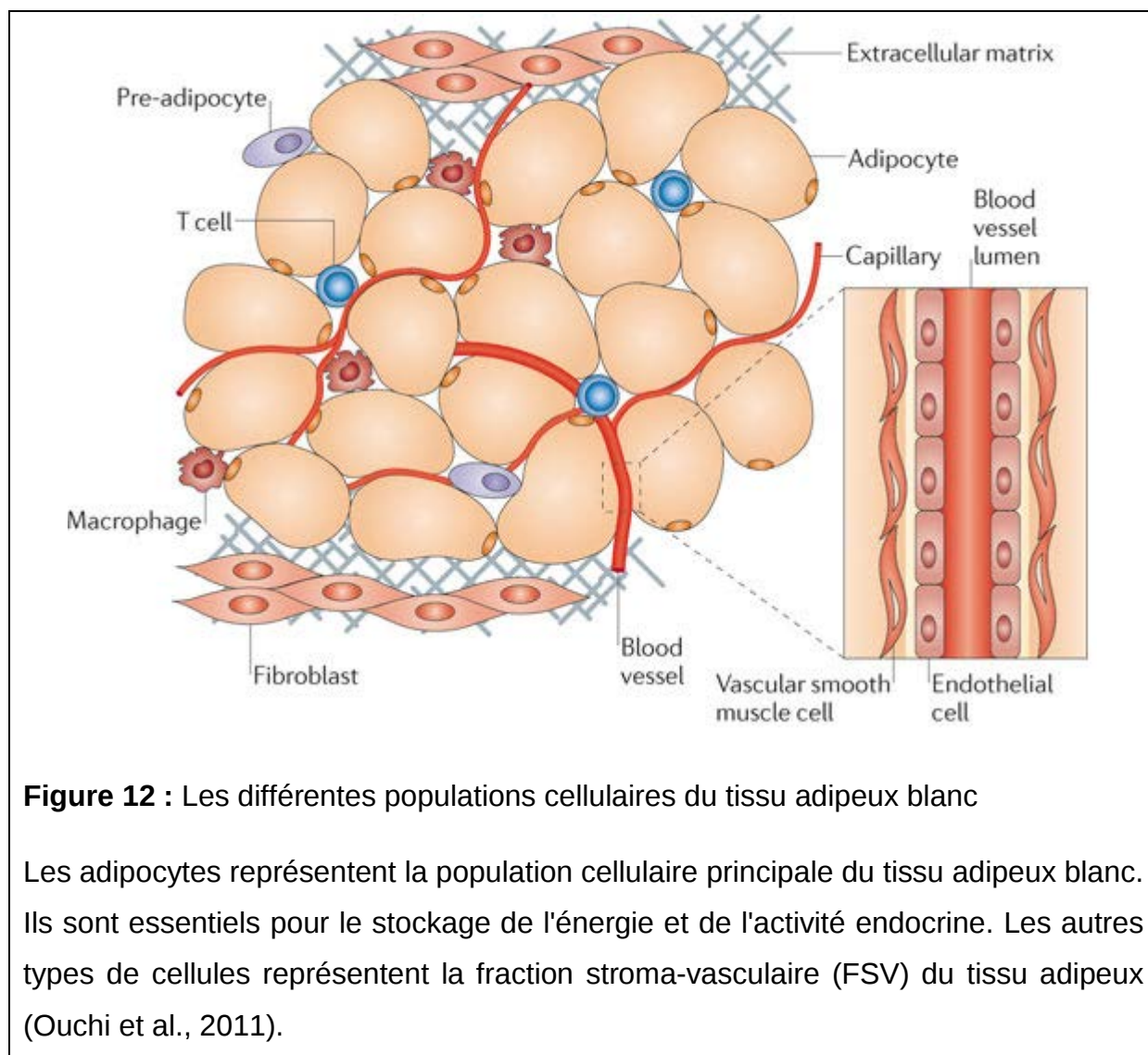
Le saccharose est une source alimentaire de fructose (Tappy and Lê, 2010) ce qui a conduit à son utilisation dans des modèles animaux afin de mimer le syndrome métabolique humain. En effet, un régime riche en saccharose induit une hyperinsulinémie, une hyperleptinémie, une hypertriglycéridémie, une hyperglycémie, une élévation des niveaux d'acides gras libres et une intolérance au glucose (Coelho et al., 2010; Lombardo et al., 1996). Cependant, de la même manière que le fructose, les résultats concernant l'induction de l'obésité par le saccharose restent controversés (Kanarek et al., 1987; Santuré et al., 2002). Le régime riche en saccharose conduit aussi à une augmentation de la pression artérielle (Sharma et al., 2008) et à une stéatose hépatique (Huang et al., 2010).

ii. Régimes enrichis en lipides

Les régimes riches en graisses, également appelé High-Fat diet (HFD) ont été utilisés pour induire l'obésité, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline chez les

rongeurs pendant plusieurs années. Une des premières descriptions de l'utilisation d'un régime HFD pour induire l'obésité date de la fin des années 1950 (Masek and Fabry, 1959). Aujourd'hui, un grand nombre de protocoles basés sur la modification du régime alimentaire dans le but d'étudier le syndrome métabolique utilisent des régimes HFD. Cependant, la grande variabilité dans les protocoles expérimentaux rend la comparaison entre les différentes études délicate. Classiquement, ces régimes HFD contiennent un pourcentage de calories apportées par les lipides compris entre 35 % et 60 % ce qui se traduit par une baisse de l'apport protéique. L'origine des lipides utilisés peut être animale (lard, huile de poisson...) ou végétale (huile d'olive, huile de coco...). Cette diversité dans la composition des régimes permet d'obtenir des modèles animaux variés, qui développent plus ou moins rapidement et avec plus ou moins de sévérité les principaux symptômes du syndrome métabolique. L'utilisation des lipides de natures différentes permet également d'étudier l'effet de lipides saturés ou insaturés sur la santé. Les régimes hyperlipidiques contenant des acides gras polyinsaturés (contenus par exemple dans l'huile de poisson) auraient ainsi un effet protecteur contre la résistance à l'insuline et le développement de l'obésité (Buettner et al., 2006; Storlien et al., 2000). Les régimes hyperlipidiques fabriqués à base de lard sont les plus obésogènes (Buettner et al., 2006).

Des rats nourris pendant plusieurs semaines avec un régime HFD 60 % ont un poids corporel et une masse adipeuse significativement plus importants que les animaux contrôles. Ils présentent également une hyperinsulinémie, une hyperglycémie, une hyperleptinémie et une augmentation des niveaux d'acides gras non estérifiés (Lei et al., 2007; Sutherland et al., 2008). De la même façon, un régime HFD 42 % (lard ou huile de coco), conduit à une augmentation du poids corporel corporelle des rats et à une accumulation de triglycérides dans le foie. Les animaux nourris avec le régime HF-Lard sont ceux qui prennent le plus de poids et présentent une hyperinsulinémie et une diminution de l'adiponectinémie (Buettner et al., 2006).



II. L'inflammation : Lien entre obésité et résistance à l'insuline

1. Le tissu adipeux :

Le tissu adipeux (TA) joue un rôle important dans l'homéostasie métabolique de l'organisme. Chez les mammifères, nous distinguons deux types de tissu adipeux qui présentent une morphologie et des fonctions bien distinctes : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun (Prunet-Marcassus et al., 2006). Le tissu adipeux blanc a un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique alors que le tissu adipeux brun joue un rôle dans la thermogénèse.

a. Le tissu adipeux blanc :

Le tissu adipeux blanc est un tissu hétérogène présentant une grande diversité cellulaire (Figure 12). On distingue deux populations cellulaires : les adipocytes et les cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV), qui comprennent les cellules de l'immunité, en particulier les macrophages, les préadipocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Ouchi et al., 2011). Cependant, les adipocytes représentent la population cellulaire majoritaire du tissu. Ils sont impliqués dans la régulation de la balance énergétique en stockant l'énergie en surplus sous forme de triglycérides (TG). Ces réserves pourront ensuite être sollicitées et mobilisées pour être utilisées par d'autres tissus en fonction des besoins métaboliques (Trayhurn and Beattie, 2001a).

A côté de son rôle de réserve énergétique, le tissu adipeux blanc synthétise et sécrète de nombreuses adipokines (protéines sécrétées par les adipocytes) et cytokines (protéines sécrétées par les macrophages infiltrant le tissu adipeux) à action paracrine et endocrine, qui influencent la sensibilité à l'insuline, l'homéostasie énergétique, l'oxydation des lipides, l'immunité ainsi que les fonctions vasculaires (Reaven et al., 2004).

Chez l'homme, le tissu adipeux blanc est réparti en différents endroits de l'organisme et sa localisation diffère selon le sexe, l'âge, l'alimentation et l'environnement (Wajchenberg, 2000). On distingue principalement le tissu adipeux

sous-cutané, graisse superficielle localisée entre les muscles et la peau, et le tissu adipeux viscéral, graisse profonde entourant les viscères. Le tissu adipeux viscéral joue un rôle important dans la sensibilité à l'insuline. En effet, ce dernier exprime des niveaux plus élevés de récepteurs à l'insuline et présente une plus grande sensibilité à l'insuline que le tissu adipeux sous cutané (Laviola et al., 2006). De plus, sa masse est positivement corrélée avec l'intolérance au glucose, l'augmentation des concentrations plasmatiques des triglycérides et du cholestérol, l'hypertension et la dyslipidémie (Hardy et al., 2012; Klein, 2004). La taille du tissu adipeux viscéral est aussi un déterminant important du syndrome métabolique et de la résistance à l'insuline. En effet une diminution du tissu adipeux viscéral améliore la sensibilité à l'insuline (Goodpaster et al., 2005; Piché et al., 2005). Les adipocytes du tissu adipeux viscéral présentent aussi un profil sécrétoire différent de ceux du tissu adipeux sous-cutané. En effet, leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est plus importante et ont une activité métabolique plus élevée. En effet, ces adipocytes ont une forte activité lipolytique libérant ainsi de grandes quantités d'acides gras au niveau sanguin (Fain et al., 2004).

Au cours de l'installation de l'obésité, l'augmentation excessive de la masse du tissu adipeux blanc peut se traduire d'une part par une augmentation des réserves de triglycérides accumulées dans les adipocytes (hypertrophie) et d'autre part par une augmentation du nombre d'adipocytes (hyperplasie) par la différenciation des préadipocytes (Björntorp, 1974; Spalding et al., 2008; Strawford et al., 2004). Ainsi, les adipocytes du tissu adipeux viscéral vont être plutôt caractérisés par une hypertrophie alors que ceux du tissu adipeux sous-cutané par une hyperplasie (Drolet et al., 2008).

b. Le tissu adipeux brun :

Le tissu adipeux brun est principalement impliqué dans la régulation de la thermogénèse et de la dépense énergétique. Le tissu adipeux brun est caractérisé par une vascularisation importante et des adipocytes de petites tailles qui possèdent plusieurs gouttelettes lipidique ainsi qu'un nombre élevé de mitochondries (Frontini and Cinti, 2010).

Le tissu adipeux brun a été largement étudié chez les mammifères hibernants et les rongeurs. Le mécanisme thermogénique est expliqué par une forte expression de

la protéine UCP1 (uncoupling protein 1) localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries. UCP1 est un canal ionique qui permet la dissipation du gradient de protons sans production d'ATP. L'énergie dissipée est alors convertie sous forme de chaleur par l'oxydation mitochondriale des acides gras. (Chechi et al., 2013).

Chez l'homme, le tissu adipeux brun est présent chez les nouveaux nés qui ne sont pas encore capables de frissonner et participe à la régulation thermique néonatale. Sa présence chez l'adulte humain vient d'être récemment démontrée par des études d'imagerie par TEP-scan (tomographie d'émission par positrons) (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Ainsi, une meilleure compréhension du **développement** et de **l'activation** de ce tissu pourrait servir à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le développement de l'obésité (Haas et al., 2012).

Activation du tissu adipeux brun : Il a été observé qu'un traitement à long terme aux capsaïcinoïdes, substances actifs du piment, chez des sujets humains obèses conduit à une baisse du poids corporel et une augmentation des dépenses énergétiques (Snitker et al., 2009). En effet, il a été montré récemment que le traitement aux capsaïcinoïdes chez l'homme stimule les canaux TRP (transient receptor potential) et conduit à la réactivation du tissu adipeux brun (Yoneshiro et al., 2013).

Développement du tissu adipeux beige ou brite à partir du tissu adipeux blanc, « le « brunissement » du tissu adipeux blanc » : Des études récentes chez les rongeurs ont montré qu'il existe un troisième type de tissu adipeux, le tissu adipeux beige. En effet, le tissu adipeux blanc peut présenter sous l'effet du froid des cellules ressemblant aux adipocytes du tissu adipeux bruns, les adipocytes « beiges » et semblent participer à la thermogénèse. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le « brunissement » des adipocytes blancs pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques contre le développement de l'obésité et du diabète. Des études récentes montrent l'implication du facteur de transcription Prdm16. L'activation de ce facteur stimule la conversion des adipocytes blancs en adipocytes beiges et limite les effets délétères d'un régime hyperlipidique et améliore la tolérance au glucose (Bi et al., 2014; Ohno et al., 2012; Seale et al., 2011). Les macrophages infiltrant le tissu adipeux semblent

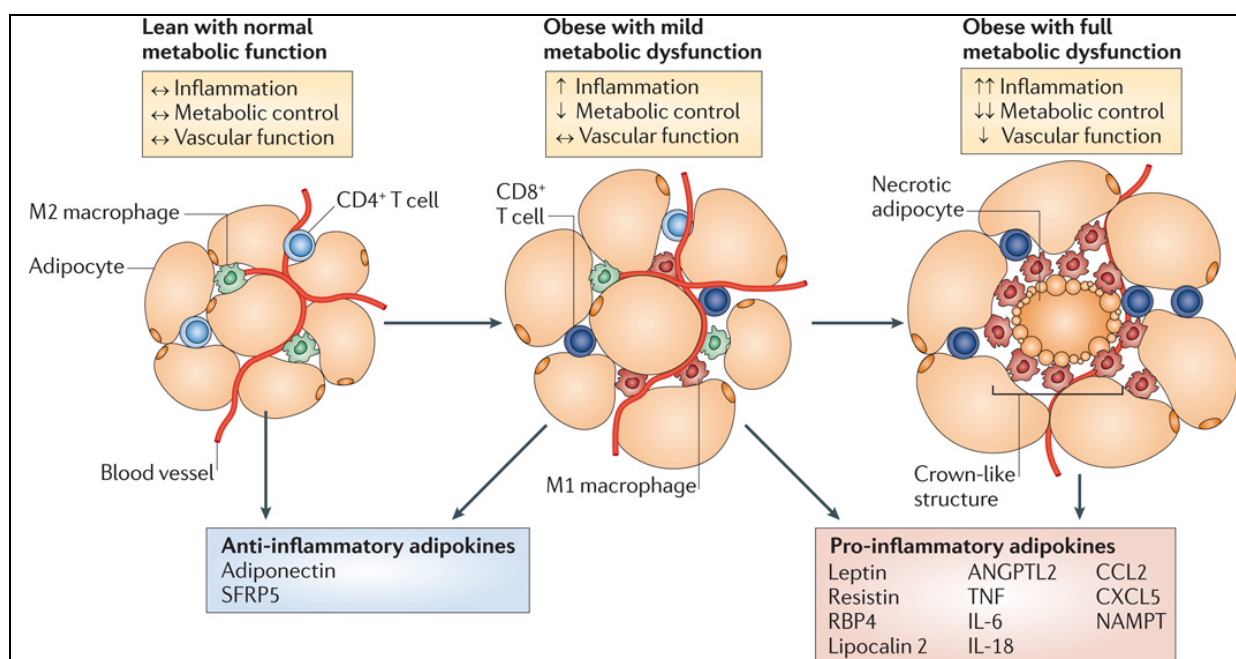


Figure 13 : Modulation du tissu adipeux au cours du développement de l'obésité.

Le tissu adipeux peut se décrire par au moins trois phases structurelles et fonctionnelles : maigre avec une fonction métabolique normale, obèse avec un faible dysfonctionnement métabolique et obèse avec un dysfonctionnement métabolique total. Le tissu adipeux maigre présente un profil sécrétoire normal et exprime des marqueurs de macrophages M2 anti-inflammatoires. De plus, des adipokines anti-inflammatoires telles que l'adiponectine et SFRP5 (secreted frizzled-related protein 5) sont préférentiellement sécrétée par le tissu adipeux maigre. Dans un stade d'obésité modérée, le tissu adipeux conserve des fonctions métaboliques relativement normales et présente de faibles niveaux d'activation des cellules immunitaires. L'obésité induit l'hypertrophie des adipocytes, augmentant leur capacité de stockage des triglycérides, ainsi que le recrutement de cellules immunitaires et de macrophages M1 pro-inflammatoires. L'obésité altère également le profil sécrétoire du tissu adipeux. Ce dernier génère de grandes quantités de facteurs pro-inflammatoires, tels que la résistine, le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) et l'interleukine 6 (IL6) (Ouchi et al., 2011).

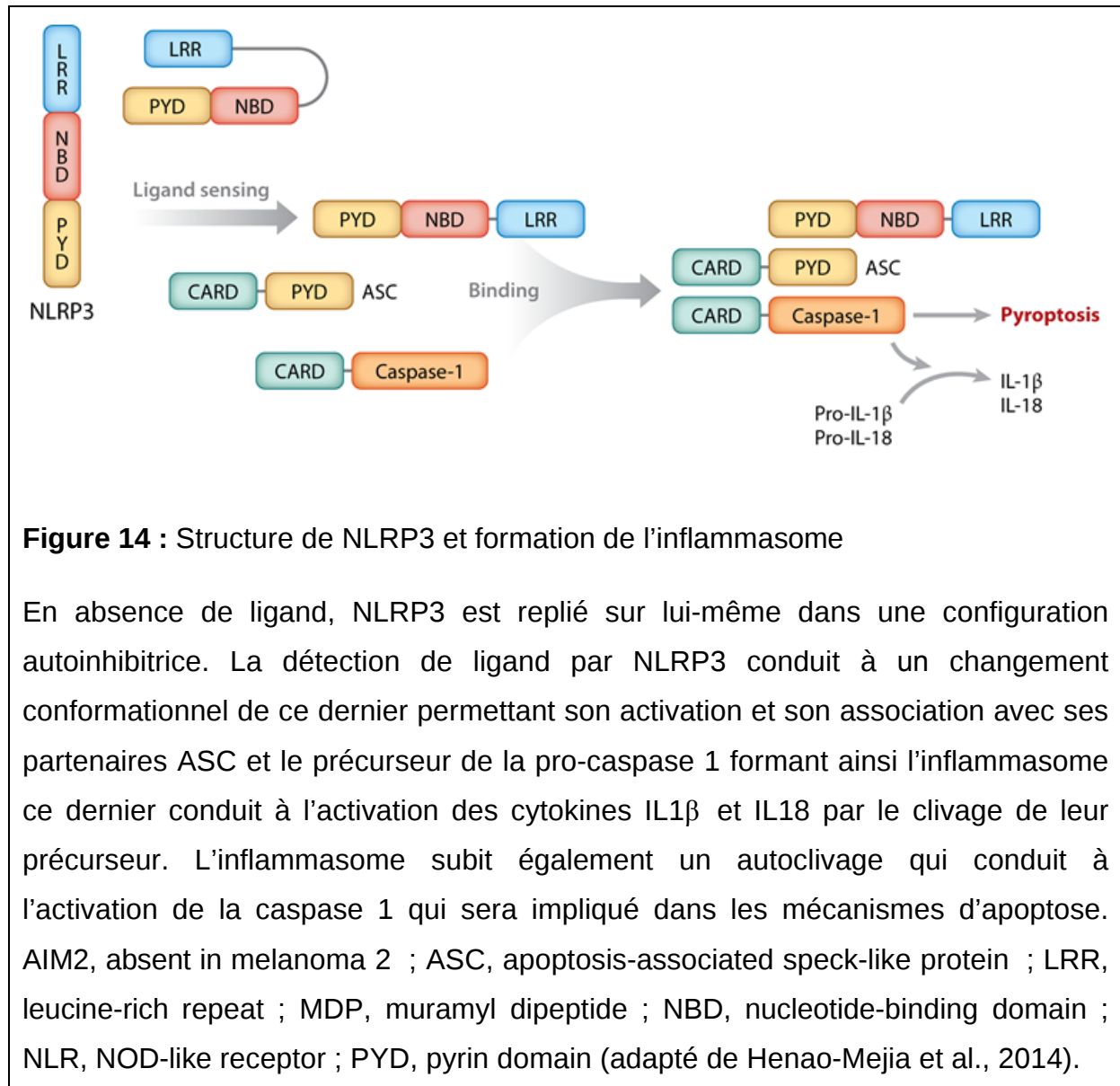
aussi jouer un rôle important dans ce phénomène de « brunissement ». Il existe deux groupes principaux de macrophages : les macrophages M1 avec des rôles pro-inflammatoires et les macrophages M2 avec des rôles anti-inflammatoires. Ces derniers sont capables d'activer le « brunissement » des adipocytes blancs et réduisent ainsi l'obésité (Suárez-Zamorano et al., 2015). FGF21 (fibroblast growth factor 21), un régulateur clé du métabolisme et qui joue un rôle important dans la régulation de la thermogénèse par le tissu adipeux brun (Chartoumpekis et al., 2011; Hondares et al., 2011), induit l'expression du facteur de transcription PGC1 α favorisant ainsi le développement des adipocytes beiges (Coskun et al., 2008; Fisher et al., 2012).

c. L'inflammation du tissu adipeux et obésité :

L'obésité est caractérisée par un état d'inflammation chronique. Cette inflammation est dite « de bas grade » puisqu'elle se différencie de l'inflammation aigue classique. En effet, les symptômes de l'inflammation classique (fièvre, douleur, chaleur, rougeur) ne sont pas observés au cours de l'obésité. De plus, la nature des stimuli est aussi différente puisque l'inflammation associée à l'obésité n'est pas due à une infection par des agents bactériens, viraux ou parasitaires mais à un excès de nutriments (bien que la participation d'une cause bactérienne issue de la flore intestinale soit aussi très probable) (Gregor and Hotamisligil, 2011).

L'obésité induit des altérations majeures dans le tissu adipeux telles que l'hypertrophie adipocytaire et l'accumulation de cellules immunitaires (Figure 13). Ainsi, l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes et les macrophages infiltrant le tissu adipeux constitue un des mécanismes de base impliqué dans l'installation de cet état inflammatoire. En effet, l'excès de masse adipeuse est associé à une augmentation des niveaux d'IL6 et de CRP (C reactive protein) (Aronson et al., 2004; Visser et al., 1999), molécules utilisées comme marqueurs biologiques de l'inflammation (Pepys and Hirschfield, 2003).

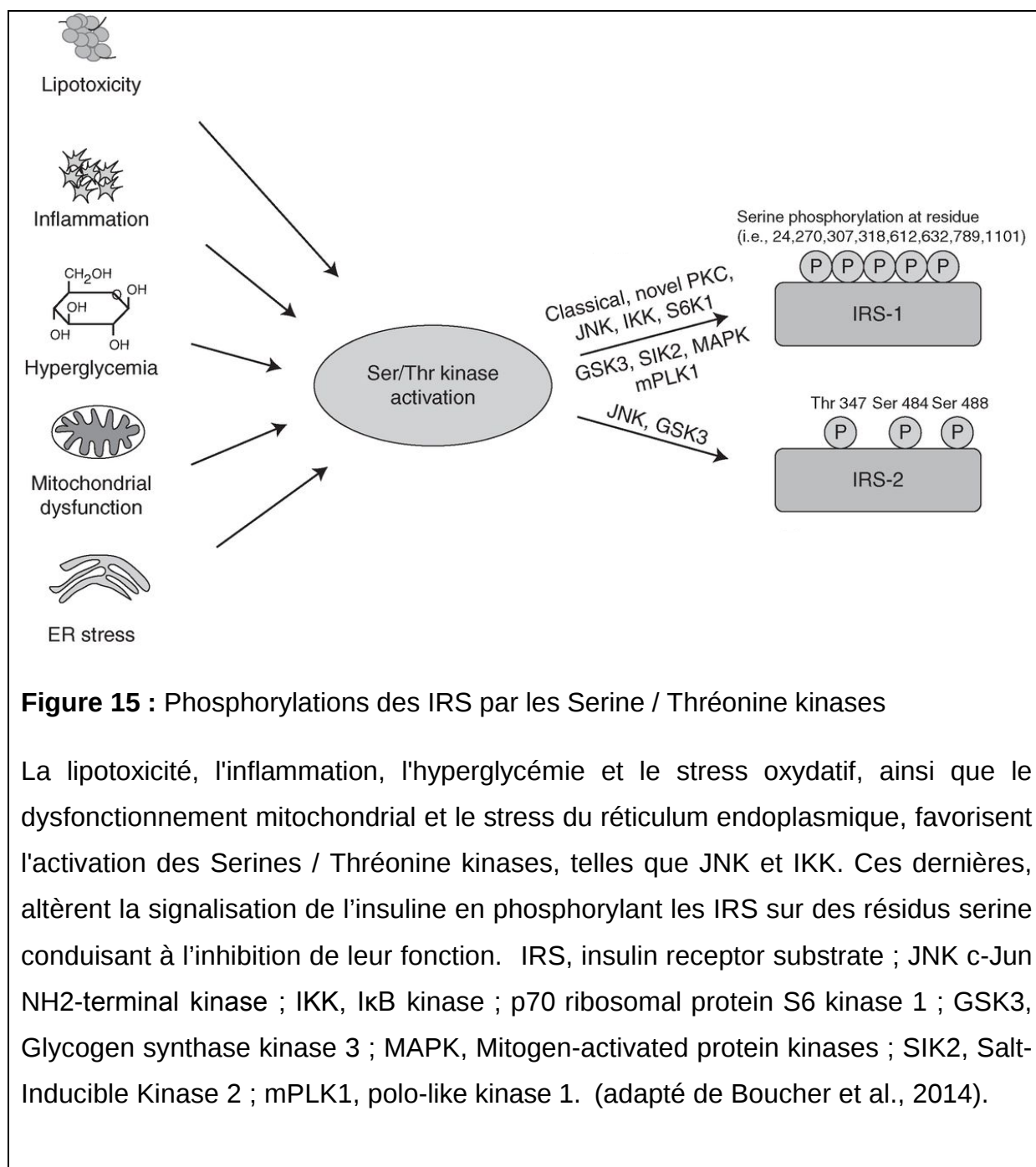
Le tissu adipeux est le premier tissu où un lien entre inflammation et résistance à l'insuline a été mis en évidence (Hotamisligil et al., 1995). Cependant, une altération du nombre et de la nature des cellules immunitaires a été aussi observée au niveau du foie, du pancréas et du muscle dans des modèles animaux de diabète et



d'obésité, mais aussi chez des patients diabétiques et résistants à l'insuline. En situation d'obésité, l'excès d'acides gras libre et l'hypertrophie du tissu adipeux conduisent à une altération de ses fonctions sécrétoires qui se traduit par une hausse de la synthèse d'adipokines et de cytokines pro-inflammatoires telles la resistine, CRP, $\text{TNF}\alpha$, et IL6. L'obésité est aussi caractérisée par l'activation de certains composants de la réponse immunitaire, tels l'inflammasome et les récepteurs Toll-Like (TLR) qui sont impliqués dans la médiation de la réponse inflammatoire et dans l'immunité innée.

L'inflammasome est un complexe protéique constitué d'un senseur intracellulaire NLR (Nod Like Receptor), du précurseur pro-caspase 1 et l'adaptateur ASC (Apoptosis Associated Speck like protein) (Figure 14). L'inflammasome est un composant crucial de notre système immunitaire. Il est responsable de l'activation de processus inflammatoires et favorise la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme $\text{IL1}\beta$ et IL18 en les clivant via l'activation de la caspase1 (Haneklaus and O'Neill, 2015). Plusieurs études ont montré l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans le développement de la résistance à l'insuline dans différents tissus et par différents types cellulaires (Stienstra et al., 2010; Wen et al., 2012; Zhou et al., 2011). En effet les souris invalidées pour le gène NLRP3 présentent une sensibilité augmentée à l'insuline (Zhou et al., 2011). NLRP3 est activé par les acides gras saturés comme les céramides et les palmitates ce qui conduit à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires $\text{IL1}\beta$ et IL18 et à la perturbation de la sensibilité à l'insuline (Wen et al., 2011). Il faut aussi noter que les acides gras polyinsaturés oméga 3 préviennent l'activation de l'inflammasome (L'homme et al., 2013).

Il est maintenant bien admis que cette inflammation chronique associée à l'obésité constitue un facteur de risque majeur pour le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 chez l'homme et des modèles animaux (Hotamisligil, 2006; Olefsky and Glass, 2010; Ouchi et al., 2011; Schenk et al., 2008; Shoelson et al., 2007). Un des mécanismes impliqués dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline par l'activation des voies pro-inflammatoires passe par la phosphorylation des IRS sur des résidus sérine, la sérine 312 (307 chez les rongeurs), la sérine 616 (612 chez les rongeurs) la sérine 636 (632 chez les rongeurs) et la sérine 1101 (Gual et al., 2005). En effet, les voies pro-inflammatoires



conduisent à l'activation de plusieurs serine/thréonine kinases qui vont phosphoryler les IRS sur serine (Figure 15). Parmi ces serine/thréonine kinases on peut citer JNK et IKK β qui phosphorylent IRS1 et IRS2 sur plusieurs résidus sérine (Boucher et al., 2014; Gao et al., 2004; Samuel and Shulman, 2012). Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , IL6 et IL1 β sécrétés par le TA peuvent aussi induire l'expression des SOCS 1 et 3 impliqués dans l'inhibition de la signalisation de l'insuline (Rui et al., 2002).

IKK β favorise l'activation du facteur de transcription NF κ B (nuclear factor kappa B), ce dernier joue un rôle clé dans la réponse immunitaire, le stress et la prolifération cellulaire, l'inflammation, la différenciation et l'apoptose (Rahman and McFadden, 2011; Sakurai et al., 2003). NF κ B est un homo- ou hétérodimère formé à partir de cinq sous-unités qui font partie de la superfamille des facteurs de transcription à domaine Rel et qui comprend p65/RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 et p52/p100 (Pereira and Oakley, 2008). NF κ B est séquestré dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I κ B α . La phosphorylation de cette dernière sur les sérines 32 et 36 par les IKK β conduit à sa dégradation et la translocation de NF κ B au niveau nucléaire où il va activer la transcription de plusieurs médiateurs inflammatoires tels que TNF α , IL6 et IL1 β (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Rahman and McFadden, 2011). Ainsi, l'inhibition de IKK β conduit à la prévention de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les acides gras libres alors que son activation inhibe l'expression des adipokines anti-inflammatoires comme l'adiponectine (Jiao et al., 2011). De la même façon, l'inhibition de NF κ B améliore la sensibilité à l'insuline (Yekollu et al., 2011) ce qui suggère que la voie IKK β /NF κ B joue un rôle important dans l'induction de la résistance à l'insuline par l'inflammation.

JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) fait partie de la famille des MAP kinases. Elle existe sous 3 isoformes (JNK1, 2 et 3) et est impliquée dans l'activation des voies pro-inflammatoires. JNK est activée par différents stimuli de stress comme les chocs thermique ou osmotique, les cytokines pro-inflammatoires (TNF α), les UV, les céramides et les acides gras saturés (Tarantino and Caputi, 2011). JNK contribue à l'installation de l'obésité et la résistance à l'insuline en régulant positivement la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α) et en activant les voies de l'apoptose (Han et al., 2013; Pal et al., 2013). JNK inhibe aussi la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques, un mécanisme qui passe par la cytokine

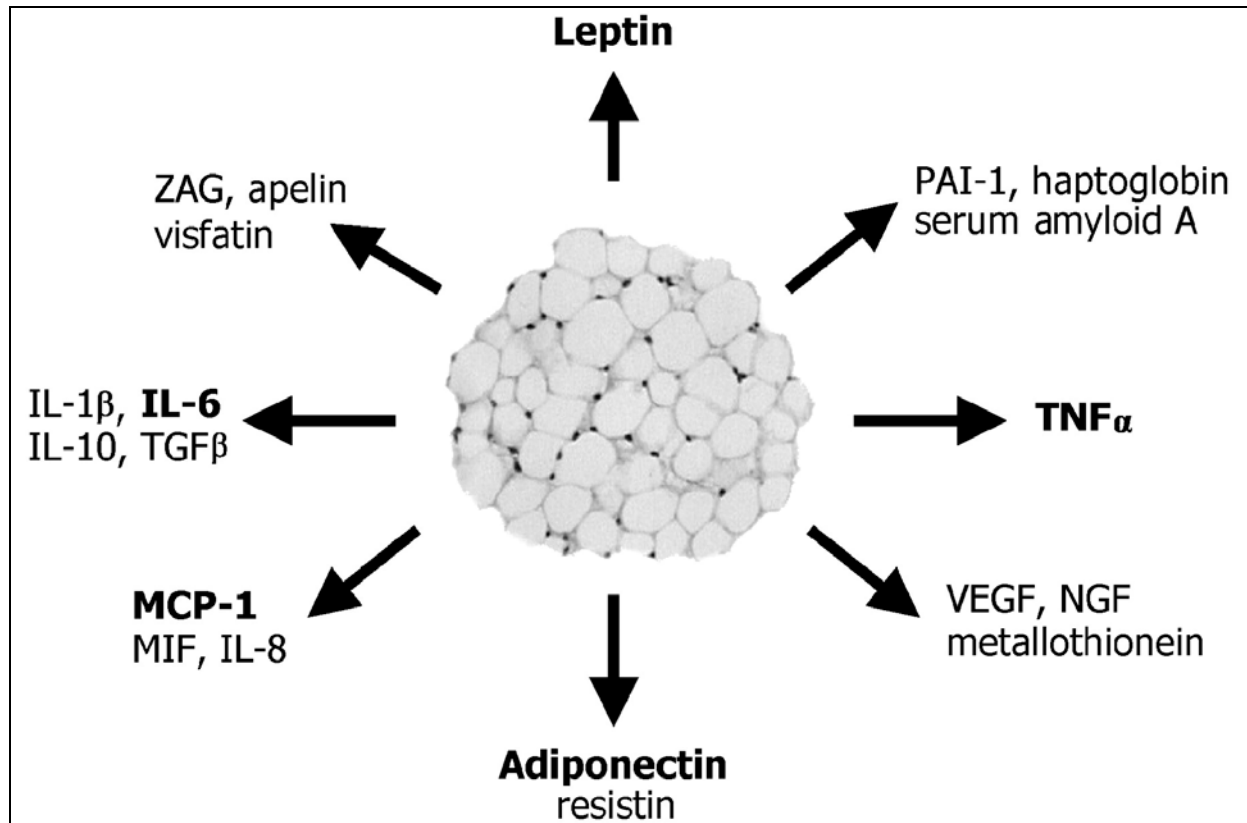


Figure 16 : Principaux facteurs sécrétés par le tissu adipeux

IL1 β , Interleukin 1 β ; IL6, Interleukin 6 ; IL8, Interleukin 8 ; IL10, Interleukin 10 ; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1 ; MIF, macrophage migration inhibitory factor ; NGF, nerve growth factor ; PAI1, Plasminogen activator inhibitor-1 ; TNF α , tumor necrosis factor α ; VEGF, Vascular endothelial growth factor ; TGF- β , transforming growth factor- β ; ZAG, zinc- α 2-glycoprotein. (Trayhurn and Beattie, 2001b)

IL1 β (Lanuza-Masdeu et al., 2013). L'inactivation de JNK1 dans le foie, le tissu adipeux et le muscle améliore la sensibilité à l'insuline (Nakatani et al., 2004; Santos et al., 2012; Zhang et al., 2011) alors que son activation est associée avec l'obésité et la résistance à l'insuline (Han et al., 2013; Lanuza-Masdeu et al., 2013). Les effets insulino-desensibilisateurs de JNK sont dus à sa capacité à phosphoryler les IRS sur des résidus sérine empêchant ainsi l'interaction du domaine PTB de IRS1/2 avec la tyrosine 960 phosphorylée du récepteur à l'insuline (Aguirre et al., 2002).

d. Fonction endocrine :

Après avoir été longtemps considéré comme un simple tissu dédié au stockage des lipides, le tissu adipeux est maintenant reconnu comme un « organe » sécrétant plusieurs adipokines et cytokines, à activité paracrine et/ou endocrine (Figure 16). La découverte de la première hormone sécrétée par le tissu adipeux remonte à 1985 où il a été montré que ce dernier était la source principale d'adipsine (Cook et al., 1985). Ensuite les découvertes successives de la sécrétion par le tissu adipeux de molécules comme le TNF α (Hotamisligil et al., 1993), la leptine (Zhang et al., 1994) et l'adiponectine (Scherer et al., 1995) ont pu confirmer la fonction endocrinienne du tissu adipeux et son rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique, la sensibilité à l'insuline et l'inflammation (Antuna-Puente et al., 2008; Lago et al., 2009; Ouchi et al., 2011; Ronti et al., 2006; Wang and Nakayama, 2010).

Bien que plusieurs adipokines et cytokines aient été identifiées jusqu'à maintenant, seuls la leptine, l'adiponectine, la résistine, le TNF α , l'IL6 et l'IL1 β feront l'objet de ce chapitre.

i. La leptine :

La leptine du grec *leptos* pour maigre est une hormone anorexigène de 16 kDa codée par le gène *ob*. La leptine est produite principalement par les adipocytes du tissu adipeux blanc (Pellemounter et al., 1995; Weigle et al., 1995; Zhang et al., 1994) mais également par d'autres tissus, mais en faible quantité, comme le placenta (Masuzaki et al., 1997), l'estomac (Bado et al., 1998), l'hypophyse et l'hypothalamus (Morash et al., 1999). La synthèse et la sécrétion de leptine par le tissu adipeux sont dépendantes de l'état nutritionnel où le jeûne diminue la leptinémie alors que la prise alimentaire l'augmente (Porte et al., 1998). Chez les

souris et chez les humains, les niveaux circulants de leptine sont directement corrélés avec la masse du TA (Considine et al., 1996; Maffei et al., 1995).

La leptine joue un rôle important dans la régulation centrale de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques. La leptine agit via son récepteur Ob-Rb au niveau de l'hypothalamus, en régulant la prise alimentaire en fonction de la masse du tissu adipeux, par son action opposée sur deux populations neuronales du noyau arqué de l'hypothalamus (Bjørbaek and Kahn, 2004) : la leptine inhibe la synthèse de neuromédiateurs orexigènes (NPY, AgRP) et active la synthèse de neuromédiateurs anorexigènes (POMC le précurseur de α MSH, CART), ce qui induit une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de α MSH qui va se lier à son récepteur MC4R (melanocortine type 4 receptor) dans le noyau paraventriculaire et permet ensuite l'inhibition des effecteurs de la prise alimentaire (Ahima, 2008; Morton et al., 2006; Myers, 2008; Zigman and Elmquist, 2003).

La leptine avait été initialement perçue comme un remède potentiel pour l'obésité chez l'homme étant donné que l'administration de cette dernière aux rongeurs réduisait le poids corporel, la masse grasse, la prise alimentaire et augmentait les dépenses énergétiques (Rajala and Scherer, 2003). L'utilisation de la leptine recombinante comme traitement contre l'obésité chez l'homme est efficace chez les rares patients présentant une déficience en leptine (Farooqi et al., 1999; Gorden and Gavrilova, 2003). En effet, la majorité des cas d'obésité humaine sont caractérisés par un fort taux de leptine qui est incapable d'entraîner une perte de poids suggérant un état de résistance centrale à la leptine (Klein et al., 2006; Myers, 2008). De nombreux mécanismes ont été évoqués pour expliquer cette résistance centrale à la leptine, parmi eux : un défaut de passage/transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (Banks and Farrell, 2003; El-Haschimi et al., 2000), une altération de la voie de signalisation de la leptine via ObRb dans l'hypothalamus (El-Haschimi et al., 2000; Morrison, 2009) et une perturbation de l'organisation et du fonctionnement des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Bouret and Simerly, 2006).

La résistance à la leptine associée à l'obésité est d'ailleurs considérée comme un facteur important dans le développement du diabète de type 2. Chez l'homme, la leptinémie est corrélée positivement avec l'insulinémie (Boden et al., 1997). Des

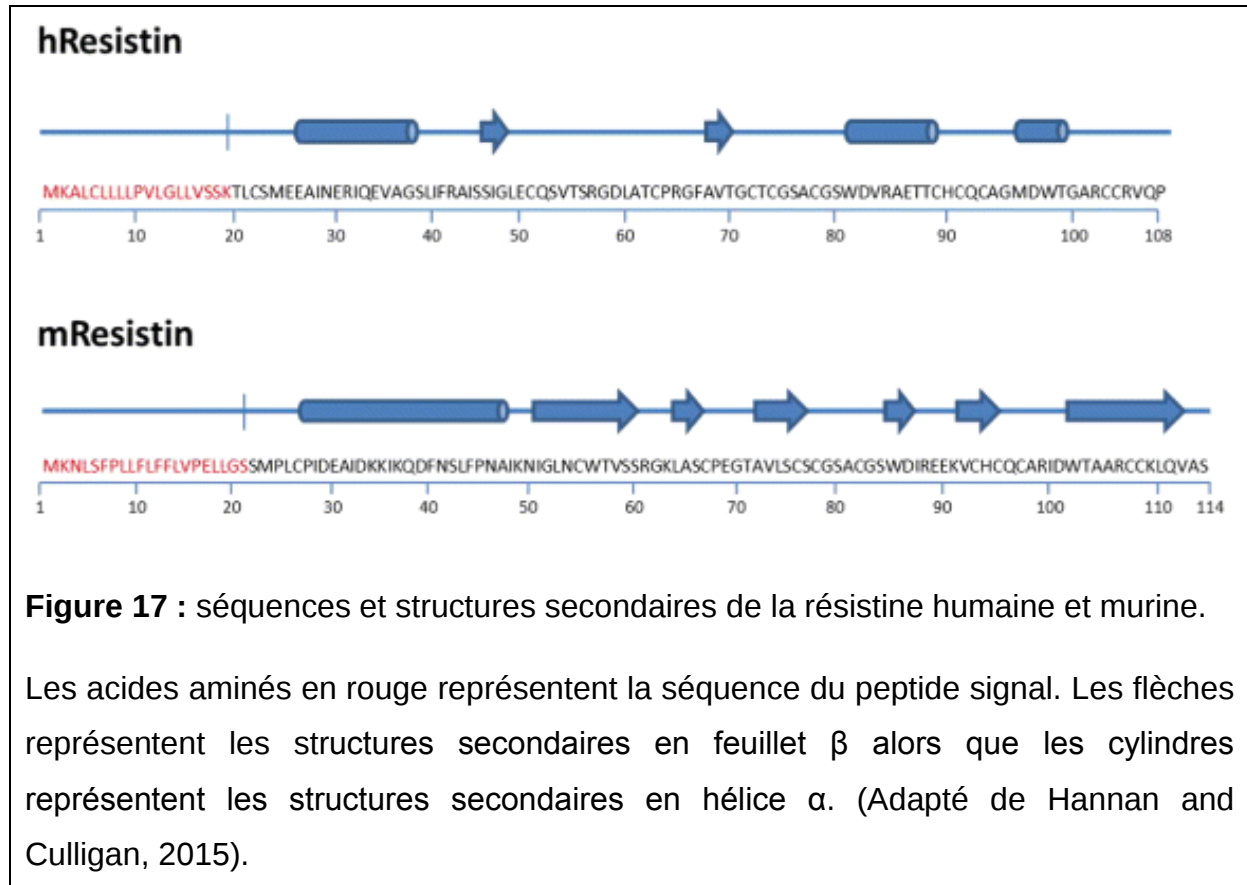
niveaux élevés de leptine peuvent constituer un facteur à risque pour l'installation de la résistance à l'insuline (Jialal et al., 2014). En effet, il existe un dialogue entre la voie de signalisation de la leptine et celle de l'insuline et une perturbation de l'une des deux voies peut conduire à un état de résistance à la leptine ou l'insuline (Benomar et al., 2005a, 2005b).

ii. L'adiponectine :

L'adiponectine est une protéine de 30 kDa produite principalement par le tissu adipeux blanc (Maeda et al., 1996; Scherer et al., 1995) et présente dans la circulation sanguine sous trois formes : un trimère, un hexamère ou un multimère de haut poids moléculaire (complexe de 12 à 18 molécule d'adiponectine) (Kadowaki et al., 2006). Deux récepteurs de l'adiponectine ont été identifiés : AdipoR1 et AdipoR2. (Yamauchi et al., 2003). AdipoR1 est principalement exprimé au niveau du muscle alors qu'AdipoR2 est aussi abondant au niveau du foie (Yamauchi et al., 2003).

L'adiponectine exerce des effets anti-inflammatoires et insulino-sensibilisateurs. En effet, contrairement aux autres adipokines, les niveaux circulants d'adiponectine sont corrélés négativement avec l'obésité et le diabète de type 2 (Hu et al., 1996; Ouchi and Walsh, 2007). Des faibles concentrations d'adiponectine prédisent le développement du diabète de type 2 alors que de fortes concentrations d'adiponectine sont associés à un risque réduit du développement de cette pathologie et à une sensibilité à l'insuline (Spranger et al., 2003). De plus, un traitement à l'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline chez la souris (Kadowaki et al., 2006) alors que son inactivation (Kubota et al., 2002; Maeda et al., 2002) ou l'invalidation de ses deux récepteurs conduisent à une résistance à l'insuline (Yamauchi et al., 2007). Plusieurs facteurs pro-inflammatoires comme IL6 et le TNF α régulent négativement l'expression de l'adiponectine ce qui peut expliquer les faibles niveaux d'adiponectine observés au cours de l'obésité (Esteve et al., 2009).

L'effet sensibilisateur à l'insuline de l'adiponectine passe à la fois par l'inhibition de la néoglucogenèse et l'activation de l'oxydation des acides gras en activant la voie de l'AMPK via AdipoR1, ainsi que par l'activation des dépenses énergétique



(oxydation des acides gras) et l'inhibition du stress oxydatif et de l'inflammation en activant la voie de PPAR α via AdipoR2 (Capeau, 2007; Yamauchi et al., 2007).

Les effets anti-inflammatoires de l'adiponectine sont attribués à la répression de la production de cytokines pro-inflammatoires via l'inhibition de NF κ B et à l'activation de la production de cytokines anti-inflammatoires tel que IL10 (Kumada et al., 2004; Yokota et al., 2000). L'adiponectine active aussi la différenciation des macrophages anti-inflammatoires M2 (Takemura et al., 2007) et inhibe la production d'interférons γ par le récepteur TLR4 au niveau des lymphocytes NK (Wilk et al., 2013).

iii. La resistine :

Découverte :

La résistine a été caractérisée par trois laboratoires différents. Elle a été initialement appelée FIZZ3 (Found In Inflammatory Zone 3) de par ses effets pro-inflammatoires (Holcomb et al., 2000) ou encore ADSF (adipose tissue specific secretory factor) (Kim et al., 2001)(Kim, 2001). Le nom resistine a été introduit suite à son association avec la résistance à l'insuline (Steppan et al., 2001). En effet, son implication dans la résistance à l'insuline a été suggérée suite à plusieurs observations : la résistine est sécrétée par les adipocytes chez la souris et ses niveaux circulants sont élevés chez les souris obèses. Cependant, un traitement avec des médicaments antidiabétiques, comme le rosiglitazone qui rétablit la sensibilité à l'insuline, diminue les niveaux circulants de la résistine ainsi que son expression au niveau des adipocytes. De plus, le traitement des souris par de la résistine recombinante conduit à une intolérance au glucose et à une altération des fonctions de l'insuline alors que son inhibition chez des souris obèses (suite à un régime hyperlipidique) diminue la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline.

Expression de la résistine

Chez la souris, la résistine est principalement exprimée et produite par le tissu adipeux blanc. Ses niveaux d'expressions sont influencés par les régimes alimentaires et les niveaux de la masse adipeuse viscérale (Steppan et al., 2001). C'est une protéine de 11 kDa dont le gène est situé sur le chromosome 8A1. Elle est traduite sous forme d'un long précurseur de 114 acides aminés qui sera clivé pour donner la forme mature de la protéine constituées de 94 acides aminés (Figure 17)

(Ghosh et al., 2003). La résistine de souris est riche en cystéine. Sa partie N-terminale forme une structure en super hélice α alors que la partie C-terminale est constituée de plusieurs feuillets β antiparallèles formant une structure en tonneaux (Patel et al., 2004). Dans la circulation la résistine est retrouvée sous deux formes : une forme prépondérante hexamérique de haut poids moléculaire et une forme trimérique de faible poids moléculaire plus réactive mais moins prépondérante (Patel et al., 2004).

La résistine chez la souris est aussi exprimée par d'autres tissus comme le pancréas (Minn et al., 2003), l'hypophyse (Morash et al., 2004) et l'hypothalamus (Tovar et al., 2005; Wilkinson et al., 2005). Dans l'hypothalamus, la résistine est localisée dans les neurones exprimant POMC au niveau des noyaux arqué et paraventriculaire (Tovar et al., 2005; Wilkinson et al., 2005) où elle aura un rôle dans la régulation de la prise alimentaire (Tovar et al., 2005), le métabolisme des lipides (Vasquez, 2008) et l'induction de la résistance à l'insuline (Benomar et al., 2013; Muse et al., 2007; Singhal et al., 2007).

Chez l'homme, la résistine présente un poids moléculaire de 12,5 kDa et est constituée de 108 acides aminés (Figure 17). Elle est codée par le gène RETN situé sur le chromosome 19p13.3 (Ghosh et al., 2003). Contrairement à la souris, la résistine humaine est principalement exprimée et sécrétée par les monocytes suite à une réponse inflammatoire (Patel et al., 2003; Verma et al., 2003). Elle est aussi structurellement différente de celle de la souris. En effet les deux protéines n'ont que 54% de similarité de séquence en acides aminés. La partie N-terminale de la résistine humaine est aussi constituée d'une structure en super hélice α cependant, cette dernière ne contient pas de structure en tonneaux β dans la partie C-terminale mais plutôt des hélices α (Ghosh et al., 2003). La résistine humaine est aussi riche en cystéine. Deux résidus cystéines ont été montré comme important pour l'oligomérisation de la résistine : la cystéine 6 et la cystéine 22 (Ghosh et al., 2003; Raghu et al., 2004). En effet, la résistine humaine est capable de former des dimères, des trimères ainsi que des multimères de hauts poids moléculaires (Raghu et al., 2004). L'oligomérisation de la résistine joue un rôle important dans la médiation de ses effets pro-inflammatoires. Des études montrent que plus le niveau d'oligomérisation de la résistine est important et plus ses effets pro-inflammatoires sont augmentés (Aruna et al., 2008).

De par ces différences fonctionnelles et structurelles, il est difficile d'assigner des rôles biologiques à la résistine chez l'homme similaires à ceux décrits chez les rongeurs (Arner, 2005; Schwartz and Lazar, 2011)(Arner, 2005 ; Schwartz and Lazar, 2011). Cependant, il est généralement admis que les niveaux de résistine sont augmentés au cours de l'obésité et du diabète de type 2 (Aquilante et al., 2008; Berghoff et al., 2015; Norata et al., 2007). De plus, l'implication de la résistine humaine dans l'inflammation et l'installation de la résistance à l'insuline a été clairement établie chez les rongeurs malgré les différences de séquence avec la résistine murine (Qatanani et al., 2009). En effet, des souris transgéniques déficientes en résistine murine mais exprimant la résistine humaine par les macrophages à des niveaux similaires à ceux décrits chez l'homme, développent une inflammation plus importante au niveau du tissu adipeux ainsi qu'une résistance à l'insuline plus prononcée quand elles sont soumises à un régime hyperlipidique comparé aux souris contrôles (Qatanani et al., 2009).

Régulation et mécanismes d'action de la résistine :

Chez les rongeurs, l'insuline et le glucose régulent l'expression de la résistine. En effet, l'insuline inhibe l'expression de la résistine (Kawashima et al., 2003; Kim et al., 2001) alors que le glucose active sa sécrétion par les adipocytes (Kawashima et al., 2003; Rajala et al., 2004; Wölfling et al., 2008). Ainsi, ces effets antagonistes du glucose et de l'insuline sur l'expression de la résistine peuvent expliquer les différences obtenus entre certaines études concernant les niveaux circulants de résistine dans des situations d'obésité et de diabète, qui sont caractérisées par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie (Barnes and Miner, 2009). En effet, la stimulation des adipocytes par de l'insuline et du glucose n'induit aucun effet sur l'expression des ARNm de la résistine alors que leur stimulation par de l'insuline diminue l'expression des ARNm de la résistine et une augmentation de ces derniers quand les adipocytes sont stimulés par le glucose (Kawashima et al., 2003). Les niveaux d'expressions de la résistine sont aussi négativement régulés par le jeûne (Rajala et al., 2004; Stepan et al., 2001), le TNF α (Fasshauer et al., 2001) et l'IGF1 (Chen et al., 2005).

Chez les rongeurs, il est clairement établi que la résistine induit une résistance à l'insuline. En effet, l'administration de la résistine ou sa surexpression altère la

signalisation de l'insuline (Pravenec et al., 2003; Rajala et al., 2003; Satoh et al., 2004) alors que son inhibition ou son invalidation génique améliore la sensibilité à l'insuline (Muse et al., 2004; Qi et al., 2006).

Ainsi, les effets pro-diabétiques de la résistine pourraient impliquer plusieurs mécanismes :

L'inhibition de la phosphorylation du récepteur à l'insuline et la diminution de son expression dans les adipocytes 3T3-L1 (Steppan et al., 2005), mais aussi dans l'hypothalamus, le foie, le muscle, le tissu adipeux (Benomar et al., 2013) et les cellules bêta pancréatiques (Brown et al., 2007).

- La diminution de l'activité intrinsèque des transporteurs de glucose (Moon et al., 2003).
- L'inhibition de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 au niveau membranaire (Palanivel et al., 2006) ou la répression de l'expression de son gène (Fu et al., 2006).
- L'inhibition de l'AMPK, une molécule impliquée dans les effets sensibilisateurs à l'insuline (Muse et al., 2007; Satoh et al., 2004).
- L'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline en induisant l'expression de SOCS3 (Benomar et al., 2013; Brown et al., 2007; Muse et al., 2007; Steppan et al., 2005) ou de PTP1B (Benomar et al., 2013).
- L'inhibition de l'expression de IRS1 et IRS2 (Satoh et al., 2004; Sheng et al., 2008; Steppan et al., 2005).
- Augmentation des taux d'acides gras libres au niveau sanguin suite à l'augmentation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux (Pravenec et al., 2006).
- L'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL6 (Muse et al., 2007) ou TNF α (Kitagawa et al., 2004).
- L'activation de voies pro-inflammatoires par l'intermédiaire du récepteur TLR4 régulant ainsi négativement la signalisation de l'insuline (Benomar et al., 2013).

Chez l'homme, la résistine serait plutôt impliqué dans les processus inflammatoires. En effet, les niveaux circulants de résistine sont augmentés chez les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques et sont corrélés positivement avec les niveaux de certains marqueurs inflammatoires comme la CRP

(Berghoff et al., 2015; Bertolani et al., 2006; Bokarewa et al., 2005; Konrad et al., 2007). De plus, le niveau d'expression de la résistine est régulé positivement par plusieurs facteurs pro-inflammatoires comme IL1 β (Kaser et al., 2003), l'IL6 (Reilly et al., 2005), TNF α (Lehrke et al., 2004) et LPS (Lipopolysaccharide) (Kaser et al., 2003; Lehrke et al., 2004). De plus, l'expression de la résistine est diminuée par des inhibiteurs de NF κ B, des inhibiteurs des MAP kinases P38 et ERK1/2 ainsi que par des anticorps dirigés contre IL1 β , IL6 et TNF α (Lehrke et al., 2004).

Des traitements par de la résistine humaine conduisent à l'activation voies de signalisation pro-inflammatoires comme NF κ B et les MAP kinases JNK, P38 et ERK1/2 (Benomar et al., 2013; Bertolani et al., 2006; Sheng et al., 2008) ainsi qu'à la stimulation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL6 et TNF α (Bokarewa et al., 2005).

Récepteur de la résistine :

Depuis la découverte de la résistine en 2001, plusieurs récepteurs putatifs pour cette dernière ont été proposés :

- Récepteurs de la résistine murine :

Un isoforme de la décorine (un protéoglycane du tissu conjonctif) nommé Δ DCN a été identifié comme récepteur de la résistine. Ce dernier serait impliqué dans la régulation de l'expansion du tissu adipeux blanc par la résistine en modulant la migration, la prolifération et la différenciation des adipocytes (Daquinag et al., 2011).

Une interaction entre la résistine et le récepteur ROR1 (tyrosine protein kinase transmembrane receptor 1) a été aussi montrée. En effet, la résistine régulerait via ROR1 l'expression de SOCS3 et des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4, la phosphorylation des MAP kinases ERK1/2 et l'adipogénèse (Sánchez-Solana et al., 2012). Bien que ces deux récepteurs soient capables de lier la résistine murine, d'autres études complémentaires sont nécessaires pour renforcer leur rôle en tant que récepteur de la résistine et confirmer les effets de cette dernière et son implication dans l'installation de la résistance à l'insuline.

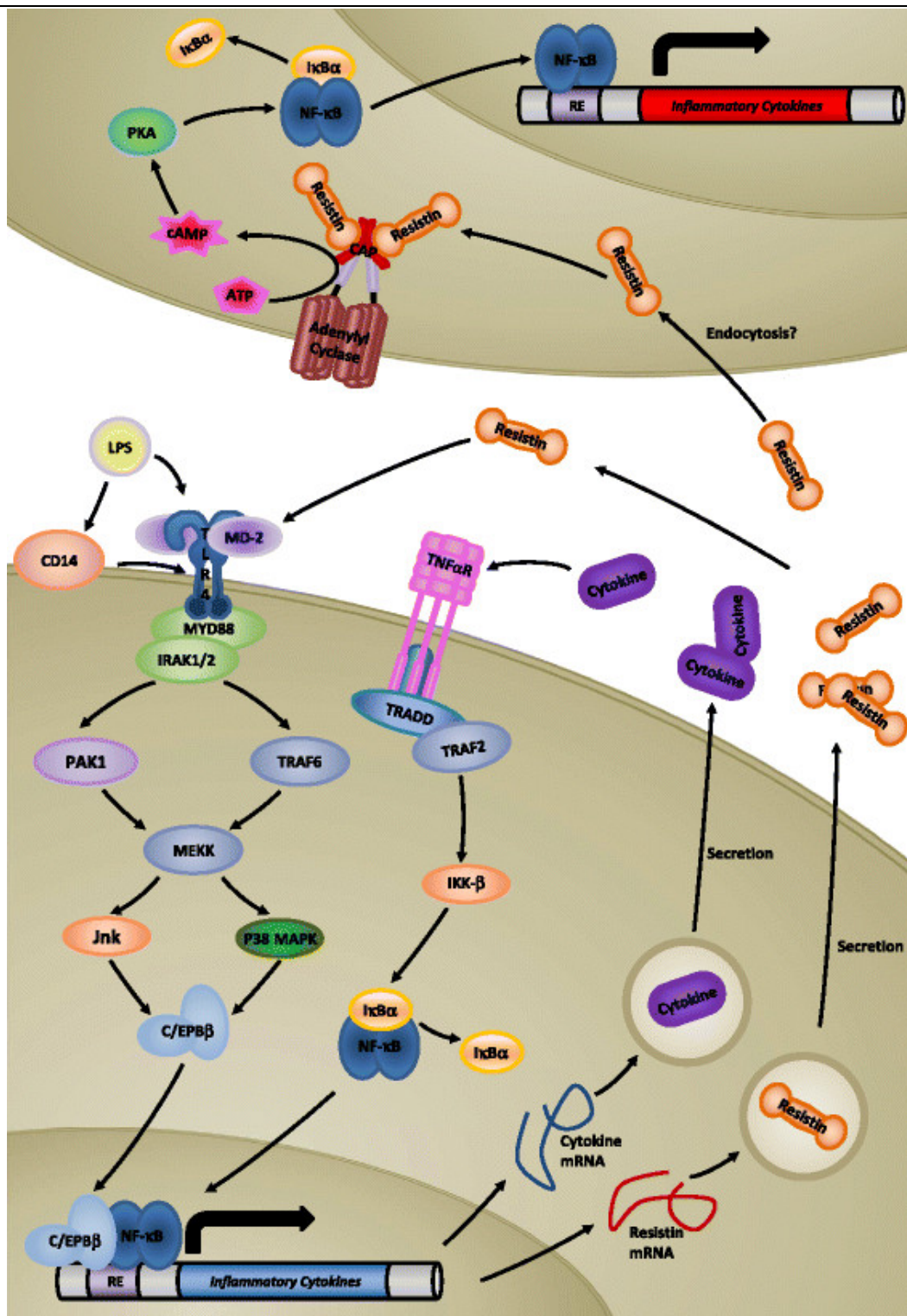


Figure 18 : Mécanismes d'action de la résistine humaine.

(Hannan and Culligan, 2015).

Récepteurs de la résistine humaine :

Une étude récente propose CAP1 (adenylyl cyclase associated protein 1) comme le récepteur fonctionnel de la résistine humaine au niveau des monocytes (Lee et al., 2014). La résistine en interagissant avec CAP1, conduit à l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire ce qui induit l'activation de la PKA (protéine kinase A), NFκB et la transcription de gènes des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL1β et TNFα dans les monocytes humains THP-1. Cependant, bien que l'interaction entre CAP1 et la résistine ait été clairement montrée, des questions restent en suspens concernant les mécanismes conduisant à cette interaction. En effet, CAP1 est une protéine cytosolique, qui peut se retrouver au niveau de la membrane mais ne possède pas de domaine transmembranaire (Hubberstey and Mottillo, 2002) alors que la résistine est une protéine circulante (Figure 18).

Le récepteur TLR4 a aussi été suggéré comme le récepteur fonctionnel de la résistine humaine selon plusieurs études (Figure 18), et semble être le meilleur candidat qui permet d'expliquer les rôles multifonctionnels de la résistine au niveau de l'inflammation, l'installation de l'obésité et la résistance à l'insuline, l'athérosclérose et le cancer (Benomar et al., 2013; Hsieh et al., 2014; Pirvulescu et al., 2014; Tarkowski et al., 2010). L'implication de TLR4 dans tous ces processus sera détaillée un peu plus loin.

i. Le facteur de nécrose tumorale α (TNFα) :

Le TNFα est une cytokine pro-inflammatoire produite dans un premier temps sous la forme d'une protéine transmembranaire de 26 kDa. Par la suite, TNFα est libéré dans la circulation après un clivage protéolytique par la metalloprotease TACE (TNF alpha converting enzyme) produisant une molécule soluble de 17 kDa. Les TNFα solubles forment ensuite des homotrimères de 51 kDa. Bien que les adipocytes soit capables de produire du TNFα, ce sont principalement les macrophages de la FSV qui sécrètent le TNFα (Fain et al., 2004; Maury et al., 2009).

Le TNFα agit principalement via le récepteur TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) en activant 2 voies de signalisation pro-inflammatoires impliqués dans l'obésité et la résistance à l'insuline : la voie IKKβ/NFκB et la voie des MAP kinases JNK (Maury and Brichard, 2010) (Figure 19). Le traitement par le TNFα de rongeurs

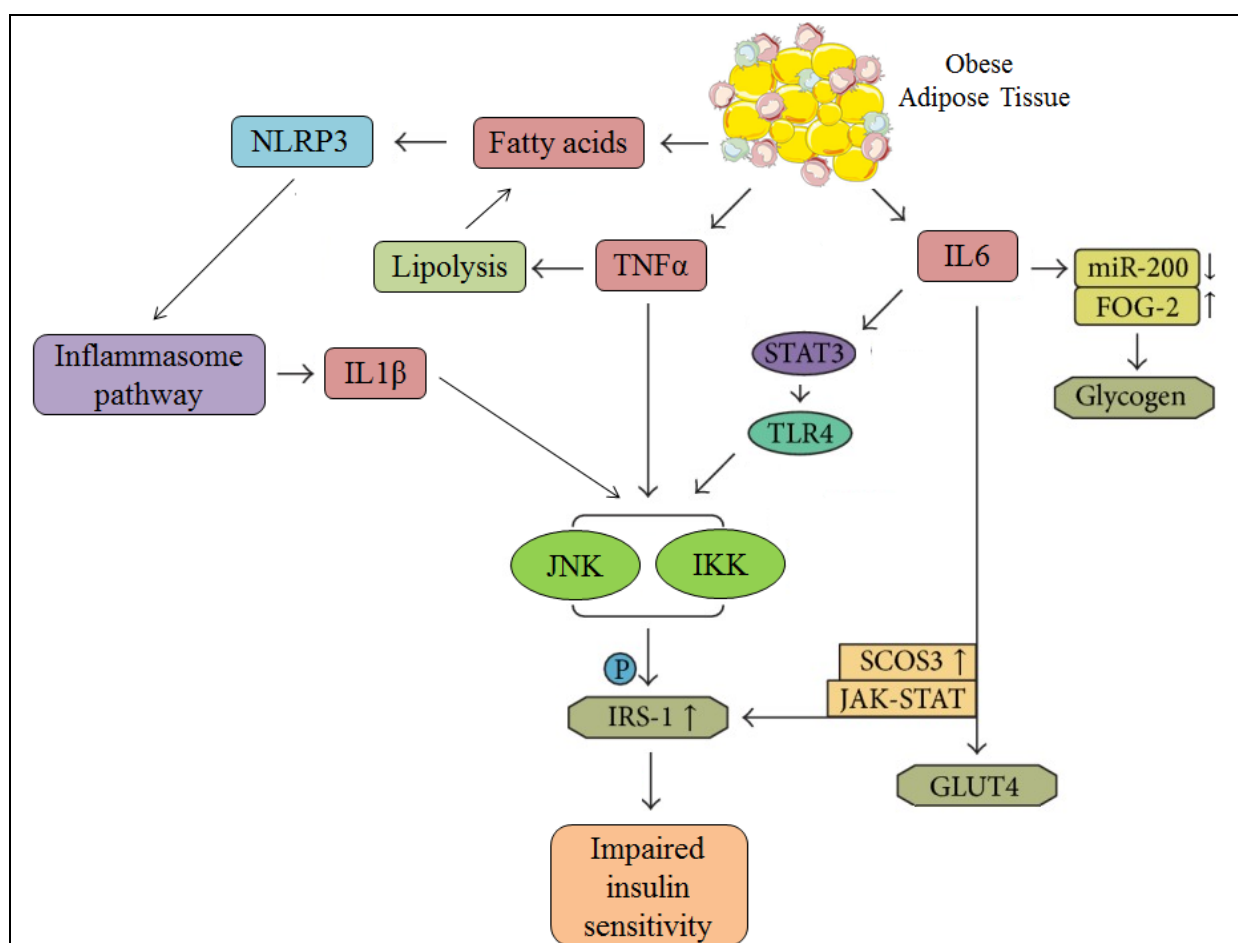


Figure 19 : Mécanismes d'action des cytokines pro-inflammatoires

Le TNF α et IL1 β induisent la résistance à l'insuline en favorisant l'activation des Serine / Thréonine kinases JNK et IKK qui inhibent les IRS en les phosphorylant sur des résidus serine. TNF α est également impliqué dans l'élévation des niveaux d'acides gras libres en favorisant la lipolyse. IL6 conduit à l'installation de la résistance à l'insuline en réduisant l'expression du transporteur de glucose GLUT4 et en induisant l'expression de SOCS3 qui empêche la fixation des IRS sur le récepteur de l'insuline. IL6 peut également activer les Serine / Thréonine kinases JNK et IKK au niveau musculaire par l'intermédiaire du récepteur TLR4. De plus, IL6 inhibe l'expression du miR-200 et favorise celle de FOG-2 altérant ainsi les mécanismes de synthèse du glycogène. (adapté de Chen et al., 2015).

ou de cellules en culture induit une résistance à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993) alors que sa neutralisation chez les rats obèses *fa/fa*, les souris *ob/ob* ou les souris soumises à un régime hyperlipidique améliore la sensibilité à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997). Cependant, chez l'homme, ses effets restent controversés. Il a été montré que les niveaux de TNF α étaient 2.5 fois supérieur dans le tissu adipeux d'individus obèses (Kern et al., 1995). De plus, certaines études montrent qu'un traitement à long terme avec des agents bloquant le TNF α chez des patients obèses et souffrant de maladies inflammatoires chroniques, comme la polyarthrite rhumatoïde, améliore leur sensibilité à l'insuline (Gonzalez-Gay et al., 2006; Stanley et al., 2011) alors que l'ensemble des autres études cliniques ne démontre aucune amélioration (Bernstein et al., 2006; Dominguez et al., 2005; Wascher et al., 2011).

Le TNF α favorise la résistance à l'insuline en inhibant la voie de signalisation de l'insuline et en activant la lipolyse (Souza et al., 1998; Zhang et al., 2002). L'activation des serine/threonine kinases JNK et IKK β conduit à la phosphorylation des IRS sur des résidus sérines et inhibant ainsi la signalisation de l'insuline (Gao et al., 2002; Hotamisligil et al., 1994). Le TNF α amplifie la libération des acides gras libres, induisant ainsi une dyslipidémie athérogène (Rosenson et al., 2004). Les acides gras libres sont aussi impliqués l'activation du récepteur TLR4 (Lee et al., 2001) ce qui conduit à l'activation de NF κ B qui va amplifier le signal pro-inflammatoire en augmentant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL1 β) (McArdle et al., 2013) ainsi que plusieurs enzymes impliqués dans l'inflammation comme la cyclooxygénase 2 (COX2) (Sarkar et al., 2004). En effet, les souris déficientes en TLR4 et soumises à un régime riche en acides gras saturés présentent une meilleure sensibilité à l'insuline (Kim et al., 2007)

iv. L'Interleukine 6 (IL6) :

L'IL6 est une cytokine pro-inflammatoire de 22 à 27 kDa produite par plusieurs types cellulaires (les adipocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales) et dont 15-35% des niveaux circulants proviennent du tissu adipeux (Bastard et al., 2005). IL6 exerce ses effets via son récepteur IL6R (Interleukin 6 receptor) en activant la voie Jak (janus kinase) / STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Les STAT3 ainsi phosphorylés forment des dimères

capables d'être transférés au niveau nucléaire où ils vont contrôler l'expression de gènes cibles (Figure 19).

L'augmentation des niveaux plasmatiques et de la production d'IL6 est corrélée positivement avec l'obésité et la résistance à l'insuline (Kwon and Pessin, 2013). Le traitement des adipocytes *in vitro* avec IL6 diminue l'expression de GLUT4 (Lagathu et al., 2003) et une administration périphérique d'IL6 chez le rongeur provoque une résistance à l'insuline (Kim et al., 2004). De plus, des souris nourries avec un régime riche en acides gras saturés présentent des niveaux élevés d'IL6 et développent une résistance à l'insuline (Sabio et al., 2008). Les effets de IL6 sur l'installation d'une résistance à l'insuline sont expliqués par une augmentation de l'expression de la protéine SOCS3, qui est impliqué dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline (Lukic et al., 2014; Sabio et al., 2008; Serrano-Marco et al., 2012). En effet, une surexpression de SOCS3 dans le tissu adipeux de souris conduit à une résistance locale à l'insuline (Shi et al., 2006). IL6 diminue également la synthèse du glycogène au niveau hépatique et musculaire en inhibant la PI3K, un mécanisme qui passe par la régulation négative de la famille des microARN-200 et la régulation positive de FOG2 (friend of GATA 2) (Dou et al., 2013). Il a été suggéré aussi que la stimulation par IL6 au niveau musculaire conduit à une résistance à l'insuline en induisant l'expression du récepteur TLR4 par l'intermédiaire de STAT3 (Kim et al., 2013).

Cependant, l'implication d'IL6 dans le développement de l'obésité et l'installation de la résistance à l'insuline n'est pas encore totalement élucidée et reste controversée. En effet, les souris déficientes en IL6 développent une obésité, une résistance à l'insuline ainsi qu'une inflammation hépatique et l'administration de IL6 améliore leur sensibilité à l'insuline (Matthews et al., 2010; Wallenius et al., 2002). De plus, des études ont montré que le muscle squelettique produisait et sécrétait de IL6 lors d'un exercice physique, alors qu'il présente une meilleure sensibilité à l'insuline (Maury and Brichard, 2010; Pedersen and Febbraio, 2008). Ces résultats sont expliqués par un rôle d'IL6 au niveau mitochondrial qui n'est pas encore clairement élucidé (Matthews et al., 2010).

v. L'interleukine 1 β (IL1 β) :

IL1 β , est une cytokine pro-inflammatoire produite par plusieurs types cellulaires (Banerjee and Saxena, 2012) et impliquée dans la réponse aux stress cellulaires et l'induction de l'apoptose (van de Veerdonk et al., 2011). IL1 β agit via son récepteur IL1R en activant les voies JNK, MAPK et NF κ B qui conduisent à la production de médiateurs d'inflammation et qui sont impliqués dans l'installation de la résistance à l'insuline (Figure 19). Chez l'homme, l'augmentation des niveaux circulants d'IL1 β est associée au développement du diabète de type 2 (Spranger et al., 2003). De plus, chez les individus obèses, les niveaux d'IL1 β et de son récepteur sont augmentés au niveau du tissu adipeux et contribuent à l'installation d'un état inflammatoire et au gain de poids (Juge-Aubry et al., 2003).

IL1 β est produit sous la forme d'un précurseur inactif (pro-IL1 β). En situation d'inflammation / obésité, ce dernier est activé suite à son clivage par la caspase 1 (Dinarello et al., 2012), qui elle-même doit être activée par l'inflammasome NLRP3, qui est activé par les acides gras saturés (Wen et al., 2011). IL1 β et NLRP3 jouent un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux (Stienstra et al., 2010, 2012). Au niveau du pancréas, IL1 β peut être produit par les cellules β pancréatiques où il contribue à l'inflammation en recrutant des cellules immunitaires ce qui favorisera le dysfonctionnement des cellules β pancréatiques et leur mort cellulaire. Cependant les souris déficientes en IL1 β , caspase1 ou NLRP3 présentent une meilleure sensibilité à l'insuline (Hardaway and Podgorski, 2013). De plus, les souris déficientes en NLRP3 sont protégées contre les effets délétères du régime hyperlipidique (Youm et al., 2011).

2. TLR4, lien entre l'inflammation, l'obésité et la résistance à l'insuline :

a. Description des récepteurs Toll-Like :

Les récepteurs Toll-Like (TLR) sont des récepteurs cellulaires qui existent chez l'homme et les mammifères et sont homologues au produit du gène *Toll* de la drosophile. Ces récepteurs sont très conservés au cours de l'évolution et jouent un rôle important dans l'immunité innée.

Le premier TLR identifié chez les mammifères a été le TLR4 en 1997 (Medzhitov et al., 1997). Ce dernier a été identifié comme le récepteur du LPS, un composant essentiel de la face externe de la membrane des bactéries à Gram négatif (Politorak et al., 1998). Par la suite, plusieurs TLR ont été identifiés (11 chez l'homme et 13 chez la souris) (Akira, 2006). Les TLR sont retrouvés sur des cellules immunitaires mais aussi sur des cellules non immunes comme les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules épithéliales, respiratoires et urogénitales (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Les TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 sont exprimés sur la surface membranaire des cellules alors que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont localisés dans les endosomes (Kanzler et al., 2007).

La structure des TLR se divise en trois domaines (Kawai and Akira, 2007) : un domaine LRR extracellulaire riche en leucine et responsable de la reconnaissance des éléments du pathogène, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui comprend une séquence TIR (Toll/IL1 receptor) responsable de la transduction du signal.

Les TLR reconnaissent des molécules composantes des microorganismes, appelées PAMP (pathogen associated molecular pattern), mais aussi des molécules endogènes libérées par des cellules en situation de stress ou suite à leur apoptose ou nécrose appelées DAMP (Damage associated molecular pattern) (Kanzler et al., 2007).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous focaliser sur le récepteur TLR4. En effet, TLR4 est l'un des TLR les plus étudiés et son gène est très conservé parmi les espèces (Vaure and Liu, 2014). Au niveau membranaire, le récepteur TLR4 forme un complexe avec la protéine à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) CD14 et la protéine MD2, qui vont jouer un rôle dans la reconnaissance de certains ligands de TLR4, comme le LPS (Fitzgerald et al., 2004).

b. Les ligands du TLR4 :

En plus du LPS, le TLR4 reconnaît d'autres ligands que l'on peut diviser en deux groupes selon leurs origines :

i. Les ligands exogènes :

Le Paclitaxel (Taxol), un agent anti-tumorale utilisé dans le traitement de certains cancers, est responsable d'une réponse dépendante de TLR4 (Kawasaki et al., 2000; Rajput et al., 2013).

Certains virus sont aussi capables d'activer le TLR4 grâce à leurs protéines de surface comme le virus respiratoire syncytial (VRS) (Kurt-Jones et al., 2000) et le mouse mammary tumor virus (MMTV) (Rassa et al., 2002).

ii. Les ligands endogènes :

Les protéines de stress sont des molécules chaperons qui signalent un danger ou une lésion au système immunitaire inné. Ces molécules sont généralement libérées au cours de la mort cellulaires et induisent une réponse pro-inflammatoire. Parmi ces molécules qui sont reconnus par le TLR4, on retrouve les protéines du choc thermique HSP (heat shock proteins) (Vabulas et al., 2002).

Certains composants de la matrice extracellulaire sont aussi reconnus par le TLR4 comme l'extra domaine A de la fibronectine et des oligosaccharides de l'acide hyaluronique (Akira, 2006; Marshak-Rothstein and Rifkin, 2007).

TLR4 reconnaît aussi certains acides gras saturés, par l'intermédiaire de la féтуine-a, une protéine synthétisée et sécrétée dans la circulation sanguine par le foie. Cette dernière appartient aux groupes de protéines transporteuses comme l'albumine et assure la liaison, le transport et les équilibres d'une large variété de substances. Ainsi, la féтуine-a en transportant les acides gras saturés conduit à l'induction des effets pro-inflammatoires de ces derniers en se liant à TLR4 (Pal et al., 2012).

Le récepteur TLR4 joue également un rôle majeur dans la médiation des effets pro-inflammatoires et insulino-résistants de la résistine humaine. En effet, il existe une compétition entre la résistine et le LPS pour se lier à TLR4

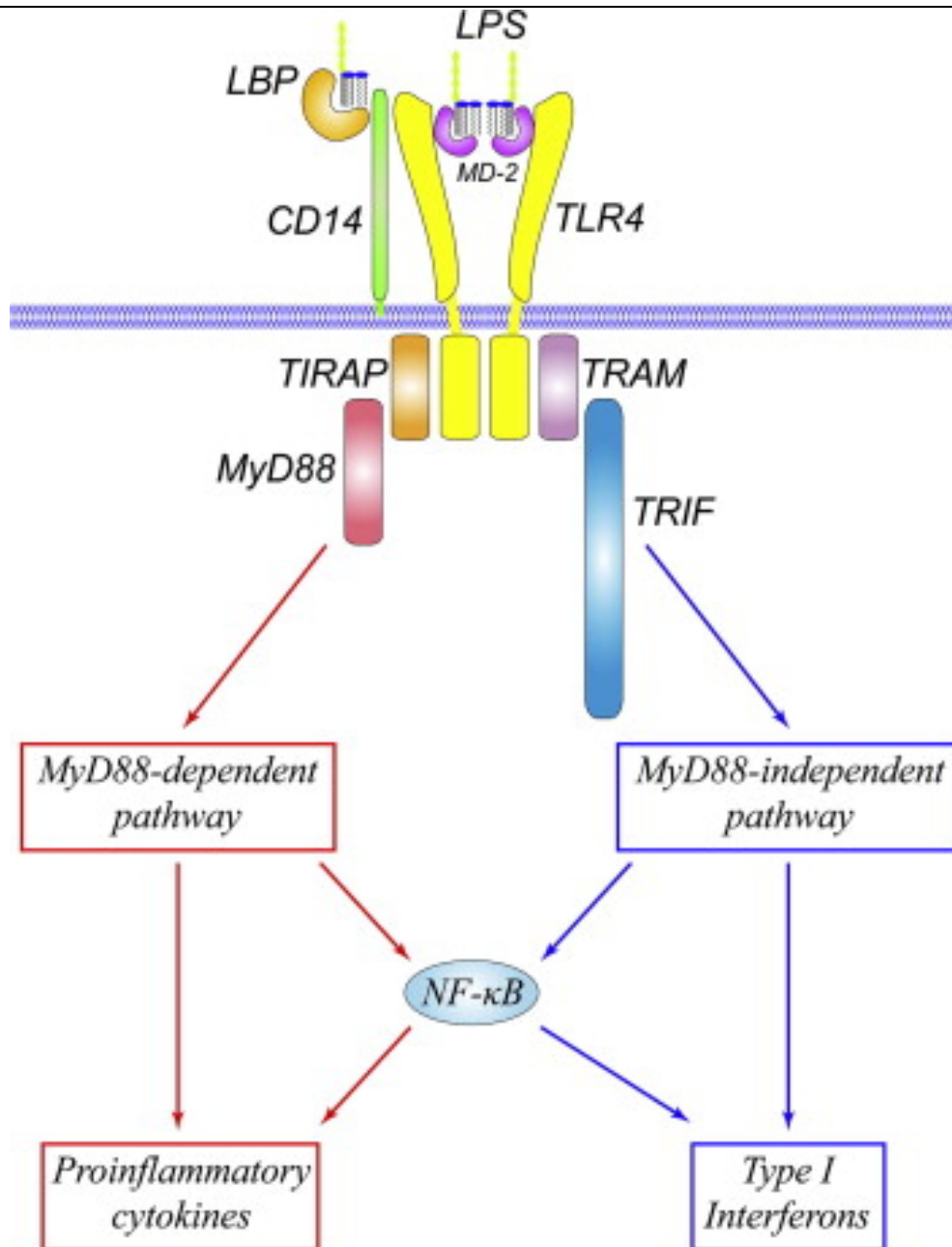


Figure 20 : Voies de signalisation du récepteur TLR4

Deux principales voies de signalisation sont activées par le récepteur TLR4, cela dépend des protéines adaptatrices recrutées. La voie MyD88 dépendante aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires, alors que la voie TRIF dépendante (aussi appelé MyD88 indépendante) qui conduit à la synthèse d'interférons de type 1. (Lu et al. 2008)

(Tarkowski et al., 2010) et un traitement chez des rats en icv (intra cérébro-ventriculaire) par de la résistine humaine pendant 14 jours conduit à une résistance centrale à l'insuline via l'activation des voies de signalisations de TLR4 (Benomar et al., 2013). En effet, l'inhibition de l'expression de TLR4 par des siRNA conduit à l'abolition des effets pro-inflammatoires et insulino-résistants de la résistine (Benomar et al., 2013). La résistine induit aussi via TLR4 l'expression du facteur SDF1 (stromal cell-derived factor 1) qui est impliqué dans le développement du cancer de l'estomac chez l'homme (Hsieh et al., 2014). De plus, la résistine et TLR4 jouent un rôle dans la formation des plaques d'athérosclérose. En effet, la résistine en activant TLR4 induit l'infiltration des macrophages au niveau de la paroi artérielle (Pirvulescu et al., 2014).

c. Les voies de signalisation de TLR4 :

Après sa liaison avec son ligand, le récepteur TLR4 va recruter un ensemble de protéines adaptatrices via ses domaines TIR, ce qui aboutit à l'activation de deux principales voies de signalisation : la voie MyD88 dépendante, qui induit l'expression des facteurs pro-inflammatoires, et la voie TRIF dépendante, qui mène à l'activation d'interféron de type I (Figure20) (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2004).

i. Les protéines adaptatrices :

MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene) :

MyD88 est une protéine de 33 kDa contenant deux domaines d'interaction protéine-protéine : un domaine TIR dans la région C-terminale et un domaine de la mort (DD, death domain) dans la région N-terminale (Burns et al., 1998). MyD88 a été initialement décrit comme un adaptateur critique des récepteurs IL1R et TLR qui possèdent des domaines TIR (Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). Les études des souris déficientes en MyD88 ont permis de montrer son rôle dans la réponse rapide au LPS et la distinction entre les deux voies activées par TLR4. En effet, les souris déficientes en MyD88 sont résistantes aux chocs septiques induits par le LPS et leur activation du facteur NFκB survient plus tardivement (Kawai et al., 1999). De plus, l'activation des interférons de type I et l'induction de l'expression de gènes par ces derniers ne sont pas modifiés dans les macrophages déficients en MyD88 (Kawai et al., 2001).

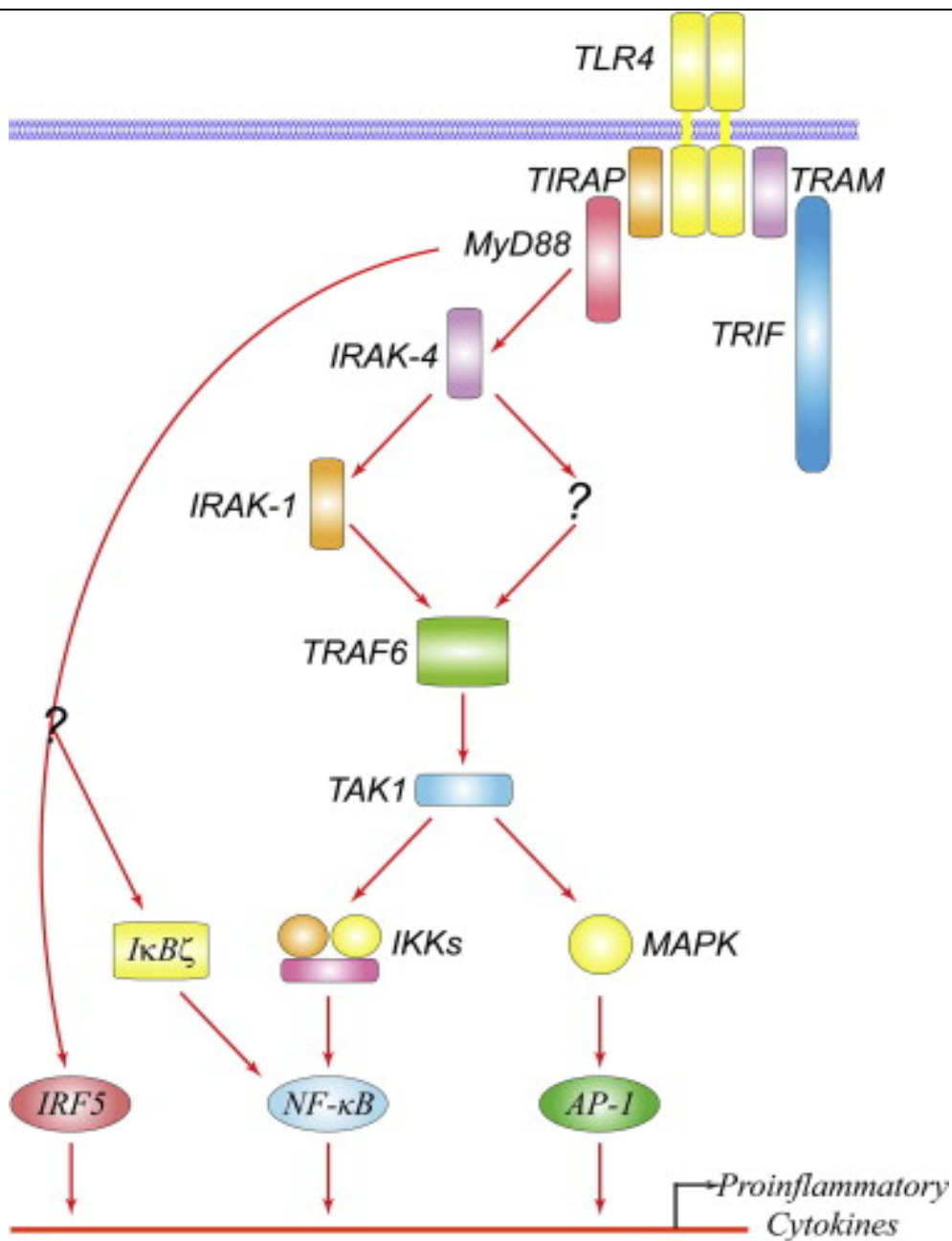


Figure 21 : TLR4 et voie de signalisation MyD88 dépendante

(Lu et al., 2008)

TIRAP (TIR domain containing adaptator protein) :

TIRAP a été découvert et cloné suite à des recherches *in silico* pour des protéines contenant le domaine TIR (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001). TIRAP est aussi appelé Mal (MyD88 adapter like) pour son rôle coopératif avec MyD88. En effet, les souris déficientes en TIRAP présentent un phénotype similaire aux souris déficientes en MyD88 (Fitzgerald et al., 2001). TIRAP contient un domaine de liaison au PIP2 (Kagan and Medzhitov, 2006) qui permet son recrutement à la surface membranaire. TIRAP se lie ainsi au récepteur TLR4 via son domaine TIR et facilite l'association entre MyD88 et le domaine cytoplasmique de TLR4 initiant ainsi la voie de signalisation MyD88-dépendante (Kagan and Medzhitov, 2006).

TRAM (TRIF related adaptator molecule) :

TRAM a été découvert de la même façon que TIRAP (Yamamoto et al., 2003a). Les études des souris déficientes en TRAM ont montré que ce dernier est impliqué dans l'activation d'un signal indépendant de MyD88 (Yamamoto et al., 2003a). TRAM est recruté à la membrane plasmique par myristoylation où il se lie à TLR4 et induit le recrutement de TRIF (Rowe et al., 2006).

TRIF (TIR domain containing adaptater inducing interferon β) :

TRIF a été découvert suite à de multiples approches de clonage (Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Son rôle important dans l'activation d'un signal indépendant de MyD88 a été démontré sur des souris déficientes en TRIF, en MyD88 ou les deux. En effet, les souris déficientes en TRIF présentent, suite à des traitements au LPS, une réponse rapide de NF κ B et une absence d'expression d'interféron de type I alors que les souris déficientes en MyD88 présentent une réponse en NF κ B plus tardive mais une expression plus importante d'interféron de type I. Cependant les souris déficientes en TRIF et MyD88 ont abolition complète de la réponse en NF κ B et en interféron (Lu et al., 2008b; Yamamoto et al., 2003b).

i. La voie MyD88 dépendante (Figure 21) :

TIRAP et MyD88 sont recrutés au niveau du récepteur TLR4 suite à son activation. MyD88 va ensuite recruter et activer la kinase IRAK4 (IL1 receptor

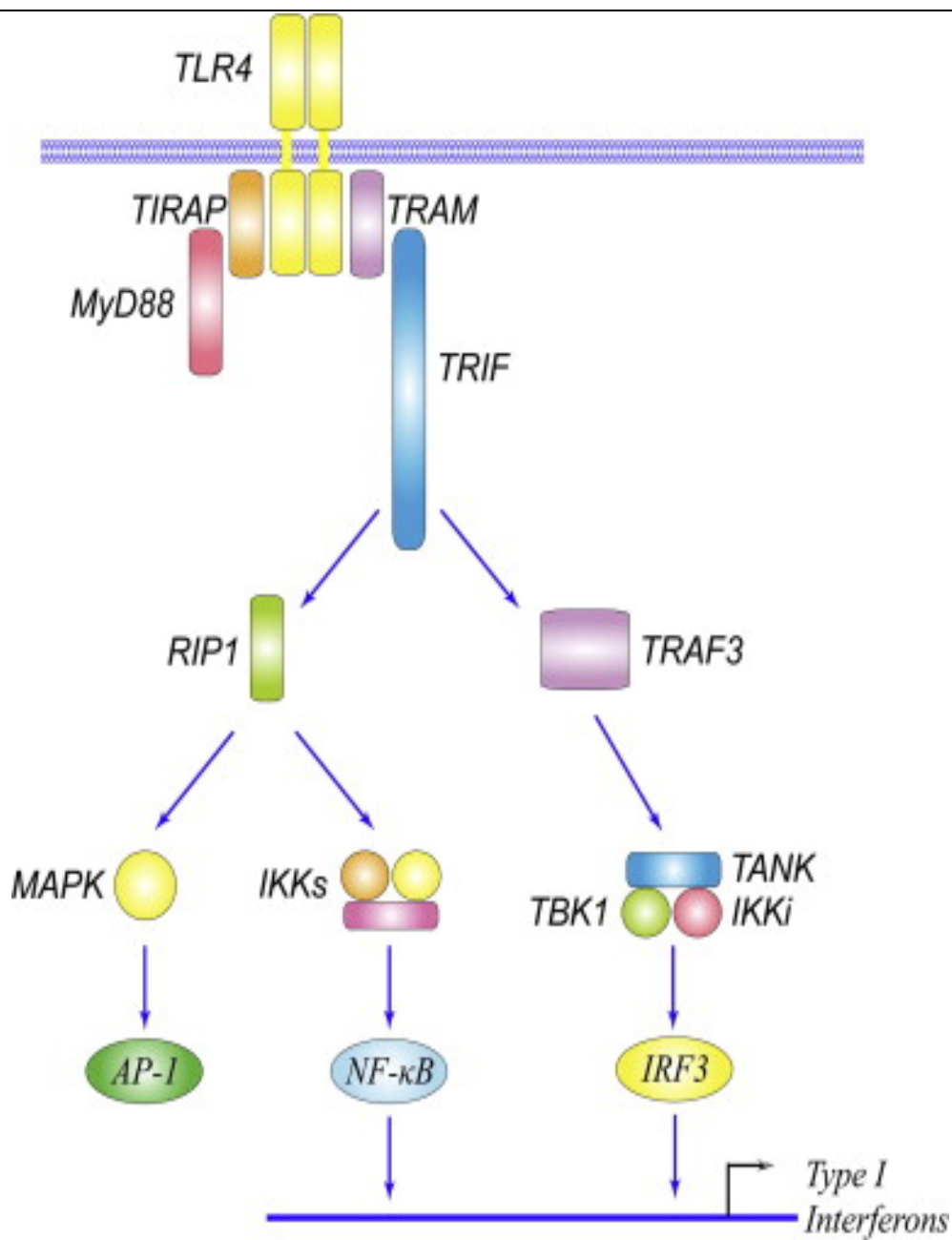


Figure 22 : TLR4 et voie de signalisation TRIF dépendante

(Lu et al., 2008)

associated kinase 4) par son domaine DD (Suzuki et al., 2002). Cette dernière va à son tour recruter et activer d'une manière séquentielle IRAK1 (Lye et al., 2004) et IRAK2 (Kawagoe et al., 2008). TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) est ensuite mobilisé au niveau du complexe membranaire et activé par IRAK1 ou IRAK2 via leur association au domaine TRAF de TRAF6. Une fois activé, TRAF6 se dissocie du complexe membranaire et va se lier avec TAB2 (TAK1 binding protein 2) et activer alors TAK1 (Transforming growth factor β activated kinase 1) (Gohda et al., 2004). TAK1 va ensuite activer les voies de IKK/ NF κ B et des MAP kinases P38, JNK et ERK1/2 (Sato et al., 2005) TRAF6 conduit aussi à l'activation de la voie PI3K/Akt via son association avec RIP (Receptor interacting protein) (Vivarelli et al., 2004).

i. La voie TRIF dépendante (Figure 22) :

L'activation de la voie TRAM/TRIF via TLR4 favorise la production d'interféron de type I suite à l'activation de deux voies de signalisation :

- Le recrutement de RIP1 (receptor interacting protein 1) par TRIF active TAK1 d'une manière similaire à celles des voies sous le contrôle de MyD88, de NF κ B et des MAP kinases (Lu et al., 2008b).
- Le recrutement de TRAF3 par TRIF active le facteur de transcription IRF3 (interferon regulatory factor 3) contrôlant ainsi la transcription d'interféron β (Lu et al., 2008b).

D'autres études ont montré qu'il existe un complexe préassemblé entre TLR4, TRAM et TIRAP à la surface cellulaire. Cependant, la signalisation TLR4/TRAM ne peut être initiée qu'après l'internalisation du récepteur TLR4, ce qui peut expliquer la réponse tardive au niveau de l'activation de NF κ B (Kagan et al., 2008).

d. Rôle de TLR4 dans l'obésité et la résistance à l'insuline :

L'implication du récepteur TLR4 dans l'installation de l'obésité et la résistance à l'insuline est actuellement fortement suggérée. En effet, TLR4 est exprimé dans les cellules immunitaires mais aussi dans les principaux tissus impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique comme le tissu adipeux, le foie, le muscle et l'hypothalamus (Tanti et al., 2012). Les niveaux d'expression du récepteur TLR4 sont augmentés chez les souris obèses et les patients diabétiques (Catalán et al., 2012; Mraz et al., 2011; Reyna et al., 2008; Shi et al., 2006; Song et al., 2006). De plus son

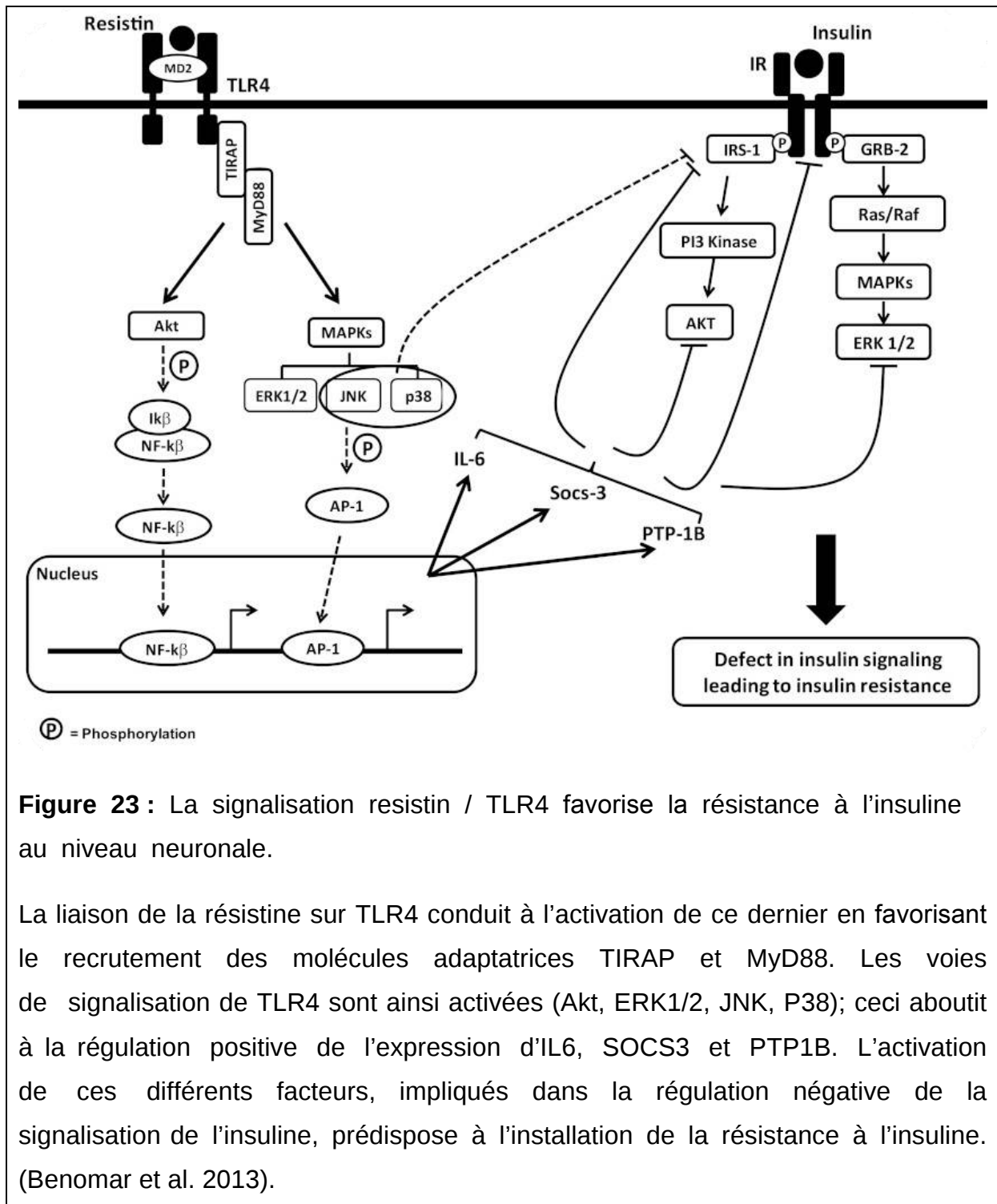


Figure 23 : La signalisation resistin / TLR4 favorise la résistance à l'insuline au niveau neuronale.

La liaison de la résistine sur TLR4 conduit à l'activation de ce dernier en favorisant le recrutement des molécules adaptatrices TIRAP et MyD88. Les voies de signalisation de TLR4 sont ainsi activées (Akt, ERK1/2, JNK, P38); ceci aboutit à la régulation positive de l'expression d'IL6, SOCS3 et PTP1B. L'activation de ces différents facteurs, impliqués dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline, prédispose à l'installation de la résistance à l'insuline. (Benomar et al. 2013).

expression est corrélée négativement avec la sensibilité à l'insuline (Könner and Brüning, 2011). Les souris déficientes en TLR4 sont protégées contre l'obésité et la résistance à l'insuline induites par un régime hyperlipidique ou par un traitement par des acides gras saturés (Saber et al., 2009; Shi et al., 2006). Ainsi, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la contribution de TLR4 dans l'installation de l'obésité et la résistance à l'insuline. Parmi eux :

i. L'endotoxémie métabolique :

L'endotoxémie métabolique est définie par l'augmentation des niveaux circulants des lipopolysaccharides (LPS) provenant des bactéries Gram négatives de la flore intestinale. Il a été montré qu'un régime hyperlipidique entraînait une modification de la flore et la perméabilité intestinale conduisant à une augmentation de la translocation des bactéries Gram négatives dans le tissu adipeux et à l'endotoxémie via un mécanisme dépendant de la voie de LPS/CD14/TLR4 (Amar et al., 2011; Cani et al., 2007). L'endotoxémie serait ainsi le facteur déclenchant de l'inflammation et favorisant l'installation de l'obésité et du diabète de type 2 (Cani et al., 2012).

i. La résistine :

Comme évoqué précédemment, la résistine est impliquée dans l'installation de la résistance à l'insuline. Récemment, il a été montré que la résistine humaine pouvait se lier à TLR4 dans un modèle neuronale de neuroblastome humain et qu'un traitement en ICV par cette dernière induisait une résistance centrale à l'insuline (Figure 23) (Benomar et al., 2013b). De plus, le traitement par la résistine humaine chez les rats Wistar conduit, au niveau de l'hypothalamus, à une augmentation de l'association de TLR4 avec ses protéines adaptatrices TIRAP et MyD88 ainsi qu'à l'activation des voies de signalisations des MAP kinases JNK et P38.

ii. L'infiltration des macrophages :

Le récepteur TLR4 joue un rôle important dans la réponse immunitaire. Ainsi, il a été proposé que l'infiltration des tissus métabolique par les macrophages puisse être impliquée dans la médiation des effets pro-inflammatoires de TLR4 dans ces tissus, accentuant ainsi l'état d'obésité et de résistance à l'insuline. En effet, il a été montré que les souris déficientes en TLR4 avaient des niveaux bas d'inflammation

accompagnés par une réduction de l'infiltration des macrophages ainsi qu'un développement plus important des macrophages anti-inflammatoires M2 au profit des macrophage pro-inflammatoires M1 (Davis et al., 2008; Orr et al., 2012; Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007).

iii. Les acides gras :

L'augmentation des niveaux circulants d'acides gras saturés libres contribue au développement de l'obésité viscérale, favorise l'accumulation de gras dans le muscle et le foie ce qui favorise la résistance à l'insuline (Boden, 2008). Les acides gras saturés conduisent à l'activation du récepteur TLR4 et ses voies de signalisation induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et de céramides (Fresno et al., 2011; Milanski et al., 2009; Radin et al., 2008; Shi et al., 2006). Cependant, il a été montré qu'il n'y avait aucune liaison directe des acides gras saturés sur le récepteur TLR4 suggérant une activation indirecte (Erridge and Samani, 2009; Schaeffler et al., 2009). En effet, il a été montré récemment que la fétuine-a servirait de lien entre les acides gras saturés et le récepteur TLR4 pour promouvoir la résistance à l'insuline (Pal et al., 2012).

La longueur de la chaîne des acides gras saturés joue aussi un rôle important dans la médiation des effets pro-inflammatoires de ces derniers. En effet, elle est corrélée positivement avec la capacité des acides gras à induire une résistance à l'insuline (Hommelberg et al., 2009). Ainsi, au niveau musculaire, il a été montré que des acides gras saturés à longue chaîne comme l'acide palmitique (C16:0) étaient capables d'activer les voies pro-inflammatoires et induire une résistance à l'insuline ce qui n'est pas le cas des acides gras saturés à courte chaîne comme l'acide laurique (C12:0) (Hommelberg et al., 2009).

Les acides gras saturés peuvent aussi activer la signalisation de TLR4 par l'intermédiaire de la production de dérivés lipidiques comme les céramides. Ces derniers résultent de la combinaison d'une sphingosine avec un acide gras et sont impliqués dans plusieurs processus dont l'inflammation (Summers, 2006). En effet, les céramides peuvent induire une réponse pro-inflammatoire en agissant comme agonistes du récepteur TLR4 (Fischer et al., 2007). De plus, il a été montré que les céramides (C16 :0) dérivés de l'acide palmitique étaient capables d'induire une résistance à l'insuline (Raichur et al., 2014; Turpin et al., 2014).

III. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga-3 :

1. Généralités sur les acides gras :

Les acides gras (AG) sont les constituants majeurs des lipides. Ces molécules sont composées d'une chaîne hydrocarbonée avec un groupement méthyle (CH_3) à l'une des extrémités et un groupement carboxyle (COOH) à l'autre. Les acides gras diffèrent les uns des autres par la longueur de leur chaîne carbonée et leur degré d'insaturation. Ce dernier est défini par la présence ou non de doubles liaisons entre les différents carbones qui constituent la chaîne. On différencie ainsi les acides gras saturés (AGS) qui ne comportent aucune double liaison dans leur chaîne hydrocarbonée, des acides gras insaturés (AGI) qui présentent une (acides gras monoinsaturés, AGMI) ou plusieurs (acides gras polyinsaturés, AGPI) doubles liaisons (Walrand et al., 2010).

Par convention, la nomenclature des acides gras est la suivante : $\text{C}_x : y_n - z$, « x » étant le nombre d'atomes de carbone C, « y » le nombre de doubles liaisons et « z » la position de la première double liaison sur la chaîne carbonée en comptant à partir de l'extrémité méthyle CH_3 (Walrand et al., 2010).

Les acides gras saturés représentent 30 à 40 % des acides gras totaux contenus dans les tissus des animaux. Ces derniers peuvent être synthétisés par l'organisme mais peuvent également être apportés directement par l'alimentation. On les trouve principalement dans les graisses animales, les produits laitiers et les huiles de palme et de coco (de Souza et al., 2015). Parmi les acides gras saturés courants, on peut citer l'acide butyrique ($\text{C}_4:0$), l'acide laurique ($\text{C}_{12:0}$), l'acide myristique ($\text{C}_{14:0}$), l'acide palmitique ($\text{C}_{16:0}$) et l'acide stéarique ($\text{C}_{18:0}$). Chacun de ces acides gras possède ses propres fonctions biologiques dans l'organisme. Ainsi, l'acide butyrique est impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes et pourrait jouer un rôle dans l'inhibition du développement des cellules cancéreuses, l'acide laurique pourrait participer à la synthèse d'AGPI oméga 3, l'acide myristique joue un rôle dans la signalisation cellulaire en régulant la myristoylation de certaines protéines, et

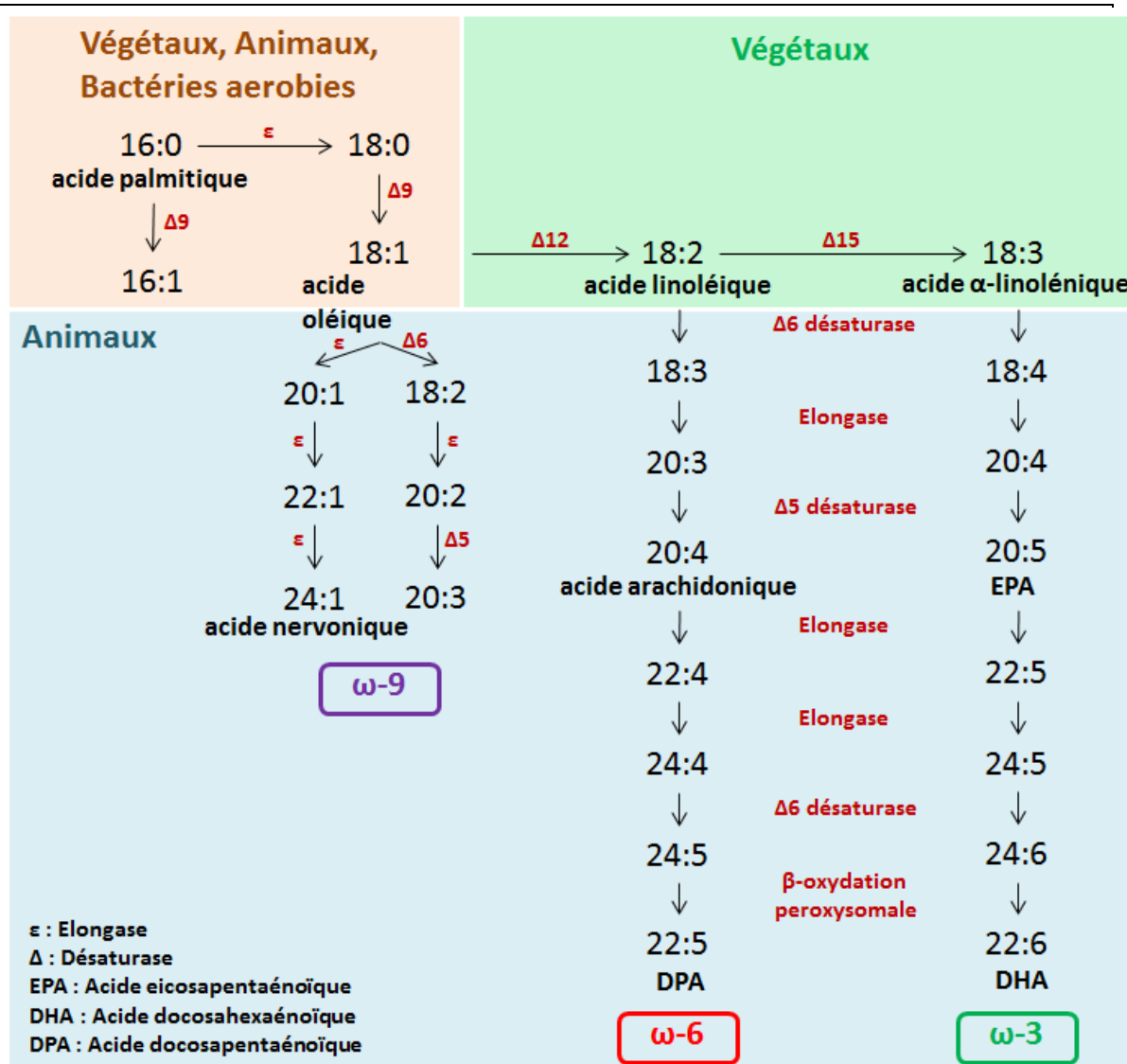
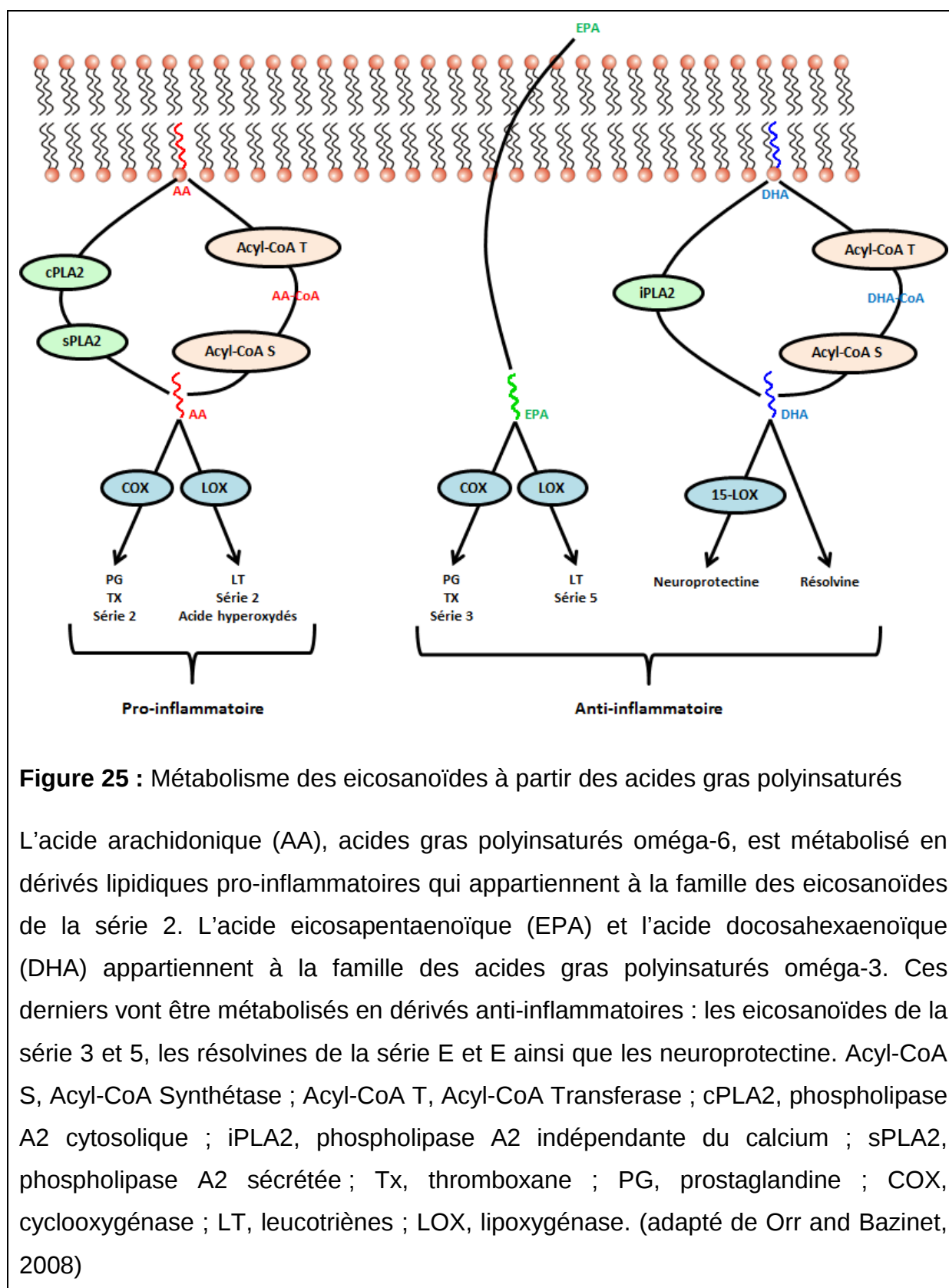


Figure 24 : Biosynthèse des acides gras insaturés

L'acide oléique constitue le point de départ de la voie de biosynthèse des acides gras polyinsaturés oméga 3 et oméga 6. Les désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$ insèrent respectivement une double liaison à 6 carbones et 3 carbones de l'extrémité méthyle. Ces deux étapes constituent le point limitant de cette voie de biosynthèse puisqu'elles sont spécifiques du règne végétal. L'acide linoléique (LA) et l'acide α -linolénique (ALA) sont considérés comme des acides gras indispensables parce qu'ils sont nécessaires pour les fonctions physiologiques de tous les tissus mais ne sont pas synthétisés par l'homme. Cependant, l'homme et les animaux peuvent ensuite ajouter des doubles liaisons et allonger la chaîne carbonée des deux acides gras précurseurs LA et ALA conduisant à la formation des autres acides polyinsaturés oméga-3 et oméga-6. (adapté de Legrand, 2007).

l'acide palmitique intervient dans plusieurs processus biologique et possède des propriétés pro-inflammatoires et réduit la sensibilité à l'insuline (Rioux and Legrand, 2007; Walrand et al., 2010). L'acide palmitique est ainsi considéré le plus délétères en raison de sa prédominance dans les différents régimes alimentaire et sa grande consommation qui peut représenter jusqu'à 56% de la consommation des AGS totaux (Kris-Etherton and Yu, 1997).

Les AGPI sont composés de deux familles : la famille de l'acide α -linoléique (C18:3n-3 ou ALA) ou oméga-3 et la famille de l'acide linoléique (C18:2n-6 ou LA) ou oméga-6. L'ALA et le LA sont appelés acides gras indispensables car ils ne peuvent pas être produits par l'organisme humain et doivent être apportés par l'alimentation. En effet, les désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$ qui génèrent successivement ALA et LA à partir de l'acide oléique (C18:1n-9) en introduisant des doubles liaisons à l'extrémité méthyle ne sont retrouvés que chez les végétaux (Figure 24). L'être humain trouve donc son apport en AGPI principalement dans des sources végétales, telles que les noix, les graines et les huiles végétales, mais également dans des sources marines par l'intermédiaire des microalgues et des poissons gras (hareng, saumon, maquereau) (Deckelbaum and Torrejon, 2012). L'ALA et le LA sont les précurseurs des deux familles d'AGPI et permettent la synthèse de dérivés à plus longue chaîne par une succession de désaturations et d'élongations localisées dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, les principaux AGPI formés dans les organismes animaux sont l'acide arachidonique (C20:4n-6 ou AA) pour la famille des oméga-6 et les acides eicosapentaénoïque (C20:5n-3 ou EPA) et docosahexaénoïque (C22:6n-3 ou DHA) (Simopoulos, 2014) pour la famille des oméga-3.



Les acides gras oméga-3 et oméga-6 ont des propriétés métaboliques et physiologiques différentes. Les AGPI à longue chaîne formés par la voie de désaturation-élongation peuvent entrer dans les voies enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation afin de former de puissants médiateurs métaboliques tels que les eicosanoïdes. La découverte de ces derniers et de leur synthèse à partir des AGPI a valu le prix Nobel à Bergstrom, Samuelsson et Vane en 1982 et constitue véritablement le déclenchement de l'intérêt envers les AGPI (Kenéz, 1983). Ainsi, les acides gras oméga-6 et leurs dérivés tendent à être pro-inflammatoires et induisent la prolifération du tissu adipeux alors que les acides gras oméga-3 et leurs dérivés ont plutôt un rôle protecteur et anti-inflammatoire (Figure 25) (Li, 2015; Simopoulos, 2006).

Les acides gras sont impliqués dans plusieurs processus biologiques et ont plusieurs rôles :

- Rôle métabolique : les acides gras représentent l'une des principales sources d'énergie de l'organisme. En cas d'excès, ils sont stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux et lors d'un effort physique ou un jeûne prolongé, ils seront dégradés afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.
- Rôle structural : les acides gras (sous forme de phospholipides) sont les principaux constituants des membranes biologiques. Selon la nature des acides gras qui les composent, les membranes vont avoir des propriétés particulières. Ainsi, les acides gras jouent un rôle dans la modulation de la fluidité membranaire et de l'activité des protéines qu'elles contiennent.
- Rôle de messenger : les acides gras sont aussi des régulateurs de l'expression de plusieurs gènes par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de transcription comme les PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor). Les acides gras peuvent également activer les voies de signalisation de plusieurs récepteurs tels que les récepteurs TLR2 et TLR4 par les acides gras saturés et le récepteur FFAR4 (Free Fatty Acid Receptor 4) par les acides gras polyinsaturés oméga-3.

2. Intérêt et sources alimentaires des acides gras oméga-3 :

L'intérêt pour l'étude des effets de la consommation des acides gras oméga-3 a été relevé la première fois par les travaux de Bang et Dyerberg dans les années 1970 (Bang et al., 1971). Ces derniers ont publié une série de travaux et d'études épidémiologiques révélant une diminution de la prévalence des maladies cardiovasculaires au sein de la population des Inuits due à leur régime alimentaire basé sur la consommation de grandes quantités de poissons et de mammifères marins, dont les graisses sont très riches en EPA et DHA (Dyerberg and Bang, 1979). Plus récemment, les AGPI ont été identifiés comme éléments clés dans le développement du cerveau et de la rétine (SanGiovanni et al., 2000).

Ainsi, la consommation d'huiles de poisson, comme source d'EPA et de DHA, a été proposée comme approche nutritionnelle pour le traitement et la prévention du syndrome métabolique. Les huiles de poissons ont été largement étudiés pour leur rôle bénéfique (Kantha, 1987), notamment pour leur action insulino-sensibilisatrice (Delarue et al., 2006; Jucker et al., 1999; Storlien et al., 1991). Ils diminuent aussi l'hypertriglycémie, la production de VLDL et la stéatose hépatique (Peyron-Caso et al., 2002; Rossi et al., 2005). Les huiles de poissons constituent aujourd'hui la principale source d'AGPI oméga-3 (Barnathan, 2007; Williams and Burdge, 2006). Cependant, l'accumulation de résidus polluants (métaux lourds) dans les graisses de poissons, les changements saisonniers de leur composition en acides gras associés aux problèmes d'odeur et de goût en tant que complément alimentaire pour l'homme (Barnathan, 2007; Certik and Shimizu, 1999), poussent au développement d'autres sources pour la production d'AGPI oméga-3. Les microalgues s'avèrent comme la solution permettant la substitution des AGPI des huiles de poisson (Mimouni et al., 2012; Ward and Singh, 2005).

Les microalgues sont apparus sur terre il y a plus d'un milliard d'années et constituent au sein du règne végétale, les membres avec l'organisation la plus simple et la plus primitive. Ce sont des microorganismes photosynthétiques eucaryotes unicellulaires dont la taille varie entre 3 et 20 µm. Les microalgues se trouvent généralement dans les eaux douces mais aussi dans la plupart des systèmes marins. La biodiversité des microalgues est énorme. En effet, il existe

environ plus de 50 000 espèces de microalgues dont seulement quelques-unes ont été caractérisées (Lordan et al., 2011).

Les microalgues présentent l'avantage de ne pas contenir de cholestérol contrairement aux huiles de poissons. Les microalgues ont aussi une image favorable auprès des consommateurs de par leur statut de cellule végétale ce qui facilite leur utilisation comme complément alimentaire. L'intérêt pour les AGPI des microalgues est aussi augmenté par l'absence de l'odeur contrairement aux huiles de poissons (Mimouni et al., 2012; Robles Medina et al., 1998). De plus, la culture de microalgues nécessite des substrats peu coûteux comme l'eau de mer, du CO₂, de l'énergie solaire et quelques minéraux (Pulz, 2001). L'intérêt de l'utilisation des microalgues comme source d'AGPI réside également dans la présence d'antioxydants tel que la fucoxanthine qui présente des effets anti-inflammatoire et anti-obésité (Gammone and D'Orazio, 2015; Tan and Hou, 2014).

Ainsi, de par leur composition biochimique intéressante, riche en AGPI et en antioxydants, l'utilisation des microalgues comme complément alimentaire constitue une approche nutritionnelle potentielle pour améliorer la santé humaine (Spolaore et al., 2006). En effet, plusieurs microalgues montrent des propriétés insulino-sensibilisatrices et anti-inflammatoires.

La microalgue *Spirulina* a été largement étudiée pour ses effets hypolipidémiants, antioxydants et anti-inflammatoires (Deng and Chow, 2010). Au niveau clinique, l'utilisation de la *Spirulina* comme complément chez des patients diabétiques durant plusieurs semaines réduit les niveaux plasmatiques des triglycérides et du cholestérol-LDL ainsi que la glycémie et la pression artérielle (Lee et al., 2008a; Parikh et al., 2001). De plus, la *Spirulina* diminue les niveaux d'inflammation en réduisant les taux plasmatiques de IL6 et des marqueurs de stress oxydatif chez les personnes âgées (Kim et al., 2005; Park et al., 2008) et chez les patients diabétiques (Lee, 2008). De la même façon, l'utilisation de la microalgue *Chlorella* comme supplément alimentaire améliore la sensibilité à l'insuline en réduisant les niveaux de lipides et de glucose plasmatique et protège contre le stress oxydatif et l'inflammation chez les rongeurs et l'homme (Cherng and Shih, 2005; Panahi et al., 2015; Queiroz et al., 2003).

En France, la microalgue *Odontella aurita*, produite par l'entreprise INNOVALG (Bouin, France) a été agréée en 2002 pour l'alimentation humaine par l'AFSSA (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments) pour sa teneur en EPA qui peut atteindre jusqu'à 35% des acides gras totaux (INNOVALG). *Odontella aurita* contient également une forte teneur en antioxydants tels que la chrysolaminarine (Xia et al., 2014) et la fucoxanthine (Xia et al., 2013). Les effets anti-obésité de la fucoxanthine ont été décrits par plusieurs études (Gammone and D'Orazio, 2015). En effet, la supplémentation de la fucoxanthine à d'un régime hyperlipidique prévient la prise de poids et l'augmentation de la masse du tissu adipeux, et en augmentant l'expression de la protéine UCP1 (Uncoupling protein 1) dans les adipocytes (Maeda et al., 2005, 2009). En effet, UCP1, une protéine mitochondriale généralement exprimée dans les adipocytes bruns, et est impliquée dans les mécanismes de dépenses énergétiques et de thermogénèse (Kozak and Anunciado-Koza, 2008). De plus, la fucoxanthine prévient la réponse inflammatoire induite par le LPS au niveau des macrophages RAW264.7 (Kim et al., 2010).

Récemment, il a été montré que la supplémentation d'un régime riche en acides gras saturés par la microalgue *Odontella aurita* pendant 7 semaines chez le rat prévient le développement de plusieurs facteurs de risque du syndrome métabolique tels que l'hyperlipidémie, l'agrégation plaquettaire et le stress oxydatif (Haimeur et al., 2012). Ainsi, notre étude a porté essentiellement sur la caractérisation des effets insulino-sensibilisateurs et anti-inflammatoires de cette microalgue (*Odontella aurita*).

3. Impact des acides gras saturés et les acides gras polyinsaturés sur le développement du syndrome métabolique :

a. Effets des acides gras sur les niveaux de lipides plasmatiques :

Les AGS, comme les acides myristique et palmitique augmentent les niveaux plasmatiques de triglycérides et du cholestérol des LDL (LDL-cholestérol) (Kris-Etherton and Yu, 1997). En effet, les AGS induisent une réduction de l'expression génique et protéique du récepteur aux LDL ainsi qu'une diminution de son activité réduisant ainsi la capture des LDL et favorisant leur accumulation dans la circulation sanguine (Bennett et al., 1995; Daumerie et al., 1992; Horton et al., 1993). D'autres mécanismes ont été aussi proposés pour expliquer cette augmentation de triglycérides et LDL-cholestérols plasmatique, parmi eux :

- Un changement dans la composition membranaire en acides gras (plus riche en acides gras saturés) conduit à une diminution du catabolisme des LDL plasmatique (Nicolosi et al., 1990).
- Une augmentation de la production hépatique de l'apolipoprotéine B100 se traduisant par un nombre de particules LDL et VLDL élevé ce qui favorise une augmentation des LDL-cholestérols et des triglycérides (Jackson et al., 2006).
- Une augmentation de l'expression du facteur de transcription SREBP-1c qui est impliqué dans la synthèse des triglycérides (Oosterveer et al., 2009).

Les AGPI, contrairement aux AGS, diminuent les niveaux de lipides plasmatiques par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes :

- La réduction de la production hépatique de VLDL et de la MTP (microsomal triacylglycerol transfer protein), une protéine impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines (Jackson et al., 2006)(Jackson, 2006).
- L'augmentation de l'expression du récepteur aux LDL ainsi que son activité en augmentant la fluidité membranaire des hépatocytes (Jackson et al., 2006; Lottenberg et al., 2012).
- L'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'oxydation des acides gras comme PPAR α et l'inhibition de ceux impliqués dans leur synthèse tels que SREBP1a et SREBP1c (Hannah et al., 2001; Lottenberg et al., 2012).

Ainsi, des régimes riches en acides gras saturés sont impliqués dans le développement des facteurs de risques des maladies cardiovasculaires en augmentant la cholestérolémie (Kris-Etherton and Yu, 1997), ce qui favorise le développement de l'inflammation et l'athérosclérose (Chait and Kim, 2010). De plus, l'augmentation des niveaux de triglycérides provoque également plusieurs désordres métaboliques dont une dyslipidémie, une stéatose hépatique ainsi qu'une résistance à l'insuline (Lewis et al., 2002; Reaven, 1988b).

Cependant, l'introduction des AGPI oméga-3 dans les régimes alimentaires permet de diminuer l'hypertriglycéridémie, la production de VLDL au niveau du foie, la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline (Peyron-Caso et al., 2002; Rossi et al., 2005; Taouis et al., 2002).

b. Effets des acides gras sur la sensibilité à l'insuline :

i. Les acides gras saturés :

Les acides gras saturés favorisent le développement de la résistance à l'insuline par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes :

L'accumulation de lipides dans les tissus et organes clés du métabolisme énergétique : Un régime riche en acides gras saturés favorise l'accumulation et le stockage de lipides au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle (Casaschi et al., 2005; Corcoran et al., 2007; Petrus et al., 2015).

L'activation des facteurs du stress du réticulum endoplasmique et de l'apoptose : Les acides gras saturés sont également associés à une augmentation de l'expression de marqueurs du stress du réticulum endoplasmique tels que XBP1 (X-box DNA binding protein 1), eIF2 α (eucaryotic initiation factor 2 α), CHOP (proapoptotic C/EBP homologous protein) et GRP78 (glucose regulated protein 78). En effet, des régimes riches en acides gras saturés favorisent le développement du stress du réticulum endoplasmique au niveau du foie et du tissu adipeux (Nivala et al., 2013; Wei et al., 2006). De plus, un traitement par de l'acide palmitique induit un stress du réticulum endoplasmique ainsi que l'apoptose par l'intermédiaire de l'activation de la kinase JNK sur plusieurs modèles cellulaires tels que des cultures primaires d'hépatocytes ou de cardiomyocytes ainsi que sur les myotubes C2C12 et les cellules hypothalamiques mHypoE (Haffar et al., 2015; Malhi et al., 2006; Mayer and Belsham, 2010; Salvadó et al., 2013; Wei et al., 2006).

La production de dérivés lipidiques : Les acides gras saturés peuvent être convertis en diglycérides ou céramides qui sont également impliqués dans l'installation de la résistance à l'insuline. Les céramides, des sphingolipides résultant de la combinaison d'un acide gras avec la sphingosine, induisent la résistance à l'insuline en inhibant l'activité de la protéine kinase Akt (Stratford et al., 2004) et en activant les voies pro-inflammatoires par l'intermédiaire de TLR4 (Fischer et al., 2007; Turpin et al., 2014) alors que les diglycérides activent la protéine kinase C impliquée dans la phosphorylation des IRS sur résidus sérine (Samuel and Shulman, 2012). En effet, une perfusion par voie intracérébroventriculaire (ICV) de l'acide

palmitique altère la sensibilité hypothalamique à l'insuline en augmentant les niveaux de diglycérides qui activent la PKC (Benoit et al., 2009).

L'activation des voies de l'inflammation : Les acides gras saturés conduisent à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et favorisent donc la production de cytokines pro-inflammatoires tels que IL1 β et IL18 altérant ainsi la signalisation de l'insuline (Wen et al., 2011, 2012). Les acides gras saturés stimulent aussi les voies pro-inflammatoires par l'intermédiaire du récepteur TLR4 en activant les kinases JNK et IKK impliquées dans la phosphorylation des IRS sur résidus sérine (Glass and Olefsky, 2012). JNK et IKK amplifient également le signal pro-inflammatoire en activant les facteurs de transcription AP1 et NF κ B augmentant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (Glass and Olefsky, 2012; Nguyen et al., 2007).

La fluidité membranaire : Les phospholipides et les sphingolipides riches en acides gras saturés et en cholestérol sont impliqués dans la formation de micro-régions rigides au niveau de la membrane plasmique appelées « radeaux lipidiques » ou « raft » qui jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire (Calder and Yaqoob, 2007). Les « rafts » membranaires jouent un rôle important dans la médiation du signal insulinémique au niveau des adipocytes et la perturbation de ces derniers inhibe le transport de glucose et la phosphorylation des IRS sur tyrosine en réponse à l'insuline (Bickel, 2002; Cohen et al., 2003; Parpal et al., 2001). Cependant, les rafts sont également impliqués dans l'activation de récepteurs et de voies de signalisation pro-inflammatoires telles que celles du récepteur TLR4 (Huang et al., 2012; Nakahira et al., 2006; Powers et al., 2006; Wong et al., 2009). Ainsi, l'activation de TLR4 favorise la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α qui, au niveau des rafts, induit l'expression de la protéine GM3 (ganglioside monosialic 3) responsable de la translocation du récepteur à l'insuline hors des rafts lipidiques menant à une désensibilisation de la signalisation de ce dernier (Inokuchi, 2010).

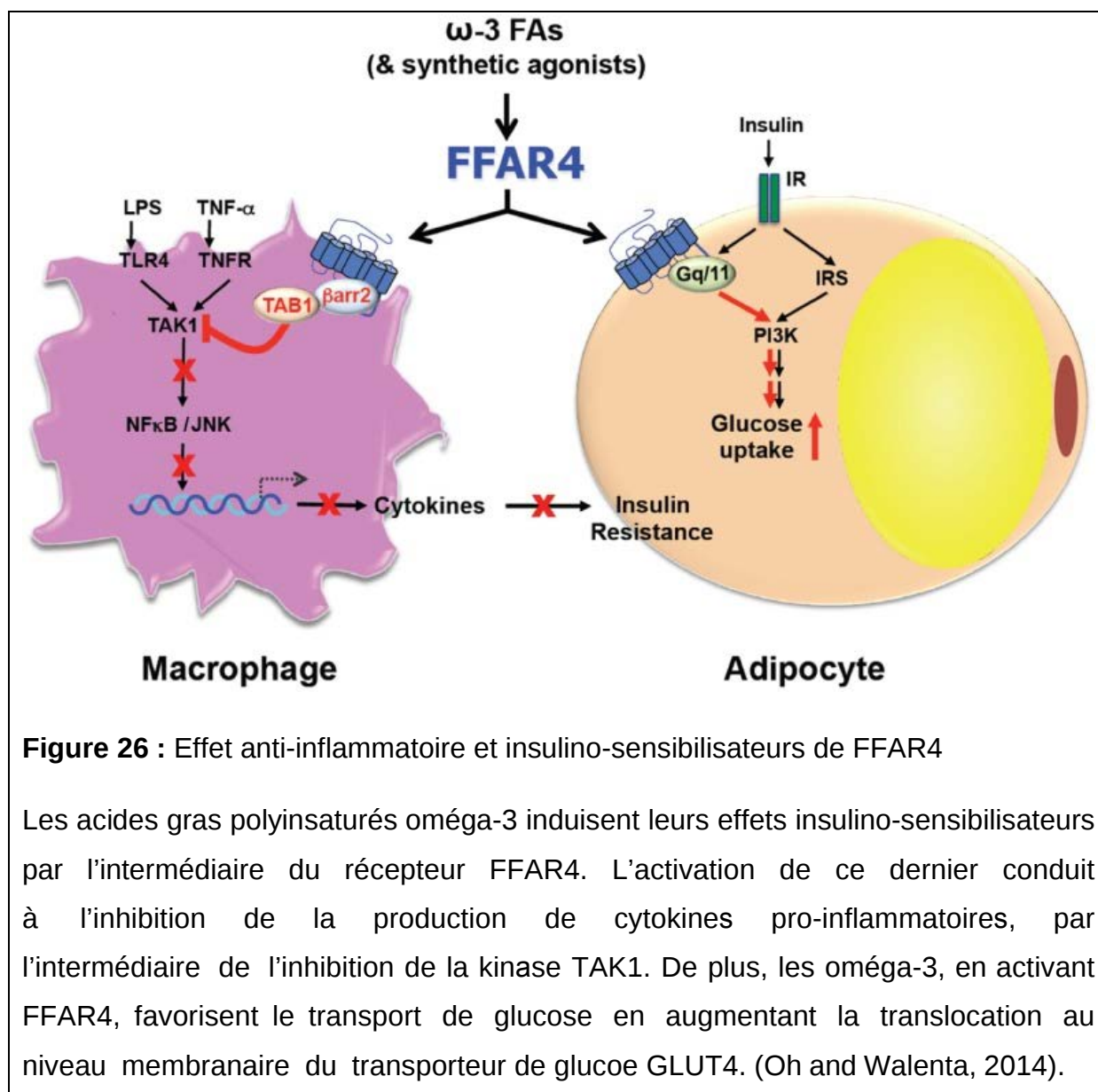


Figure 26 : Effet anti-inflammatoire et insulino-sensibilisateurs de FFAR4

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 induisent leurs effets insulino-sensibilisateurs par l'intermédiaire du récepteur FFAR4. L'activation de ce dernier conduit à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, par l'intermédiaire de l'inhibition de la kinase TAK1. De plus, les oméga-3, en activant FFAR4, favorisent le transport de glucose en augmentant la translocation au niveau membranaire du transporteur de glucose GLUT4. (Oh and Walenta, 2014).

ii. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 :

Les AGPI oméga-3 EPA et DHA, contrairement aux acides gras saturés, préviennent la résistance à l'insuline chez les rongeurs et l'homme (Fedor and Kelley, 2009; Taouis et al., 2002). Chez des rats obèses, la supplémentation du régime hyperlipidique avec de l'EPA ou du DHA améliore la sensibilité à l'insuline (Poudyal et al., 2013) en favorisant ses voies de signalisation (Agrawal and Gomez-Pinilla, 2012; Gingras et al., 2007; Kamolrat et al., 2013). Un régime riche en (EPA+DHA) améliore également la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux et le foie des souris ob/ob en augmentant l'expression des transporteurs de glucose GLUT2 et GLUT4, les substrats du récepteur à l'insuline IRS1 et IRS2 et le facteur de transcription PPAR γ ainsi qu'en augmentant la phosphorylation et l'activation de l'AMPK (González-Périz et al., 2009).

Les AGPI EPA et DHA sont efficaces pour baisser la triglycéridémie (Durrington et al., 2001; von Schacky and Harris, 2007). En effet, en activant le facteur de transcription PPAR α et en inhibant le facteur de transcription SREBP1c, les AGPI oméga-3 favorisent la β -oxydation des triglycérides et réduisent leur libération au niveau sanguin en réduisant l'expression de protéines impliqués dans la synthèse des VLDL (Jump, 2008).

Les oméga-3 améliorent également la sensibilité à l'insuline en interagissant avec le récepteur FFAR4 (Figure 26). En effet, cette interaction active la β -arrestine2 impliquée dans l'inhibition de la kinase Tak1. Tak1 active à son tour les voies IKK/NF κ B et MAPK. Ainsi, en inhibant Tak1, les oméga-3 inhibent l'activation des kinases JNK et IKK réduisant ainsi la phosphorylation des IRS sur sérine et l'activation des facteurs de transcription NF κ B et AP1 (Ichimura et al., 2012; Oh et al., 2010; Welty et al., 2016). De plus, l'activation de FFAR4 suite à la supplémentation d'un régime riche en acides gras saturés par les oméga-3 favorise le développement de macrophages anti-inflammatoires M2 au dépend des macrophages pro-inflammatoires M1 dans le tissu adipeux (Oh et al., 2010).

Les AGPI oméga-3 ont aussi des vertus anti-inflammatoires. En effet, les oméga-3 inhibent l'activation du récepteur TLR4 et la production de cytokines pro-inflammatoires (Huang et al., 2012; Lee et al., 2003; Wong et al., 2009). L'inhibition

de la translocation de TLR4 au niveau des rafts lipidiques constitue un des mécanismes d'action des oméga-3 (Wong et al., 2009). Ces derniers favorisent également la réduction des dérivés réactifs à l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) diminuant ainsi l'activation de NFκB (De Caterina and Massaro, 2005; Massaro et al., 2006). Chez la souris, la supplémentation d'un régime riche en acides gras saturés avec des AGPI réduit le nombre de macrophage et les niveaux des molécules d'adhésion cellulaire ICAM et VCAM (Matsumoto et al., 2008). Chez l'homme, la supplémentation du régime alimentaire en oméga-3 conduit à une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα et IL1β (Calder, 2007). De plus, chez des patients hypertriglycéridémique, la supplémentation en DHA pendant 91 jours réduit les niveaux de CRP et d'IL6 ainsi que le nombre de neutrophile (Fedor and Kelley, 2009).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Etude 1 : La microalgue *Odontella aurita* prévient la résistance à l'insuline et l'inflammation induites par un régime hyperlipidique riches en acides gras saturés au niveau du foie

Etude 2 : L'acide palmitique induit l'expression de TLR4 et favorise la signalisation rétinine/TLR4 dans les cellules neuronales humaine SH-SY5Y

Etude 1 : La microalgue *Odontella aurita* prévient la résistance à l'insuline et l'inflammation induites par un régime hyperlipidique riches en acides gras saturés au niveau du foie

La prévalence du diabète de type 2 dans le monde est en constante augmentation et prend des proportions alarmantes. En 2014, le diabète a été la cause directe de 1,5 million de décès et on estime que 9% de la population adulte était diabétique.

La résistance à l'insuline représente le facteur de risque majeur pour le diabète de type 2. Ainsi, restaurer partiellement ou totalement la sensibilité à l'insuline constitue de véritables enjeux afin de prévenir le diabète de type 2 et les complications qui lui sont associées. Plusieurs stratégies ont été proposées pour combattre et prévenir le diabète de type 2, même si l'approche alimentaire et l'activité physique demeurent incontournables.

Les régimes alimentaires riches en acides gras saturés sont impliqués dans l'installation de la résistance à l'insuline en altérant la sensibilité dans les tissus cibles (foie, muscle, tissu adipeux et hypothalamus) à cette hormone. En effet, il a été montré que les acides gras saturés à longue chaîne favorisaient l'installation de la résistance à l'insuline par l'intermédiaire de l'activation de voie de signalisation pro-inflammatoire connues pour leur impact négatif sur la signalisation de l'insuline (comme les kinases JNK et IKK) (Glass and Olefsky, 2012). Néanmoins, les acides gras n'ont pas tous des effets délétères sur la signalisation de l'insuline. En effet, il est actuellement bien admis que les acides gras polyinsaturés de la série oméga-3 (principalement l'EPA et le DHA) ont plusieurs effets bénéfiques sur la santé humaine et contribuent à la prévention des facteurs de risque du syndrome métabolique (Fedor and Kelley, 2009; Poudyal et al., 2013; Taouis et al., 2002). Ainsi, la consommation d'huile de poissons, comme source d'EPA et de DHA, a été proposée comme approche nutritionnelle pour le traitement et la prévention du syndrome métabolique.

Les huiles de poissons constituent aujourd'hui la principale source d'acides gras oméga-3 (Miller et al., 2007; Turchini et al., 2010). Cependant, l'accumulation de résidus polluants (métaux lourds) dans les graisses de poissons ainsi que les

problèmes d'odeur et de goût en tant que complément alimentaire pour l'homme poussent au développement de sources alternatives d'acides gras oméga-3 (Barnathan, 2007). Les microalgues, semblent représenter la solution permettant la substitution des acides gras oméga-3 des huiles de poissons (Mimouni et al., 2012). Ainsi, de par sa haute teneur en EPA et sa richesse en antioxydant, la microalgue *Odontella aurita* a été agréée par l'AFSSA (agence française pour la sécurité sanitaire des aliments) en nutrition humaine comme complément alimentaire. Récemment, il a été montré que la supplémentation d'un régime riche en acides gras saturés par la microalgue *Odontella aurita* pendant 7 semaines chez le rat prévient le développement de l'hyperlipidémie, l'agrégation plaquettaire et le stress oxydatif qui représentent des facteurs de risque du syndrome métabolique (Haimeur et al., 2012). Ainsi, notre étude a essentiellement porté sur la caractérisation des effets insulino-sensibilisateurs et anti-inflammatoires de cette microalgue.

L'objectif de cette première étude a donc été de comparer les effets de la supplémentation d'un régime hyperlipidique, riche en acides gras saturés, par un lyophilisat d'*Odontella aurita* ou par de l'huile de poisson, sur la prévention de la résistance à l'insuline et l'inflammation induites par les acides gras saturés au niveau hépatique. Pour cela, 24 rats mâles de souche Wistar ont été répartis en 4 groupes homogènes et nourris pendant 8 semaines avec différents régimes :

- Un régime standard (groupe contrôle, C)
- Un régime hyperlipidique à 40% de lipides (groupe HF)
- Un régime hyperlipidique supplémenté avec 12% de lyophilisat de la microalgue *Odontella aurita* (groupe HFOA).
- Un régime hyperlipidique supplémenté avec 0,5% d'huile de poisson (groupe HFFO).

Les deux derniers régimes ont été conçus de façon à apporter le même taux d'EPA.

Les résultats obtenus ont aboutis à la publication 1 : « **Odontella aurita-enriched diet prevents high fat diet-induced liver insulin resistance** » publié dans **Journal of Endocrinology**, 2016 Jan;228(1):1-12.

Odontella aurita-enriched diet prevents high fat diet-induced liver insulin resistance

Hamza Amine^{1,2,3}, Yacir Benomar^{1,2}, Adil Haimeur³, Hafida Messaouri³, Nadia Meskini³ and Mohammed Taouis^{1,2}

¹Unité Mixte de Recherche, Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, NeuroPSI UMR9197, University Paris-Sud, Orsay, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, NeuroPSI Institute, Unité Mixte de Recherche 9197, Orsay, France

³Laboratoire de Virologie, Microbiologie, Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité, University Hassan II, Casablanca, Morocco

Correspondence
should be addressed
to M Taouis
Email
mohammed.taouis@u-psud.fr

Abstract

The beneficial effect of polyunsaturated omega-3 fatty acid (w-3 FA) consumption regarding cardiovascular diseases, insulin resistance and inflammation has been widely reported. Fish oil is considered as the main source of commercialized w-3 FAs, and other alternative sources have been reported such as linseed or microalgae. However, despite numerous reports, the underlying mechanisms of action of w-3 FAs on insulin resistance are still not clearly established, especially those from microalgae. Here, we report that *Odontella aurita*, a microalga rich in w-3 FAs eicosapentaenoic acid, prevents high fat diet-induced insulin resistance and inflammation in the liver of Wistar rats. Indeed, a high fat diet (HFD) increased plasma insulin levels associated with the impairment of insulin receptor signaling and the up-regulation of toll-like receptor 4 (TLR4) expressions. Importantly, *Odontella aurita*-enriched HFD (HFOA) reduces body weight and plasma insulin levels and maintains normal insulin receptor expression and responsiveness. Furthermore, HFOA decreased TLR4 expression, JNK/p38 phosphorylation and pro-inflammatory factors. In conclusion, we demonstrate for the first time, to our knowledge, that diet supplementation with whole *Odontella aurita* overcomes HFD-induced insulin resistance through the inhibition of TLR4/JNK/p38 MAP kinase signaling pathways.

Key Words

- ▶ *Odontella aurita*
- ▶ insulin resistance
- ▶ inflammation
- ▶ high fat diet
- ▶ TLR-4

Journal of Endocrinology
(2016) 228, 1–12

Introduction

Insulin resistance is a major risk factor for type 2 diabetes that is often associated with metabolic syndrome including obesity, cardiovascular diseases and dyslipidemia. The alarming worldwide augmentation of type 2 diabetes becomes a major public health concern. Thus, restoring insulin sensitivity or responsiveness becomes a real challenge to overcome type 2 diabetes and associated diseases. Several strategies have been used for this purpose. Indeed, among environmental factors, dietary fat plays

an important role in the induction of insulin resistance (Storlien *et al.* 1997). Both the amount and the type of fatty acids ingested alter insulin sensitivity in target tissues (i.e., muscle, adipose tissue and liver) associated with glucose intolerance and obesity (Storlien *et al.* 1986, Storlien *et al.* 1991). Insulin resistance in the liver is also characterized by an increased flux through glucose-6-phosphatase (Oakes *et al.* 1997), whereas insulin resistance in muscle and adipose tissue results from an impairment

of glucose uptake (Kraegen *et al.* 1986) and/or glucose phosphorylation followed by a reduction in the rate of both muscle glycogen synthesis and glucose oxidation (Roden *et al.* 1996). These effects mimic those reported in patients with type 2 diabetes (Cline *et al.* 1999, Clore *et al.* 2000). Furthermore, previous studies suggested that long chain saturated fatty acids promote insulin resistance through c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation leading to the phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS)1/2 on serine residues, then impairing insulin signaling (Nguyen *et al.* 2005, Solinas *et al.* 2006). However, not all types of fatty acids induce an alteration of insulin action during a high fat diet in rats (Storlien *et al.* 1991). Indeed, the substitution of omega-3 fatty acids (w-3 FAs) from fish oil for other types of lipids prevents insulin resistance (Kraegen *et al.* 1991, Jucker *et al.* 1999) and has been recognized as beneficial on human health (Kantha 1987). These beneficial effects cover several diseases and metabolic dysfunctions such as glucose homeostasis, insulin sensitivity, cardiovascular diseases and hepatic lipid metabolism (Serhan *et al.* 2008, Lee *et al.* 2009, Scorletti & Byrne 2013, Flachs *et al.* 2014). Indeed, previous studies reported that the effects of dietary w-3 FAs could be related to the subsequent changes in fatty acid content in membrane phospholipids of insulin target tissues (Kahn & Peersen 1993). In muscle, w-3 FAs might improve insulin sensitivity through a relative increase in the unsaturation of membrane phospholipids and/or a decrease in muscle content in triglycerides (Oakes *et al.* 1997, Wilkes *et al.* 1998). The alterations in membrane composition could affect insulin receptors (Liu *et al.* 1994) and/or IRS-1 and PI 3'-kinase expression and protein abundance (Taouis *et al.* 2002). More recently, the beneficial effect of w-3 FAs has been attributed to their actions through G protein-coupled receptor 120 (GPR120) or free fatty acid receptor 4 (FFAR4) leading to anti-inflammatory and insulin sensitizing effects (Oh *et al.* 2010). Indeed, w-3 FAs bind to FFAR4 on macrophages recruiting then arrestin-2 followed by the internalization of FFAR4/arrestin-2 complex. This complex sequesters the pro-inflammatory TAK-1 binding protein (TAB1) (Oh *et al.* 2010). Thus, the decrease in macrophage pro-inflammatory factor's production and secretion promotes insulin responsiveness in insulin-dependent tissues such as adipose tissue (Oh *et al.* 2010). These data clearly indicate the beneficial anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects of w-3 FAs when supplemented to human or rodent diets. The major sources of w-3 FAs are fish oils. However, the use of w-3 FAs from fish oil can have some disadvantages such as the presence of pollution

residues (heavy metals), seasonal change in fatty acid composition and remnant smell, especially when used as a complement to the human diet. Several sources of w-3 FAs have been described such as those extracted from linseed and marine microalgae. Among marine microalgae, *Odontella aurita* (*O. aurita*) presents a high content in eicosapentaenoic acid (EPA) that is a bioactive w-3 FA. Furthermore, the supplementation of diet with *O. aurita* reduced high fat induced-metabolic syndrome risk including hyperlipidemia and oxidative stress (Haimeur *et al.* 2012). It has been also shown that feeding a rat a high fat diet supplemented with *O. aurita* increased the level of w-3 FAs content in different tissues such as the liver and platelets. Thus, these effects could be, at least partially, attributed to the high w-3 FAs content of *O. aurita*. Indeed, *O. aurita* contains anti-oxidants such as fucoxanthin (Moreau *et al.* 2006). However, the underlying mechanisms concerning the effects of *O. aurita* regarding the attenuation of metabolic syndrome risk and especially concerning insulin resistance are still not elucidated. Indeed, it is of great interest to compare the effect of w-3 FAs originated from fish oil and *O. aurita* regarding insulin sensitivity. Here, we aimed to investigate the effect of a high fat diet supplemented with *O. aurita* or fish oil on insulin signaling and pro-inflammatory factors.

Animals and experimental protocol

Twenty-four male Wistar rats weighing 120 ± 10 g were purchased from the Centre d'Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). They were housed in pairs in cages in a room under standard conditions of temperature (22–24 °C), humidity (40–60%) and 12 h light:12 h darkness cycle. All of the animals were fed a standard diet (SAFE, Augy, France) for 1 week of acclimation. The animals were then randomly divided into four groups of six rats and were fed with the following diets for 8 weeks: the control group (C) continued to receive the standard diet; the HF group was fed a high-fat diet containing (on a per weight basis: 40% fat, 23% proteins, 23% carbohydrates, 6% cellulose, 7% mineral and 1% vitamins); the HFOA group received the high fat diet supplemented with 12% (w/w) of freeze-dried *O. aurita* (Innovalg, Bouin, France); the HFFO group was fed with the high fat diet supplemented with 0.5% (w/w) of fish oil (Polaris, Pleuven, France). The composition of the experimental diets is shown in Table 1. All animals were allowed to feed *ad libitum* with free access to water. All study protocols complied with the institutional guidelines (Direction des services Vétérinaires de la Mayenne, France, N° B53500).

Table 1 Composition of the experimental diets (gram/kilogram diet). Analysis was provided by SAFE (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France). The mineral mixture provides the following amounts in milligram/kilogram of diet: CaHPO₄, 17.2; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄, 7 H₂O, 200; trace elements, 400. Trace element mixture (mg/kg of diet): MnSO₄, H₂O, 98; CuSO₄, 5 H₂O, 20; ZnSO₄, 7 H₂O, 80; CoSO₄, 7 H₂O, 0.1; KI, 0.3. The vitamin mixture provides the following amounts per kilogram of diet: retinol, 39.600 IU; cholecalciferol, 5000 IU; thiamin, 40 mg; riboflavin, 30 mg; pantothenic acid, 140 mg; pyridoxine, 20 mg; inositol, 300 mg; cyanocobalamin, 0.1 mg; ascorbic acid, 1600 mg; choline, 2.720 mg; folic acid, 10 mg; p-aminobenzoic acid, 100 mg; biotin, 0.6 mg

Nutrient	C	HF	HFOA	HFFO
Caseine	230	230	230	230
Corn starch	200	80	80	80
Glucose	360	150	150	150
Cellulose	60	60	60	60
Lard	50	50	50	50
Coprah	–	330	330	330
Freeze-dried <i>O. aurita</i>	–	–	120	–
Fish oil	–	–	–	5
Corn oil	10	10	10	10
Rape oil	10	10	10	10
Mineral 205B SAFE	70	70	70	70
Vitamin 200 SAFE	10	10	10	10

C, control diet; HF, high-fat diet; HFOA, high-fat diet supplemented with 12% (w/w) of freeze-dried of *Odontella aurita*; HFFO, high-fat diet supplemented with 0.5% (w/w) of fish oil.

Supplementation rates of freeze-dried *O. aurita* (12%) and fish oil (0.5%) were selected to provide the same intake of EPA, consisting predominantly of PUFA n-3 for both sources, in the HFOA and HFFO diets.

The bodyweight (BW) gains of the rats were monitored at regular intervals, and their daily food intakes were estimated. At the end of the experiment, blood was collected from the abdominal aorta under diazepam/ketamine (4v/3v) anesthesia and the livers were removed, rinsed with ice-cold NaCl (0.9%), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before analysis.

Western blot analysis

Frozen liver samples were homogenized in 1 ml of solubilization buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% nonidet P40, 10% glycerol, protease inhibitors (0.35 mg/ml PMSF, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin and

2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin) and phosphatase inhibitors (10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium β -glycerophosphate and 10 mM benzamidine). Homogenates were incubated for 2 h at 4°C then insoluble materials were removed by centrifugation and stored at -80°C . Protein concentrations of the resulting lysates were determined using a protein assay kit (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Illkirch, France).

Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto Immobilon-FL membrane (Life Technologies, Illkirch, France). Blots were then blocked with 5% BSA and incubated with primary antibodies raised against insulin receptor (IR) β -subunit, phospho (p)-IRS-1 (ser³⁰⁷), IRS-1, p-JNK, JNK, p-P38MAPK, P38MAPK, β -tubulin (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), toll-like receptor 4 (TLR4), IL-6 and protein-tyrosine phosphatase (PTP)-1B (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) overnight at 4°C . The immunoblots were washed with PBS, incubated with the appropriated secondary antibody labeled with Alexa 488 (Life Technologies) then scanned and quantified using the Bruker Molecular Imaging System 4000MM Pro (Billerica, MA, USA).

In vitro insulin stimulation on liver membranes

The *in vitro* stimulation of the insulin receptor had been performed as previously reported (Benoit *et al.* 2013). Briefly, 500 mg of rat liver were homogenized in 1 ml buffer A (0.32 M sucrose, 2 mM HEPES (pH 7.4), protease and phosphatase inhibitors as described before) with Precellys 24/Cryolys apparatus (3000 g 2×20 s). Homogenates were centrifuged 5 min at 1000 g at 4°C . Supernatants were kept and pellets were suspended in 1 ml buffer A and centrifuged 5 min at 1000 g at 4°C . The two supernatants were mixed and centrifuged 20 min at 10 000 g at 4°C . Pellets were suspended in 1 ml buffer B (50 μM CaCl₂, 2 mM HEPES (pH 7.4), protease and phosphatase inhibitors) and centrifuged 45 min at 17 000 g at 4°C . Pellets, representing crude membranes, were then suspended in buffer C (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM MgCl₂, 2mM EGTA, protease and phosphatase inhibitors) and stored at -80°C .

Crude liver membranes were incubated for 10 min at 37°C with insulin (1 μM) and ATP (5 mM) or buffer C as control. Reaction was stopped by the addition of loading buffer. Western blots were performed as described before. Immunoblots were incubated with a primary antibody raised against IR β -subunit and phosphotyrosine (Millipore, Darmstadt, Germany).

Immunoprecipitation

Crude liver membranes (500 µg) were incubated for 10 min at 37 °C with insulin (1 µM) and ATP (5 mM) or buffer C as control. Reaction was stopped by the addition of 0.5 ml buffer D (Buffer C, 1% Triton X-100, 1% nonidet P40) followed by 2 h incubation at 4 °C. Lysate samples were then incubated with antibody raised against IR β-subunit overnight at 4 °C. The immune complexes were precipitated after incubation with a protein A-agarose (Sigma–Aldrich) for 2 h at 4 °C and then heated in loading buffer at 100 °C for 5 min. Western blots were performed as described before.

RNA analysis

Frozen liver samples were homogenized with Precellys 24/Cryolys apparatus, and total RNA was extracted using TRIzol LS reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. 1 µg of total RNA was reverse transcribed (F-572L M-Mulv) (Finnzymes, Illkirch, France), and the cDNAs were subjected to real-time PCR. Quantitative RT-PCR was performed using adequate primers: 18s forward, TCCCGAGAAGTTTCAGCATCC, and reverse, CTCCCATCCTTCACGTCCTTCTG; CD68 forward, CTGGTGCTCATTGCCTTCTG, and reverse, GAGGGGCTGGTAGGTTGATT; IBA-1 forward, ATGAGCCAGAGCAAGGATTT, and reverse, ACCTCTCTTCTGTGGGC; ICAM-1 forward, TCCATCCATCCACACAGAAGC, and reverse, TCGCAAGAGGAAGAGCAGTT; IL-1β forward, TAAGCCAACAAGTGGTATTC, and reverse, AGGTATAGATTCTTCCCCTTG; IL-6 forward, GTTGCCCTTCTTGGGACTGATGTTGT, and reverse, ACTGGTCTGTTGTGGGTGGTATCC; InsR forward, TGCCACCAATCCTTCCGTTCC, and reverse, TCCTCCGCCTGCCTCTCC; NF-κB forward, GCGACAGATGGGCTACACAGAGG, and reverse, TGGAGGAGGACGAGAGAGGCA;

PTP1B forward, GCACAGCATGAGCAGTATGAGTC, and reverse, TCCACCCACCATCCGTTTCC.

Chemicals

Bovine serum albumin (fraction V) was purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). All other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a Mann–Whitney *U* test for physiological parameters, endocrine parameters data, signaling and gene expression experiments. Repeated-measures two-way ANOVA was used to test the changes of body weight and energy intake over time followed by Bonferroni *post-hoc* test. The results were expressed as mean ± S.E.M., and *P* value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

High fat diet supplemented with *O. aurita* reduced body weight and adiposity

Adult Wistar rats were subjected during 8 weeks to control, HF, HFOA or HFFO diet. The HFOA group exhibited a lower body weight and lower body weight gain when compared to C, HF and HFFO groups as measured over time (Fig. 1A and 2B; Table 2). Food intake expressed as grams per day was significantly higher in the control group as compared to all groups, but when expressed as kilocalories per day, all groups consumed similar energy (Fig. 1D and Table 2). However, the weight of adipose tissue was significantly higher in the HF group as compared to all groups. In addition, adipose tissue weight was significantly lower in the HFOA group as compared to

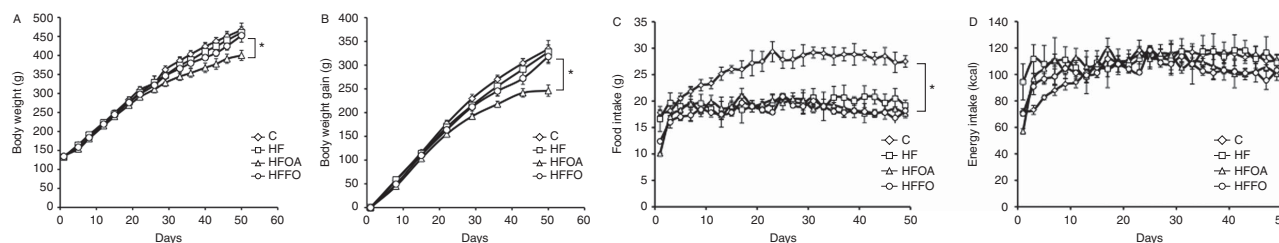
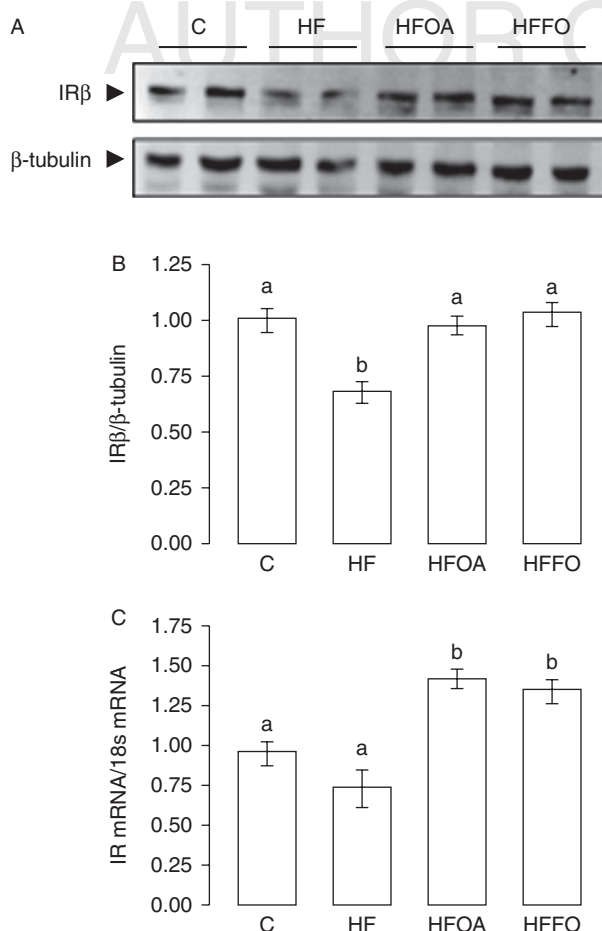


Figure 1

HFOA group exhibited lower body weight as compared to all groups. Body weight (A), body weight gain (B), food intake (C) and energy intake (D) were measured during 8 weeks in C, HF, HFOA and HFFO groups. Results are presented as means ± S.E.M. (*n* = 6). Repeated-measures two-way ANOVA

was used to test changes of body weight and energy intake over time followed by Bonferroni *post-hoc* test. **P* value <0.05 considered as statistically significant.

**Figure 2**

Odontella aurita supplementation prevents liver insulin receptor down-regulation in HFD rats. Liver samples were either solubilized for western blot analysis or extracted to prepare RNAs for quantitative RT-PCR. (A) is a representative western blot revealed with anti-insulin receptor antibody and normalized to β -tubulin. (B) is a quantification of band density. The results were expressed as ratio of insulin receptor/ β -tubulin. (C) is a qRT-PCR analysis of insulin receptor mRNA expression. Results were normalized to 18s mRNA levels. All data are presented as means $\pm$ S.E.M. ($n=4-6$ /group). ^{a,b}denotes significant differences at $P<0.05$ by ANOVA test.

the HFFO and C groups ($P<0.05$). When results were expressed as a ratio of adipose tissue weight to body weight, the HF group showed a significantly higher adiposity as compared to all groups (Table 2). In contrast, liver weight was not modified by diets (Table 2).

High fat diet supplemented with *O. aurita* or fish oil normalized plasma insulin and lipid levels

Wistar rats fed a high fat diet (HFD) during the 8 weeks exhibited a significant increase of plasma insulin levels as compared to the C, HFOA and HFFO groups without

changes in plasma glucose ($P<0.05$, Table 3). Furthermore, both HFOA and HFFO improved the homeostatic model assessment (HOMA) index when compared to the HF group. Triglyceride liver content was lower in the HFOA group as compared to the HF and HFFO groups (Table 3). We also showed that the HFOA group exhibits significantly lower liver cholesterol content as compared to all groups including the C group (Table 3). In addition, plasma leptin was significantly increased in the HF group as compared to the C and HFOA groups. Plasma triglyceride and cholesterol levels were significantly higher in the C and HF groups as compared to the HFOA and HFFO groups (Table 3, $P<0.05$).

Supplementation of HFD with *O. aurita* or fish oil prevents the impairment of liver insulin receptor expression and tyrosine kinase activity

We examined the effect of the supplementation of a high fat diet with *O. aurita* (OA) or fish oil on liver insulin receptor expression. We show that HFD induced the down-regulation (approximately -25%) of liver insulin receptor at both protein and mRNAs levels as compared to rats fed a chow diet (Fig. 2A, B and C). The supplementation of HFD with OA or fish oil maintained insulin receptor expression to the level of control rats (Fig. 2A, B and C). To determine whether OA or fish oil (FO) supplementation affected insulin receptor tyrosine kinase activity, we measured the insulin-dependent tyrosine phosphorylation in liver crude membranes prepared from HFD, HFOA and HFFO rats. We showed that HFD significantly reduced the insulin-dependent tyrosine phosphorylation of a band with around 180 kDa corresponding to IRS-1 and IRS-2 and a band around 95 kDa corresponding to IR as evidenced by the re-blotting using anti-IR antibodies as compared to control rats (Fig. 3A and B). Whereas, when HFD was supplemented with OA, the impairment of insulin-dependent IR and IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation was prevented (Fig. 3C and D). To further investigate the impact of OA and FO on intrinsic insulin receptor tyrosine kinase activity, following crude liver membranes incubation in the presence or absence of insulin, samples were subjected to immunoprecipitation using anti-IR antibodies, and blots were revealed with anti-phosphotyrosine antibodies. We showed that the HFOA group exhibited a higher insulin receptor tyrosine phosphorylation in response to insulin with a higher amplitude when compared to C, HFD and HFFO groups (Fig. 3E and F). Because HFD induced the down-regulation of the insulin receptor,

Table 2 Effects of the different diets given for 8 weeks on body and adipose tissue weights and daily food and energy intake. Mean values with different superscript letters (a, b and c) are significantly different ($P < 0.05$, $n = 6$)

Diet groups	C	HF	HFOA	HFFO
Body weight (g)	466.8 ± 9.4 ^a	460.2 ± 25 ^a	400.2 ± 13.3 ^b	452.4 ± 7 ^a
Adipose tissue weight (g)	13.6 ± 2.8 ^b	17.1 ± 3 ^a	8.5 ± 2.3 ^c	11 ± 1 ^b
AT/BW (%)	2.7 ± 0.7 ^b	3.3 ± 1.2 ^a	2.3 ± 0.5 ^b	2.6 ± 0.8 ^b
Liver weight (g)	12.4 ± 0.7	11.8 ± 1.7	10.6 ± 1.6	11.4 ± 1.4
Daily food intake (g/day)	26.6 ± 0.5 ^a	19.7 ± 0.2 ^b	18.4 ± 0.4 ^c	18.1 ± 0.3 ^c
Energy intake (Kcal/day)	107.2 ± 1.9	111.6 ± 1.1	110.8 ± 2.3	110.7 ± 2

C, control diet; HF, high-fat diet; HFOA, high-fat diet supplemented with 12% (w/w) of freeze-dried of *O. aurita*; HFFO, high-fat diet supplemented with 0.5% (w/w) of fish oil; AT, adipose tissue weight; BW, body weight.

we have also normalized insulin receptor phosphorylation to glycoprotein 130 (gp130) and confirmed the result obtained in Fig. 2F with lower insulin sensitivity in the HF group. Indeed, insulin receptor phosphorylation in response to insulin in the HF group was significantly lower as compared to the C, HFOA and HFFO groups (Fig. 3G).

Supplementation of HFD with OA prevents the augmentation of negative regulators of insulin signaling in the liver

We examined whether the insulin sensitizing effect of OA is attributed to the prevention of HFD-induced up-regulation of the insulin signaling negative regulator, PTP-1B and/or to the augmentation of IRS-1 phosphorylation on serine residues that impairs IRS-1 tyrosine phosphorylation. We showed that HFD increased PTP-1B expression as evidenced by western blot analysis using adequate antibodies and quantitative RT-PCR (Fig. 4A, B and C). The supplementation of HFD with OA maintained PTP-1B expression to the level measured in the liver of rat fed chow diet (Fig. 4A, B and C). The same effect was observed when HFD was supplemented with FO especially for PTP-1B mRNA expression (Fig. 4C). We have also

investigated IRS-1 phosphorylation on Ser307. HFD significantly increased IRS-1 Ser307 phosphorylation as compared to rat fed chow diet (Fig. 4D and E). The supplementation of HFD with OA prevented HFD-induced IRS-1 Ser307 phosphorylation (Fig. 4D and E). When HFD was supplemented with FO, the IRS-1 Ser307 phosphorylation was similar to that obtained following OA supplementation (Fig. 4D).

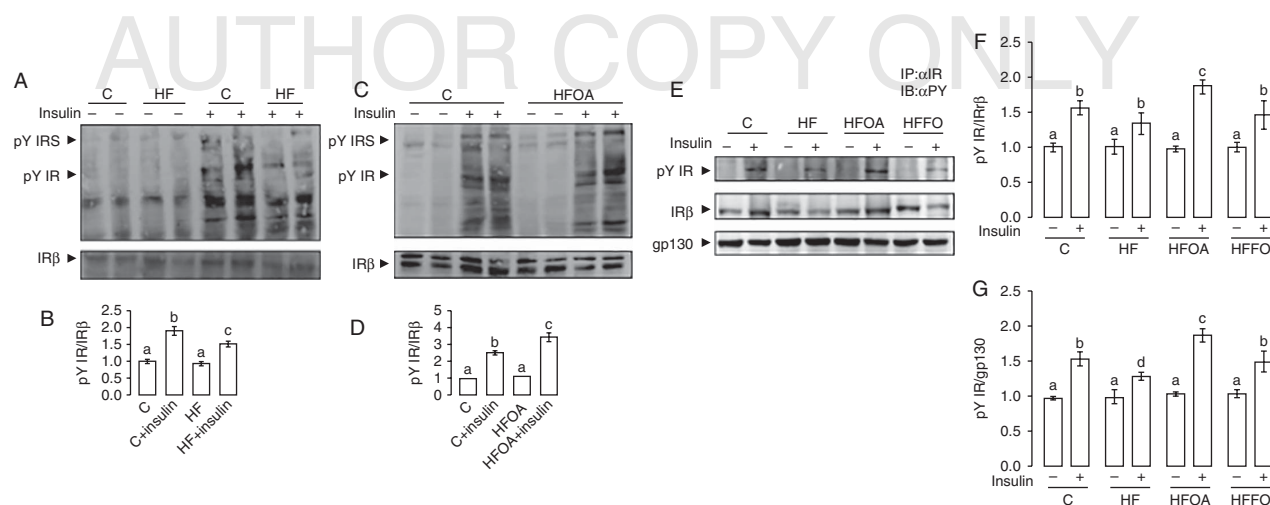
OA supplementation prevented HFD-induced p38 and JNK1 phosphorylation

To investigate the effect of OA supplementation on insulin signaling, we investigated the impact on the phosphorylation of p38 MAPK and JNK1, known as hallmarks of insulin resistance. We showed that HFD induced both p38 and JNK1 phosphorylation (Fig. 4F, G, H and I). OA supplementation prevented the augmentation of p38 phosphorylation and maintained it to a level located between C and HF groups, but not significantly (Fig. 4F and G). A similar result was obtained with FO supplementation (Fig. 4F); however, the statistical analysis was not performed ($n = 2$). OA supplementation to HFD significantly prevented HFD-induced JNK1

Table 3 Effects of the different diet for 8 weeks on glycemia, plasma insulin level, blood triglyceride and cholesterol levels. Mean values with different superscript letters (a, b and c) are significantly different ($P < 0.05$, $n = 6$)

Metabolic parameters	C	HF	HFOA	HFFO
Triglyceridemia (g/l)	0.65 ± 0.14 ^a	0.75 ± 0.27 ^a	0.43 ± 0.01 ^b	0.5 ± 0.04 ^b
Cholesterolemia (g/l)	0.71 ± 0.03 ^a	0.76 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.02 ^b	0.47 ± 0.05 ^b
Liver triglyceride (mg/g)	42.1 ± 10.4 ^a	94.8 ± 22.4 ^b	45.9 ± 13.3 ^a	92.6 ± 16.9 ^b
Liver cholesterol (mg/g)	6.1 ± 1.8 ^a	22.2 ± 3.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^c	4.05 ± 0.7 ^a
Leptinemia (ng/ml)	2.14 ± 0.55 ^a	5.23 ± 0.813 ^b	2.63 ± 0.19 ^a	ND
Insulinemia (ng/ml)	0.63 ± 0.07 ^{a,c}	1.1 ± 0.09 ^b	0.53 ± 0.05 ^c	0.76 ± 0.08 ^a
Glycemia (g/l)	0.58 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.52 ± 0.03
HOMA-IR	2.21 ± 0.21 ^a	3.74 ± 0.32 ^b	1.75 ± 0.21 ^a	2.36 ± 0.2 ^a

C, control diet; HF, high-fat diet; HFOA, high-fat diet supplemented with 12% (w/w) of freeze-dried of *O. aurita*; HFFO, high-fat diet supplemented with 0.5% (w/w) of fish oil.

**Figure 3**

Odontella aurita supplementation maintains liver insulin receptor tyrosine kinase activity in HFD rats. (A and C) present liver crude membrane phosphotyrosine profiles in response to insulin of rats fed control diet, HFD (A) or HFOA diet (C). Blots were revealed using anti-phosphotyrosine antibody and normalized to insulin receptor (IRβ). (B and D) represent the quantification of band density using Carestream software. The results were presented as ratio of tyrosine phosphorylated insulin receptor/insulin

receptor. (E) is a representative immunoprecipitation/immunoblot (IP/IB) analysis of insulin receptor phosphorylation normalized to insulin receptor and gp130. (F and G) are quantifications of band densities of phosphorylated insulin receptor normalized to IR (F) or to gp130 (G). All data are presented as means $\pm$ s.e.m. ($n=4-6$ /group). ^{a,b,c,d} denotes significant differences at $P<0.05$ by ANOVA test.

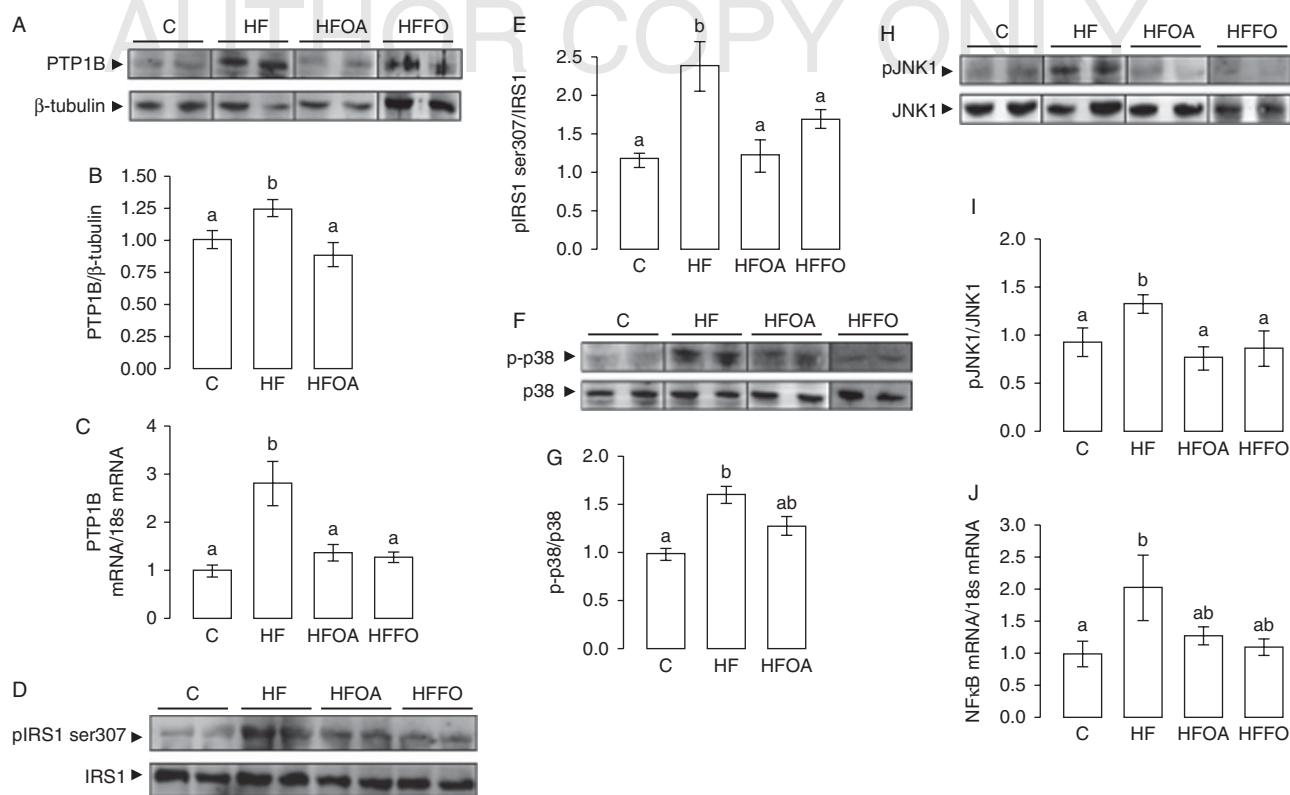
phosphorylation (Fig. 4H and I). Similar, tendency on JNK1 phosphorylation was also found when HFD was supplemented with FO (Fig. 4H and I). We also investigated the expression levels of NF-κB, known as one of key components involved in insulin resistance onset. We showed that HFD significantly increased NF-κB expression levels as compared to the C group (Fig. 4J). The HFOA and HFFO groups exhibited lower expression levels of NF-κB as compared to the HF group, but the difference was not significant (Fig. 4J).

OA supplementation prevents HFD-induced toll-like receptor 4 and IL-6 expressions in the liver

Recent studies have provided evidence for the implication of TLR4 and pro-inflammatory cytokines such as IL-6 in the pathogenesis of obesity and insulin resistance. Thus, we investigated the effect of OA supplementation to HFD on TLR4, IL-6 and IL-1β expression. HFD induced the overexpression of TLR4 but not the glycosylated form of the receptor (Fig. 5A and B). The supplementation of HFD with OA led to significantly lower levels of both forms of TLR4 as compared to the HF group (Fig. 5A and B). The supplementation of HFD with FO had a weaker effect on TLR4 expression as compared to OA (Fig. 5A). To further investigate the effect of OA supplementation on TLR4

signaling, we studied the co-immunoprecipitation of TLR4 with its signaling components. We showed that HFD increased both Myd88 and TIRAP co-immunoprecipitation with TLR4. This co-immunoprecipitation was diminished when HFD was supplemented with OA (Fig. 5C). However, the supplementation with FO seemed to have a weak impact on HFD-induced TLR4/Myd88/TIRAP co-immunoprecipitation (Fig. 5C).

The HFOA group significantly exhibited lower IL-6 plasma levels as compared to the HF group (Fig. 5A). In addition, the expression level of IL-6 at both mRNA and protein levels in the liver was significantly reduced in HFOA and HFFO groups when compared to the HF group (Fig. 5B and 6C). Similar results were obtained when the expression of IL-1β was measured by quantitative RT-PCR. Indeed, HFD induced the up-regulation of hepatic IL-1β, and the supplementation of HFD with OA prevented this effect (Fig. 6D). However, FO supplementation had a weaker effect as compared to OA supplementation (Fig. 6D). We next investigated the impact of HFD supplementation with OA on other inflammation markers. We showed that HFD induced the up-regulation of IBA1, ICAM1 and CD68 (Fig. 6E, F and G). This effect was completely prevented by OA supplementation (Fig. 6E, F and G). However, FO supplementation was unable to down-regulate these markers (Fig. 6E, F and G).

**Figure 4**

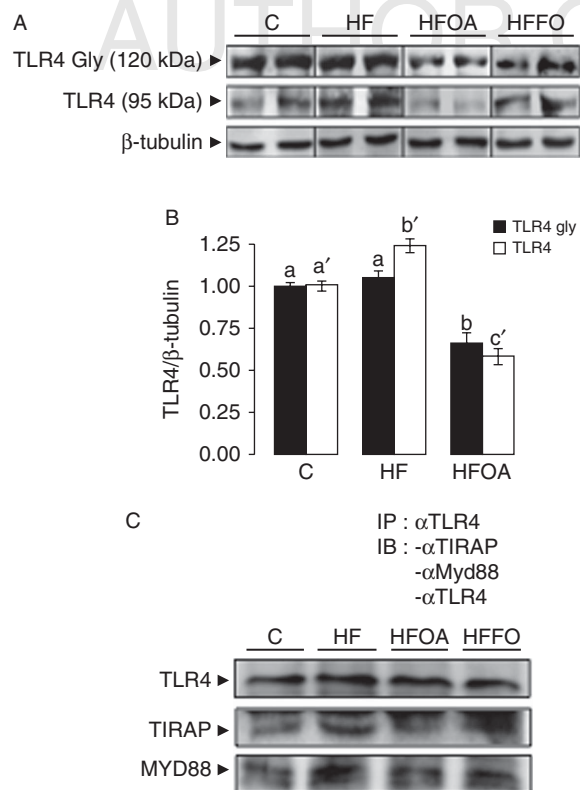
Odontella aurita supplementation prevents the up-regulation of negative regulators of insulin signaling in the liver of HFD rats. Liver samples were either solubilized for western blot analysis or extracted to prepare RNAs for quantitative RT-PCR. (A) is a representative western blot revealed with anti-PTP1B antibody and normalized to β -tubulin. (B) is a quantification of band density. The results were expressed as ratio of PTP1B/ β -tubulin. (C) presents qRT-PCR analysis of PTP1B mRNA expression. Results were normalized to 18s mRNA levels. (D) is a representative western blot revealed with anti-serine 307 phosphorylated IRS-1 antibody and normalized to IRS-1. Band densities are presented in (E). The results were expressed as ratio of

pIRS-1ser307/IRS-1. (F) is a representative western blot revealed with anti-phospho-p38 MAPK antibody and normalized to p38 MAPK. Bands densities are presented in (G). The results were expressed as ratio of phospho-p38 MAPK/p38 MAPK. (H) is a representative western blot revealed with anti-phospho-JNK antibody and normalized to JNK. Bands densities are presented in (I). The results were expressed as ratio of phospho-JNK/JNK. (J) presents NF- κ B mRNA expression measured by qRT-PCR normalized to 18s mRNA. Data are presented as means $\pm$ s.e.m. ($n=4-6$ /group). For western blot analysis, HFFO samples are presented with $n=2$. ^{a,b}denotes significant differences at $P<0.05$ by ANOVA test.

Discussion

A high fat diet promotes overall insulin resistance through the increase of pro-inflammatory factors and the modification of adipokines secretion (e.g., leptin, adiponectin or resistin) mainly originated from adipose tissue. These factors impair insulin signaling mostly in insulin responsive tissues such as the liver, adipose tissue and muscle. The alteration of insulin signaling in the liver is a strong marker for overall insulin resistance as mirrored by increased hepatic glucose production that leads to increased insulin plasma levels in the early stages of insulin resistance. However, it is noteworthy that most studies that showed the deleterious effects of HFD on insulin responsiveness were performed using HFD enriched in saturated fat. In contrast, diet enrichment

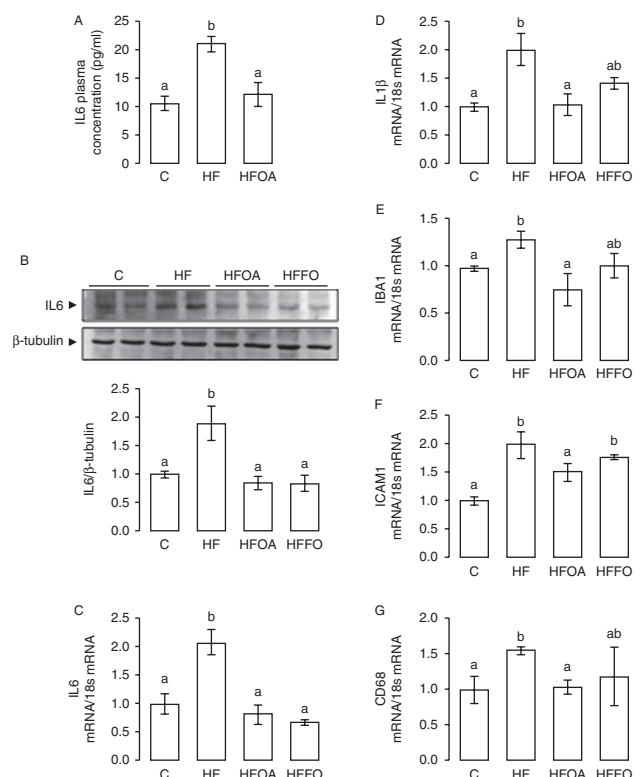
with polyunsaturated omega-3 partially prevents these effects. The aim of the present study was to investigate the effect of the supplementation of HFD with *O. aurita*, a marine diatom rich in EPA, on liver insulin responsiveness. The effect of OA supplementation has been also compared to the supplementation of HFD with fish oil. Here and as expected, HFD (mostly rich in saturated fatty acids) increased adipose tissue mass and plasma levels of insulin, triglycerides and cholesterol. Importantly, the HFOA and HFFO groups exhibited normal plasma insulin and lipid levels as compared to rats fed a control diet. Despite similar energy intake, HFOA showed a lower body weight and fat mass as compared to HFD and HFFO rats. This indicates that the OA supplementation of HFD has different effects on fat mass and body weight as those of

**Figure 5**

Odontella aurita supplementation prevents the up-regulation of TLR4 expression and TLR4/MyD88/TIRAP interaction in the liver of HFD rats. (A) is a representative western blot revealed with anti-TLR4 antibody that reveals both glycosylated and non-glycosylated TLR4. TLR4 expression was normalized to β -tubulin. Band densities are presented in (B). The results are expressed as ratio of TLR4/ β -tubulin (white bars) and TLR4 glycosylated form/ β -tubulin (black bars). (C) presents an immunoprecipitation/immunoblot (IP/IB) analysis of the interaction of TLR4 with MyD88 and TIRAP ($n=2$). For western blot analysis, data are presented as means $\pm$ S.E.M. ($n=6$ /group, except HFFO with $n=2$). ^{a,b,c}denotes significant differences for TLR4 gly at $P<0.05$ by ANOVA test. ^{a',b',c'}denotes significant differences for TLR4 at $P<0.05$ by ANOVA test.

HFFO, and this is most likely attributed to the composition of OA. Indeed, OA contains EPA and other components such as anti-oxidants, especially fucoxanthin known for its beneficial effects (Maeda *et al.* 2009, Xia *et al.* 2013, Tan & Hou 2014). Indeed, fucoxanthin has been described as having anti-obesity, anti-diabetic and anti-inflammatory effects (Maeda *et al.* 2009, Tan & Hou 2014). These effects may contribute to the differential effects between the supplementation with OA and FO regarding liver insulin responsiveness. Importantly, we show that the HFOA group had a lower body weight even compared to the control group and clearly re-enforced the beneficial effect of OA supplementation that could attribute to both polyunsaturated omega-3 fatty acids and anti-oxidant

fucoxanthin. To further analyze these differences between the supplementation of HFD with OA or FO, we focused on liver insulin responsiveness. We showed that HFD induced the down-regulation of liver insulin receptor and this effect is prevented when HFD was supplemented with OA and FO. Importantly, the effect on liver insulin receptor expression is concomitant with the restoration of endogenous insulin receptor tyrosine kinase activity. The prevention of insulin receptor and tyrosine kinase activity impairment in the HFOA group could be at least in part attributed to the effect of OA supplementation on plasma insulin and lipid levels. Indeed, the HFOA group exhibited lower plasma insulin levels as compared to all other groups including the HFFO group. We also showed that OA supplementation prevented HFD-induced up-regulation of tyrosine phosphatase PTP-1B, one of major negative regulators of insulin signaling (Koren & Fantus 2007).

**Figure 6**

Odontella aurita supplementation prevents the up-regulation of pro-inflammatory markers in the liver of HFD rats. (A) presents plasma IL-6 levels. (B) is a representative western blot revealed with anti-IL-6 antibody normalized to β -tubulin and a quantification of band density expressed as ratio of IL-6/ β -tubulin. (C, D, E, F and G) present the mRNA expression levels of IL-6, IL-1 β , IBA1, ICAM1 and CD68 measured by qRT-PCR and normalized to 18s mRNA. All data are presented as means $\pm$ S.E.M. ($n=4-6$ /group). ^{a,b}denotes significant differences at $P<0.05$ by ANOVA test.

In addition, it is well established that Ser307 phosphorylation of IRS-1 impairs insulin signaling (Aguire *et al.* 2000). Indeed, the serine phosphorylation of IRS-1 impairs the tyrosine phosphorylation of IRS-1 and thus the alteration of the IR/IRS-1/PI3-kinase/Akt pathway. Here, we show that HFD increased liver IRS-1 Ser307 phosphorylation, and this effect is completely abolished in the HFOA and HFFO groups. The phosphorylation of IRS-1 on serine residues is also promoted by the increase of JNK1 (a serine kinase) phosphorylation. JNK1 phosphorylation has been reported in the insulin resistance state in various cellular models and *in vivo* (Aguire *et al.* 2000, Solinas *et al.* 2006). Here, we show that HFD-induced augmentation of JNK1 phosphorylation is prevented in the HFOA group. In addition, p38MAPK phosphorylation induced by HFD is prevented by OA supplementation as well as the expression of NF- κ B but not significantly. However, this tendency could also promote the insulin sensitizing effect of OA. Indeed, p38MAPK phosphorylation contributes to the onset of insulin resistance (Shen *et al.* 2006). Taken together, these data indicate clearly that the supplementation of HFD with OA promotes liver insulin responsiveness through the amelioration of insulin signaling through the inhibition of several negative regulators of insulin signaling such as PTP-1B and the phosphorylation of IRS-1 on serine residues. This leads to increased insulin sensitivity that could explain the diminution of plasma insulin levels. In addition, we also demonstrate that the supplementation of HFD with OA prevented the augmentation of IL-6 pro-inflammatory cytokine and the up-regulation of TLR4. Indeed, TLR4 is known to bind lipopolysaccharide (LPS) and resistin, which both strongly contribute to insulin resistance as previously reported (Benomar *et al.* 2013). We have recently shown that resistin-induced inflammation is associated with the up-regulation of TLR4 and the impairment of insulin signaling leading to overall insulin resistance. Thus, the role of OA in preventing the HFD-induced up-regulation of liver TLR4 is of great importance because this will reduce HFD-induced inflammation restoring then insulin responsiveness. Indeed, we show here that HFD induces the up-regulation of TLR4 in the liver, and this up-regulation was completely prevented when diet was supplemented with OA or FO. In addition, we show that HFD induced the co-immunoprecipitation of TLR4 and Myd88/TIRAP. Interestingly, this interaction is reduced in the HFOA group but not in the HFFO group. The interaction of TLR4 with TIRAP and Myd88 initiates overall inflammation (Benomar *et al.* 2013). These findings are reinforced by the effect of OA

supplementation on HFD-induced up-regulation of other liver inflammation markers such as IL-1 β , IBA1, ICAM1 and CD68. We show that HFD supplementation with OA prevented the expression of IL-1 β that is known as a marker of inflammation and insulin resistance (Stanton *et al.* 2011). Furthermore, we also show that OA supplementation prevented the expression of markers of hepatic macrophages or liver macrophage infiltration such as IBA1, ICAM1 and CD68 (Deininger *et al.* 2002, Xu *et al.* 2003, Cai *et al.* 2005, Koller 2007). All of these markers are up-regulated in HFD rats. Importantly, the supplementation of HFD with FO has a weaker effect as compared to OA regarding inflammation markers. This difference could be attributed to the composition of OA that contains EPA and other components such as anti-oxidants (Moreau *et al.* 2006, Haimeur *et al.* 2012) that are absent in FO. In conclusion, the originality of our findings is that *O. aurita* added as whole microalga without any processing or purification to HFD is sufficient to overcome HFD-induced liver insulin resistance and inflammation.

Taken together, we show for the first time that the supplementation of HFD with OA prevents HFD-induced insulin resistance by acting through several mechanisms: normalizing plasma insulin and lipids, preventing the down-regulation of the insulin receptor, maintaining insulin receptor tyrosine kinase activity, preventing HFD-induced up-regulation of negative insulin receptor regulators, preventing TLR4 signaling increase and preventing the augmentation of pro-inflammatory factors.

Declaration of interest

We declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work has been funded by University of Paris-Sud and CNRS.

Author contribution statement

H A has performed experiments and participated in writing; Y B participated in performing experiments and discussions; A H measured metabolic parameters; H M participated in discussions; N M participated in performing experiments and discussions; and M T supervised experiments, wrote the manuscript, acted as guarantor.

Acknowledgements

We thank Gerard Tremblin, Virginie Minmouni and Lionel Ulmann (University of Maine, France) for providing samples.

References

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R & White MF 2000 The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *Journal of Biological Chemistry* **275** 9047–9054. (doi:10.1074/jbc.275.12.9047)
- Benoit C, Ould-Hamouda H, Crepin D, Gertler A, Amar L & Taouis M 2013 Early leptin blockade predisposes fat fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *Journal of Endocrinology* **218** 35–47. (doi:10.1530/JOE-12-0561)
- Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crepin D, OuldHamouda H, Riffault L & Taouis M 2013 Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* **62** 102–113. (doi:10.2337/db12-0237)
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J & Shoelson SE 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine* **11** 183–190. (doi:10.1038/nm1166)
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL & Shulman GI 1999 Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* **42** 358–364.
- Clare JN, Stillman J & Sugerman H 2000 Glucose-6-phosphatase flux *in vitro* increased in type 2 diabetes. *Diabetes* **49** 969–974. (doi:10.2337/diabetes.49.6.969)
- Deininger MH, Meyemann R & Schluesener HJ 2002 The allograft inflammatory factor-1 family proteins. *FEBS Letters* **514** 115–121. (doi:10.1016/S0014-5793(02)02430-4)
- Flachs P, Rossmesl M & Kopecky J 2014 The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiological Research* **63** 93–118.
- Haimeur A, Ulman L, Mimouni V, Gueno F, Pineau-Vincent F, Meskini N & Tremblin G 2012 The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids in Health and Disease* **11** 147–160. (doi:10.1186/1476-511X-11-147)
- Jucker BM, Cline GW, Barucci N & Shulman GI 1999 Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin stimulated glycogen synthesis in skeletal muscle. *Diabetes* **48** 134–140. (doi:10.2337/diabetes.48.1.134)
- Kahn BB & Peersen O 1993 Suppression of GLUT-4 expression in skeletal muscle of rats that are obese from high fat feeding but not from high carbohydrate feeding or genetic obesity. *Endocrinology* **132** 13–22.
- Kantha SS 1987 Dietary effects of fish oil on human health: a review of recent studies. *Yale Journal of Biology and Medicine* **60** 37–44.
- Koller C 2007 Allograft inflammatory factor-1/ionized calcium-binding adapter specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Research* **330** 291–302. (doi:10.1007/s00441-007-0474-7)
- Koren S & Fantus IG 2007 Inhibition of the tyrosine phosphatase PTP-1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* **21** 621–640. (doi:10.1016/j.beem.2007.08.004)
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ & Storlien LH 1986 *In vivo* insulin resistance in individual peripheral tissues of the fat fed rat: assessment by euglycemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* **29** 192–198. (doi:10.1007/BF02427092)
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ & Storlien LH 1991 Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high fat fed rats. *Diabetes* **40** 1397–1403. (doi:10.2337/diab.40.11.1397)
- Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ & Harris WS 2009 Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nature Reviews. Cardiology* **6** 753–758. (doi:10.1038/nrcardio.2009.188)
- Liu S, Baracos VE, Quinney HA & Clandinin MT 1994 Dietary omega 3 and polyunsaturated fatty acids modify fatty acyl composition and insulin binding in skeletal muscle sarcolemma. *Biochemical Journal* **299** 831–837. (doi:10.1042/bj2990831)
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K & Miyashita K 2009 Anti-obesity and antidiabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports* **6** 897–902. (doi:10.3892/mmr.00000189)
- Moreau D, Tomasoni C, Jacquot C, Kaas R, Le Guedes R, Cadoret JP, Muller-Feuga A, Kotiza I, Vgias C, oussis V *et al.* 2006 Cultivated microalgae and carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22** 97–103. (doi:10.1016/j.etap.2006.01.004)
- Nguyen MT, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T & Sbodio JI 2005 JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **280** 35361–35371. (doi:10.1074/jbc.M504611200)
- Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ & Kraegen EW 1997 Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high fat feeding. *Diabetes* **46** 1768–1774. (doi:10.2337/diab.46.11.1768)
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H & Fan W 2010 GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142** 687–698. (doi:10.1016/j.cell.2010.07.041)
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW & Shulman GI 1996 Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation* **97** 2859–2865. (doi:10.1172/JCI118742)
- Scorletti E & Byrne CD 2013 Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and non-alcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Nutrition* **33** 231–248. (doi:10.1146/annurev-nutr-071812-161230)
- Serhan CN, Chiang N & Van Dyke TE 2008 Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* **8** 349–361. (doi:10.1038/nri2294)
- Shen YH, Zhang L & Gan Y 2006 Up-regulation of PTEN mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin in resistin-treated human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **281** 7727–7736. (doi:10.1074/jbc.M511105200)
- Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS & Karin M 2006 Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin receptor substrates. *PNAS* **103** 16454–16459. (doi:10.1073/pnas.0607626103)
- Stanton MC, Chen SC, Jackson JV, Rojas-Triana A, Kinsley D, Cui L, Fine JS, Greenfeder S, Bober LA & Jenh CH 2011 Inflammatory signals shift from adipose to liver during fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *Journal of Inflammation* **8** 8. (doi:10.1186/1476-9255-8-8)
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ & Kraegen EW 1986 Fat feeding causes widespread *in vivo* insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **251** E583–E583.
- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S & Kraegen EW 1991 Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. *Diabetes* **40** 280–289. (doi:10.2337/diab.40.2.280)
- Storlien LH, Kriketos D, Jenkins AB, Baur LA, Pan DA, Tapsell LC & Calvert GD 1997 Does dietary fat influence insulin action. *Annals of New York Academy of Sciences* **827** 287–301. (doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb51842.x)
- Tan CP & Hou YH 2014 First evidence for anti-inflammatory activity of fucoxanthin in high-fat-diet-induced obesity in mice and the antioxidant functions in PC12 cells. *Inflammation* **37** 443–450. (doi:10.1007/s10753-013-9757-1)

Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G & Pinault M 2002 Delarue JN-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **282** E664–E671. (doi:10.1152/ajpendo.00320.2001)

Wilkes JJ, Bonen A & Bell RC 1998 A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **275** E679–E686.

Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q & Zhang C 2013 Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs* **11** 2667–2681. (doi:10.3390/md11072667)

Xu H, Barnes GT, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA & Chen H 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial rôle in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1821–1830. (doi:10.1172/JCI200319451)

Received in final form 22 September 2015

Accepted 12 October 2015

Accepted Preprint published online 12 October 2015

Principaux résultats de l'article 1 :

Le but de cette étude a été de comparer l'effet de la supplémentation d'un régime riche en acides gras saturés (HF) par 12% de lyophilisat de la microalgue *Odontella aurita* (HFOA) ou 0.5% d'huile de poisson (HFFO) sur la prévention de la résistance à l'insuline et l'inflammation au niveau hépatique.

- Au niveau des paramètres métaboliques, nous avons montré que 8 semaines de régimes HF augmentent la masse grasse (au niveau du tissu adipeux viscéral) ainsi que les niveaux plasmatiques de l'insuline et des lipides (triglycérides et cholestérols) alors que l'enrichissement du régime HF avec la microalgue ou l'huile de poisson prévient ces effets avec une action plus importante de la microalgue. En effet, les animaux HFOA présentent un poids corporel plus bas et une masse grasse moins importante que les autres groupes.
- Au niveau de la sensibilité à l'insuline, nous avons montré que 8 semaines de régime HF altèrent la signalisation de l'insuline favorisant ainsi une résistance à l'insuline caractérisée par une augmentation des mécanismes de régulations négatifs de la signalisation de l'insuline (phosphorylation d'IRS1 sur sérine, PTP1B) ainsi qu'une diminution de l'expression protéique du récepteur à l'insuline, associée à une diminution de la sensibilité de ce dernier, due à une baisse de son activité tyrosine kinase intrinsèque. Cependant, la supplémentation du régime HF avec la microalgue ou l'huile de poisson prévient ces effets et améliore la sensibilité à l'insuline. On a aussi remarqué un effet plus important sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline en réponse à l'insuline dans le groupe HFOA.
- Au niveau de l'induction de l'inflammation, nous avons montré que les 8 semaines de régimes HF augmentent l'expression du récepteur TLR4 et son association avec les protéines adaptatrices TIRAP et MyD88. Le régime HF active également les MAP kinases JNK et P38 et augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL6 et IL1 β) et de marqueurs d'activation des macrophages (IBA1, CD68, ICAM1). Ces effets sont totalement prévenus suite à la supplémentation du régime HF avec la microalgue et partiellement prévenus avec l'huile de poisson.

Discussion de l'article 1 :

Le foie joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique de l'organisme. Ainsi, la résistance à l'insuline au niveau hépatique peut donc avoir des conséquences majeures sur la balance énergétique, la régulation de la glycémie et le métabolisme lipidique (Meshkani and Adeli, 2009). Il est maintenant bien admis que l'inflammation chronique associée à l'obésité viscérale constitue un des mécanismes impliqués dans l'installation de la résistance hépatique à l'insuline (Meshkani and Adeli, 2009). En effet, les régimes hyperlipidiques riches en acides gras saturés ont été largement décrits pour leurs effets délétères sur la sensibilité à l'insuline, par l'intermédiaire de l'activation des voies pro-inflammatoires (Riccardi et al., 2004; Storlien et al., 1991). Or, il a été montré que la substitution des acides gras saturés ou leur supplémentation par des acides gras polyinsaturés oméga-3 prévient partiellement leurs effets délétères (Jucker et al., 1999; Storlien et al., 1991). De plus, les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets insulino-sensibilisateurs des acides gras polyinsaturés oméga-3 ne sont pas encore clairement identifiés.

Au cours de cette étude, nous avons examiné l'effet de la supplémentation du régime HF, riche en acides gras saturés, par la microalgue *Odontella aurita*, sur la sensibilité à l'insuline. L'effet de la microalgue a été comparé avec la supplémentation du régime HF par de l'huile de poisson. Ainsi, comme attendu, nous avons montré que le régime HF augmente la masse grasse viscérale ainsi que les niveaux plasmatiques des lipides (triglycérides et cholestérols) et de l'insuline. Nous montrons que la microalgue et l'huile de poisson préviennent ces effets puisque les paramètres métaboliques des animaux HFOA et HFFO sont similaires aux animaux contrôles. D'une manière intéressante, les animaux HFOA présentent un poids corporel plus bas et une masse grasse viscérale moins importante que les animaux contrôles et HFFO, malgré une prise énergétique similaire aux autres groupes d'animaux. Cela suggère que les mécanismes de régulation du poids corporel et de la masse grasse sont différents selon la supplémentation du régime HF par la microalgue ou l'huile de poisson ; ce résultat pourrait s'expliquer par leur différence de composition. En effet, la microalgue, en plus de l'EPA, est riche en antioxydant, comme la fucoxanthine, connue pour ses effets anti-obésité, antidiabétique et anti-inflammatoire (Maeda et al., 2009; Tan and Hou, 2014).

Afin d'analyser les différents effets de la supplémentation du régime HF par la microalgue ou l'huile de poisson, nous nous sommes focalisés sur la sensibilité à l'insuline au niveau du foie. Nous avons montré que le régime HF induit une diminution de l'expression du récepteur à l'insuline et de son activité tyrosine kinase intrinsèque, qui se traduit par une faible phosphorylation du récepteur sur les résidus tyrosine suite à une stimulation par l'insuline. L'addition de la microalgue au régime HF prévient la down-régulation du récepteur à l'insuline et la déficience de son activité tyrosine kinase. Cela peut être expliqué par l'effet de la microalgue sur les niveaux plasmatiques de l'insuline et les niveaux hépatiques de lipides. En effet, les animaux HFOA présentent des taux plasmatiques d'insuline plus bas que les autres groupes, cela peut suggérer que ces animaux ont une meilleure sensibilité à l'insuline puisqu'ils n'ont besoin que de très peu d'insuline pour qu'elle induise ses effets.

Nous avons également montré que la supplémentation du régime HF par la microalgue *Odontella aurita* prévient l'augmentation de l'expression de PTP1B, de la phosphorylation d'IRS1 sur le résidu sérine 307 et de l'activation de la kinase JNK1 responsable de la phosphorylation des IRS sur les résidus sérine. En effet, l'augmentation des niveaux d'expression de PTP1B et la phosphorylation d'IRS1 sur sérine constituent deux mécanismes de régulation négative de la signalisation de l'insuline (Aguirre et al., 2002; Koren and Fantus, 2007).

Le récepteur TLR4 joue un rôle important dans l'installation de la résistance à l'insuline par l'intermédiaire de l'activation des voies pro-inflammatoires en réponse à la résistine et au le LPS (Benomar et al., 2013, 2016; Poltorak et al., 1998). Nous avons montré que l'expression de TLR4 et son association avec les protéines adaptatrices (TIRAP et MyD88) est augmentée dans le foie des rats soumis au régime HF. Ces derniers présentent aussi des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (IL6 et IL1 β) et de marqueurs d'activation de macrophages plus importants que les rats soumis à un régime contrôle. Cependant la supplémentation du régime HF par la microalgue prévient totalement ces effets pro-inflammatoires alors que la supplémentation avec l'huile de poisson a des effets modestes concernant la normalisation de l'expression de TLR4 et son association avec ses adaptateurs ainsi que l'expression de IL1 β et des marqueurs d'activation des macrophages. Cette différence d'action anti-inflammatoire entre la microalgue et

l'huile de poisson met en évidence les effets bénéfiques des antioxydants combinés aux acides gras polyinsaturés oméga-3 présents chez la microalgue, ce qui lui confère des propriétés anti-inflammatoires plus importantes que l'huile de poisson, ne contenant que les acides gras polyinsaturés oméga-3.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois que la supplémentation du régime HF par la microalgue *Odontella aurita* prévient la résistance à l'insuline hépatique induite par le régime HF par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes :

- La prévention de l'hyperinsulinémie et l'hyperlipidémie
- La prévention de la down-régulation du récepteur à l'insuline et le maintien de son activité tyrosine kinase
- La prévention des régulations négatives de la signalisation de l'insuline
- La prévention de l'activation de la signalisation de TLR4 et des facteurs pro-inflammatoires.

Etude 2 : L'acide palmitique induit l'expression de TLR4 et favorise la signalisation résistine/TLR4 dans les cellules neuronales humaine SH-SY5Y

Il est maintenant bien admis que l'inflammation chronique associée à l'obésité constitue un facteur de risque majeur pour le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. En effet, les niveaux de facteurs pro-inflammatoires sont augmentés chez les patients obèses et diabétiques et leur impact sur la sensibilité à l'insuline a été largement décrit dans différents tissus et modèles cellulaires (Ilievski et al., 2015; Kain et al., 2015; Schenk et al., 2008; Zheng et al., 2015). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'installation de la résistance à l'insuline ne sont pas encore totalement élucidés. Néanmoins, il a été montré qu'il existe un lien fort entre l'obésité et le risque de développement de la résistance à l'insuline (Golay and Ybarra, 2005). Parmi les facteurs impliqués dans ce lien on trouve les acides gras. En effet, l'obésité est caractérisée par une augmentation des niveaux d'acides gras libres, plus spécifiquement, l'acide palmitique, l'acide gras saturé le plus abondant dans la circulation sanguine (Boden, 2008; Kris-Etherton and Weber, 2005). Ce dernier a été largement décrit pour sa régulation négative de la signalisation de l'insuline et ses effets lipotoxiques et pro-inflammatoires (Dey et al., 2007; Hommelberg et al., 2009; Nakamura et al., 2009). En effet, les acides gras saturés conduisent à l'activation des voies de l'inflammation par l'intermédiaire du récepteur TLR4, connu pour la médiation des effets pro-inflammatoires du LPS (Fresno et al., 2011; Milanski et al., 2009; Pal et al., 2012; Radin et al., 2008).

Le récepteur TLR4 joue un rôle majeur dans l'immunité innée, et l'activation de ses voies de signalisation pro-inflammatoires favorise l'apparition de l'insuline résistance (Tanti et al., 2012). Récemment, nous avons montré que la résistine induisait une neuroinflammation via sa liaison avec le récepteur TLR4, favorisant ainsi l'installation de la résistance à l'insuline (Benomar et al., 2013). En effet, la résistine a été étudiée pour ses effets pro-diabétiques et pro-inflammatoires. Chez les rongeurs, elle est produite par les adipocytes blancs alors que chez l'homme elle est majoritairement exprimée par les cellules immunitaires (monocytes et macrophages) (Sánchez-Solana et al., 2012). De plus, ses niveaux d'expression sont augmentés dans des situations d'obésité et d'inflammation (Berghoff et al., 2015;

Dalamaga, 2014). Ainsi, la résistine pourrait être le facteur faisant le lien entre l'inflammation chronique associée à l'obésité et l'installation de la résistance à l'insuline.

Il a été montré que l'acide palmitique augmente la sécrétion de la résistine par les adipocytes 3T3-L1 (Schaeffler et al., 2009). De plus, les acides gras saturés activent la signalisation de TLR4. Cependant, aucune liaison directe des acides gras saturés sur TLR4 n'a été mise en évidence (Erridge and Samani, 2009; Schaeffler et al., 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que les effets des acides gras saturés concernant l'activation de TLR4 seraient en partie dus à une augmentation de l'expression de la résistine ou de la potentialisation de son action.

Ainsi, l'objectif de cette deuxième étude était d'examiner l'impact de l'acide palmitique sur la sensibilité à l'insuline dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (les cellules SH-Y5Y). Nous avons exploré les mécanismes moléculaires impliqués dans l'action de la résistine via l'activation de TLR4. L'effet de l'acide palmitique a été comparé avec celui du DHA, un acide gras polyinsaturés oméga-3, connu pour ses effets anti-inflammatoires et neuro-protecteurs (Chang et al., 2013). Les cellules SH-SY5Y ont été exposées à différents traitements par la résistine, l'acide palmitique et le DHA.

Nous avons ensuite étudié l'effet de ces traitements sur la sensibilité à l'insuline ainsi que l'activation de TLR4 et des facteurs pro-inflammatoires.

Les résultats obtenus font l'objet de l'article 2 : « **Palmitic acid enhances TLR4 expression and promotes resistin/TLR4 signaling** » soumis pour publication.

Palmitic acid enhances TLR4 expression and promotes resistin action in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line

Hamza Amine ^{1,2}, Yacir Benomar ^{1,2}, Arie Gertler ³ and Mohammed Taouis ^{1,2}

¹ Molecular Neuroendocrinology of Food Intake (NMPA), UMR 9197, University Paris-Sud, Orsay, France; ² NMPA, Neurosciences Paris Saclay Institute (NeuroPSI), Department molecules & circuits, CNRS UMR 9197, Orsay, France ; ³ The Institute of Biochemistry, Food Science, and Nutrition, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.

Running title: TLR4 links palmitate to resistin effects

To whom correspondence should be addressed: **Corresponding author:** Pr. Mohammed Taouis, PHD Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire NeuroPSI UMR9197, University of Paris-Sud, **Telephone:** +33-1-69-15-70-08; **Fax:** +33-1-69-15-77-26; **E-mail:** mohammed.taouis@u-psud.fr

Keywords: Insulin resistance, resistin, inflammation, palmitate, TLR4

Abstract:

High circulating levels of saturated free fatty acids such as palmitate promote inflammation and insulin resistance in peripheral tissues. In contrast, polyunsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA) exhibit a protective action. The deleterious effects of palmitate have been attributed to its potential action through Toll-like receptor 4 (TLR4). In addition, resistin, an adipokine, has been also reported to promote inflammation and insulin resistance via TLR4 signaling. In the brain, palmitate and resistin trigger neuroinflammation and insulin resistance. However, the potential link between palmitate and resistin regarding TLR4 signaling at the neuronal level is unknown. Here, using human SH-SY5Y neuroblastoma cell line we showed that palmitate pretreatment impaired insulin-

dependent Akt and Erk phosphorylation whereas DHA maintained or even increased insulin action. Palmitate but not DHA induced TLR4 up-regulation associated with the augmentation of IL6 and TNF α expression. We confirmed that resistin bound to TLR4 leading to the activation of Akt and p38 MAP kinase phosphorylation. Similarly to palmitate, resistin treatment induced the up-regulation of IL6 and TNF α , and activated NF κ B. Importantly, palmitate potentiated the resistin action towards the activation of NF κ B; in contrast DHA inhibited resistin action. In addition, palmitate but not DHA increased membrane lipid rafts and TLR4 expression with increased TLR4 recruitment to membrane lipid rafts. Palmitate but not DHA also increased resistin-induced TLR4/MYD88/TIRAP complex formation necessary for TLR4 signaling. In conclusion,

palmitate increased TLR4 expression promoting resistin signaling through this receptor and its recruitment to membrane lipid rafts. These effects were prevented when neuronal cells were pretreated with DHA.

Introduction:

Inflammation is now considered as a hallmark for several metabolic diseases including obesity and type 2 Diabetes (T2D). Indeed, increased levels of pro-inflammatory factors are found in subjects with T2D (1). Furthermore, the impact of pro-inflammatory factors on insulin responsiveness and signaling has been largely described in different tissues and cell models including hepatocytes, muscle cells and adipocytes (2, 3, 4). However, the mechanisms underlying the onset of insulin resistance are still poorly understood. Nevertheless, raising evidences indicate the strong relationship between obesity and the risk of developing insulin resistance (and T2D). Among the factors involved in this relationship, the increased levels of free fatty acids (FFAs) in obese subjects. Indeed, obese and T2D subjects exhibit a high plasma levels of non-esterified FFAs especially palmitic acid, the most abundant saturated fatty acid in the blood. Palmitic acid has been described as a negative modulator of insulin signaling by the inhibition of insulin action in isolated hepatocytes, myocytes and adipocytes (5, 6, 7). Furthermore, it has been also reported that the exposure to palmitic acid induced a lipotoxicity of pancreatic β cells leading to the alteration of β cell functions. Accumulated evidences suggested that FFAs might exert their lipotoxic effects through Toll-like receptors (TLRs) especially TLR4 (8). Indeed, it has been reported that FFA-mediated inflammation responses are mediated by TLR4 signaling cascade, suggesting that saturated fatty acids may bind to TLR4 (9). Furthermore, FFAs are able to activate TLR4 signaling in monocytes and adipocytes (10). Among other ligands of TLR4, LPS is the most known to

promote inflammation through this signaling pathway (11). Recently, we have reported that resistin was able to activate neuroinflammation and to promote insulin resistance through its binding to TLR4 (12). Resistin is a key metabolic regulator in obesity and insulin resistance (and T2D). Resistin has been suggested as proinflammatory and insulin resistance promoting factor. It is expressed in mice white adipose tissue (WAT), whereas in human its expression in WAT is weak but it is highly expressed in immune cells (monocytes and macrophages) (13, 14). Thus, resistin could be the metabolic link between obesity and insulin resistance, since resistin levels are high in inflammatory states such as in obese subjects promoting then insulin resistance. Furthermore, it has been also shown that palmitic acid increased the release of resistin from differentiated 3T3-L1 adipocytes (10). Recently, we have shown that central resistin impaired insulin signaling and increased inflammatory markers at both hypothalamic and peripheral levels. These effects were mediated through newly identified resistin/TLR4 signaling pathway (12). According to these data, we may hypothesize that palmitic acid or FFAs effects regarding inflammation and insulin resistance may be, at least partially, indirect through the augmentation of resistin plasma levels especially at the neuronal level. Indeed, palmitic acid and saturated FFAs have been described as endogenous ligand for TLR4 but however, until now there is no evidence for a direct binding of FFAs to TLR4. Here, we investigated the impact of palmitic acid neuronal insulin responsiveness and its potential effects on TLR4 expression and resistin action.

Materials and Methods

Cell culture and stimulation

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mmol L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in a 37 °C, 5% CO₂ humidified atmosphere. Serum starved cells were then incubated for 4 h in the presence or absence of palmitic acid (200 µM), DHA (20 µM), resistin (200 ng/mL) or insulin (100 nM) and/or challenged for 15 min with insulin (100 nM), to evaluate the impact of fatty acids and resistin treatment on SH-SY5Y insulin responsiveness, or with resistin (200 ng/mL), to analyze the effect of fatty acid treatment on resistin/TLR4 signaling. MK-2206 (Akt inhibitor), U0126 (MEK1/2 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), SB202190 (p38 MAPK inhibitor) were provided by Santa Cruz Biotechnology and were dissolved in DMSO for cell culture experiments, the control cells were treated with DMSO alone. Cells were exposed to 1 µM MK-2206, 10 µM U0126, 20 µM SP600125, 50 µM SB202190 for 1 h and then after washout cells were treated with resistin (200 ng/mL) for 4 h.

Fatty acids preparation

27.8 mg sodium palmitate was dissolved in 1mL sterile water to make 100 mM palmitate stock solution. DHA was suspended in absolute ethanol to make 10 mM DHA stock solution. 10% free fatty acid low endotoxin bovine serum albumin (FFA-BSA) was prepared in sterile PBS. Palmitic acid and DHA were conjugated to FFA-BSA in a 6:1 molar ratio. The solutions were then filtered through a 0.2 µm filter and stored at -20 °C. FFA-BSA/fatty acids complexes were further diluted in serum free DMEM to reach the desired final concentrations and were shaken for 1h at 140 rpm at 40 °C before use. FFA-BSA alone was used as a control.

Western blot analysis

After treatment, SH-SY5Y cells were solubilized in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCL (pH 7.5), 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1% nonidet P40, 10% glycerol, protease inhibitors (0.35 mg/ml PMSF, 2 µg/ml leupeptin and 2 µg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors (10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium β-glycerophosphate and 10 mM benzamidine). Lysates protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) and analyzed by Western blot. Briefly, proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto Immobilon-FL membrane (Life Technologies, Illkirch, France). Blots were then blocked with 5% Bovine Serum Albumin fraction V (BSA) (Euromedex, souffelweyersheim, France) and incubated with primary antibodies raised against p-AKT, AKT, p-P38MAPK, P38MAPK, pERK1/2, ERK1/2, Insulin receptor (IR) β subunit, β-tubulin (Cell signaling, Danvers, MA, USA), Toll-like receptor 4 (TLR4), MyD88, TIRAP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and resistin (Abcam, Cambridge, UK) overnight at 4 °C. The immunoblots were washed with PBS, incubated with the appropriate secondary antibody labeled with Alexa 488 (Life Technologies, Illkirch, France) then scanned and quantified using the Brucker Molecular Imaging System 4000MM Pro (Billerica, MA, USA).

Immunoprecipitation

Protein lysates were incubated with antibodies raised against TLR4 overnight at 4 °C. The immune complexes were precipitated after incubation with a protein A-agarose (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) for 2 h at 4 °C and then heated in loading buffer at 100 °C for 5 min. Western blots were performed as described before and membranes

were immunoblotted with antibodies raised against TLR4, MyD88 or TIRAP.

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

SH-SH5Y cells were solubilized in TRIzol LS reagent (Invitrogen, Illkirch, France) and total RNA was extracted according to the manufacturer's recommendations. 1 µg of total RNA was reverse transcribed (F-572L M-Mulv) (Finnzymes, Illkirch, France), and the cDNAs were subjected to real-time PCR using the Step One apparatus (Applied Biosystems, Illkirch, France), Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Illkirch, France) and adequate primers : GAPDH forward, ACTCCGACCTTCACCTTCCCC, and reverse, CTCCCGCTTCGCTCTCTGCT; IL6 forward, TGCTCCTGGTGTGCTGCTGCT, and reverse, TGAGTGGCTGTCTGTCTG-GGG; InsR forward, GAGAAGGTGGTGAACAAGGAGTC, and reverse, CCGTGAA-GTGTGCAAGCC; TLR4 forward, GACTTGCGGGTTCTACATCA, and reverse, CA-TAGGGTTTCAGGGACAGGT; TNF α forward, GCTCCAGGCGGTGCCTTGTTTC, and reverse, AGGCTTGTCACCTCGGGGTTC.

Small interfering RNA silencing

Negative-control scrambled Silencer Select small interfering RNA (siRNA), TLR4-targeting Silencer Select siRNA, and MyD88 targeting Silencer Select siRNA were purchased from Ambion (Illkirch, France) and used following the manufacturer's instructions. Briefly, SH-SH5Y cells were seeded at 1×10^6 cells per well in a six-well plate and transfected with the different Silencer Select siRNA to a final concentration of 5 nM using the Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Illkirch, France) transfection reagent according to the manufacturer's instructions. 48 h after transfection, serum starved cells were treated for 4 h with palmitate (200 µM) or FFA-BSA as a control then challenged with resistin (200 ng/mL) for 15 min. Cells were then solubilized

and protein lysates were subjected to Western blot as described before.

Crosslinking experiments

Cross-Linking experiments were performed as previously described (Benomar *et al*, 2013). Briefly, serum starved SH-SH5Y cells were washed with ice-cold PBS then treated with resistin (200 ng/mL) or resistin antagonist (200 ng/mL) for 1 h at 4 °C. BS3 crosslinking agent (Thermo Scientific, Illkirch, France) was then added directly to the incubation solution to a final concentration of 2.5 mM and followed by an additional incubation for 1 h at 4 °C. Crosslinking reaction was stopped by the addition of a quenching solution (20 mM Tris-HCL pH 7.5). Cells were solubilized and protein lysates were then subjected to immunoprecipitation using antibodies raised against TLR4. Western blots were performed as described before and membranes were immunoblotted with antibodies raised against TLR4 or resistin.

Stable transfection and reporter gene luciferase assay

NF- κ B luciferase reporter gene cells were generated by stably transfecting SH-SY5Y cells with the pGL4.32[*luc2P*/NF- κ B-RE/Hygro] vector (Promega, Charbonnières les bains, France) containing five copies of an NF- κ B response element that drives transcription of the luciferase reporter gene *luc2P* and a mammalian selectable marker for hygromycin resistance. After hygromycin selection (200 µg/mL), surviving cells were transfected with a control vector containing β -galactosidase with a cytomegalovirus promoter. 48 h after transfection, serum starved cells were treated 4h with resistin (200 ng/ml), palmitate (200 µM) or DHA (20 µM) then luciferase and β -galactosidase activity were measured using the Mithras LB 940 apparatus (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany) and the Dual-Light Chemiluminescent Reporter Gene Assay System (Applied Biosystems, Illkirch, France)

according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was normalized by β -galactosidase activity. All transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Illkirch, France) transfection reagent according to the manufacturer's instructions.

Isolation of lipid raft using sucrose gradient centrifugation

Serum starved SH-SY5Y cells were treated with palmitate (200 μ M) or DHA (20 μ M) for 4h. Cells were solubilized in MBS buffer (MES-buffered saline) (25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and an anti-protease cocktail) for 1h at 4 °C then homogenized by sonication for 5 s. 0.5 mL of each lysates were mixed with an equal volume of 80% sucrose in MBS buffer and loaded in the bottom of a centrifuge tube. Samples were then overlaid with 1.5 mL of 30% sucrose and 0.5 mL sucrose both prepared in MBS buffer and ultracentrifuged in a TLA100.3 rotor (Beckman coulter, Brea, CA, USA) for 18h at 60000 rpm using maximum acceleration and no brake conditions. Eight 375 μ L fractions were collected from the top and subjected to trichloroacetic acid (TCA) precipitation by adding an equal volume of 25% w/v TCA to each gradient fraction. After 30 min incubation on ice, proteins were pelleted at 4 °C at 16000 g for 20 min then washed twice with cold acetone and resuspended in sample buffer (60 mM Tris pH 7.0, 2% SDS, 25% glycerol, β -mercaptoethanol and trace of bromophenol blue). Western blot was performed as described before.

Immunocytochemistry and microscopy analysis

SH-SY5Y cells were seeded onto Lab-Tek chamber Slides (Millipore, Darmstadt, Germany). Serum starved cells were treated 4 h with palmitate, DHA or FFA-BSA as a control, then washed with ice-cold PBS and incubated or not with 1 μ g/mL of

isothiocyanate-conjugated cholera toxin B subunit (FITC-CTxB) for 15 min at 4 °C. Cells were washed with PBS then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C followed by incubation with 50 mM NH_4Cl for 20 min and were blocked/permeabilized with a solution containing 0.1% Triton X-100, 0.2% Fish Gelatin, 2% normal donkey serum for 1 h at room temperature. Fixed cells were then incubated with 1/300 dilution of rabbit anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in Blocking/permeabilization solution overnight at 4 °C. Cells were washed with ice-cold PBS and incubated with 1/500 dilution in PBS of Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rabbit IgG (Life Technologies, Illkirch, France) or DyLight 649 conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 1 h at room temperature. Cells were then washed with PBS and incubated for 3 min with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for DNA staining. After washing with PBS coverslips were mounted in Vectashield antifade mounting medium (Vectorlabs, Burlingame, Ca, USA) and slides were sealed with nail polish. Immunofluorescence was examined by confocal microscopy (Zeiss MRC1024ES; Zeiss microscopy, Jena, Germany) for TLR4 recruitment into lipid raft.

Hormones and chemicals

Human resistin and human resistin antagonist were a generous gift from Protein Laboratories Rehovot Ltd. (Rehovot, Israel). Human insulin Actrapid was provided by Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). Sodium palmitate, DHA and FFA-BSA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) and all cell culture reagents were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Data analysis and statistics

Repeated-measures two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test were

used to test the changes in signaling and gene expression experiments and P value < 0.05 was considered as statistically significant. The results are expressed as means $\pm$ S.E.M.

Results:

- Palmitic acid reduced insulin-dependent Akt/ERK phosphorylation and increased TLR4 expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

To determine the effect of palmitic acid on insulin responsiveness, SH-SY5Y cells were pretreated with palmitic acid, DHA or placebo. We showed that palmitic acid pretreatment reduced both insulin-dependent Akt and Erk1/2 as compared to control. In contrast, DHA pretreatment increased insulin-dependent phosphorylation of Akt and Erk1/2 (fig. 1A). Since, we have recently reported that the activation of TLR4 signaling impaired insulin signaling, we investigated the effect of palmitic acid on TLR4 expression. Palmitic acid pretreatment increased the expression of TLR4 at both protein and mRNA levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells, whereas DHA pretreatment did not affect TLR4 expression (fig 1B, 1C).

-Palmitic acid increased the expression of pro-inflammatory markers in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

To compare the effect of palmitic acid and DHA on proinflammatory factors expression, cells stably expressing NFkB responsive element fused to luciferase were pretreated with placebo, palmitic acid or DHA. Palmitic acid significantly increased luciferase activity as compared to placebo and DHA treated cells (fig 2A). Furthermore, the palmitic acid but not DHA pretreatment significantly increased both IL6 and TNFa mRNA expression levels (fig 2B).

-Resistin/TLR4 signaling increased proinflammatory markers.

To determine the interaction between TLR4 and resistin, we performed cross-link experiment using SH-SY5Y neuroblastoma cells. Using cross-link approach, we showed that resistin bound to TLR4 (fig 3A). Acute resistin exposure increased both Akt and p38 MAP kinase phosphorylation (fig 3B and 3C). To determine the impact of chronic resistin exposure on neuroinflammation, cells were incubated in the presence or absence of resistin during 4 hours. Resistin treatment increased luciferase activity associated to NFkB responsive element (fig 3D), and also increased both IL6 and TNFa expression (fig 3E). To determine the specific signaling pathways involved in resistin-induced neuroinflammation, cells were treated with resistin in the presence or absence of specific inhibitors of Akt, Erk, Jnk or p38 and then IL6 and TNFa expression were measured. Resistin significantly increased both IL6 and TNFa expression as shown in figure 3E and 3F. The inhibition of Akt completely abolished resistin-induced up-regulation of IL6 and TNFa (fig. 3F). In addition, resistin-induced TNFa expression was also blunted in the presence of inhibitors targeting Erk, Jnk and p38 (fig. 3F). We also showed that resistin-induced IL6 expression was not impaired in the presence of Erk, Jnk or p38 inhibitors (fig. 3F).

- Palmitic acid but not DHA promoted resistin action.

To investigate the effect of palmitic acid and DHA pretreatments on resistin effects, SH-SY5Y neuroblastoma cells were chronically treated with palmitic acid or DHA and then challenged with resistin. Resistin alone activated Akt and p38 MAP kinase phosphorylation (fig 4A). The pretreatment with palmitic acid but not DHA re-enforced the effect of resistin regarding Akt and p38 MAPK phosphorylation (fig 4A and 4B). We also showed that DHA treatment alone increased p38MAPK phosphorylation (fig 4B and 4C). Palmitic acid treatment but not DHA

amplified resistin effect toward the activation of luciferase activity driven by NFκB responsive element (fig 4D). Resistin treatment also increased both IL6 and TNFα, the pretreatment with palmitic acid did not further increase these expressions (fig 4E). However, DHA treatment completely abolished the effect of resistin towards IL6 and TNFα expression (fig 4E).

- Palmitic acid but not DHA increased TLR4 location within lipid raft.

To investigate whether palmitic acid and DHA modified TLR4 membrane location and especially within lipid rafts, we determined the co-localization of TLR4 and CTXB (a marker of lipid rafts). We showed that palmitic acid pretreatment increased lipid rafts and TLR4 with the augmentation of TLR4 co-localization with CTXB (fig 5). DHA pretreatment did not induce the co-localization of TLR4 and CTXB and did not increase TLR4 expression (fig 5).

- Palmitic acid increased resistin-dependent TLR4/MYD88/TIRAP complex formation.

In order to determine whether palmitic acid promoted the activation of resistin/TLR4 signaling, we investigated the impact of palmitic acid and DHA on the formation of the signaling complex TLR4/MYD88/TIRAP in response to resistin. Resistin alone increased the co-immunoprecipitation of TLR4/TIRAP and TLR4/MYD88 (fig 6A). Following palmitic acid pre-treatment, resistin effect was amplified as evidenced by the augmentation of TLR4/TIRAP and TLR4/MYD88 co-immunoprecipitation (fig 6A). DHA pre-treatment did not increase resistin-dependent TLR4/TIRAP/MYD88 co-immunoprecipitation but rather decreased it especially concerning TIRAP (fig 6A). To further investigate resistin signaling through TLR4/MYD88, SH-SY5Y cells lacking TLR4 or MYD88 were generated by siRNA methodology. Firstly, we verified that siTLR4 and siMYD88 cells exhibited a strong reduction of TLR4 and MYD88 expression,

respectively (fig. 6B). We also showed in siTLR4 cells that resistin was unable to activate Akt phosphorylation even following palmitic acid pre-incubation (fig. 6C). Similar result was obtained in siMYD88 but however with a lesser extend as compared to that obtained in siTLR4 cells (fig. 6C).

Discussion

In most Type2 Diabetes and obese patient's plasma FFA levels are elevated (15, 16). It is also well accepted that saturated FFA impair insulin responsiveness especially at the peripheral level. Indeed, in pancreatic b cells saturated fatty acids including palmitic acid inhibit insulin gene expression and b cells functions (8). In endothelial cells, palmitic acid was able to inhibit insulin-dependent Akt phosphorylation and increased ER stress through the downregulation of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) (17). Furthermore, FFAs have been also associated to increased inflammation in various cellular models and in vivo (18, 19, 20, 21, 22). The inflammatory effects of FFAs have been linked to the activation of TLR4 in pancreatic b cells (8), immune cells and adipocytes (10). These studies have suggested that the FFAs exert their deleterious effects through TLR4 but so far the direct binding of FFAs to TLR4 has not been demonstrated. Furthermore, TLR4 has been reported to be the binding site for LPS leading to inflammatory responses (11, 23, 24). Recently, we have reported that resistin, an adipokine promoting insulin resistance, was able to induce its effects through an interaction with TLR4 at the neuronal level leading to pro-inflammatory response and insulin resistance (12). It has been also reported that palmitic acid induced resistin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes (10). However, the potential impact of palmitic acid on resistin/TLR4 signaling has not been studied. In the present study, we showed that the overexposure to palmitic acid impaired insulin-dependent Akt phosphorylation whereas DHA maintained this

phosphorylation in neuronal cells. Importantly, we also reported for the first time, to our knowledge, that palmitic acid but not DHA induced TLR4 up-regulation in neuronal cells. Indeed, the palmitic acid-dependent up-regulation of TLR4 has been previously reported in peripheral tissues such as muscle and liver (25, 26). Our results also showed that the palmitic acid but not DHA increased the expression of IL6 and TNF α in neuronal cells. This is in good agreement with numerous studies reporting the pro-inflammatory action of palmitic acid and saturated FFA (8, 17, 18, 27). At the neuronal level, our findings confirm previous studies, which showed that palmitic acid in the hypothalamus or neuronal cells impaired insulin signaling through different signaling pathways involving PKC- δ or ER stress (28, 29). Despite, numerous studies reporting the deleterious effects of palmitic acid on insulin signaling especially at the peripheral level, the underlying mechanisms of its action at the neuronal level are not yet totally elucidated. Indeed, it has been shown that overexposure to FFAs rapidly increased their incorporation in the brain lipids suggesting a possible action within neuronal cells (30, 31). Other studies suggested that FFAs might act through the activation of TLR4 at the plasma membrane level (8, 10, 25, 26, 32). In the context of inflammation and insulin resistance, resistin have been described as key player concerning the onset of insulin resistance through its central action (12, 33, 34, 35) and have been also reported to act through TLR4 (12). Here we confirm that resistin directly bound to TLR4. We also showed that acute resistin treatment activated Akt phosphorylation as previously reported at the hypothalamic level (12, 35). Interestingly, overexposure to resistin produced similar effects as palmitic acid regarding the augmentation of pro-inflammatory factors IL6 and TNF α . We also showed that resistin-dependent IL6 and TNF α augmentation was dependent upon Akt phosphorylation. Furthermore other signaling pathways such as ERK, JNK and p38 MAP kinases were

involved in resistin-dependent TNF α up-regulation but not that of IL6. This revealed that resistin differently regulated IL6 and TNF α expression, the mechanisms involved in this differential regulation remain unknown. Interestingly, our present data demonstrate that palmitic acid pretreatment amplified resistin action through the activation Akt and p38 MAP kinase phosphorylation. Importantly we also showed that DHA pretreatment did not affect resistin action towards Akt and p38 MAP kinase phosphorylation. Furthermore, we showed that both palmitic acid and resistin induced the up-regulation of IL6 and TNF α without cumulative effect. This might indicate that palmitic acid and resistin used similar signaling pathways to induce neuroinflammation that could most likely involve TLR4. It was also noteworthy to show that the pre-treatment with DHA completely abrogated resistin-induced inflammation. Thus, to further investigate the involvement of palmitic acid on resistin action and the possible link to TLR4, we showed that palmitic acid but not DHA increased TLR4 expression and its recruitment into plasma membrane lipid rafts. Indeed, the location of TLR4 within plasma membrane rafts is considered necessary for its activation and signaling, and more specifically for its interaction with other signaling components such as CD14 and MD2 (24, 36, 37). We then investigated the impact of palmitic acid pretreatment on resistin-induced TLR4 interaction with TIRAP and MYD88 known as crucial component of TLR4 signaling (38, 39, 40). We showed that palmitic acid pretreatment alone did not increase TLR4/TIRAP/MYD88 interaction, in contrast, resistin alone increased this interaction. Interestingly, palmitic acid pretreatment amplified resistin effect. Thus, we suggest that palmitic acid induced the up-regulation of TLR4 amplifying then resistin action, which could be also facilitated by TLR4 recruitment to plasma membrane lipid rafts leading to an efficient TLR4 signaling. To confirm this finding we showed that the amplification action of palmitic acid regarding

resistin-dependent AKT phosphorylation was strongly inhibited in cells expressing TLR4 or MYD88 siRNAs. Importantly, DHA pretreatment reduced resistin-dependent TLR4/TIRAP/MYD88 co-immunoprecipitation, which may constitute one of the mechanisms by which omega 3 fatty acids play their protective actions towards inflammation and insulin resistance.

In conclusion, our results demonstrate that (1) palmitic acid but not DHA up-regulates TLR4 and impairs insulin-dependent Akt phosphorylation in neuronal cells; (2) palmitic acid but not DHA increases neuronal inflammatory markers; (3) resistin/TLR4 signaling pathway increased neuronal inflammatory markers using an Akt-dependent mechanism; (4) DHA abrogates resistin-dependent neuro-inflammation; (5) palmitic acid promotes resistin action through the recruitment of TLR4 to plasma membrane rafts; (6) palmitic acid but not DHA increases the resistin dependent TLR4/MYD88/TIRAP complex formation.

Acknowledgments

This work is supported by the University of Paris-Sud and CNRS (Centre National de Recherches Scientifiques) through our recurrent grant.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest with the contents of this article.

Authors' contributions

HA: Performed and analyzed the experiments, YB: contributed to the experiments and discussion, AG: production of human recombinant resistin and participated to the discussion, MT: designed and coordinated the experiments, and wrote the paper.

References

- 1- Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J.M. (2008) [Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation](#). *J Clin Invest*. 118,2992-3002
- 2- Ilievski, V., Cho, Y., Katwala, P., Rodriguez, H., Tulowiecka, M., Kurian, D., Leoni, L., Christman, J. W., Unterman, T. G., and Watanabe, K. (2015) TLR4 expression by liver resident cells mediates the development of glucose intolerance and insulin resistance in experimental periodontitis. *Plos One* 10(8):e0136502
- 3- Zheng, C., Yang, Q., Xu, C., Shou, P., Cao, J., Jiang, M., Chen, Q., Cao, G., Han, Y., Li, F., Cao, W., Zhang, L., Shi, Y., and Wang, Y. (2015) CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting activation and proliferation of adipose tissue macrophages. *Proc.NAS pii*: 201500396
- 4- Kain, V., Kapadia, B., Viswakarma, N., Seshadri, S., Prajapati, B., Jena, P.K., Meda, C.L.T., Subramanian, M., Suraj, S.K., Kumar, S.T., Babu, P.P., Thimmapaya, B., Reddy, J.K., Parsa, K.V.L., and Misra, P. (2015) Co-activator binding protein PIMT mediates TNF α induced insulin resistance in skeletal muscle via the transcriptional down-regulation of MEF2A and Glut4. *Sci Rep* 5, 15197
- 5- Dey, D., Bhattacharya, A., Roy, S., and Bhattacharya S. (2007) [Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase Cepsilon](#). *Biochem Biophys Res Commun*. 357:474-9
- 6- [Hommelberg, P.P., Plat, J., Langen, R.C., Schols, A.M., and Mensink, R.P.](#) (2009) Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. [Am J Physiol Endocrinol Metab](#). 296 :E114-20.
- 7- Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K., and Kaneko S. (2009) [Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria](#). *J Biol Chem*. 284:14809-18.
- 8- Eguchi, K., Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kone, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyaki, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2012) Saturated fatty acid and TLR signaling link b cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab*. 15, 518-533
- 9- Liu, S.P., Li, X.Y., He, L.N., Xiao, Y., Yan, K., and Zhou, Z.G. (2012) Octanoylated ghrelin inhibits the activation of the palmitic acid-induced TLR4/NF-kB signaling pathway in THP-1 macrophages. *ISRN Endocrinol*. 237613
- 10- Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich, J., and Falk, W. (2008) Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kB pathway in adipocytes links nutritional signaling with innate immunity. *Immunology* 126, 233-245
- 11- Beutler, B., Du, X., and Poltorak, A. (2001) Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies. *J. Endotoxin. Res*. 7, 277-280
- 12- Benomar, Y., Gertler, A., De Lacy, P., Crépin, D., Ould Hamouda, H., Riffault, L., Taouis, M. (2013) [Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4](#). *Diabetes*. 62, 102-14
- 13- Savage, D.B., Sewter, C.P., Klenk, E.S., Segal, D.G., Vidal-Puig, A., Considine, R.V., and O'Rahilly, S. (2001) [Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans](#). *Diabetes* 50, 2199-202.
- 14- Patel, L., Buckels, A.C., Kinghorn, I.J., Murdock, P.R., Holbrook, J.D., Plumpton, C., Macphie, C.H., and Smith, S.A. (2003) [Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators](#). *Biochem Biophys Res Commun*. 300, 472-6.
- 15- Ishii, M., Maeda, A., Tani, S., and Akagawa, M. (2015) Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Arch. Biochem. Biophys*. 566, 26-35

- 16- Boden, G., Chen, X., and Iqbal, N.(1998) [Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects.](#) *Diabetes* 47, 1609-12
- 17- Vazquez-Jimenez, J.G., Chavez-Reyes, J., Romero-Garcia, T., Zarain-Herzberg, A., Valdes-Flores, J., Galindo-Rosales, J.M., Rueda, A., Guerrero-Hernandez, A., and Olivares-Reyes, J.A. (2016) Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell. Sign.* 28, 53-59
- 18- Kwon, B., Lee, H.K., and Querfurth, H.W. (2014) Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Act.* 1843, 1402-1413
- 19- Zeyda, M., and Stulnig, T.M. (2009) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gerontology* 55, 379-386
- 20- Funaki, M. (2009) Saturated fatty acids and insulin resistance. *J. Med. Investig.* 56, 88-92
- 21- Boden, G. (2006) Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr. Diab. Rep.* 6, 177-181
- 22- Xu, H., Barnes, Q., Yang, G., Tan, D., Yang, C.J., Chou, J., Sole, A., Nichols, J.S., Ross, L.A., Tartaglia, H., and Chen, H. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-1830
- 23- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenburg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice/ mutations in *tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088
- 24- Plociennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzecka, K., and Kwiatkowska, K. (2015) Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 557-581
- 25- Reyna, S. M., Ghosh, S., Tantiwong, P., Meka, R.C.S., Eagan, P., Jenkinson, C.P., Cersosimo, E., DeFranzo, R. A., Coletta, D. K., Sriwijitkamol, A., and Musi, N. (2008) Elevated Toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 57, 2595-2602
- 26- Sharifnia, T., Antun, J., Verriere, T. G. C., Suarez, G., Wattacheril, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., Abumrad, N.N., and Flynn, C.R. (2015) Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G270-G278
- 27- Mayer, C.M., and Belsham, D.D. (2010) Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5 Monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151, 576-585
- 28- Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., Schwartz, M.W., and Niswender, K.D. (2009) Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation and insulin resistance in rats fed a high fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1003-E1012
- 29- Mayer, C.M., Fick, L.J., Gingerich, S., and Belsam, D.D. (2009) Hypothalamic cell lines to investigate neuroendocrine control mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 405-423
- 30- Kimes, A.S., Sweeney, D., and Rapoport, S.I. (1985) Brain palmitate incorporation in awake and anesthetized rats. *Brain Res.* 341, 164-170
- 31- Smith, Q.R., and Nagura, H. (2001) Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with perfusion model. *J. Mol. Neurosci.* 16, 167-172
- 32- Tian, H., Liu, C., Zou, X., Wu, W., Zhang, C., and Yuan, D. (2015) MiRNA-194 regulates palmitic acid-induced Toll-like receptor 4 inflammatory responses in THP-1 cells. *Nutrients* 7, 3483-3496
- 33- Muse, E.D., Lam, T.K., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2007) [Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance.](#) *J. Clin. Invest.* 117, 1670-8
- 34- Vazquez, M.J., Gonzalez, C.R., Varela, L., Lage, R., Tovar, S., Sangiao-Alvarellos, S., Williams, L.M., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Lopez, M., and Dieguez, C. (2008) Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* 149, 4534-4543

- 35- Park, S., Hong, S.M., Sung, S.R., and Jung, H.K. (2008) Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and b-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* 149, 445-454
- 36- Pfeiffer, A., Böttcher, A., Orsó, E., Kapinsky, M., Nagy, P., Bodnár, A., Spreitzer, I., Liebisch, G., Drobnik, W., Gempel, K., Horn, M., Holmer, S., Hartung, T., Multhoff, G., Schütz, G., Schindler, H., Ulmer, A.J., Heine, H., Stelter, F., Schütt, C., Rothe, G., Szöllösi, J., Damjanovich, S., and Schmitz, G. (2001) [Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts.](#) *Eur J Immunol.* 31, 3153-64
- 37- Triantafilou, M., Brandenburg, K., Kusumoto, S., Fukase, K., Mackie, K., Seydel, A., and Triantafilou, K.(2004) Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem. J.* 381, 527-536
- 38- Janssens, S., and Beyaert, R. (2002) A Universal role for MyD88 in TLR:IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem. Sci.* 27, 474-482
- 39- Motshwene, P.G., Moncrieffe, M.C., Grossmann, J.G., Kao, C., Ayaluru, M., Sanderock, A.M., Carol, V., Robinson, C., Latz, E., and Gay, N.J. (2009) An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J. Biol. Chem.* 284, 25404-25411
- 40- Lin, S.C., Lo, Y.C., and Wu, H.(2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling. *Nature* 465, 885-890

Figure Legends

Figure 1

Palmitate but not DHA, inhibits insulin action and up-regulates TLR4.

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were pretreated with palmitate, DHA or placebo during 16 hours, then: insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation measured by Western blots using adequate antibodies (panel A); TLR4 expression was measured by Western blot using anti-TLR4 antibodies and the expression was normalized to β tubulin, and band densities were quantified and expressed as ratio of TLR4/ β -tubulin (panel B); TLR4 mRNA expression was determined by qRT-PCR normalized to GAPDH (panel C). Western blot and qRT-PCR data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), * and ** denoted significant differences at $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively.

Figure 2

Palmitate but not DHA, increased the expression of pro-inflammatory factors.

Panel A: human SH-SY5Y neuroblastoma cells stably transfected with NF- κ B luciferase reporter gene were treated with palmitate, DHA or placebo, and then relative luciferase activity measured. Panel B:

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were treated with palmitate, DHA or placebo and then IL6 and TNF α expression was determined using adequate primers, and normalized using GAPDH. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), * and ** denoted significant differences at $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively.

Figure 3

Resistin increased neuroinflammation through its binding to TLR4.

Panel A: Immunoprecipitation/ Immunoblot (IP/IB) analysis of the direct association of resistin with TLR4 in protein extracts from SH-SY5Y cells treated with resistin (100 ng/ml) for 16h in the presence or absence of the cross-linker agent BS3. Panel B and C: SH-SY5Y cells were treated with or without resistin and then Akt and p38MAPkinase phosphorylation measured by Western blots using adequate antibodies, the band densities were quantified and expressed as phosphorylated/total proteins. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), *** denoted significant differences at $p < 0.0005$. Panel D: human SH-SY5Y neuroblastoma cells stably transfected with NF- κ B luciferase reporter gene were treated resistin and relative luciferase activity determined. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), * and *** denoted significant differences at $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively. Panel E: Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were treated with resistin or placebo and then IL6 and TNF α expression was determined using adequate primers, and normalized using GAPDH. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), * and *** denoted significant differences at $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. Panel F: Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were treated with resistin in the presence or absence of Akt, Erk, JNK or p38 MAP kinase inhibitors, and then IL6 and TNF α expression was determined using adequate primers, and normalized using GAPDH. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3). Different lettering indicated a $p < 0.05$.

Figure 4

Palmitate promoted resistin action.

Human SH-SY5Y cells were pre-treated with palmitate (panel A) or DHA (panel B) and then stimulated by resistin. Phosphorylated Akt and p38MAPkinase was determined by Western blot using adequate antibodies. Panel C: cells were treated with DHA or placebo and p38MAP kinase phosphorylation was determined by Western blot using adequate antibodies. Panel D: human SH-SY5Y neuroblastoma cells stably transfected with NF- κ B luciferase reporter gene were treated resistin, resistin+palmitate or resistin + DHA, and relative luciferase activity determined. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), ** and *** denoted significant differences at $p<0.005$ and $p<0.001$, respectively. Panel E: Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were treated with resistin, resistin + palmitate or resistin + DHA, and then IL6 and TNF expression was determined using adequate primers, and normalized using GAPDH. Data were presented as means $\pm$ SEM (n= 3), * and ** denoted significant differences at $p<0.05$ and $p<0.005$, respectively.

Figure 5

Palmitate induced TLR4 recruitment to membrane lipid rafts.

Human SH-SY5Y were treated with palmitate, DHA or placebo and fixed for immunohistochemistry analysis by confocal microscopy using antibodies directed towards CTXB (marker of membrane lipid rafts) or TLR4. The arrow in the merge indicated the recruitment of TLR4 to membrane lipid rafts. Images were captured using a confocal microscope with high-magnification scan (X40).

Figure 6

Palmitate increased resistin-dependent TLR4/MYD88/TIRAP association.

Panel A: Immunoprecipitation/Immunoblot (IP/IB) analysis of the association of TLR4 with MyD88 and TIRAP was analyzed in human SH-SY5Y neuroblastoma cells following treatment with palmitate or DHA and in response to resistin by Western blot using adequate antibodies. Panel B and C: SH-SY5Y cells were treated with control siRNA or specific siRNA duplexes targeting TLR4 or MyD88. Then, the protein lysates were subjected to Western blot analysis. Panel B presented the Immunoblot analysis of TLR4 and MYD88 contents in control and siTLR4 or siMYD88 treated cells. Panel C: cells expressing siTLR4 or siMYD88 were treated with palmitate in the presence or absence of resistin and using Western blot Akt phosphorylation was determined and normalized to total Akt.

A

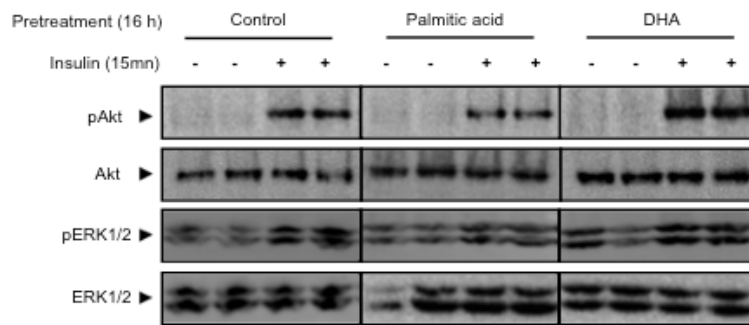
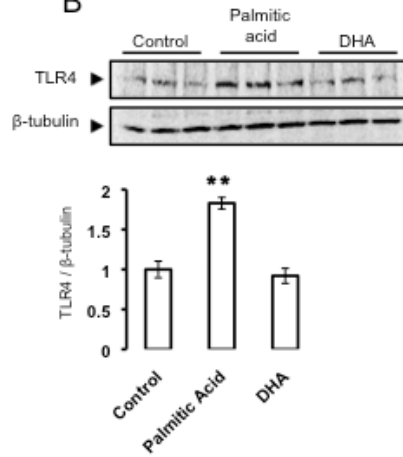


Fig 1

B



C

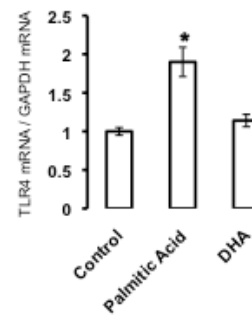
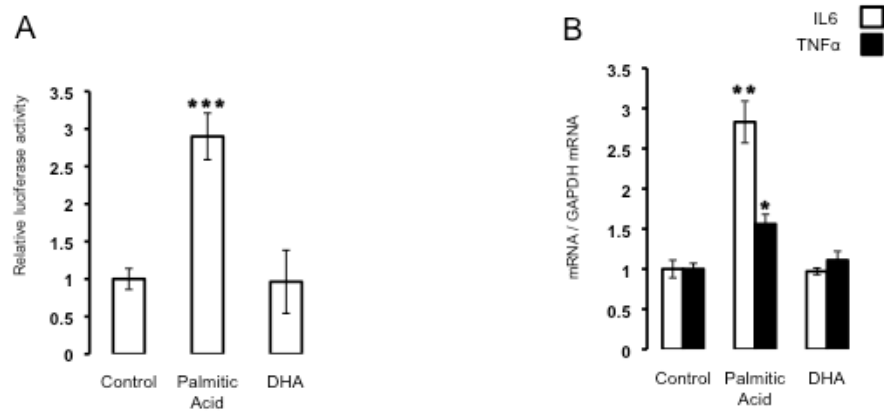
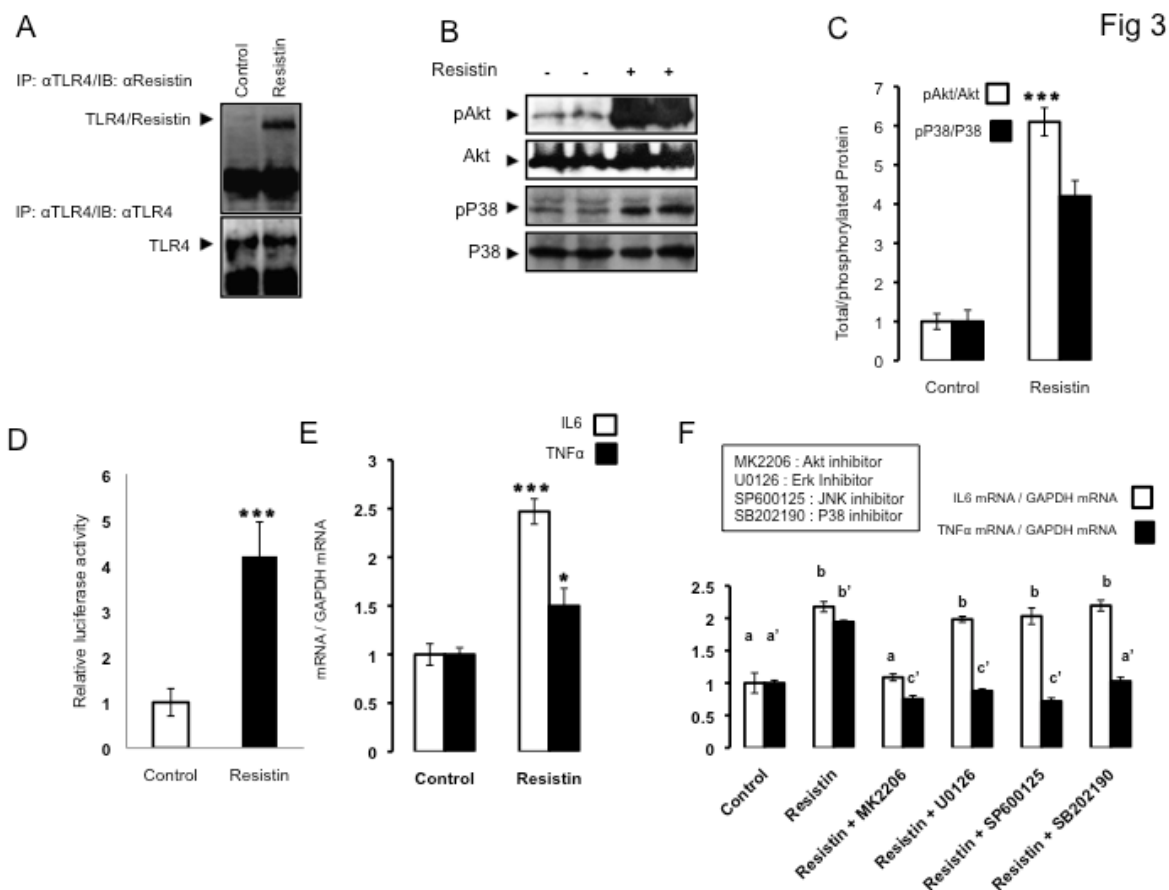


Fig 2





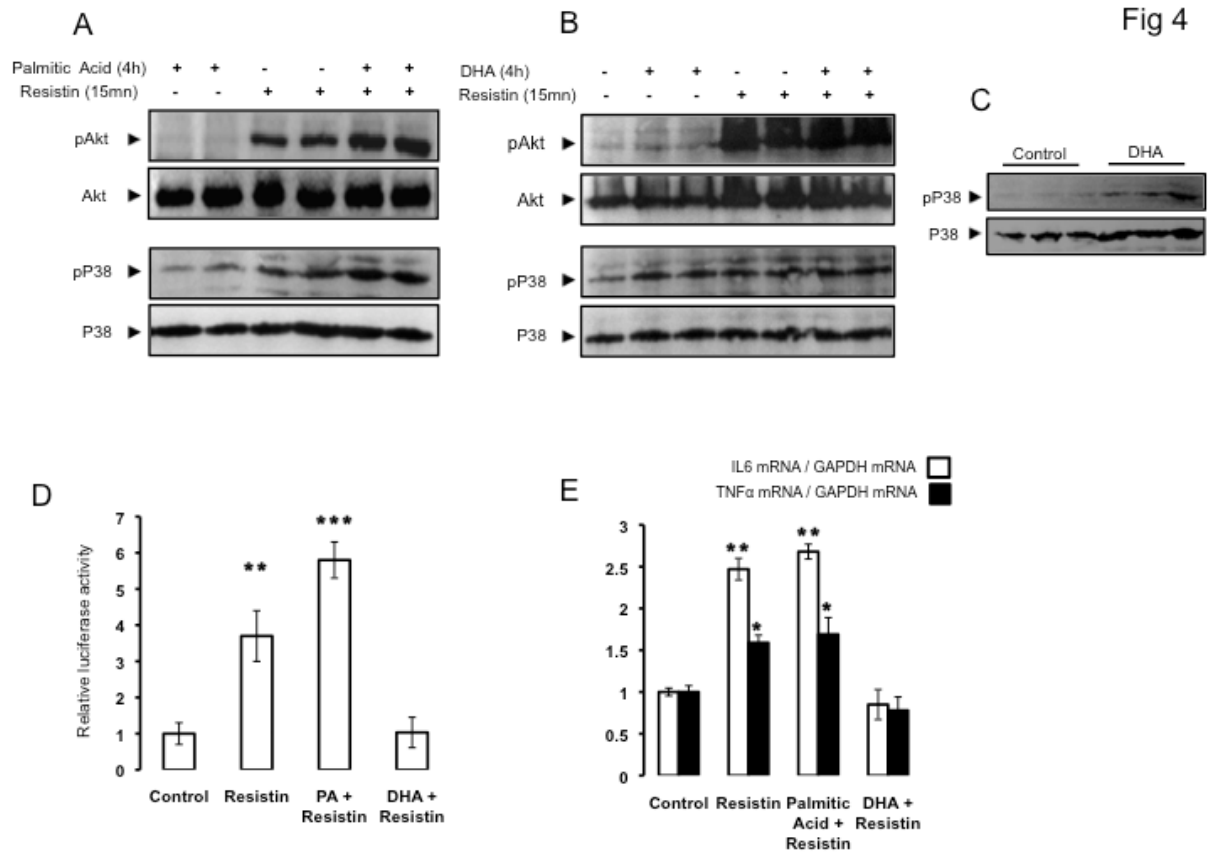


Fig 5

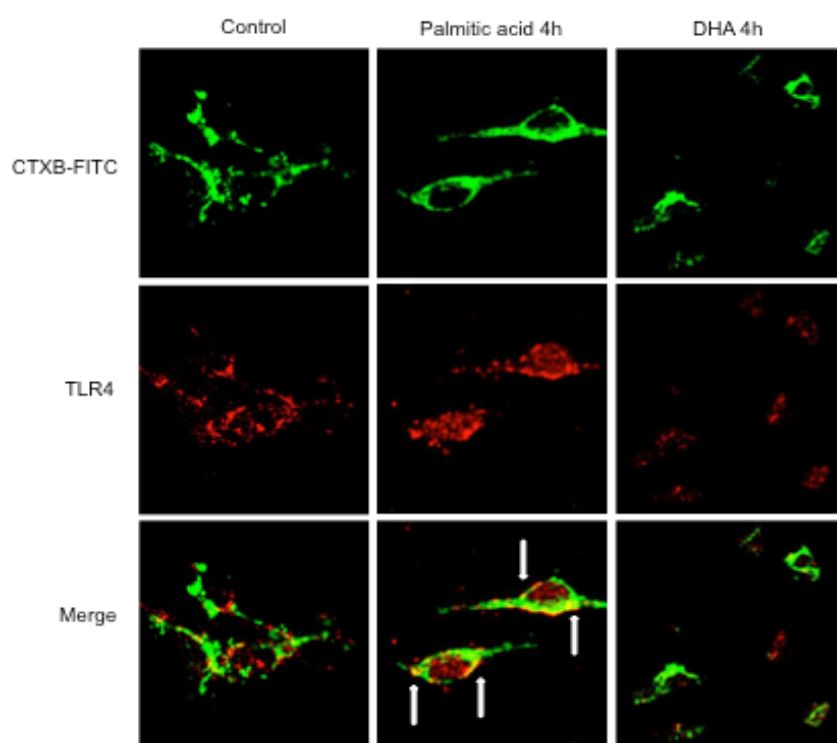
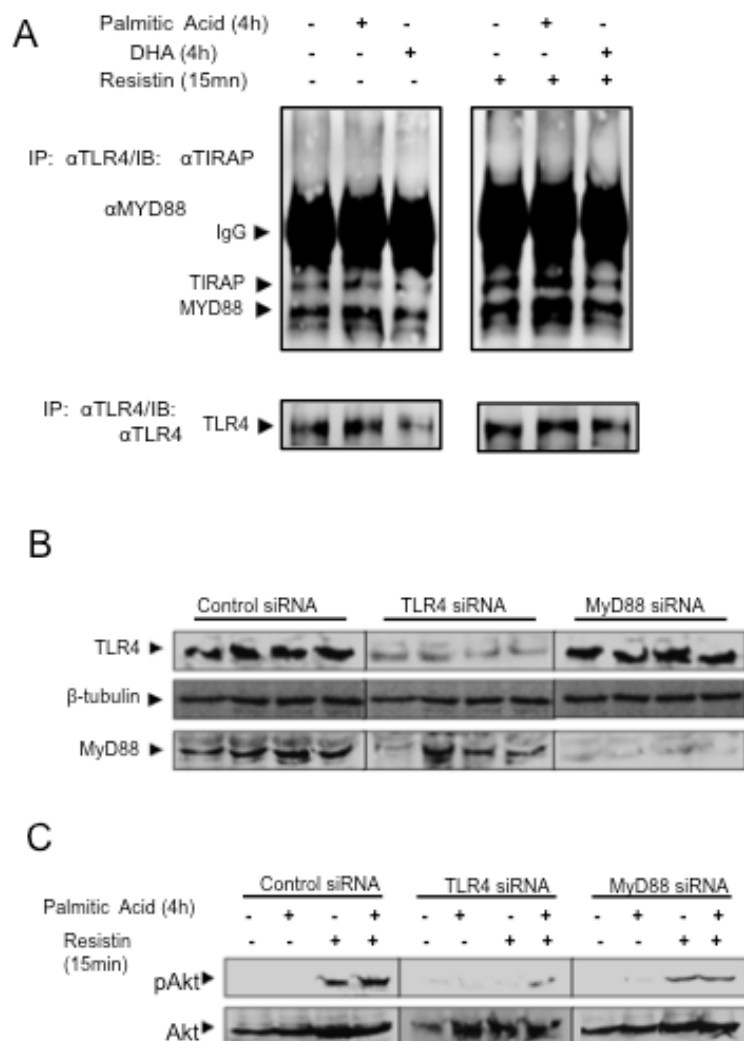


Fig 6



Principaux résultats de l'article 2 :

Le but de cette étude a été d'analyser l'effet de l'acide palmitique et du DHA sur la sensibilité à l'insuline ainsi que l'activation des voies d'inflammation, en étudiant l'action de la résistine et la signalisation du récepteur TLR4, sur un modèle cellulaire neuronale humain (les cellules SH-SY5Y).

Nous avons montré que :

- Le traitement des cellules SH-SY5Y pendant 16h avec l'acide palmitique réduit leur sensibilité à l'insuline, ce qui se traduit par une baisse de la phosphorylation insulino-dépendante de Akt et de ERK1/2 alors que le traitement pendant 16h avec le DHA améliore la réponse à l'insuline.
- Le traitement des cellules SH-SY5Y pendant 4h avec l'acide palmitique augmente l'expression du récepteur TLR4 et son association avec les protéines adaptatrices TIRAP et MyD88 alors que le traitement avec le DHA n'a pas d'effet.
- L'acide palmitique, contrairement au DHA, conduit augmente les niveaux d'expression de marqueurs pro-inflammatoires (IL6, TNF α et NF κ B).
- Le traitement des cellules SH-SY5Y pendant 4h avec l'acide palmitique favorise la translocation du récepteur TLR4 au niveau des radeaux lipidiques. Par contre le DHA n'a pas d'effet.
- La résistine se lie sur le récepteur TLR4 et active les voies de signalisation augmentant ainsi la phosphorylation d'Akt et P38 MAPK, et l'activation de NF κ B. La résistine augmente aussi les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6 et TNF α .
- L'acide palmitique potentialise les effets de la résistine alors que le DHA les inhibe.

Discussion de l'article 2 :

Il est actuellement bien admis que les acides gras saturés altèrent la réponse à l'insuline (Funaki, 2009). Les niveaux d'acides gras saturés libres dans la circulation sanguine sont augmentés chez les patients obèses et favorisent l'installation de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. En effet, il a été montré que les acides gras saturés favorisent l'activation de l'inflammation et stimulent les voies pro-inflammatoires par l'intermédiaire du récepteur TLR4 dans différents tissus et modèles cellulaires (Fresno et al., 2011; Milanski et al., 2009; Pal et al., 2012). Dans une étude précédente, nous avons montré que le récepteur TLR4 liait la résistine au niveau neuronal favorisant l'induction de l'inflammation et de la résistance à l'insuline (Benomar et al., 2013). Cependant, l'effet des acides gras saturés sur l'activation de TLR4 semble être indirect puisqu'aucune interaction directe des acides gras saturés avec le récepteur TLR4 n'a été démontrée à ce jour (Erridge and Samani, 2009; Schaeffler et al., 2009). Récemment, il a été montré que la fétuine-a, une protéine de transport, pourrait servir de lien entre le récepteur TLR4 et les acides gras saturés, induisant ainsi leurs effets pro-inflammatoires (Pal et al., 2012).

Au cours de cette étude, nous avons examiné l'impact de l'acide palmitique, un acide gras saturé, et du DHA, un acide gras polyinsaturés oméga-3, sur la signalisation resistin/TLR4 au niveau neuronal. Nous avons montré qu'un traitement avec l'acide palmitique altère la réponse à l'insuline concernant la phosphorylation de Akt et de ERK1/2 alors que le DHA l'améliore. Cela est en accord avec d'autres études qui montrent une diminution de la sensibilité à l'insuline suite à un traitement par l'acide palmitique au niveau neuronal (Benoit et al., 2009; Mayer and Belsham, 2010; Posey et al., 2009). De plus, nous montrons pour la première fois, à notre connaissance, que l'acide palmitique, mais pas le DHA, augmente l'expression du récepteur TLR4 au niveau neuronal. En effet, au niveau périphérique (muscle et foie), il a été observé une augmentation de l'expression de TLR4 suite à des traitements par l'acide palmitique (Reyna et al., 2008; Sharifnia et al., 2015). De plus, l'acide palmitique, contrairement au DHA, augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6 et TNF α au niveau neuronal, confirmant les résultats d'autres études (Gustavo Vazquez-Jimenez et al., 2016; Kwon et al., 2014).

Au niveau périphérique, l'impact de l'acide palmitique sur la sensibilité à l'insuline a été largement décrit. Cependant, au niveau neuronal, les mécanismes sous-tendant son action sur la sensibilité à l'insuline ne sont pas encore totalement élucidés. Il a été montré que l'acide palmitique conduisait à une résistance hypothalamique à l'insuline par l'intermédiaire de l'activation de la PKC-theta (Benoit et al., 2009). Dans une autre étude, il a été suggéré que les acides gras saturés favorisent l'insulino-résistance au niveau hypothalamique à travers l'activation des voies de signalisation de TLR4 (Milanski et al., 2009). Dans ce contexte, nous avons précédemment montré qu'une perfusion intra-cerebroventriculaire de résistine induisait une neuroinflammation suite à l'activation de la signalisation de TLR4 favorisant l'installation d'une résistance hypothalamique à l'insuline (Benomar et al., 2013). Ici, nous montrons que la résistine interagit directement avec TLR4 et induit la phosphorylation de Akt et P38 MAPK comme précédemment décrit au niveau hypothalamique (Benomar et al., 2013). La résistine induit également l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6 et TNF α d'une manière dépendante de la phosphorylation de Akt. Les MAP kinases ERK1/2, JNK et P38 sont aussi impliquées dans l'activation de l'expression du TNF α par la résistine. Cependant, ils n'ont pas d'effet sur l'expression de IL6, ce qui suggère que l'expression de ces deux cytokines est régulée différemment par la résistine, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. D'une manière intéressante, nos résultats montrent également que le traitement par l'acide palmitique amplifie les effets de la résistine concernant la phosphorylation de Akt et de P38 alors que le DHA n'a pas d'effet sur l'action de la résistine. L'acide palmitique et la résistine induisent tous les deux une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6 et TNF α mais aucun effet synergique n'est observé. Ce résultat suggère que l'acide palmitique et la résistine utiliseraient les mêmes voies concernant la régulation de l'expression de IL6 et TNF α , qui impliqueraient l'activation du récepteur TLR4. Cependant, il est important de signaler que le traitement par le DHA prévient totalement l'inflammation induite par la résistine concernant l'activation de IL6, de TNF α et de NF κ B.

Afin d'examiner l'implication de l'acide palmitique sur l'action de la résistine et l'activation de TLR4, nous avons montré que l'acide palmitique, mais pas le DHA, induit l'expression membranaire de TLR4 et favorise sa translocation au niveau des radeaux lipidiques. Ces derniers jouent un rôle important dans l'activation de la

signalisation du récepteur TLR4 et favorisent son interaction membranaire avec d'autres molécules, comme CD14 et MD2, impliquées dans la reconnaissance de certains de ses ligands, comme le LPS (Pfeiffer et al., 2001; Triantafilou et al., 2004; Wong et al., 2009). Nous avons étudié par la suite l'effet des deux acides gras sur l'association de TLR4 et ses adaptateurs intracellulaire TIRAP et MyD88. Nous avons montré que les traitements par l'acide palmitique et le DHA n'avaient pas d'effet sur la formation du complexe TLR4/TIRAP/MyD88. Cependant, le traitement par la résistine favorise cette association et d'une manière intéressante, l'acide palmitique potentialise cet effet. Ces résultats suggèrent que l'acide palmitique, en augmentant l'expression de TLR4, potentialise les effets de la résistine sur la formation du complexe TLR4/TIRAP/MyD88, qui serait favorisé par le recrutement de TLR4 au niveau des radeaux lipidiques. Ces effets vont par conséquent amplifier la signalisation de TLR4, se traduisant par une augmentation de la phosphorylation de Akt, de P38 et de l'activation de NFκB. En effet, l'inactivation de TLR4 ou de MyD88 abolit totalement l'effet de la résistine sur l'activation de Akt. De plus, le DHA prévient la formation du complexe TLR4/TIRAP/MyD88, qui peut être expliqué par la prévention de la translocation de TLR4 au niveau des radeaux lipidiques comme suggéré dans des études précédentes et qui peut constituer un des mécanismes anti-inflammatoire exercé par les acides gras polyinsaturés oméga-3.

En conclusion, nos résultats démontrent qu'au niveau neuronal :

- L'acide palmitique, mais pas le DHA, augmente l'expression de TLR4 et altère la signalisation de l'insuline.
- L'acide palmitique favorise l'activation de marqueurs d'inflammation alors que le DHA n'a pas d'effet.
- La résistine, en se liant à TLR4, active ses voies de signalisation et induit l'expression de marqueurs d'inflammation d'une manière Akt dépendante.
- Le DHA protège contre les effets pro-inflammatoires de la résistine.
- L'acide palmitique favorise la translocation de TLR4 au niveau des radeaux lipidiques.
- L'acide palmitique, contrairement au DHA, potentialise les effets de la résistine et favorise la formation du complexe TLR4/TIRAP/MyD88 dépendante de la résistine.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale :

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les mécanismes préventifs et insulino-sensibilisateurs des acides gras polyinsaturés oméga-3. En effet, ces derniers préviennent l'inflammation et la résistance à l'insuline induites par les acides gras saturés en régulant négativement la voie de signalisation du récepteur TLR4, empêchant ainsi l'installation de la résistance à l'insuline. En effet, les acides gras saturés sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline en augmentant les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires, qui vont activer plusieurs facteurs impliqués dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline. De plus, les acides gras saturés augmentent les niveaux d'expression du récepteur TLR4 ainsi que son recrutement au niveau des radeaux lipidiques favorisant ainsi son activation. En effet, dans une situation d'obésité, les niveaux circulants de certains facteurs pro-inflammatoires, comme la résistine et le LPS, sont augmentés. Ces derniers agissent le récepteur TLR4. Ainsi, l'augmentation des niveaux d'acides gras saturés libres au cours de l'obésité pourrait potentialiser les effets de ces deux facteurs en augmentant l'expression de TLR4. Cependant, les acides gras polyinsaturés, inhibent les effets des acides gras saturés en prévenant l'activation des voies pro-inflammatoires et du récepteur TLR4. Cela peut être expliqué en partie par l'inhibition de la translocation de TLR4 au niveau des radeaux lipidiques membranaires, empêchant ainsi son activation optimale.

Perspectives :

Etude 1 :

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur les effets insulino-sensibilisateurs de la microalgue au niveau du foie. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'effet de la microalgue sur la sensibilité à l'insuline dans les autres tissus impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (tissu adipeux, muscle, hypothalamus).

Nous avons montré aussi que la microalgue avait des effets insulino-sensibilisateurs plus important que ceux de l'huile de poisson et qui seraient dus à la composition spéciale de la microalgue. En effet, cette dernière, en plus de sa haute teneur en EPA, est riche en antioxydants. Il serait ainsi judicieux d'étudier les effets et les

mécanismes moléculaires impliqués de ses différents composants sur la sensibilité à l'insuline et l'inflammation.

Au cours de cette étude, nous avons montré l'effet préventif de la microalgue sur l'installation de la résistance à l'insuline et l'inflammation induites par le régime riche en acides gras saturés. Toutefois, il serait intéressant d'étudier l'effet curatif de la microalgue sur la restauration de la résistance à l'insuline induite par le régime riche en acides gras saturés.

Etude 2 :

Cette étude a été réalisée en utilisant un modèle de cellules neuronales humaines, les cellules SH-SY5Y. Cependant, ces mécanismes doivent être validés dans d'autres modèles cellulaires (eg cellules hypothalamiques) ainsi que sur des modèles animaux (eg souris KO TLR4). Cela permettra aussi d'explorer les voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées ainsi que les mécanismes moléculaires par les quels les acides gras modulent la sensibilité à l'insuline. Il serait également intéressant de tester d'autres acides gras afin de vérifier leur implication dans les mécanismes d'inflammation.

ANNEXES

Etude 3 : L'activation de la voie résistine / TLR4 au niveau central altère la signalisation de l'adiponectine ce qui favorise l'installation de la résistance à l'insuline et FGF21

Etude 4 : La surexpression du microARN 200a dans l'hypothalamus des souris *ob/ob* est liée à l'altération de la signalisation de la leptine et de l'insuline

Etude 5 : Développement d'outils informatiques pour la recherche et la prédiction de cibles des petits ARN régulateurs

Central Resistin/TLR4 impairs adiponectin signaling contributing to insulin and FGF21 resistance.

Yacir Benomar^{1,2}, Hamza Amine^{1,2}, Délphine Crépin^{1,2}, Sarah Al Rifai^{1,2}, Laure Riffault^{1,2}, Arieh Gertler³, Mohammed Taouis^{1,2}

¹ Molecular Neuroendocrinology of Food Intake (NMPA), UMR 9197, University Paris-Sud, Orsay, France; ² NMPA, Neurosciences Paris Saclay Institute (NeuroPSI), Department molecules & circuits, CNRS UMR 9197, Orsay, France ; ³ The Institute of Biochemistry, Food Science, and Nutrition, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.

Running title: Resistin, adiponectin and FGF21 crosstalk.

Corresponding author:

Pr. Mohammed Taouis, PHD

Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire

NeuroPSI UMR9197, University of Paris-Sud

Phone: +33-1-69-15-70-08

Fax: +33-1-69-15-77-26

e-mail: mohammed.taouis@u-psud.fr

Word count: 3996 words

Number of tables and figures: 8

Abstract

Adiponectin, an insulin-sensitizing hormone, and resistin, known to promote insulin resistance, constitute a potential link between obesity and type2 diabetes. In addition, Fibroblast growth factor 21 (FGF21) has similar effects as adiponectin in regulating glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity. However, the interplay between adiponectin, FGF21 and resistin signaling pathways during the onset of insulin resistance is unknown. Here, we investigated whether central resistin promotes insulin resistance through the impairment of adiponectin and FGF21 signaling.

We showed that chronic ICV resistin infusion down-regulated both hypothalamic and hepatic APPL1, a key protein in adiponectin signaling, associated with decreased Akt/APPL1 interaction and an increased Akt association with its endogenous inhibitor TRB3. Resistin treatment also decreased plasma adiponectin levels and reduced both hypothalamic and peripheral expression of adiponectin receptors. Additionally, we reported that ICV resistin increased plasma FGF21 levels and down-regulated its receptor components in the hypothalamus and peripheral tissues promoting FGF21 resistance. Interestingly we also showed that resistin effects were abolished in TLR4 knock out mice and in neuronal cells expressing TLR4 siRNAs. Our study reveals a novel mechanism of insulin resistance onset orchestrated by central resistin/TLR4 pathway that impairs adiponectin signaling and promotes FGF21 resistance.

INTRODUCTION

Obesity is closely linked to several metabolic disorders including insulin resistance and type 2 diabetes (T2D) (1-6). However, the mechanisms underlying obesity associated insulin resistance are not fully understood. Recently, an emerging hypothesis suggests that the alteration of whole body insulin sensitivity could have a starting point in the brain and precisely in the hypothalamus (7). Indeed, chronic high-fat feeding promotes hypothalamic resistance to leptin and insulin through an inflammatory-dependent mechanism leading to impaired energy homeostasis, obesity and insulin resistance (4,7). Furthermore, compelling evidences indicate that changes in adipocyte-derived factors in obesity, dramatically affect insulin sensitivity (4-6). Among these adipokines, resistin is described as causal factor for obesity-induced insulin resistance and T2D. Indeed, the circulating levels of resistin are increased in obesity promoting both inflammation and insulin resistance (8,10-12). In addition, serum resistin has been positively correlated to resistin cerebrospinal fluid (CSF) levels, and increased CSF resistin concentrations have been associated to type 2 diabetes (13). Resistin is also expressed in the hypothalamus (14) and central resistin modulates food intake and glucose/lipid metabolism (15-19). Interestingly, we recently reported that central resistin, via hypothalamic Toll-like receptor (TLR)4, induces overall inflammation and impairment of insulin responsiveness in rat, bringing first evidences for the crucial role of hypothalamic Resistin/TLR4 pathway in the onset of whole body insulin resistance and inflammation (20). Besides resistin, adiponectin has received a special focus because of its insulin-sensitizing, and anti-inflammatory properties (21,22,24). In obesity, a decrease in plasma adiponectin is considered as an important risk factor for insulin resistance (24). Conversely, exogenous adiponectin alleviates chronic inflammation, glucose intolerance and insulin resistance in obese and diabetic rodents (24,25,26). Adiponectin exerts its effects through two adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2 (24,27). Adiponectin also activates LKB1 (Liver kinase B1)

/ AMPK (AMP-activated Protein Kinase) signaling pathways promoting then insulin sensitivity (23,27). Furthermore, the adaptor protein containing pleckstrin homology domain, and leucine zipper motif 1 (APPL1) has been implicated in the insulin-sensitizing effect of adiponectin (27,28). APPL1 is also involved in the insulin-mediated Akt signaling suggesting a crosstalk between adiponectin and insulin signaling at the level of Akt pathway (27). Recent studies reported that adiponectin is crucially involved in hypothalamic control of energy homeostasis (29,30). Additionally, central adiponectin improves glucose tolerance and reverses hypothalamic inflammation and insulin resistance in obese mice (31). These data demonstrate that the insulin-sensitizing properties of adiponectin are at least partially related to a neuroendocrine mechanism that involves central action of adiponectin.

Fibroblast growth factor 21 (FGF21), a metabolic hormone predominantly produced by liver, has many functional similarities with adiponectin in regulating glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity (34-37). FGF21 acts through a cell-surface receptor composed of a canonical FGF receptor (FGFR) associated to a co-receptor β -Klotho (KLB) (36-38). Pharmacologic FGF21 treatment counteracts obesity and its related metabolic disorders including dyslipidemia, glucose intolerance and insulin resistance (39). In withe adipose tissue (WAT), a main target of FGF21 actions, FGF21 stimulates glucoses uptake, modulates lipolysis and enhances adiponectin expression and secretion (34-37,39,40). FGF21 also acts directly in the hypothalamus to modulate energy balance, and insulin sensitivity (41,42). Recent studies reported that serum FGF21 levels are elevated in obese rodents and humans (43-45). In obese mice, the expression levels of FGFRs were also markedly down-regulated. This blunts the metabolic effects of FGF21 promoting then an obesity-associated FGF21 resistance state (43,44).

Thus, obesity is associated with adiponectin and FGF21 resistances, leading to the impairment of insulin sensitivity. However, the mechanisms linking obesity to adiponectin/FGF21

signaling impairment are not yet elucidated. Based on our previous work demonstrating that central resistin overexposure induces striking alterations of whole body insulin sensitivity, we hypothesized that resistin could be the missing link. Therefore, we investigated whether central resistin promotes insulin resistance through the impairment of adiponectin and FGF21 signaling. We show that chronic ICV resistin infusion down-regulated both hypothalamic and hepatic APPL1 expression associated with decreased Akt/APPL1 interaction and an increased Akt association with its inhibitor TRB3. Resistin treatment also reduced AdipoR1/R2 expression in the hypothalamus and peripheral tissues. Interestingly, we report that central resistin, via TLR4, impairs FGF21 signaling through the downregulation of hypothalamic expression FGF21 and both hypothalamic and peripheral expression of its receptors promoting FGF21 resistance.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals

Adult male Wistar rats, C57BL6/J mice (Janvier Labs) and TLR4 knockout mice with the same genetic background (TAAM-UPS44 CNRS, France) were housed individually in temperature-controlled environment with a 12-h light 12-h dark cycle and unrestricted access to water and standard diet (SAFE, France). All experimental procedures were performed according to the institutional guidelines of laboratory animal care and approved by the governmental commission of animal research.

Chronic intracerebroventricular (ICV) infusion of resistin

Osmotic mini-pumps (Alzet, models 2002 for rats and 1003D for mice) were implanted under ketamine (150mg/kg) / xylazine (5mg/kg) anesthesia. Brain infusion cannulas were stereotaxically placed into the right lateral brain ventricle using the following coordinates: 0.8 mm anterior to bregma, 1.5 mm lateral to the midline and 3.5 mm dorso-ventral for rats, and 0.58 mm anterior to bregma, 1 mm lateral, and 2 mm dorso-ventral for mice. The rats were then infused with either vehicle or resistin (2 μ g/12 μ L/day; pumping rate 0.5 μ L/h) for 14 days. C57BL6/J and TLR4^{Ko} mice were infused for 3 days with either vehicle or resistin (2 μ g/6 μ L/day; pumping rate 0.2 μ L/h).

Measurement of blood glucose and plasma hormones levels

Blood glucose levels were measured immediately with a blood monitoring system (Accu-Chek, Roche). Plasma levels of resistin, insulin, leptin, adiponectin and FGF21 were quantified with ELISA immunoassays according to the manufacturer's instructions (Millipore).

Hormones and chemicals

Human resistin was a generous gift of Protein Laboratories Rehovot Ltd. (Rehovot, Israel). Cell-culture reagents were from Invitrogen. Insulin, and chemicals were from Sigma-Aldrich.

Immunobilon-FL transfer membranes were from Millipore. Fluorescent secondary antibodies were from Life Technologies.

Cell culture and stimulation

SH-SY5Y human neuroblastoma cells, and adult mouse hypothalamic (mHypo) cells were grown in DMEM, and RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, and 100µg/ml streptomycin in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Serum-starved cells were incubated for 16 hours in serum-free DMEM in presence or absence of resistin (200 ng/ml), insulin (100nM), and insulin (100nM) + adiponectin (250 ng/ml). Cells were then stimulated for 10 minutes with insulin (100nM), adiponectin (250ng/ml) or FGF21 (100nM) to evaluate the impact of chronic treatments on SH-SY5Y cell sensitivity to both insulin and adiponectin.

Western blot analysis

Protein lysates from mice and rats tissues and SH-SY5Y cells were analyzed by western-blot as previously described (20). Immunoblots were incubated with primary antibodies raised against p-Akt (serine⁴⁷³)/Akt, p-ERK1/2/ERK1/2, p-IRS-1 (serine³⁰⁷)/IRS-1, p-JNK/JNK, APPL1, TRB3, β-tubulin (Cell Signaling Technology); IR, AdipoR1/R2, APPL2, TLR4, PTP1B (Santa Cruz Biotechnology); overnight at 4°C. The blots were then incubated with the appropriated secondary antibodies, and quantified using the Carestream Molecular Imaging System 4000MM Pro.

Immunoprecipitation

Protein lysates of rat tissues were incubated with antibodies against Akt overnight at 4°C. The immune-complexes were precipitated after incubation with a protein A-/protein G-sepharose mix for 2h at 4°C, and subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-APPL1, anti-TRB3 and anti-Akt antibodies.

In vitro FGFR21 stimulation on liver membranes

The in vitro phosphorylation of FGFR1 receptor has been performed as previously described (25).

In vitro adiponectin stimulation on liver membranes

In vitro adiponectin-dependent activation of liver AdipoR2 was evaluated by analyzing the AdipoR2/APPL1 co-immunoprecipitation using crude liver membranes following adiponectin stimulation.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA from mice and rats tissues and SH-SY5Y cells was isolated using TRIzol reagent. 1 µg of RNA was reverse transcribed and the cDNAs were submitted to Quantitative real-time PCR analysis using SYBR Green QPCR system (APPLIED) with specific primers (Table S1). A ratio of target mRNA/18S amplification was calculated.

siRNA silencing.

A pool of specific siRNA duplexes targeting human TLR4 and APPL1 genes and control siRNA were purchased from Ambion. Transfection of siRNAs was performed using lipofectamine 2000 transfection reagent (invitrogen). Down-regulation of APPL1 and TLR4 protein synthesis was monitored by western-blot.

Data analysis and statistics.

Data are shown as means $\pm$ SEM. Student's t-test was applied for comparisons between two groups, whereas ANOVA test was used to compare three or more sets of data, followed by Fisher post hoc test (Statview Software program). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Adiponectin improves insulin signaling in human neuronal SH-SY5Y cells and mhypo cells.

We examined the impact of adiponectin on the insulin-dependent phosphorylation of Akt and ERK1/2. We showed that acute incubation with insulin or adiponectin significantly increased both Akt and ERK1/2 phosphorylation in SH-SY5Y and mHypo cells (Figure1A and 1D). A notable synergistic effect of insulin and adiponectin was observed on Akt phosphorylation but not ERK1/2 phosphorylation (Figure1A and 1D). Cell overexposure to insulin reduced acute insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation, though the latter was affected to lesser degree (Figure1B and D). When cells were overexposed to both insulin and adiponectin the insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation were completely restored (Figure1C and D). Next we investigated the mechanisms underlying adiponectin protective effect against insulin resistance. We showed that adiponectin significantly attenuated the insulin-dependent down-regulation of insulin receptor (IR) at both mRNA and protein levels (Figure2A). Additionally, chronic exposure of SH-SY5Y cells to insulin significantly increased the serine³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1 (Figure2B), c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation (Figure2C) and PTP-1B expression (Figure2D), whereas the concomitant overexposure of cells to insulin and adiponectin markedly reduced JNK and IRS1^{ser307} phosphorylation, and PTP-1B expression to levels comparable to control cells (Figure2B, C and D).

APPL1 mediates the insulin-sensitizing effect of adiponectin in SH-SY5Y cells.

To assess the potential role of APPL1 in the insulin-sensitizing effect of adiponectin, we generated APPL1-depleted SH-SY5Y cells by siRNA-mediated knockdown (Figure3A). Cells were pre-treated with insulin or insulin+adiponectin prior to insulin or adiponectin stimulation in the absence or presence of APPL1siRNA (Figure3B). In control cells, both insulin and

adiponectin induced Akt phosphorylation (Figure3B). Insulin pretreatment reduced Akt phosphorylation in response to insulin and adiponectin. However, the insulin- and adiponectin-dependent phosphorylation of Akt was almost completely restored when cells were pretreated with both hormones, an effect that was completely abolished in APPL1-suppressed cells (Figure 3B).

To further evaluate the role of APPL1, we investigated its impact on IR expression and JNK and IRS-1 serine³⁰⁷ phosphorylation. We showed that APPL1 siRNA did not affect IRS1-serine³⁰⁷ and JNK phosphorylation, and IR expression (Figure3C). Insulin overexposure reduced IR expression and increased the phosphorylation of JNK and IRS-1^{ser307} (Figure3C). Insulin pretreatment effects were significantly reduced by simultaneous adiponectin pretreatment or in cells expressing APPL1-siRNA. (Figure3C).

Resistin negatively regulates adiponectin signaling through the down regulation of APPL1 and AdipoR1 in SH-SY5Y and mHypo cells.

To test the hypothesis whether the promoting effects of resistin on insulin resistance are mediated by the alteration of adiponectin action, we investigated the crosstalk between resistin and adiponectin signaling. For this purpose, the effect of chronic exposure to resistin on adiponectin signaling was studied in SH-SY5Y and mHypo cells. In non-pretreated cells, adiponectin increased Akt and ERK1/2 phosphorylations (Figure4A and 4B). Pretreatment with resistin, abolished adiponectin-dependent phosphorylation of Akt and increased the basal phosphorylation of ERK1/2. Resistin treatment also downregulated APPL1 and AdipoR1 expression, whereas APPL2 and AdipoR2 expression were not affected (Figure4C and 4D). Furthermore, we showed that TLR4-knock-down (Figure4D) abrogated the resistin-dependent downregulation of AdipoR1 and APPL1 (Figure4E and 4F) and restored both insulin- and adiponectin-dependent Akt phosphorylation (Figure4G and 4H).

Central resistin infusion promotes the down regulation of APPL-1 and AdipoR1/2 in rats and mice.

Next we examined whether resistin could affect APPL1, AdipoR1 and AdipoR2 expression. We showed that Wistar rats chronically (14days) infused by ICV resistin exhibited lower hypothalamic expression of APPL1, AdipoR1 and AdipoR2, whereas APPL2 levels remained unchanged (Figure5A). The protein levels of APPL-1 were also reduced in the liver but not in the muscle and WAT of resistin-treated rats (Figure5B). Resistin treatment also reduced AdipoR1/R2 expression in liver, muscle and WAT (Figure5B).

The effect of ICV resistin infusion for 3 days was also tested in wild type and TLR4-KO mice. ICV resistin reduced hypothalamic expression of APPL1, AdipoR1/R2 in wild type but not in TLR4-KO mice (Figure5C and 5E). In both strains APPL2 remained unchanged. In peripheral tissues APPL1/2 and AdipoR1/2 remained unchanged in resistin-treated mice (Figure5D).

Central resistin infusion impairs the interaction between Akt and its binding partners APPL1 and TRB3, and AdipoR2/APPL1 association.

We investigated whether ICV resistin infusion affected Akt/APPL1/TRB3 interplay in the hypothalamus and liver of rats. In the hypothalamus, we revealed the association of Akt with both APPL1 and TRB3 under the basal condition (Figure6A). In resistin-treated rats, Akt/APPL1 association was reduced, while Akt/TRB3 interaction was enhanced (Figure6A). Furthermore, in control rats, insulin treatment increased Akt/APPL1 co-immunoprecipitation and reduced Akt/TRB3 interaction (Figure6A). Conversely, in resistin-treated rats, the effect of insulin was abolished (Figure6A). In the liver, ICV resistin abolished the insulin-dependent association of Akt with APPL1 and increased Akt/TRB3 co-immunoprecipitation (Figure 6B). Next we investigated the impact of ICV resistin infusion on adiponectin-dependent association of AdipoR2 with APPL1 in rat liver membranes. We showed that resistin treatment reduced the co-immunoprecipitation of AdipoR2 and APPL1 in response to adiponectin stimulation (Figure 6C).

Central resistin infusion alters FGF21, FGFRs and KLB expressions in the hypothalamus and peripheral tissues.

Next, we investigated whether central resistin/TLR4 pathways could contribute to FGF21 resistance. Thus, we assessed in mice and rats the impact of ICV resistin infusion on FGF21, FGFRs and KLB expression in the hypothalamus and peripheral tissues. We showed that resistin decreased hypothalamic FGF21 expression in rats and mice. Hypothalamic expression of FGFR1/KLB was also significantly reduced by resistin treatment (Figure 7A and 7B). In mice, ICV resistin also decreased hypothalamic expression of FGFR2 and FGFR3 (Figure 7B). Similarly, in SH-SY5Y cells, resistin overexposure reduced the expression levels of FGFR1, FGFR2 and KLB (Figure 7K).

In peripheral tissues, ICV resistin infusion increased the expression levels of FGF21 in rat liver and WAT but not in muscle (Figure 7D). In addition, FGFR1 was down regulated in both WAT and muscle but not in liver (Figure 7D). The expression levels of KLB and FGFR4 were attenuated in the WAT of resistin-treated rats, but not in muscle and liver (Figure 7D). Interestingly, ICV resistin reduced WAT adiponectin expression (Figure 7E) and plasma adiponectin levels (Figure 7F). In contrast, the circulating levels of FGF21 and glucose were increased in resistin-treated rats (Figure 7G and 7J). Whereas plasma insulin and resistin levels were not affected (Figure 7H and 7I). In mice ICV resistin increased plasma levels of FGF21 without changes in the circulating levels of insulin and resistin, and in peripheral expression of both FGFRs and KLB (Figure S1).

Next we examined the role of TLR4 in resistin-dependent regulation of FGF21, FGFRs and KLB gene expressions. TLR4 repression in SH-SY5Y cells abrogated resistin effect on FGFR2 and KLB expression (Figure 7K). In addition, the resistin effect on FGFR1 expression was attenuated in TLR4-suppressed cells (Figure 7K). The resistin-dependent down-regulation of FGF21, FGFR1 and KLB was abolished in the hypothalamus of TLR4-KO mice

(Figure7C). We had also shown that resistin overexposure reduced FGF21-dependent phosphorylation of FGFR1 and ERK1/2 in SH-SY5Y (figure7L) and mHypo cells (figure7M). This was associated with a significant decrease of protein expression of FGFR1 (figure7L and 7M). Additionally, Rat chronic ICV resistin infusion significantly reduced FGF21-dependent phosphorylation of FGFR1 in vitro in liver crude membranes (figure7N).

DISCUSSION

Resistin is a critical factor in obesity-mediated insulin resistance. The molecular mechanisms mediating its effects are not fully characterized particularly at the neuronal level. This study reveals novel mechanisms by which central resistin induces whole body insulin resistance, through the impairment of adiponectin signaling and by promoting FGF21 resistance. We show that chronic ICV resistin infusion down-regulated hypothalamic and hepatic APPL1 expression reducing then Akt/APPL1 interaction and favouring Akt association with its inhibitor TRB3. Resistin treatment also reduced hypothalamic and peripheral expression of AdipoR1/R2. Importantly, we report that central resistin, via TLR4, promoted FGF21 resistance through the downregulation of FGF21 hypothalamic expression and both hypothalamic and peripheral expression of its receptor components.

Adiponectin increased insulin sensitivity in peripheral tissues (21,22,24). At the central level the insulin-sensitizing effect of adiponectin remained poorly documented. To investigate whether adiponectin regulates neuronal insulin signaling, we examined, in SH-SY5Y and mHypo cells the impact of adiponectin on Akt and ERK1/2. First, we showed that adiponectin significantly increased Akt and ERK1/2 phosphorylation. We reported a synergistic effect of adiponectin and insulin regarding Akt phosphorylation suggesting a crosstalk between these two hormones. This is in good agreement with recent studies showing that adiponectin and insulin signaling cascades converge on Akt through the adapter protein APPL1, known to regulate both insulin- and adiponectin-dependent Akt activation (27). Furthermore, we showed that the overexposure of cells to insulin impaired Akt and ERK1/2 phosphorylation in response to insulin. Interestingly, when cells were overexposed to insulin and adiponectin, the insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation were totally restored. This agreed with previous studies demonstrating an adiponectin-dependent improvement of both hypothalamic and peripheral insulin sensitivity (27,31). Importantly, the insulin-sensitizing effects of

adiponectin were abolished in APPL1-suppressed SH-SY5Y cells bringing the first evidence for the critical role of APPL1 in neuronal adiponectin/insulin crosstalk and in mediating the insulin-sensitizing effect of adiponectin. We investigated the mechanisms underlying adiponectin effect on insulin signaling. Previous studies reported that hyperinsulinemia-induced downregulation of IR is considered as an important mechanism promoting insulin resistance (46,47). Consistent with these studies, we showed that insulin overexposure markedly reduced IR expression in SH-SY5Y cells. When cells were overexposed to both insulin and adiponectin the insulin-dependent downregulation of IR was fully reversed. Adiponectin pretreatment also abolished the insulin-dependent up-regulation of PTP-1B, known as a promoter of insulin resistance (48). Interestingly, adiponectin treatment decreased insulin-dependent phosphorylation of JNK and IRS1-serine³⁰⁷ phosphorylation known to impair insulin signaling (49,50). Our findings demonstrate that in insulin resistance state, adiponectin improved neuronal insulin responsiveness by restoring insulin receptor expression, suppressing PTP-1B expression and inhibiting both JNK and IRS-1^{ser307} phosphorylations.

Obesity is associated with hypoadiponectinemia, considered as an important risk factor for insulin resistance (24). In contrast, plasma levels of resistin are increased in obese insulin-resistant rodents and humans (8,10,11). Unequivocal, several evidences causally links resistin to insulin resistance (8,10,11,19,20). The underlying mechanisms remain poorly characterized particularly at the neuronal level. Therefore, we assessed whether resistin could indirectly promote insulin resistance through the impairment of neuronal adiponectin signaling. We show that resistin overexposure dramatically reduced the adiponectin-dependent phosphorylation of Akt and ERK1/2 in SH-SY5Y and mHypo cells. This could be attributed to the resistin-dependent downregulation of AdipoR1. We brought the first evidence for a resistin-dependent downregulation of APPL1. To assess whether resistin action on

adiponectin signaling is mediated by TLR4, we investigated the impact of resistin overexposure on adiponectin signaling in TLR4-depleted SH-SY5Y and mHypo cells. Consistent with our recent report demonstrating that resistin, through hypothalamic TLR4, impaired hypothalamic insulin signaling (20), we showed that silencing TLR4 abrogated the resistin-dependent downregulation of AdipoR1 and APPL1, and restored insulin- and adiponectin-dependent Akt phosphorylation. This reveals a new signaling pathway through which resistin promotes insulin resistance by inducing a TLR4-dependent impairment of adiponectin signaling in neurons.

We next validated resistin/adiponectin crosstalk *in vivo* by evaluating the impact of ICV resistin infusion on the hypothalamic and peripheral expression of APPL1 and adiponectin receptors. We showed that chronic ICV resistin infusion reduced the expression levels of AdipoR1/R2 in the hypothalamus, liver, muscle and WAT of rats. Importantly, resistin treatment induced a marked downregulation of APPL1 in the hypothalamus and liver. We have also shown that ICV resistin reduced liver adiponectin responsiveness of rats as evidenced by the impairment of AdipoR1/APPL1 interaction. Similarly, we reported in mice, that ICV resistin infusion for 3 days reduced the expression levels of AdipoR1/2 and APPL1 in the hypothalamus but not in peripheral tissues. The apparent discrepancy of results between mice and rats may be explained by genotype disparities as well as by the differences on the duration of resistin treatment. Furthermore, we demonstrated in TLR4-KO mice, that ICV resistin infusion did not impair APPL1 and AdipoR1/R2 hypothalamic expression, suggesting a critical role of TLR4 in mediating resistin effects on adiponectin signaling *in vivo*. These results suggest that central resistin/TLR4 could promote adiponectin resistance through the downregulation of AdipoR1/R2 and APPL1 at both hypothalamic and peripheral levels leading to the impairment of adiponectin signalling and the abrogation of the insulin-sensitizing effects of adiponectin at least in the liver. Our results bring new mechanistic

explanation of previous findings highlighting that altered expression of APPL1 and adiponectin receptors in obesity reduced adiponectin sensitivity leading to insulin resistance and T2D (23,24,27).

APPL1 is an important player in the insulin-mediated Akt signaling. APPL-1 interacts with Akt and blocks Akt association with its inhibitor TRB3, promoting then Akt activation (27). Based on these observations, we investigated whether ICV resistin infusion could impair AKT/APPL1/TRB3 interplay. Interestingly, co-immunoprecipitation analysis showed that under basal conditions, ICV resistin reduced APPL1/Akt interaction and enhanced Akt/TRB3 association. Importantly, the insulin-dependent association of APPL1 with Akt was abolished, whereas the AKT/TRB3 interaction was enhanced in resistin treated animals. These findings highlight a novel mechanism of central resistin action toward insulin-dependent Akt phosphorylation through the blockade of Akt/APPL1 interaction and the promotion of Akt/TRB3 association.

Another major finding of the present study is the characterization of the underlying mechanisms that resistin most-likely induced insulin-resistance through the induction of FGF21 resistance in the hypothalamus and peripheral tissues. Indeed, FGF21 has several beneficial effects on insulin sensitivity and glucose/lipid metabolism (33-37). Subsequent studies reported that serum FGF21 levels are elevated in obese rodents and humans (43-45). Additionally, the expression levels of FGF21 receptors were down-regulated in the liver and WAT of obese mice leading to metabolic defects of FGF21 suggesting an obesity-associated FGF21 resistance (43,44). However, the mechanisms whereby obesity induces FGF21 resistance remained unknown. Consistent with these observations, we investigated the impact of chronic ICV resistin on the expression levels of FGF21 and its receptor components in the hypothalamus and peripheral tissues. Importantly, we found that ICV resistin infusion significantly decreased the expression levels of FGF21, FGFR1 and KLB in the hypothalamus

of mice and rats. Similarly, resistin-treated SH-SY5Y and mHypo cells showed a marked diminution of FGFR1 and KLB expressions associated with a significant inhibition of FGFR1 phosphorylation suggesting a direct effect of resistin on the modulation of FGFR expression and activity at the neuronal level. Recently, it has been shown that FGF21 acts directly in the hypothalamus to modulate energy balance, and insulin sensitivity (41,42). Additionally, mice lacking *KLB* gene are refractory to the insulin-sensitizing effects of FGF21 (42). In line with these reports, we showed that ICV resistin infusion reduced the expression of FGF21 and its receptor components FGFR1 and KLB in the hypothalamus of rats and mice that could contribute to the defect of hypothalamic FGF21 signaling. In peripheral tissues, ICV resistin increases FGF21 expression in the liver and WAT of rats, accompanied by increased circulating levels of FGF21. This was associated with a marked downregulation of FGFR1 expression in both muscle and WAT, and decreased KLB expression in WAT.

Next we examined the role of TLR4 in resistin-dependent regulation of FGF21 and FGFRs gene expressions. Interestingly, we found that the repression of TLR4 in SH-SY5Y cells almost completely abrogates resistin effects. Importantly, the resistin-dependent downregulation of FGF21, FGFR1 and KLB in the hypothalamus was abolished in TLR4-KO mice, suggesting a critical role of TLR4 in mediating resistin effects on FGF21 signaling cascade *in vivo*. Recently, it has been reported that FGF21 upregulates WAT adiponectin expression and secretion and that FGF21 critically depends on adiponectin to exert its insulin-sensitizing effect (40). Here, we showed that central resistin markedly decreased WAT adiponectin expression, thereby reducing serum adiponectin levels. This could contribute to the impairment of the insulin-sensitizing effects of adiponectin in resistin-treated rats.

Thus, we demonstrated that chronic ICV resistin treatment increased blood glucose and FGF21 levels, and decreased that of adiponectin. Insulin and resistin plasma levels remained

unchanged. Furthermore, resistin ICV treatment impaired adiponectin action and increased FGF21 plasma levels promoting then hyperglycemia.

In summary, our study bring new insights concerning the mechanisms involved in resistin-dependent insulin resistance and provide a novel mechanism by which central resistin/TLR4 pathway promotes whole body insulin resistance, through the impairment of adiponectin signaling and by promoting FGF21 resistance (Figure8).

Conflict of interest:

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Author contributions

Y.B., and M.T., designed and supervised experiments; Y.B., performed most experiments; M.T., H.A., S.A.R., D.C., and L.R., contributed to research data; Y.B. and M.T. performed data analysis; A.G., contributed to the manuscript revision and discussion and produced recombinant resistin; Y.B., and M.T., wrote the manuscript. M.T., is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

REFERENCES

1. Heindel J.J. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol. Sci.* 2003;76: 247–249
2. Heindel JJ. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod. Toxicol.* 2007;23:257–259
3. Calle EE and Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4 :579–591
4. Thaler JP, Schwartz MW. Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology.* 2010; 151:4109–4115
5. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106: 473–481
6. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1785–1788
7. Cai D, Liu T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1243 :E1–39
8. Savage DB et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* 2001; 50:2199–2202
9. Patel L et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 300:472–476
10. Steppan CM et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; 409:307–312
11. Silha JV et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur. J. Endocrinol.* 2003;149:331–335.
12. Vendrell J et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes. Res.* 2004;12:962–971.
13. Berghoff M et al. Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. *European Journal of Clinical Investigation.* 2015; Oct 28. doi: 10.1111/eci.12558.
14. Wilkinson M et al. Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology.* 2005;81:19–30.
15. Brunetti L et al. Resistin, but not adiponectin, inhibits dopamine and norepinephrine release in the hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;493:41–44
16. Tovar S, et al. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:R1–R5
17. Muse ED, Lam TK, Scherer PE, Rossetti L. Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2007;117:1670–1678
18. Vázquez MJ et al. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology.* 2008;149:4534–43
19. Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS. Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. *J Neurosci.* 2007;27:12924–12932
20. Benomar Y et al. Central Resistin Overexposure Induces Insulin Resistance Through Toll-like Receptor 4. *Diabetes.* 2013;62:102–14
21. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996;271: 10697–10703.
22. Kadowaki, T., and Yamauchi, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 2005;26:439–451
23. Kubota N et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 2007;6:55–68
24. Kadowaki T et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006;116:1784–92

25. Yamauchi T et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001;7:941-6
26. Berg AH et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001;7:947-53
27. Cheng KK, Lam KS, Wang B, Xu A. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28:3-13
28. Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E22-36
29. Coope A et al. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett.* 2008;582:1471-6
30. Qi Y et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med.* 2004;10:524-9
31. Koch CE et al. Central adiponectin acutely improves glucose tolerance in male mice. *Endocrinology.* 2014;155:1806-16
32. Yamauchi T et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8:1288-95
33. Kharitonov A et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 2005;115:1627-1635
34. Ding X et al. β Klotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism. *Cell Metab.* 2012;5;16:387-93
35. Véniant MM et al. FGF21 promotes metabolic homeostasis via white adipose and leptin in mice. *PLoS One.* 2012;7:e40164
36. Adams AC et al. The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Mol Metab.* 2012;28;2:31-7
37. Chen W et al. Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem.* 2011;286:34559-66
38. Kharitonov A et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol.* 2008;215:1-7
39. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KS. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78:489-96
40. Lin ZI et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab.* 2013;17:779-89
41. Bookout AL et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med.* 2013;19:1147-52
42. Sarruf DA et al. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes.* 2010;59:1817-24
43. Fisher FM et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes.* 2010;59:2781-9
44. Hale C et al. Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology.* 2012;153:69-80
45. Zhang X et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes.* 2008;57:1246-53
46. Benomar Y et al. Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem. J.* 2005;388:929-939
47. Flier JS. Insulin receptors and insulin resistance. *Ann. Rev. Med.* 1983;34:145-60.
48. Koren S, Fantus IG. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21:621-640.
49. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 2005;87:99-109.

50. Aguirre V et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). J Biol Chem. 2000;275:9047–9054.

Figure legends:

Figure1. Adiponectin improves insulin-dependent phosphorylation of Akt and ERK1/2 in human neuronal cells SH-SY5Y.

(A and D) SH-SY5Y and mHypocells were serum-starved overnight and treated for 10 minutes with or without insulin (100 nmol/L), adiponectin (250ng/ml) and insulin+adiponectin. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 were detected by western blot analysis with the specific antibodies indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. Bar graphs represent the ratios of P-Akt/Akt or P-ERK1/2 / ERK1/2. Serum-starved SH-SY5Y and mHypo cells were pretreated for 16 hours without (W/O preT) or with insulin (100 nmol/L, Ins preT) (B and D), or insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/ml) (Ins/Adp preT) (C and D) and then stimulated with insulin (100 nmol/L) for 10 minutes. Phosphorylated Akt and ERK1/2 and their protein levels in cell lysates were detected by western blot analysis with specific antibodies as indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. Bar graphs represent the ratios of P-Akt/Akt or P-ERK1/2/ERK1/2. All data are expressed as means $\pm$ SEM (n=3-6 /group). *P <0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with control.

Figure 2. Adiponectin improves insulin signaling in SH-SY5Y cells through the upregulation of IR, downregulation of PTP1B and inhibition of JNK activation and IRS-1^{ser307} phosphorylation.

SH-SY5Y cells were serum-starved overnight and treated for 16 hours with or without (W/O preT) insulin (Ins preT, 100 nmol/L), or insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/ml) (Ins/Adpn preT). Expression levels of IR were evaluated by western blot (A) and SYBR Green real-time RT-PCR (B). The phosphorylation of IRS-1^{ser307} (C), JNK (D) and the protein expression of PTP1B (E) were detected by western blot analysis using specific antibodies as indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. All data are expressed as means $\pm$ SEM (n=3-6 /group). p values were calculated using the Student's t test (**p < 0.01, ***p < 0.001).

Figure 3. APPL1 mediates the insulin-sensitizing effect of adiponectin in human neuronal cells SH-SY5Y.

SH-SY5Y cells were treated with control siRNA or specific siRNA duplexes targeting APPL1. The protein lysates were then subjected to Western blot analysis. (A) Immunoblot analysis of APPL1 content in control and small interfering APPL1-treated cells. The results are expressed as the ratio of APPL1/ β -tubulin. (B) Immunoblot analysis of the phosphorylation of AKT by insulin (100 nmol/L for 10 min) and adiponectin (250 ng/ml for 10 min) in control and APPL1-suppressed SH-SY5Y, treated for 16 hours with or without insulin (100nmol/L, Ins preT) or insulin (100nmol/L) + adiponectin (250ng/ml) (Ins/Adpn preT). C: Immunoblot analysis of the protein expression of IR and the phosphorylation of JNK, and IRS-1^{ser307} in control and APPL1-suppressed SH-SY5Y cells treated for 16 hours with or without (W/O preT) insulin (100nmol/L, Ins preT) or insulin (100nmol/L) + adiponectin (250ng/ml) (Ins/Adpn preT). Bar graphs represent the ratios of IR/ β -tubulin, P-JNK (P-JNK54/46)/ total JNK and p-IRS-1^{ser307}/ total IRS-1. All results are means $\pm$ SEM (n = 3–6/group). ***P < 0.001 compared with control cells. a,b,c denote significant differences by ANOVA and Fisher post hoc test at P < 0.05.

Figure 4. Resistin negatively regulates adiponectin signaling through the down regulation of both APPL1 and AdipoR1 in SH-SY5Y and mHypo cells.

SH-SY5Y and mHypo cells were serum-starved overnight and treated for 16 hours with or without (W/O preT) resistin (200 ng/ml). (A and B) Control and resistin treated cells were stimulated for 10 min with or without adiponectin (250 ng/ml). Phosphorylation of Akt and ERK1/2 were detected by western blot analysis with the specific antibodies indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. Bar graphs represent the ratios of P-Akt/Akt or P-ERK1/2 / ERK1/2. (C and E) Immunoblot analysis of the protein expression of APPL1, APPL2, AdipoR1 and AdipoR2 in control and resistin treated cells. Results are expressed as ratio of APPL1/ β -tubulin, APPL2/ β -tubulin, AdipoR1/ β -actin and AdipoR2/ β -actin. (D) mRNA levels of APPL1, APPL2, AdipoR1 and AdipoR2 in control and resistin treated SH-SY5Y (200 ng/mL, for 16h). Results were normalized to 18S RNA. SH-SY5Y cells were treated with control siRNA or specific siRNA duplexes targeting TLR4 and then stimulated for 16 hours with or without resistin (200 ng/ml, Res preT). Expression levels of AdipoR1, AdipoR2, APPL1 and TLR4 were evaluated by western blot (F) and SYBR Green real-time RT-PCR (G) in control and TLR4 suppressed SH-SY5Y cells. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 in response to acute (10 minutes) stimulation with insulin or adiponectin were detected by western blot analysis in control and resistin treated SH-SY5Y (H) and mHypo (I) cells using specific antibodies as indicated. All results are means $\pm$ SEM (n = 3–6/group). **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with control cells without any pretreatment (W/O preT).

Figure 5. Central resistin infusion promotes the down regulation of APPL-1 and AdipoR1/2 in rats and mice.

Male Wistar rats received an ICV of vehicle or resistin (2 μ g/12 μ L/day; pumping rate 0.5 μ L/h) during a period of 2 weeks. At the end of the infusion period, the expression levels of APPL1, APPL2 AdipoR1 and AdipoR2 were evaluated by western blot and SYBR Green real-time RT-PCR in the hypothalamus (A) and peripheral insulin-sensitive tissues (B). (C-E) Male WT C57BL/6J mice or TLR4 knockout mice with the same genetic background were ICV injected with vehicle or resistin (2 μ g/6 μ L/day; pumping rate 0.25 μ L/h) during a period of 3 days. At the end of the infusion period, mRNA expression of APPL1, APPL2, AdipoR1 and AdipoR2 were evaluated by SYBR Green real-time RT-PCR in the hypothalamus (C) and peripheral insulin-sensitive tissues (D) of WT mice and in the hypothalamus of TLR KO mice (E). All data are expressed as means $\pm$ SEM (n=3-6 /group). p values were calculated using the Student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with vehicle.

Figure 6. Central resistin infusion impairs the interaction between Akt and its binding partners APPL1 and TRB3, and AdipoR2/APPL1 association.

Male Wistar rats were treated intracerebroventricularly with or without resistin (2 μ g/12 μ L/day; pumping rate 0.5 μ L/h) for 14 days. At the end of the infusion period, vehicle and resistin-treated rats received IP human insulin (1 U/kg of body weight) or saline bolus 30 min before euthanasia. Protein lysates from hypothalamus and liver were subjected to immunoprecipitation/immunoblot (IP/IB) analysis to detect the interaction between Akt, APPL1 and TRB3 in the hypothalamus (A) and liver (B) using specific antibodies as indicated. (C) Is a representative immunoblot of APPL1 and AdipoR2 co-immunoprecipitation in rat liver crude membranes.

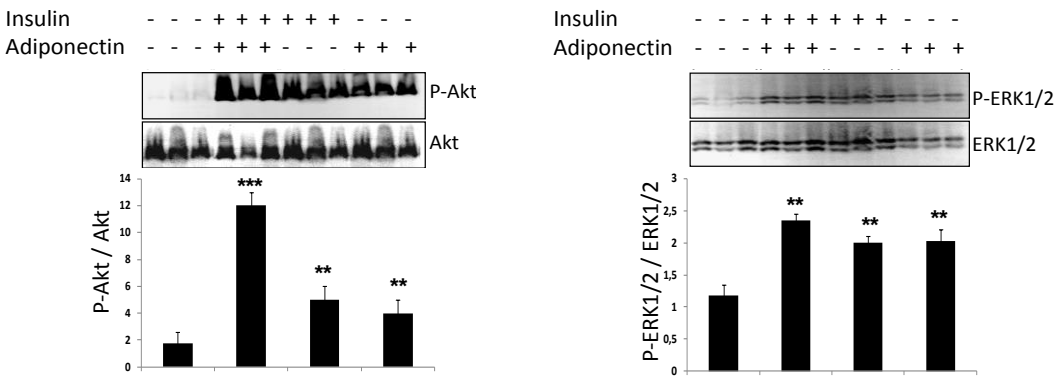
Figure 7. Effect of chronic resistin treatment on FGF21, FGFRs, β Klotho and adiponectin expressions.

Male Wistar rats received an ICV of vehicle or resistin (2 μ g/12 μ L/day; pumping rate 0.5 μ L/h) during a period of 2 weeks. Male WT C57BL/6J mice or TLR4 knockout mice with the same genetic background were ICV injected with vehicle or resistin (2 μ g/6 μ L/day; pumping rate 0.25 μ L/h) during a period of 3 days. Serum-deprived SH-SY5Y and mHypo cells were treated for 16 hours with or without resistin (200 ng/ml). At the end of the treatment period, relative mRNA expression levels of FGF21, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 and β Klotho were evaluated by SYBR Green real-time RT-PCR in the hypothalamus of rats (A), wild type mice (B) and TLR4 KO mice (C) and in peripheral insulin-sensitive tissues of rats (D). mRNA levels of adiponectin in WAT (E) and plasma levels of adiponectin (F) and FGF21 (G), insulin (H), resistin (I) and glucose (J) in vehicle and resistin treated rats. mRNA expression of FGF21, FGFRs and β Klotho in control and TLR4-suppressed SH-SY5Y cells (K). Representative immunoblot analysis of FGF21-dependent phosphorylation of FGFR1 and ERK1/2 in SH-SY5Y (L) and mHypo (M) cells treated with or without resistin for 16h. (N) FGFR1 phosphorylation on liver crude membranes from vehicle and resistin treated rats. All data are expressed as means $\pm$ SEM (n=3-6 /group). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 compared with vehicle-treated animals or control SH-SY5Y cells.

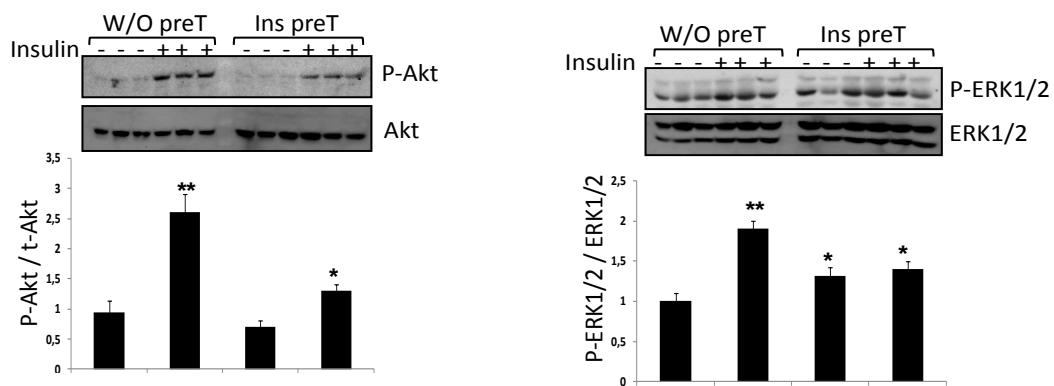
Figure 8. Schematic illustration of resistin/TLR4-dependent impairment of adiponectin and FGF21 signaling in the hypothalamus and peripheral insulin-sensitive tissues.

Figure 1.

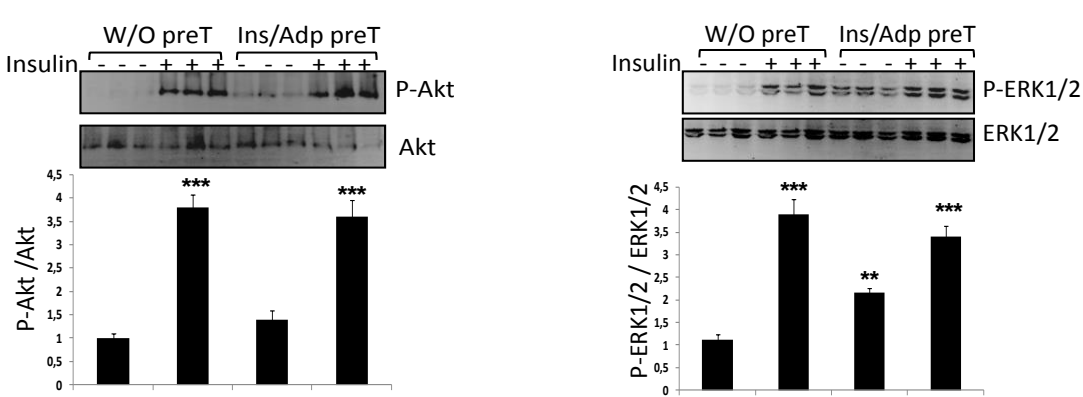
A. SH-SY5Y cells



B. SH-SY5Y cells



C. SH-SY5Y cells



D. Mouse hypothalamic cells

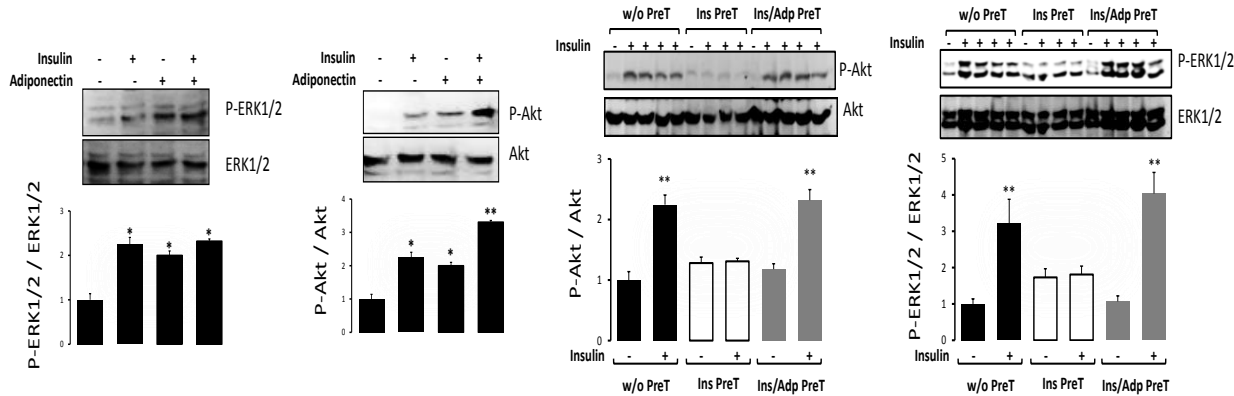
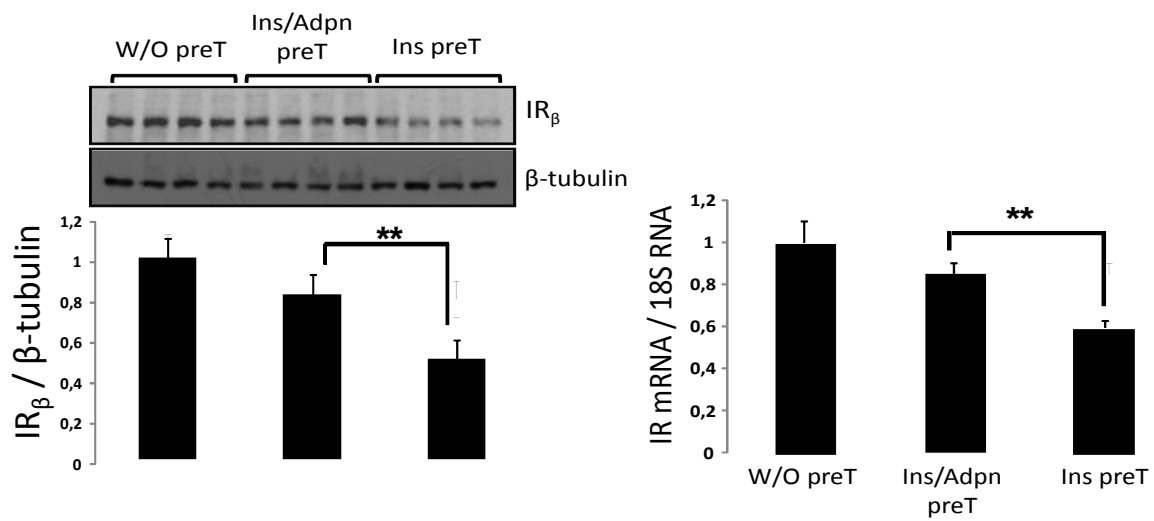
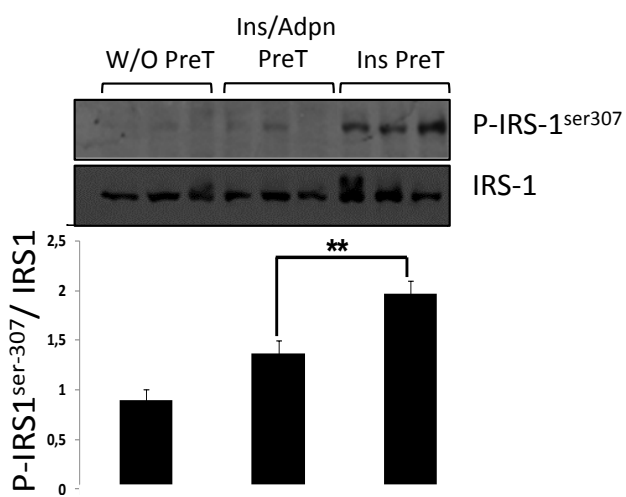


Figure 2.

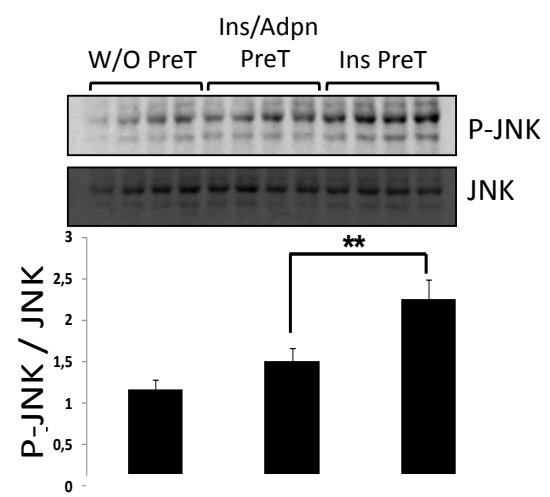
A.



B.



C.



D.

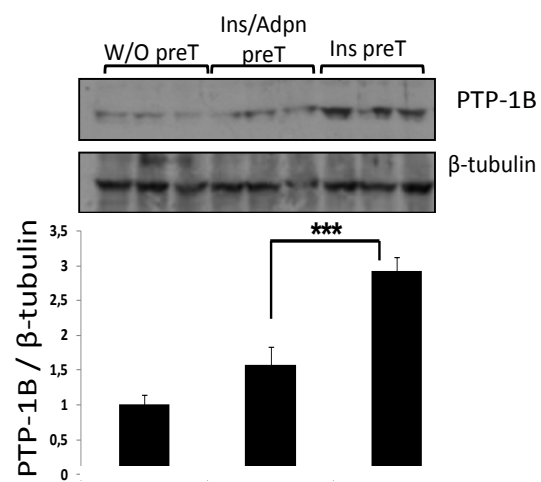
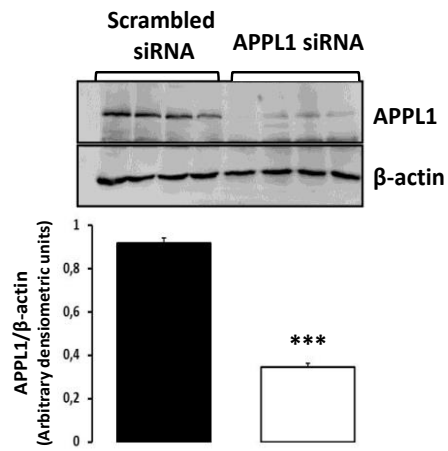
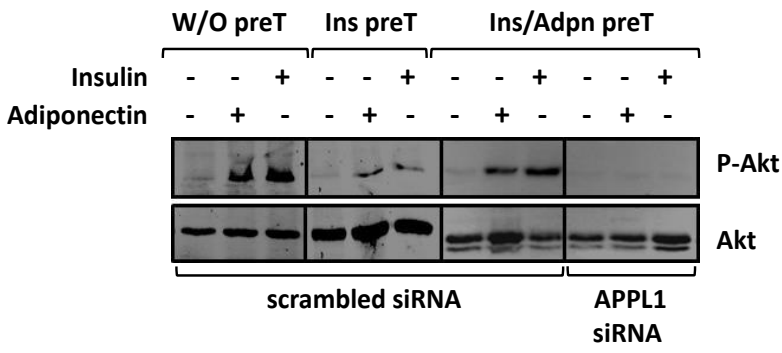


Figure3.

A.



B.



C.

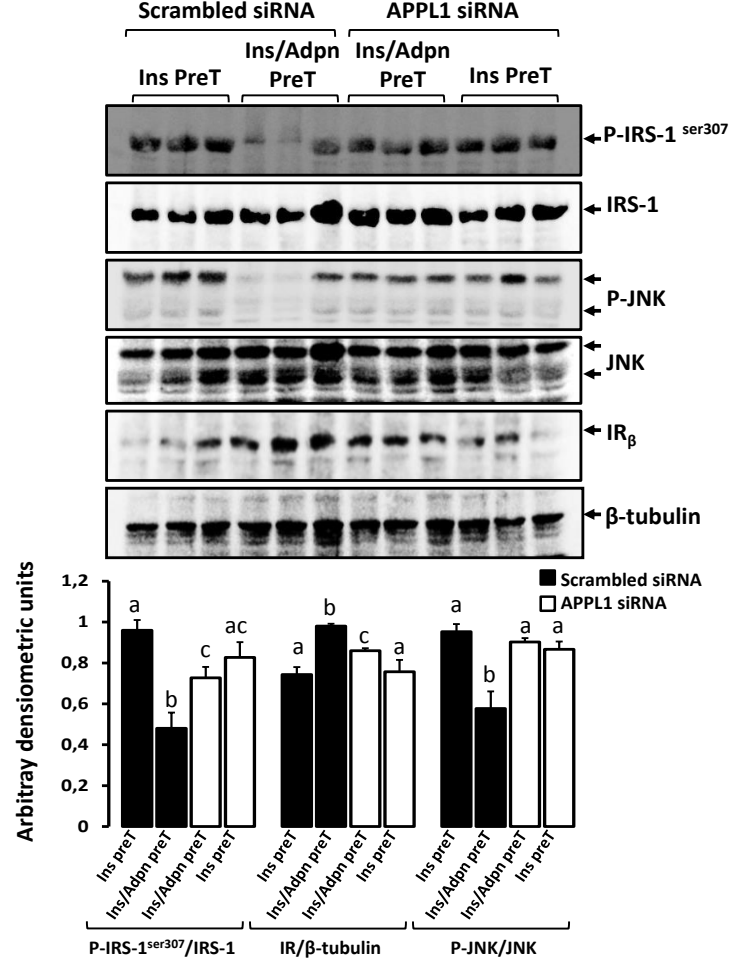
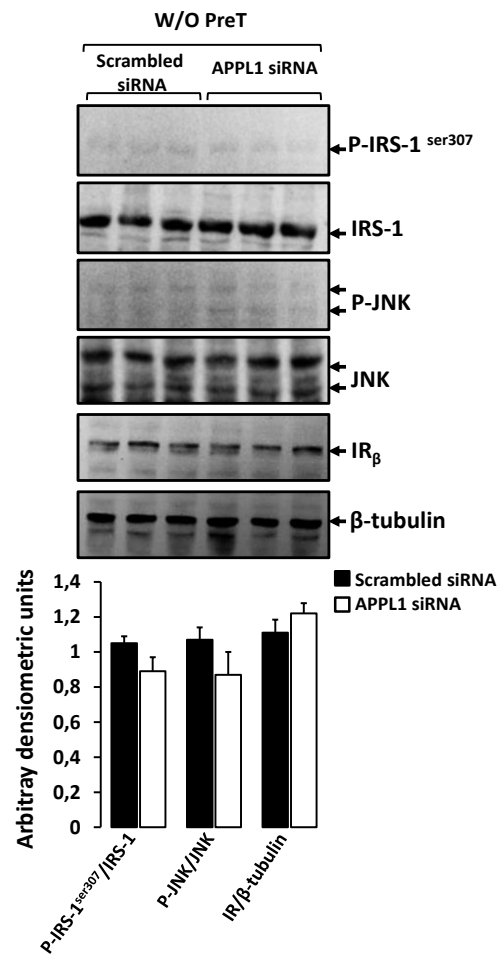


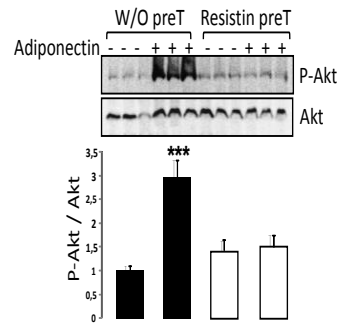
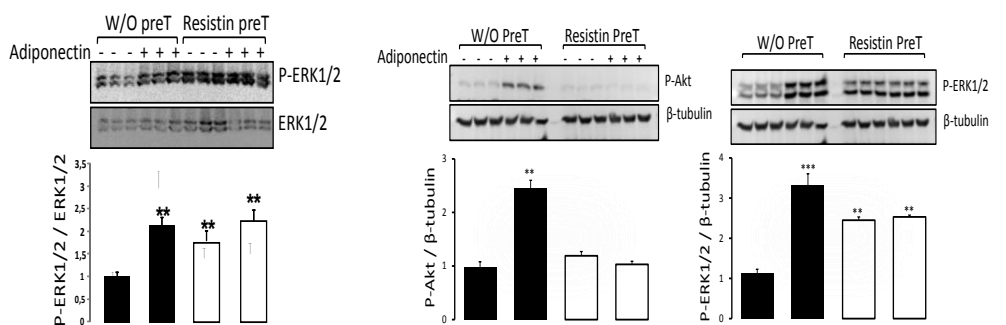
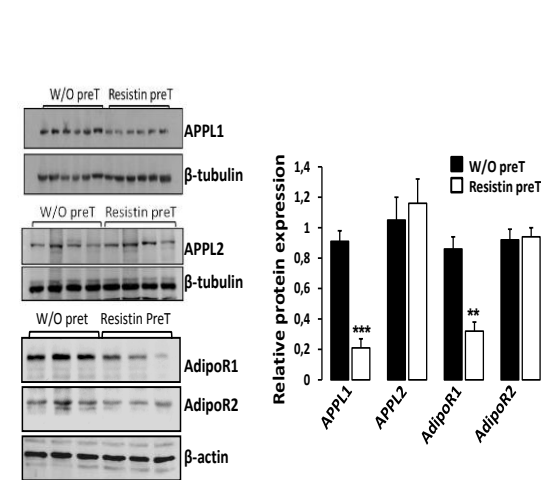
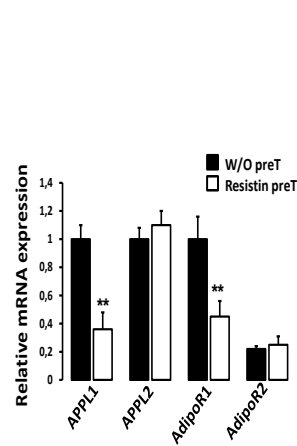
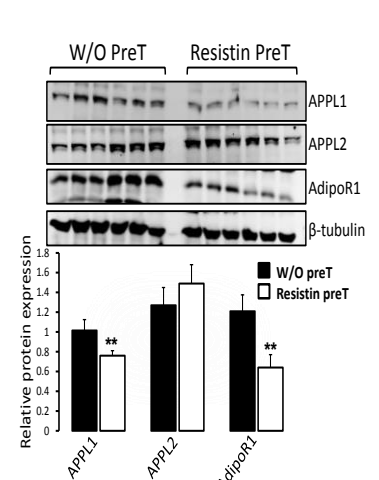
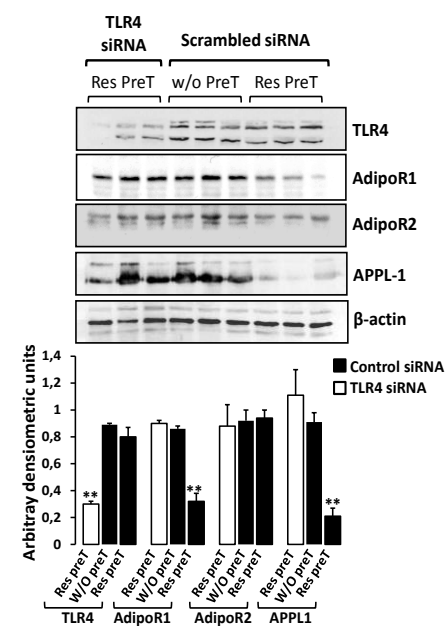
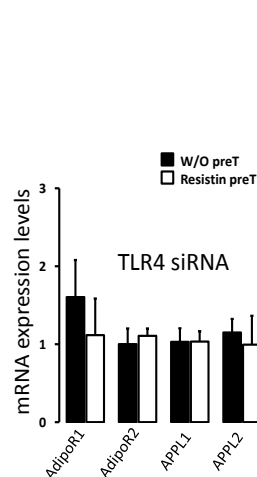
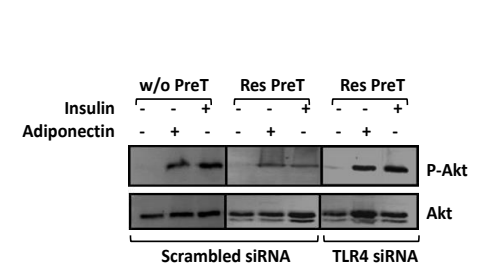
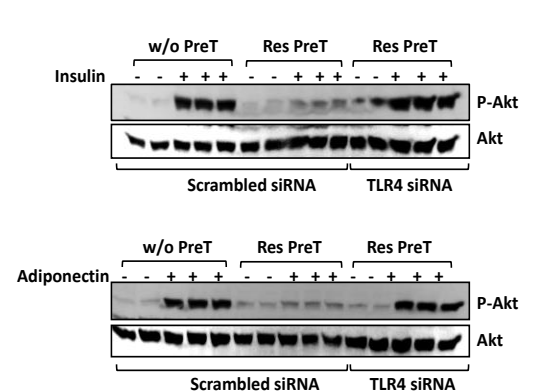
Figure 4.**A. SH-SY5Y cells****B. Mouse hypothalamic cells****C. SH-SY5Y cells****D. SH-SY5Y cells****E. Mouse hypothalamic cells****F.****G.****H.****I. Mouse hypothalamic cells**

Figure 5.

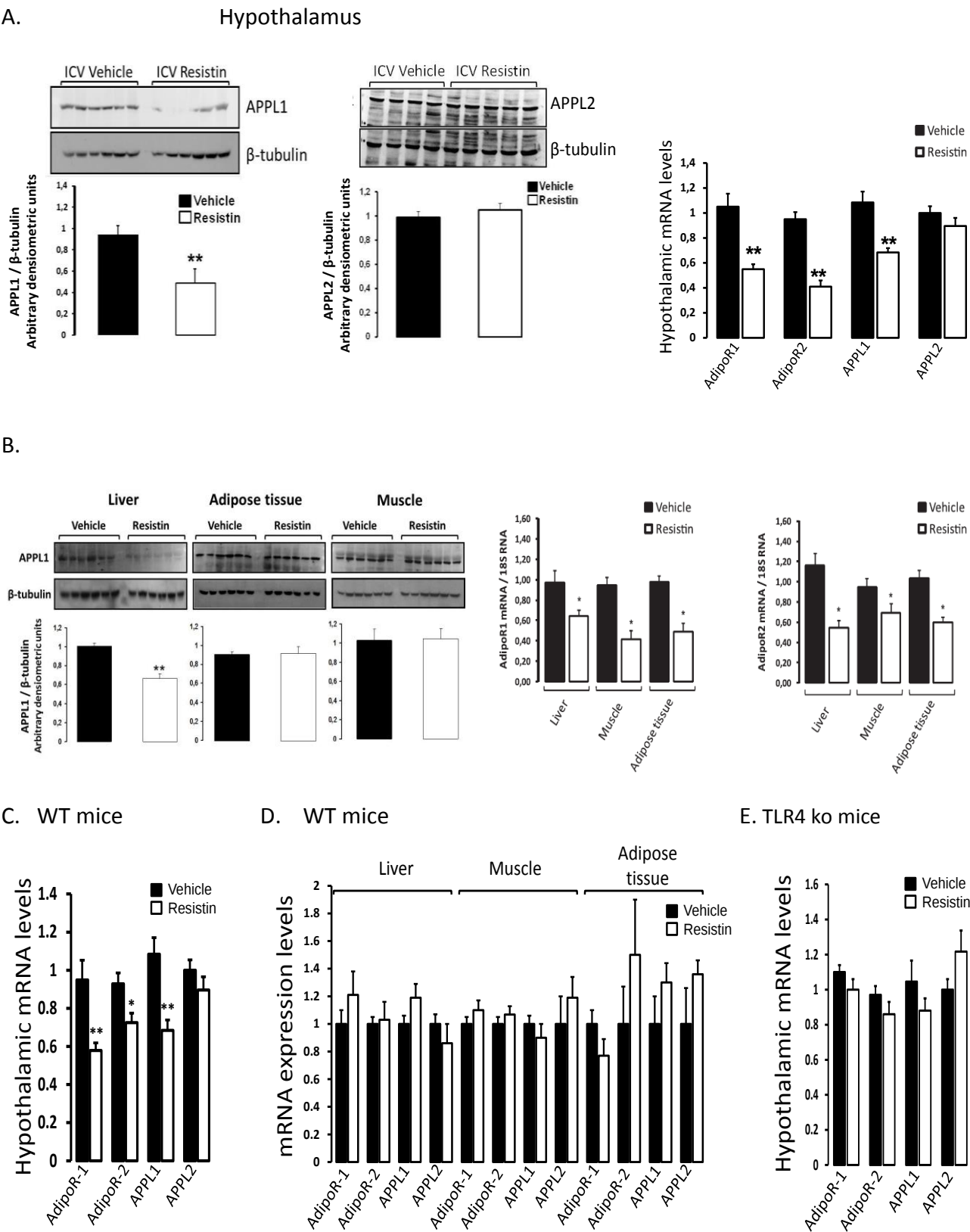
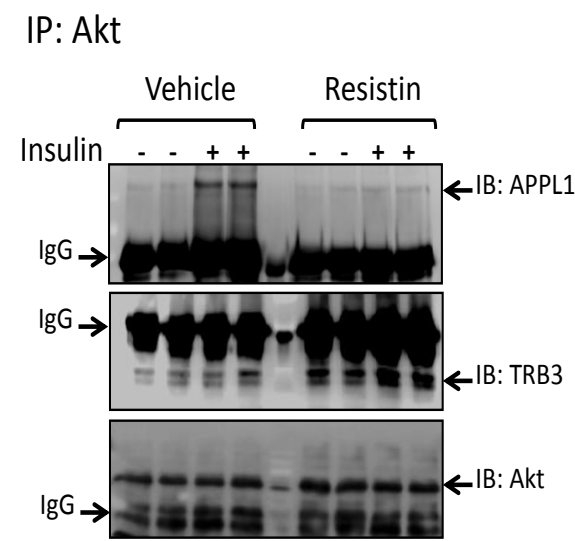
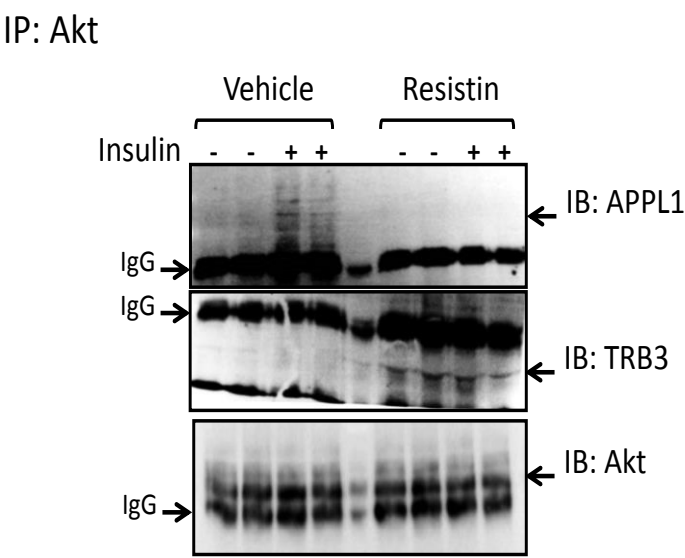


Figure 6.

A. Hypothalamus



B. Liver



C. Liver crude membranes

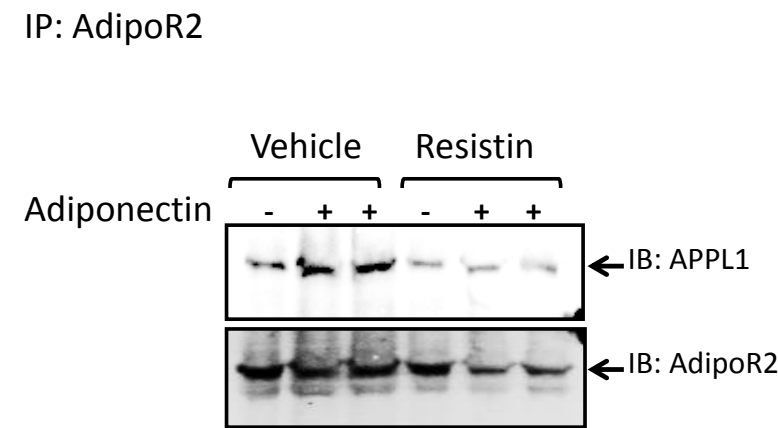


Figure 7.

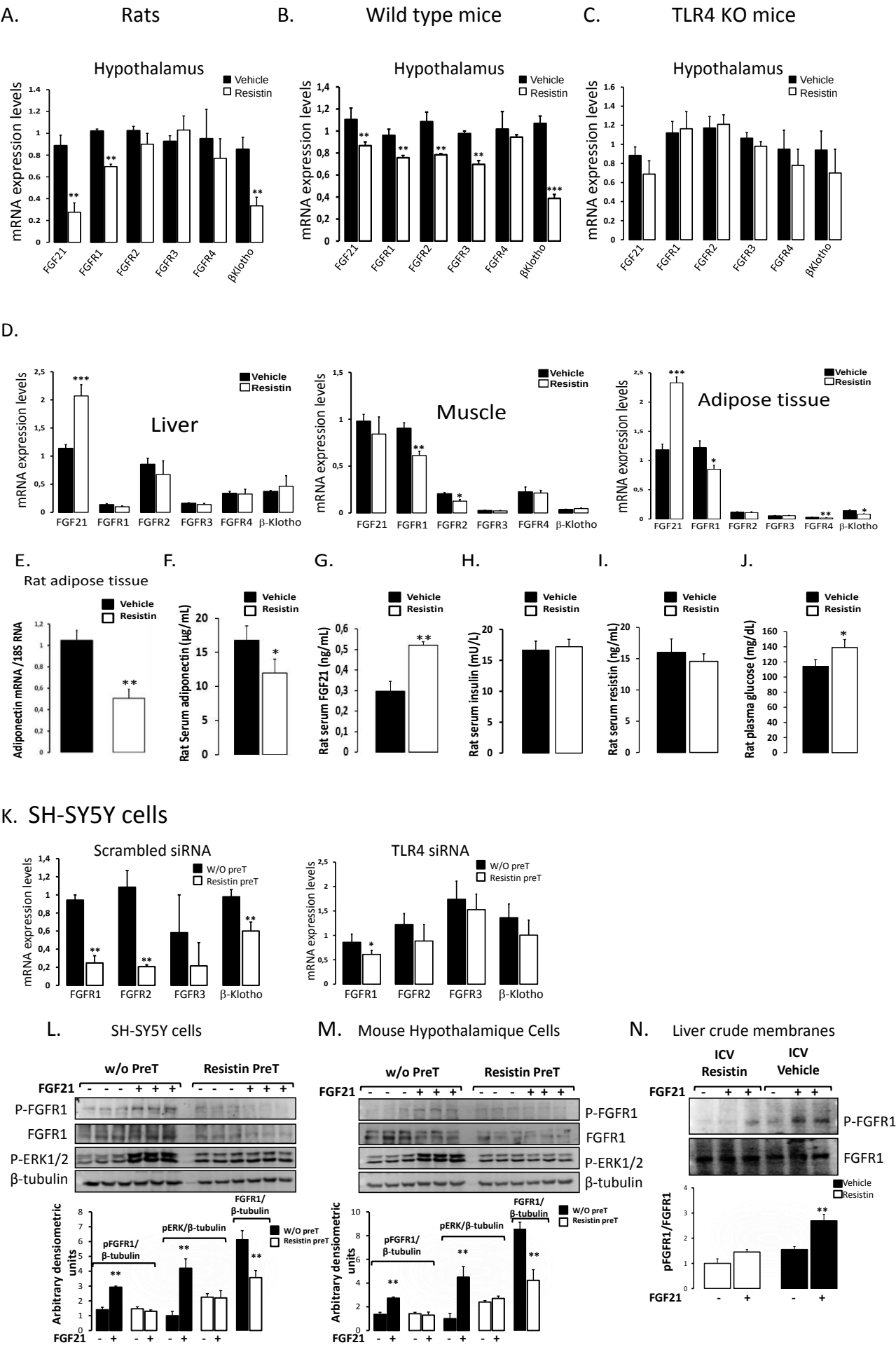
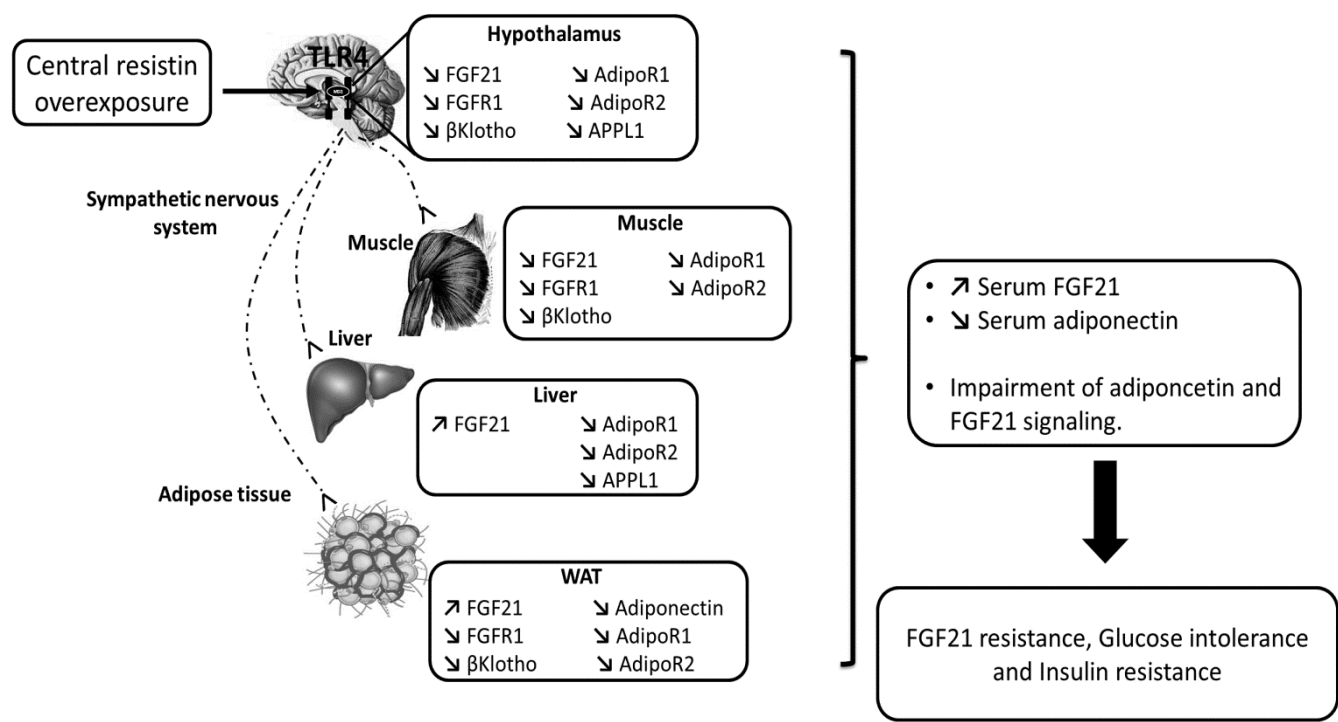


Figure 8.



Supplemental data

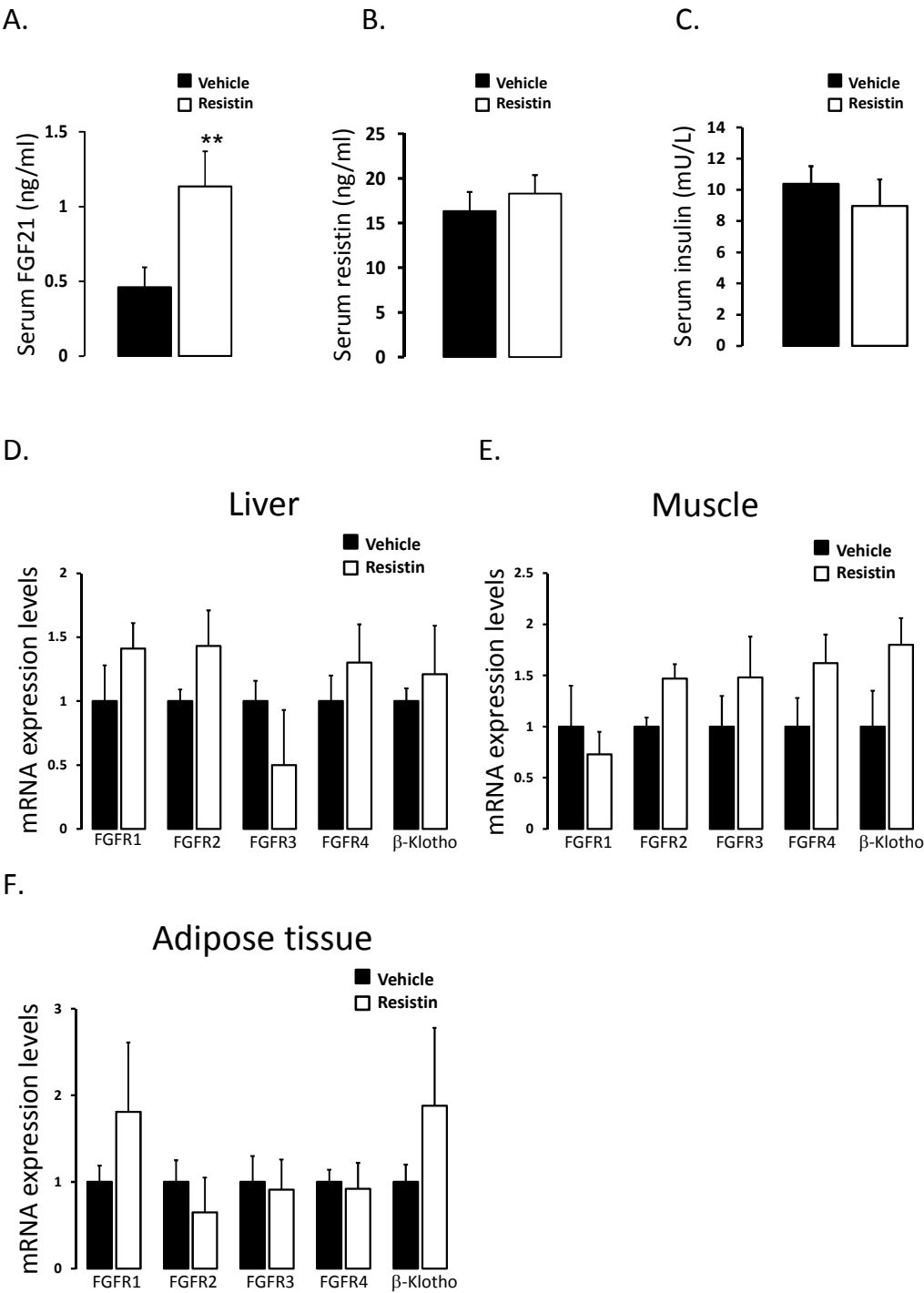


Figure S1. Effect of chronic resistin treatment on plasma FGF21 and FGFRs and β Klotho expressions in liver, muscle and adipose tissue of mice. Male C57BL/6J mice were ICV injected with vehicle or resistin (2 μ g/6 μ L/day; pumping rate 0.25 μ L/h) during a period of 3 days. At the end of the infusion period, circulating levels of FGF21 (A), resistin (B) and insulin (C) were assessed by ELISA, and relative mRNA expression levels of FGF21, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 and β Klotho were evaluated by SYBR Green real-time RT-PCR in the liver (D), muscle (E) and adipose tissue (F). All data are expressed as means $\pm$ SEM (n=3-6 /group). **P < 0.01 compared with vehicle-treated mice.

Gene		Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
hAdipoR1	humain	TTCTTCCTCATGGCTGTGATGT	AAGAAGCGCTCAGGAATTCTG
hAdipoR2	humain	ATAGGGCAGATAGGCTGGTTGA	GGATCCGGGCAGCATACA
hAppl1	humain	GACATCAAGCGGGAGAAGTG	GCCAGTCCAACAGAATCACA
hAppl2	humain	AAAGGAGAATGAGAAGGTGAAGA	TGAAGGGAGGAGAGGTGC
h β -actin	humain	ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG
hFGF21	humain	TTCTGTGCTGGCTGGTCTTC	TGGGCTTCTGTCTGCTGCTGG
hFGR1	humain	CATCACGGCTCTCCTCCAG	CGGTTGGGTTTGTCTTGTCTG
hFGR2	humain	TCTTCACTTTAGGGGGCTCG	TCCATTCTGTGTCTTCTCTTCA
hFGFR3	humain	GAGATGACGAAGACGGGGAG	CAGGAGATGGAGGGAGTGG
hFGFR4	humain	CGCTCTCCTTCCCAGTCC	CCAGCCAAAGTCAGCAATC
h β Klotho	humain	CACATTTCGCCCCACATCAG	GCAAACCATCCAAGCACAGA
hIR	humain	GAGAAGGTGGTGAACAAGGAGTC	CCGTGAAGTGTGCGAAGCC
hTLR4	humain	CTGCGTGAGGTTGGTTC	TGGTTGAGAAGGGGAGGTTG
r18S	rat	TCCCCGAGAAGTTTCAGCACATCC	CTTCCCATCCTTCACGTCCTTCTG
rAdipoR1	rat	GCTGGCCTTTATGCTGCTCG	TCTAGGCCGTAACGGAATTC
rAdipoR2	rat	CCACAACCTTGCTTCATCTA	GATACTGAGGGGTGGCAAAC
rAppl1	rat	TCACTCCTTCCCCATCTTTCC	GTTCTGTCTGTTGGTGGTC
rAppl2	rat	TGTTTCATCGTTCCGTTTTTGGG	ACTTGTGCGCATCGCTTCATA
r β -actin	rat	CTATCGGCAATGAGCGGTTCC	TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG
rFGF21	rat	TGTGGGTCTGTCTCCTGC	TGGGCTTCGGTGTCTCTG
rFGFR1	rat	TGGCACCTGAGGCATTGTT	AAGAGCACCCCAAAGACCAC
rFGFR2	rat	ACCAACTGCACCAATGAAGTGT	TTAAACGTGGGCCTCTGTGA
rFGFR3	rat	TGCCTGCTGACCCCAAGT	CCTGTCCAAAGCAGCCTTCT
rFGFR4	rat	CCGGCCAGACCAAACC	TCAGGTCTGCCAAATCCTTGT
r β Klotho	rat	GACGAGGGCTGTTTTATGTGG	TAATGAGCGGAGGACTTGGG
rIR	rat	TGCCACCAATCCTTCCGTTCC	TCCTCCGCCTGCCTCTCC
rTLR4	rat	CTGGGGAGGCACATCTTCT	TTTCCATCCAACAGGGCTT
rAdiponectin	rat	TGGAGAGAAGGGAGAGAAAGG	TGAGCGATACACATAAGCGG
m18s	mouse	GTGGGCCTGCGGCTTAAT	GCCAGAGTCTCGTTCTGTTATC
mAdipoR1	mouse	GCTGGCCTTTATGCTGCTCG	TCTAGGCCGTAACGGAATTC
mAdipoR2	mouse	CCACAACCTTGCTTCATCTA	GATACTGAGGGGTGGCAAAC
mAppl1	mouse	AGCAACACACCTGACTTCG	CCCCCAAAGGAAAACGCTG
mAppl2	mouse	GGAGAACGAGAAGGCGAAGA	ACTGAAGGGATGAGAGGTGC
m β -actin	mouse	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC	GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC
mFGF21	mouse	TACCAAGCATACCCCATCCC	TGTCCTTGGTCGTCTCTGTGT
mFGFR1	mouse	TGTTTGACCGGATCTACACACA	CTCCACAAGAGCACTCCAA
mFGFR2	mouse	TCGCAATTGGAGGCTATAAGG	CGGGACCACACTTTCCATAA
mFGFR3	mouse	GCATCCTCACTGTGACATCAAC	CCTGGCGAAGTACTGCTCAAA
mFGFR4	mouse	CGCCAGCCTGTCACTATACAAA	CCAGAGGACCTCGACTCCAA
m β Klotho	mouse	CTCTGTGCTTGGATGGTTCG	CCTCACCTCCTCTCTCTG
mTLR4	mouse	CTGGGGAGGCACATCTTCTGG	TGCCGTTTCTGTTCTTCTCTGCT

Table S1. List of PCR primers used in this study.



The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment



Delphine Crépin^{a,b}, Yacir Benomar^{a,b}, Laure Riffault^{a,b}, Hamza Amine^{a,b}, Arie Gertler^c, Mohammed Taouis^{a,b,*}

^a CNRS, Center of Neurosciences Paris-Sud, UMR 8195, Orsay cedex F-91405, France

^b University Paris-Sud, UMR 8195, Orsay cedex F-91405, France

^c The Institute of Biochemistry, Food Science, and Nutrition, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, PO Box 12, 76100 Rehovot, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2013

Received in revised form 25 December 2013

Accepted 27 December 2013

Available online 4 January 2014

Keywords:

MicroRNAs
Insulin-resistance
Obesity
Neurons
Signaling
Liver

ABSTRACT

Early in life, leptin plays a crucial role in hypothalamic neural organization. Leptin, most likely, controls neural gene expression conferring then specific phenotype regarding energy homeostasis. MicroRNAs are new regulators for several physiological functions, including the regulation of metabolism. However, the impact of leptin on hypothalamic microRNA patterns remains unknown. Here, we demonstrate that *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* are up-regulated in the hypothalamus of genetically obese and leptin deficient *ob/ob* mice. Leptin treatment down-regulates these miRNAs in *ob/ob* hypothalamus. The hypothalamic silencing of *miR-200a* increased the expression level of leptin receptor and insulin receptor substrate 2, reduced body weight gain, and restored liver insulin responsiveness. In addition, the overexpression of *pre-miR-200a* in a human neuroblastoma cell line impaired insulin and leptin signaling. These findings link the alteration of leptin and insulin signaling to the up-regulation of hypothalamic *miR-200a* which could be a new target for treatment of obesity.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leptin is a cytokine mainly synthesized and secreted by adipocytes (Zhang et al., 1994; Frederich et al., 1995). Plasma leptin levels are correlated with Body Mass Index, and leptin is involved in many biological functions including the central control of energy homeostasis (Huang and Li, 2000). However, leptin has different effects depending upon the developmental stage. Early in life, this pleiotropic adipocyte-derived cytokine acts as an essential neurotrophic factor along the development of the hypothalamic circuits regulating metabolic homeostasis (Bouret et al., 2004a,b). Later in life, leptin through its binding to specific OBRB receptors (long isoform of leptin receptor) especially abundant in the arcuate nucleus triggers the concerted signaling pathways within complex neural networks modulating the metabolism through the control of satiety and energy expenditure (Pinto et al., 2004). In the new-born, leptin production and effects are independently regulated of body fat size. A leptin surge occurs in the developing rodent during the second week of life which is not related to the regulation of food intake (Devaskar et al., 1997; Ahima et al., 1998). At this stage,

leptin regulates metabolic rate and hypothalamic neuropeptides expression but not food intake (Mistry et al., 1999; Ahima and Hileman, 2000; Proulx et al., 2002). This has been attributed to the fact that hypothalamic neural network maturation begins in rodent after birth at D6 and is not fully achieved until the end of the second postnatal week (Bouret et al., 2004a,b). During this period, neuronal projections from the ARC are developing to reach and connect to the other major sites of food intake regulation particularly the paraventricular and dorsomedial nuclei as well as the lateral hypothalamic area. In addition, leptin exerts a direct neurotrophic action to induce hypothalamic maturation in ARC explants of newborn mice (Bouret et al., 2004a). In *ob/ob* mice, lacking leptin gene expression, the hypothalamic neural organization and circuitry are impaired; and interestingly the neuronal development and the metabolic phenotype can be rescued by supplementation with leptin (Bouret et al., 2004b; Bouret and Simerly, 2004). These effects are most likely attributed to changes in gene expression involved in neural development and plasticity. Furthermore, we have previously shown that leptin blockade early in life predispose to obesity at the adulthood (Attig et al., 2008). Thus, leptin deficiency or dysfunctions early in life could lead to profound changes in gene expression including coding (mRNA) and small non-coding (microRNA) RNA expression patterns in hypothalamic nuclei. Recently, microRNAs have emerged as powerful regulators of gene expression at the post-transcriptional level (Bartel, 2004).

* Corresponding author. Address: Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire (CNPS), UMR 8195 CNRS Université Paris Sud IBAIC, Bât. 447, Orsay cedex F-91405, France. Tel.: +33 1 69 15 70 08; fax: +33 1 69 15 70 74.
E-mail address: mohammed.taouis@u-psud.fr (M. Taouis).

Bioinformatics' tools using pair-base analyses estimate that one miRNA can recognize several hundreds of predicted targets and one mRNA could be targeted by several miRNAs (Krek et al., 2005). MicroRNAs are implicated in development (Fiore et al., 2008) and different pathologies such as cancer, cardiovascular diseases, psychological disorders, and others (Wienholds and Plasterk, 2005; Krutzfeldt and Stoffel, 2006; Poy et al., 2007; Lu et al., 2005). Furthermore, compelling evidence has demonstrated the regulatory role of miRNAs in energy metabolism and liver functions (Poy et al., 2004). MiRNAs are also implicated in neuronal development, dendritic spine formation, synaptic plasticity (Schratt et al., 2006) as well as in the regulation of signaling pathways (Inui et al., 2010). Furthermore, the deletion of ribonuclease III Dicer1, endoribonuclease crucial for miRNAs maturation, in POMC neurons led POMC neuron death and to obesity (Greenman et al., 2013; Schneeberger et al., 2012). We have also showed that microRNAs are differently distributed in hypothalamic nuclei such as ARC and PVN (Amar et al., 2012). However, the impact of leptin on hypothalamic miRNAs expression pattern and the consequences on energy homeostasis regulation are still unknown.

Since, each miRNA is able to control several genes, the changes in the expression profile of miRNAs in a specific brain region especially in the hypothalamus may significantly affect its functionality or/and organization altering then energy homeostasis control. Furthermore, the effect of leptin on miRNA but also the effect of hypothalamic miRNAs on leptin/insulin responsiveness is unknown. Therefore, in the present study, we aim to determine the role of leptin in regulating hypothalamic miRNA expression pattern using leptin-deficient *ob/ob* mice and attempt to recover *ob/ob* mice metabolic dysfunctions by specifically repressing the over-expressed miRNA. Here, we report the hypothalamic overexpression of *miR-200a* in *ob/ob* mice and importantly, its blockade restores both leptin and insulin signaling in the hypothalamus but also in the liver.

2. Experimental procedures

2.1. Animal models

Male adult (9 week-old) obese *Lep^{ob/ob}* C57BL/6 mice (*ob/ob*) (*n* = 5), normal control C57BL/6 mice (*ob/+*) (*n* = 5), diabetic C57BL/KsJ@Rj-db (*db-db*) (*n* = 5) and normal control C57BL/KsJ@Rj-db (*db/+*) (*n* = 5) were housed in temperature-controlled environment with a 12 h light/dark cycle and free access to water and a standard chow diet. Experiments were performed according to European legal requirements (Decree 86/609/EEC). The hypothalamus and liver were rapidly isolated and immediately immersed in liquid nitrogen and stored at −80 °C until used for subsequent analysis.

2.2. miRNA isolation and TaqMan miRNA arrays

Total RNA (with microRNA) was extracted from hypothalamic using a mirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instruction. TaqMan miRNA Arrays were performed on RNAs pool from *ob/ob* and normal control *ob/+* mice. RNA quantity and purity were determined using a NanoDrop-1000 spectrophotometer. cDNA was synthesized using Multiplex RT Rodent Primer Pool A and B (Applied Biosystems). Resulting cDNA was then loaded onto two arrays cards (A and B) for each sample. The card set was run on the ABI 7900HT real time PCR system which measured expression levels of 524 different mouse miRNAs. All miRNAs with Cycle threshold (Ct) values greater than 35 were considered to be nonspecific (undetectable) (Schmittgen et al., 2008) and excluded from analysis. Using this filtering analysis,

Table 1

MiRNAs differentially expressed in *Lep^{ob/ob}* C57BL/6 (*ob/ob*) and control C57BL/6 mice (*ob/+*). Fold change of differentially expressed miRNAs indicates expression levels in *ob/+* compared to *ob/ob* mice (RQ-relative quantification). Underlined miRNAs have been validated by qRT-PCR.

miR name	Up-regulated miRs		miR name	Down-regulated miRs	
	ob/+	ob/ob		ob/+	ob/ob
<u>miR-345-3p</u>	1	9.30	miR-503	1	−1.42
<u>miR-200a</u>	1	7.41	miR-542-3p	1	−1.72
<u>miR-200b</u>	1	3.19	miR-127*	1	−1.84
<u>miR-322</u> *	1	3.06	<u>miR-501-5p</u>	1	−2.48
<u>miR-448</u>	1	2.70			
<u>miR-429</u>	1	2.63			
<u>miR-182</u>	1	2.53			
<u>miR-27a</u> *	1	2.36			
<u>miR-184</u>	1	2.17			
<u>miR-296-3p</u>	1	2.10			
miR-449a	1	1.98			
miR-16	1	1.98			
Let-7i*	1	1.81			
miR-295	1	1.79			
miR-451	1	1.79			
miR-450a-5p	1	1.77			
miR-764-5p	1	1.75			
miR-23b	1	1.74			
miR-200c	1	1.73			
miR-204	1	1.71			
miR-701	1	1.71			
miR-20b	1	1.70			
miR-345-5p	1	1.69			
miR-148b	1	1.69			
miR-496	1	1.67			
miR-15b	1	1.65			
miR-300*	1	1.62			
miR-877	1	1.61			
miR-409-5p	1	1.61			
miR-380-5p	1	1.59			
miR-218	1	1.59			
miR-124*	1	1.55			
miR-192	1	1.55			
miR-195	1	1.54			
miR-133a	1	1.53			
miR-34c	1	1.52			
miR-34b-3p	1	1.52			

196 miRNAs were removed. SnoRNA-135, snoRNA-202 and snoRNA-429 used as the endogenous control and all TaqMan miRNA Arrays data was subsequently normalized to these miRNAs. The multiple comparisons were used to examine the significance of miRNAs regulated in each experimental condition compared with that of the untouched control group. Results were normalized as previously described by Mestdagh et al. (2009) and D'Haene et al. (2012).

2.3. Intracerebroventricular infusion of ant-miR-200a

The mini-osmotic pumps (Alzet, model 1002), were implanted under ketamine (150 mg/kg, Virbac, France) anesthesia with xylazine (5 mg/kg, Rompun, Bayer Puteaux, France). The brain infusion cannula was implanted to the right lateral ventricle by the aim of a stereotaxic frame using the following coordinates: 0.58 mm anterior to bregma, 1 mm lateral, and 2 mm dorso-ventral. The cannula was fixed to the skull with stainless steel screws and dental cement. The osmotic pumps were housed in a subcutaneous pocket in the mid-scapular area of the animal's back. Mice received either saline (0.9%) or anti-miR-200a phosphorotiate (Qiagen, France) (2.6 µg/day or 2 nmol/day) for 14 days. This dose was chosen according to Lu et al. (2011) and to Lennox and Behlke (2010).

Body weight and food intake were daily measure and especially between days 10 and 14 of the infusion.

Leptin treatment

Ob/+ and ob/ob mice received 5 mg/kg/day of rat recombinant leptin (Shpilman et al., 2011) through ip injection as previously described (Halaas et al., 1995) during 11 days.

2.4. Glucose tolerance test

Following ICV infusion of control or anti-miR-200a, overnight fasted mice received intraperitoneally 1.5 g glucose/kg of body weight and then glycemia was determined through the tail vein in a time course manner.

2.5. Reverse transcription and real-time PCR for microRNA

The expression of miRNAs was measured by quantitative reverse transcription PCR using TaqMan MicroRNA Assays. The TaqMan MicroRNA Assays was performed on five ob/ob mice and five ob/+ mice. The PCR primer pairs for miR-345-3p, miR-200a,

miR-200b, miR-322*, miR-448 and miR-429 were obtained commercially from Applied Biosystems. In brief, complementary DNA was synthesized from total RNA by using the gene-specific primers according to the protocol of TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Reverse transcriptase reactions contained 25 ng of RNA samples, 50 nM stem and loop RT primer (TaqMan MicroRNA Assays; Applied Biosystems) and reagents from a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed by using a PCR primer (TaqMan MicroRNA Assays; Applied Biosystems) and reagents of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a StepOne apparatus (Software Version 2.1, Applied Biosystems). The 20 μ L PCR reaction mixture included 2 μ L RT product, 10 μ L buffer TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), and 1 μ L PCR primer (TaqMan MicroRNA Assays; Applied Biosystems). These reaction mixtures were incubated at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s. The expression levels of miR-345-3p, miR-200a, miR-200b, miR-322*, miR-448 and miR-429 in each sample were measured in terms of threshold cycle (Ct) value and normalized to U87 or U6, which was used as an internal control. The

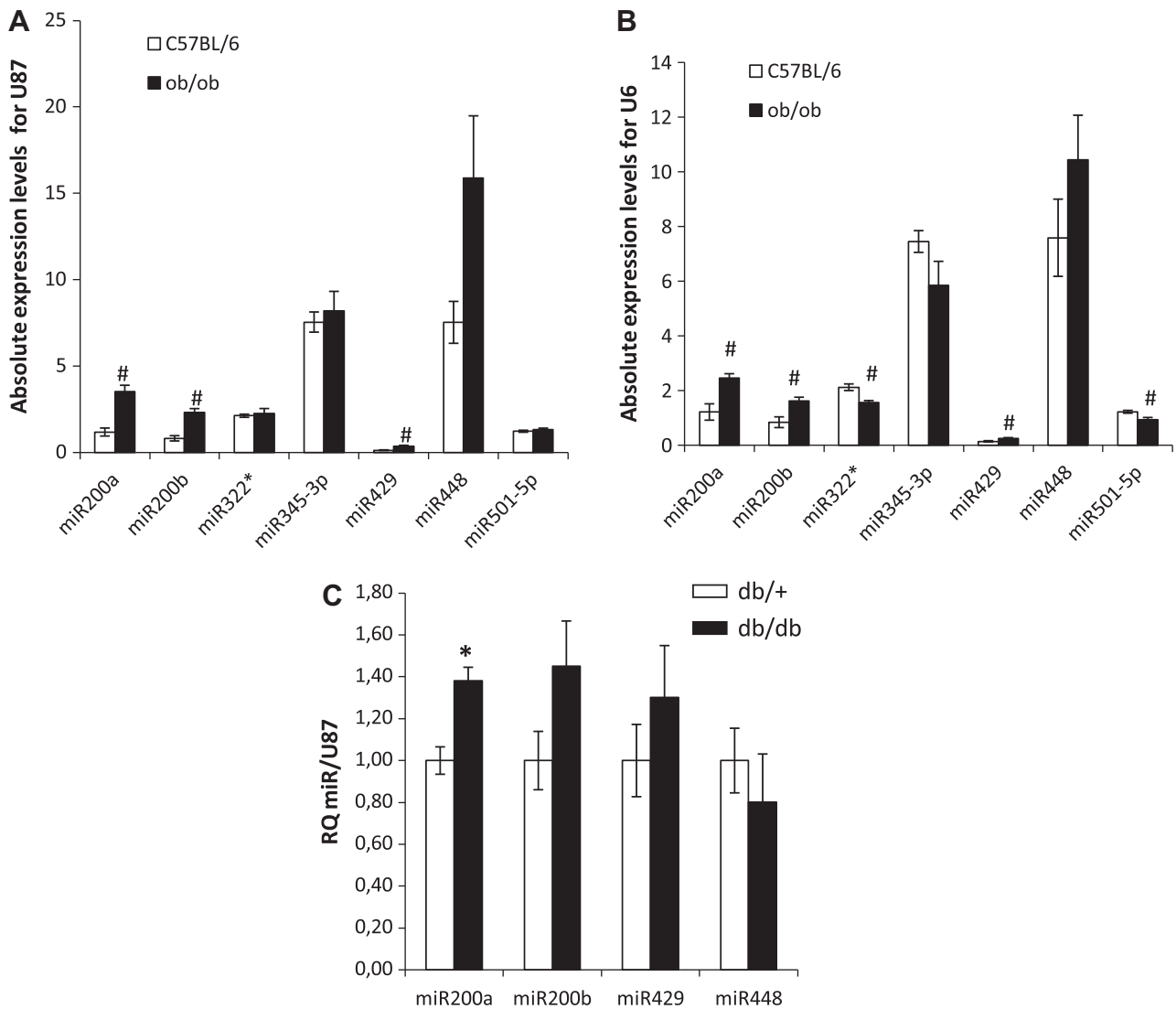


Fig. 1. miR-200a, miR-200b and miR-429 expression in the hypothalamus of ob/ob and db/db mice. Real-time RT-PCR analysis of differentially expressed miRNAs identified by TLDA was assessed in the hypothalamus of ob/ob and db/db mice. Triplicate assays were carried out for each RNA sample ($n = 5$), and the absolute expression of each miRNA was normalized to U87 (panel A) or U6 (panel B) in ob/ob mice. The relative amount of each miRNA was normalized to U87 in db/db mice (panel C). The error bars show the SEM and # indicates significant differences between ob/ob or db/db and WT groups with $p < 0.05$.

relative quantitative was determined using the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method. The results were as absolute expression levels. For db/db, results were normalized to U87 and expressed as RQ (since the same result was obtained when expressed as absolute expression level).

2.6. Reverse transcription and real-time PCR

Hypothalamus and differentiated human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) were homogenized in TRIzol[®] LS reagent (Invitrogen, France) with the homogenizer Precellys 24/Cryolys[®]. RNAs were extracted with phenol/chloroform, precipitated with isopropanol and stored at -80°C . RNAs (1 μg) were reverse transcribed (F-572L M-Mulv, Finnzymes, France) and amplified by real-time PCR (Step-One, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using adequate primers. For insulin receptor (IR sens GCCGCTCCTATGCTCTGGTATC and IR antisens GACTGATGGTGAGGTGTGTTTG), human *Fog2* human (sens AAGAAAGCAAAAGGAGCCGACCAG and antisens (AGCACACCATTTGAGGAAGCC), mouse *Fog2* (sens-CCTCCTCAAATGGGTGTGCCGT and antisens CATCTTCGTGCTGGGTATTCTGGG), *NPY* (sens TTCCAAGTTCCACCCTCATC and antisens AGTGGTGGCATGCATTGGT) and *POMC* (sens GGCTTGCAAACCTGACCTCT and antisens TGACCATGACGTAACCTCCG).

We have used the Fast SyberGreen Master Mix, whereas for *ObRb*, *irs-2* and β -actin we have used Taqman probes and primers designed by Applied Biosystems. Relative cDNA quantities were calculated from cycle thresholds (Ct) and normalized with the housekeeping gene β -actin using the 2^{-Ct} method (Poy et al., 2007).

2.7. Luciferase assay

The 3'-untranslated regions of mouse *irs-2* and *ObRb* including the potential target site for *miR-200a* were ligated into the pmirGlo vector (Promega). The 3'-untranslated region of *irs-2* was obtained by the annealing of sense (5'-AAAC TAGCGGCCGCGAGTTATTAAACAGTGTTCCTTTT T-3') and antisense (5'-CTAGA AAAAAGAAAACACTGTTTAATAACTG GCGGCCGC TA GTTT-3') oligonucleotides; The 3'-untranslated region of *ObRb* was obtained by the annealing of sense (5'-AAACTA GCGGCCGC AACTATTGCTTTCAGTATTT T-3') and antisense (5'-CTAGA AAATACTGAAGGGC AAATAGTGT GCGGCCGC TA GTTT-3') oligonucleotides; that include PmeI and XbaI restriction sites, in addition to an internal NotI site necessary for the control of the ligation to pmir Glo vector. As, negative control similar oligonucleotides were used with a

mismatch into the *miR-200a* target site. The pmirGlo-*irs-2* 3'UTR, pmirGlo-*irs-2* 3'UTR mismatch, pmirGlo-*ObRb* 3'UTR, pmirGlo-*ObRb* 3'UTR mismatch (or scrambled) and control vector containing β -galactosidase with cytomegalovirus promoter were then transfected into CHO (Chinese Hamster Ovary) cells with or without pre-*miR-200a*. Luciferase activity was measured 48 h after transfection using the Dual-Light Chemiluminescent Reporter Gene Assay System (Applied Biosystems, France) following the manufacturer's instructions. Luciferase activity was read using Mithras LB 940 (Berthold Technologies).

2.8. In vitro insulin stimulation on liver membranes

500 μg of liver from *ob/ob*, *ob/+* and *ob/ob* treated with anti-*miR200a* were homogenized in 1 mL of buffer A (0.32 M sucrose, 2 mM HEPES pH 7.4, protease and phosphatase inhibitor cocktail) with Precellys 24/Cryolys[®] (2×20 s). Homogenates were then diluted at 10% w/v in buffer A and centrifugated 5 min at 1000g at 4°C . Supernatants were kept and pellets were re-suspended in 1 mL of buffer A and centrifuged 5 min at 1000g at 4°C . The two supernatants were mixed and centrifuged 20 min at 1000g at 4°C . Pellets were then re-suspended in 1 mL of lysis buffer B (2 mM HEPES pH 7.4, 50 μM Ca^{2+} , protease and phosphatase inhibitor cocktail (see above)), lysed in ice during 30 min and centrifuged 20 min at 20,000g at 4°C . Pellets were suspended in buffer C (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, protease and phosphatase inhibitor cocktail) and stored at -80°C . Protein concentrations of the resulting lysates were determined using a protein assay kit (BCA[™] Protein Assay Kit, Thermo Scientific, France).

2.9. Overexpression of *miR-200a* in SH-SY5Y cells

The human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) was obtained from Dr.B. Dufy (UMR 5543, CNRS, and University of Bordeaux, France). Cells were differentiated for 15 days with retinoic acid as previously described (Benomar et al., 2005). Serum-starved cells were transfected with pre-*miR-200a*. Cells were transiently transfected with pre-mi-RNA 200a (chemically modified double-stranded RNAs that mimic endogenous *miR-200a*, Life Technologies) or Pre-miR Negative Control (a random sequence miRNA mimic molecule that has been extensively tested in human cell lines and tissues and validated to not produce identifiable effects on known miRNA function) using Lipofectamine RNAiMax

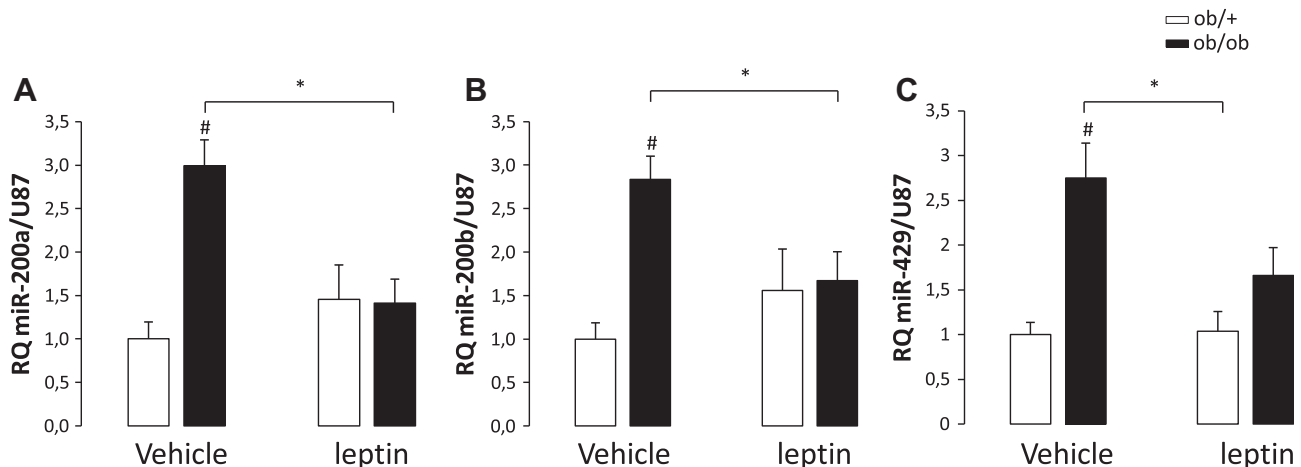


Fig. 2. Leptin regulates hypothalamic *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* expression levels. *Ob/ob* and WT mice received during 11 days 5 mg/kg of leptin and then hypothalamic *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* expression levels were determined by quantitative RT-PCR normalized to U87. Triplicate assays were carried out for each RNA sample ($n = 5$). The error bars show the SEM and * indicates significant differences between *ob/ob* mice treated with saline and those treated with leptin, # indicates significant differences between WT and *ob/ob* mice treated with saline with $p < 0.05$.

A Sequence alignment for 3'UTR region of IRS-2

Human	TATTTTGTCTATATAAACTTTAACAGTTATTAAACAGTGTTCCTTTTGGGTA
Primate	TATTTTGTCTATATAAACTTTAACAGTTATTAAACAGTGTTCCTTTTGGGTA
Mouse	TATTTTGTCTATATAAACTTTAACAGTTATTAAACAGTGTTCCTTT--GGGTA
Rat	TATTTTGTCTATATAAACTTTAACAGTTATTAAACAGTGTTCCTTT--GGGTA
Chicken	TATTTTGTCTATATAA-CCTTAACAGTTATTAAACAGTGTTCCTTTTGGGTA
	2570 2580 2590 2600 2610 2620
Structure of predicted duplex	
<u>CA UUAUUA GCAGUGUU : GU AAUGGU UGUCACAA</u>	
<u>CC UCUU U AG CAGUGUU : GG AGAA G UC GUCACAA</u>	
Free Energies kcal/mol (position 2600)	
-20	
-17.5	

B Sequence alignment for 3'UTR region of LepR

Human	ATTATGCAGTATTTTAATACCTAC
Primate	ATTATGCAGTATTTTAATACCTAC
Mouse	CTT---CAGTATTTTGACACTTAC
Rat	CTT---CAGTATTTTAGCACTTAC
	1980 1990 2000
Structure of predicted duplex	
<u>GUC UAG AGUAAUAGA : UAG GUC UCAUAAUCU</u>	
<u>CA UUAUCG AGUAAUAGA : GU AAUGGU UCAUAAUCU</u>	
Free Energies kcal/mol (position 63)	
-17.4	
-18.3	

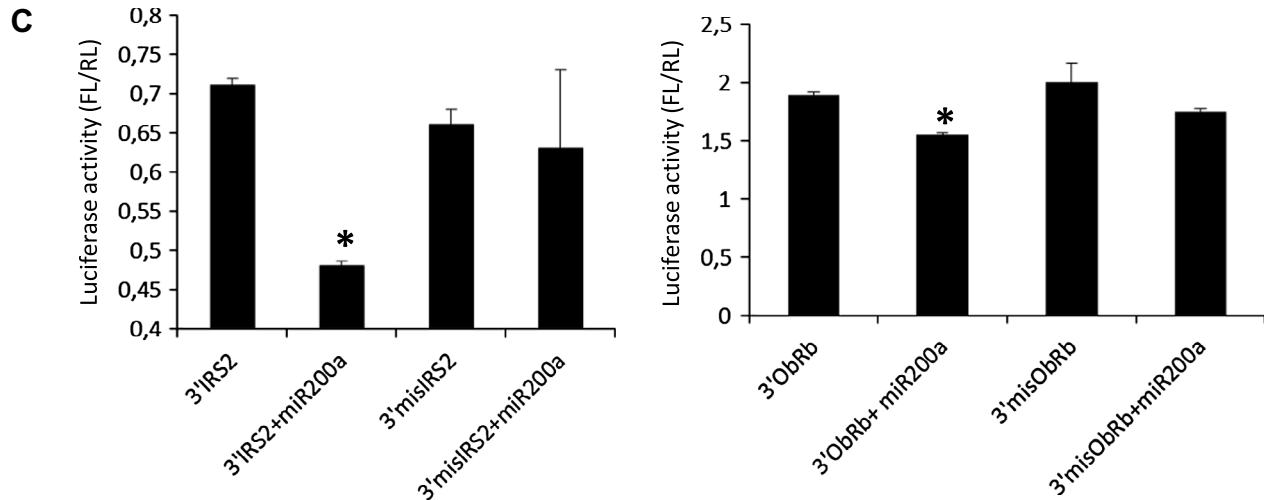


Fig. 3. miR-200 targets IRS-2 and leptin receptor. The sequence alignment of 3'UTR IRS-2 (panel A) and 3'UTR leptin receptor (panel B) was performed using ClustalW software and the predicted duplexes with miR-200a were extracted from PICTAR and TargetScan databases as well as the free energies of the predicted duplexes. (Panel C) Target site of 3'UTR region of IRS-2 or mismatched target site were cloned into pmirGlo dual luciferase vector was transfected into CHO (Chinese Hamster Ovary) cells and luciferase activity determined following the overexpression or not of pre-miR-200a. Triplicate independent assays were carried ($n = 3$). The error bars show the SEM. * Indicates significant differences ($p < 0.05$) between cells expressing 3'UTR IRS2 construct and cells expressing 3'UTR IRS-2 construct in the presence of miR-200a.

(Invitrogen). Following transfection, cells were starved overnight and then total RNA extracted as described previously. Using qRT-PCR, *miR-200a* and *ObRb* expressions were measured as described above. For insulin signaling analysis starved cells were incubated in the presence or absence of insulin (10 nM) for 10 min and then solubilized proteins were subjected to Western blot using adequate antibodies to reveal phosphorylated AKT and then normalized to total AKT.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using ANOVA to detect significant intergroup differences. Data are presented as means $\pm$ SEM, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. For glucose tolerance test ANOVA test has been performed and $p < 0.05$ was considered statistically significant. For statistical anal-

ysis performed in SH-SY5Y cells when comparing non-transfected cells to cells transfected with per-miR-200a *t*-test analysis was performed.

3. Results**3.1. Distinctive miRNA expression patterns in the hypothalamus of ob/ob mice**

To investigate the potential impact of leptin on hypothalamic microRNA expression pattern, we have performed a large-scale expression analysis using Taqman Low Density Arrays (TLDA) methodology to analyze 524 rodent mature miRNAs on the hypothalamus of five ob/ob mice and five C57BL/6 (ob/+) mice (served as controls), respectively (supplemental Table 1). As shown in

Table 1, the relative expression of only 11 out of 524 miRNAs were significantly ($p < 0.05$) modified in the hypothalamus with a fold change of at least 2 when comparing ob/ob to C57BL/6 mice. In particular we found ten miRNAs that are over-expressed in the hypothalamus of ob/ob mice as compared to ob/+ mice (*miR-345-3p*, *miR-200a*, *miR-200b*, *miR-322**, *miR-448*, *miR-429*, *miR-182*, *miR-27a**, *miR-184*, *miR-296-3p*) and only one miRNA was down-regulated-expressed in ob/ob mice.

We have selected 7 miRNAs for RT-PCR validation with a fold change of at least 2.6. Real time PCR confirmed the over-expression of *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* in ob/ob mice as compared to ob/+ mice and expressed as absolute expression normalized to U87 and U6, respectively (Fig. 1A and B), whereas *miR-322**, *miR-345-3p*, *miR-448* and *miR-501-5p* were not confirmed.

3.2. *miR-200a* is over-expressed in db/db mice

As we have shown that the lack of circulating leptin is associated with significant over-expression of *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* and with slight but no significant over-expression of *miR-448* in the hypothalamus, we investigated whether the alteration of leptin signaling is also associated with changes of these miRNAs. Thus, we determined by qRT-PCR the expression of *miR-200a*, *miR-200b*, *miR-429* and *miR-448* in the hypothalamus of db/db mice, a model that exhibits a non-functional leptin receptor leading to impaired leptin signaling. As shown in Fig. 1C, *miR-200a* was significantly over-expressed in db/db mice as compared to db/+ mice, whereas the expression levels of *miR-200b*, *miR-429* and *miR-448* were not significantly increased.

3.3. Impact of leptin on *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* expression

Since *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* are up-regulated in ob/ob mice as compared to ob/+, we hypothesized that leptin may be involved in the regulation of *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* hypothalamic expression. Thus, ob/ob and ob/+ mice received 5 mg/kg/day of leptin during 11 days and body weight was measured and the hypothalamic expression of *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* was determined by qRT-PCR. As expected, leptin treatment reduced body weight gain in ob/ob and ob/+ mice by 18.2% and 20.2%, respectively. Importantly, leptin treatment signif-

icantly reduced hypothalamic expression of *miR-200a* (Fig. 2A), *miR-200b* (Fig. 2B) and *miR-429* (Fig. 2C) in ob/ob mice but not in ob/+mice.

3.4. *Irs-2* and *ObRb* are targets of *miR-200a*

Based on three computer-aided algorithms, including TargetScan, miRanda, and PicTar, *irs-2* and *ObRb* genes are among potential targets of *miR-200*. Fig. 3 shows the conserved regions on 3'UTR of *irs-2* (panel A) and *ObRb* (panel B) that are potential targets of *miR-200* with also the structure of predicted duplex and the free energies. To verify the direct effect of *miR-200a* on *irs-2* and *ObRb* expression, the conserved 3'UTR region of *irs-2* and *obrb* *miR-200a* target sites have been inserted in 3' region of the firefly luciferase gene. We show that luciferase activity is significantly inhibited when pre-*miR-200a* was over-expressed in CHO cells (Fig. 3C), whereas mismatched *miR-200a* target did not affect luciferase activity.

Since the *miR-200a* seems the most affected by the alteration of leptin and leptin signaling as mirrored by its up-regulation in ob/ob and db/db mice, we attempted to reduce its expression in ob/ob mice using anti-*miR-200a*. We have infused ob/ob mice through ICV route in the lateral ventricle by anti-*miR-200a* for two weeks, and then we measured the expression levels of hypothalamic *irs-2*, *obrb* and *fog2*. Firstly, we verified that this anti-*miR200a* treatment significantly reduced the hypothalamic expression of *miR-200a* in ob/ob mice (Fig. 4A). Interestingly, this treatment has restored the expression levels of *irs-2* (Fig. 4B) and *obrb* (Fig. 4C). In addition, this treatment up-regulated *fog2* (Fig. 4D), which is a confirmed target for *miR-200a* involved in the modulation of PI3-kinase signaling as previously described (Hyun et al., 2009), to an expression level similar to that found in ob/+ mice.

To determine the direct impact of *miR-200a* on leptin sensitivity, we studied the effect of pre-*miR-200a* over-expression on *obrb* expression and signaling in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. Firstly, we checked that the overexpression led a significant increase in *miR-200a* expression ($p < 0.005$, Fig. 5A). The transfection of pre-*miR-200a* led to a significant ($p < 0.05$) down-regulation of *obrb* at both mRNA (Fig. 5B) and protein levels (Fig. 5C and D). Furthermore, *miR-200a* over-expression strongly impaired both STAT-3 and Erk 1/2 phosphorylation in response to leptin (Fig. 5E–G).

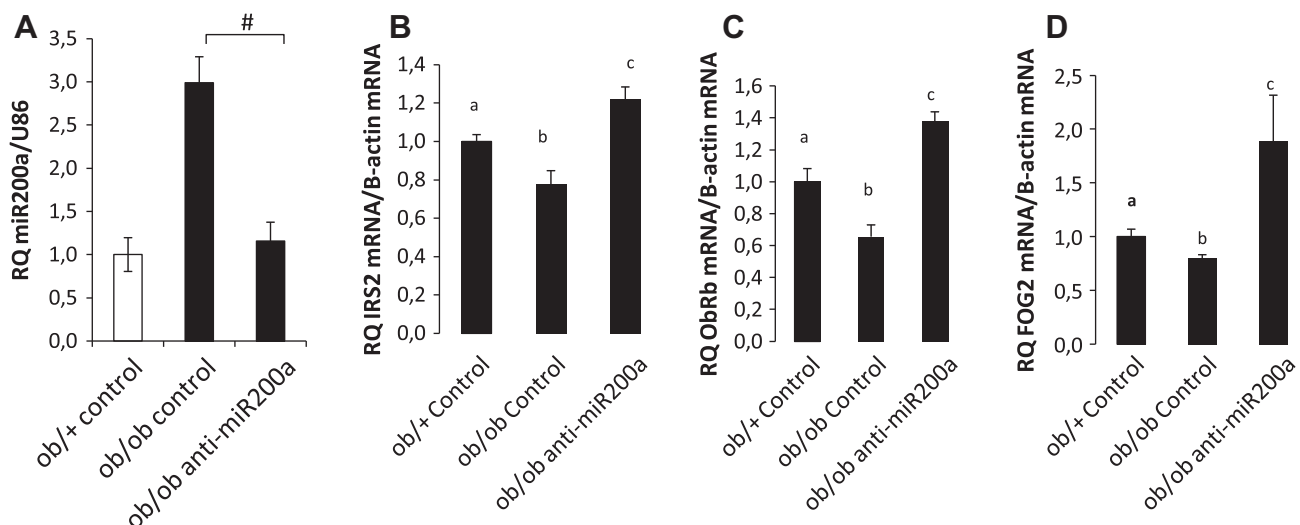


Fig. 4. Anti-*miR-200a* ICV treatment restored hypothalamic *obrb*, *irs2* and *fog2* expression levels. Using mini-osmotic pumps and intra-cerebroventricular infusion ob/ob and WT mice received either saline (0.9%) or ICV infusion of anti-*miR-200a* phosphorotiate (2.6 μ g/day) of ob/ob for 14 days. Following this treatment, we determined hypothalamic *miR-200a* (A), *irs-2* (B), *obrb* (C), and *fog2* (D) expression levels by quantitative RT-PCR normalized to β -actin. Triplicate assays were carried out for each RNA sample ($n = 5$). The error bars show the SEM. When letters are different, this indicates with $p < 0.05$, and in panel A # indicates $p < 0.05$ when comparing ob/ob to ob/ob treated with anti-*miR-200a*.

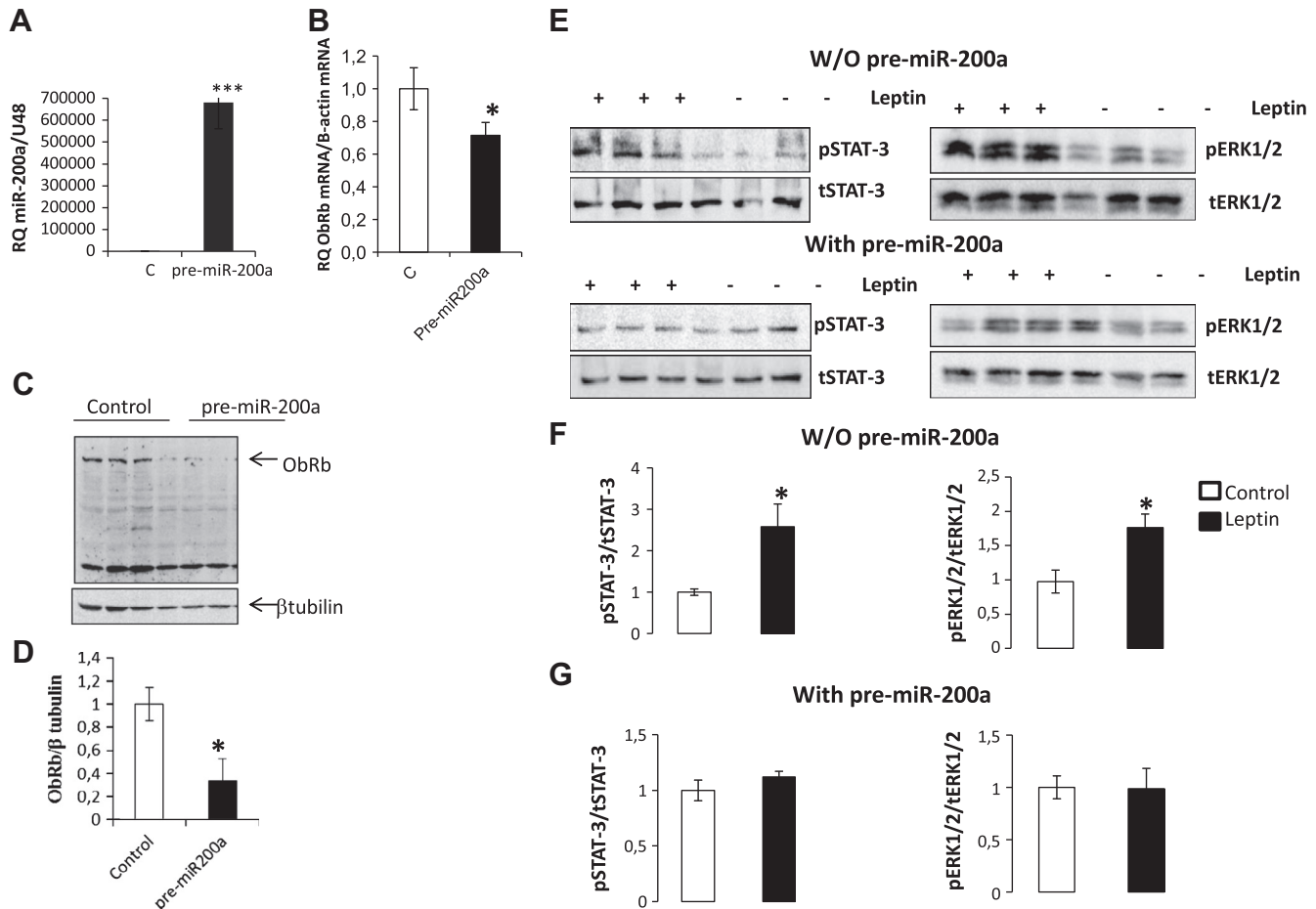


Fig. 5. The overexpression of pre-miR-200a impairs leptin signaling in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Neuroblastoma cell line SH-SY5Y was transfected with negative control or pre-miR-200a. (Panel A) Following transfection, qRT-PCR was performed and, miR-200a expression levels determined. Triplicate independent assays were carried out ($n = 3$). The error bars show the SEM. * Indicates significant differences between control and pre-miR-200a transfected cells with $p < 0.005$. (Panel B) Following transfection, qRT-PCR was performed and, ObRb expression levels determined. Triplicate independent assays were carried out ($n = 3$). The error bars show the SEM. * Indicates significant differences between control and pre-miR-200a transfected cells with $p < 0.05$. (Panel C) Following transfection, the protein expression of ObRb was determined by Western blot using adequate antibodies and revealed using CareStream apparatus, Western blot was normalized to β tubulin. Band quantification was carried out using CareStream software (Panel D). Triplicate independent assays were carried out ($n = 3$). The error bars show the SEM. * Indicates significant differences between control and pre-miR-200a transfected cells with $p < 0.05$. (Panel E) Cells overexpressing or not pre-miR-200a were incubated in the presence or absence of leptin and then STAT-3 and ERK 1/2 phosphorylation determined by Western blot. The blots were normalized using respectively total STAT-3 or total ERK 1/2 antibodies. Band quantification was carried out using CareStream software (Panel F and G). Triplicate independent assays were carried out ($n = 3$). The error bars show the SEM. * Indicates significant differences between control and pre-miR-200a transfected cells with $p < 0.05$.

3.5. Anti-miR-200a ICV infusion increases hypothalamic expression of insulin receptor, POMC and NPY in *ob/ob* mice

To determine whether the blockade of *miR-200a* ameliorates energy homeostasis markers such as insulin receptor or neuropeptides involved in the control of food intake such as POMC and NPY, we measure their expression in *ob/ob* mice ICV infused by anti-miR-200a. We show that anti-miR-200a restored hypothalamic insulin receptor expression (Fig. 6A). In addition, this treatment significantly increased *pomc* (Fig. 6B) and *npv* (Fig. 6C) expression but with different amplitudes, about 22-fold increase for *pomc* and only around 3-fold for *npv* (Fig. 6B and C).

3.6. Anti-miR-200a ICV infusion reduces body weight gain and ameliorates glucose tolerance of *ob/ob* mice

Following anti-miR-200a ICV infusion, we showed that body weight gain measured from day 10 to day 13 of the infusion was significantly reduced in *ob/ob* mice receiving anti-miR-200a as compared to *ob/ob* mice (Fig. 7A), without significant changes in

food intake (Fig. 7B). Fasted glycaemia of the three studied groups was not significantly modified (*ob/+*: 0.99 ± 0.004 g/L; *ob/ob*: 1.03 ± 0.05 g/L and *ob/ob* anti-miR-200a: 1.07 ± 0.1 g/L). Fasted insulinemia was also measured and indicated that control mice (1.7 ± 0.86 ng/mL) exhibited significantly ($p < 0.05$) lower insulinemia as compared to *ob/ob* mice (39.5 ± 5.8 ng/mL) and *ob/ob* anti-miR-200a mice (28.5 ± 2 ng/mL). Anti-miR200a treatment tended to reduce insulinemia but not significantly. In addition, the oral glucose tolerance test showed a slight but significant improvement of glucose tolerance of *ob/ob* mice receiving anti-miR-200a specifically 120 min following glucose challenge (Fig. 7C). However, when results were expressed as area under the curve *ob/ob* mice receiving anti-miR-200a exhibit no significant difference compared to *ob/ob* mice receiving the placebo (data not shown).

3.7. Impact of hypothalamic miR-200a blockade on liver insulin-sensitivity

To determine the impact of miR-200a blockade on overall insulin sensitivity we focused on liver insulin sensitivity. Anti-miR-200a ICV infusion significantly increased IRS-2 (Fig. 8A) and IR

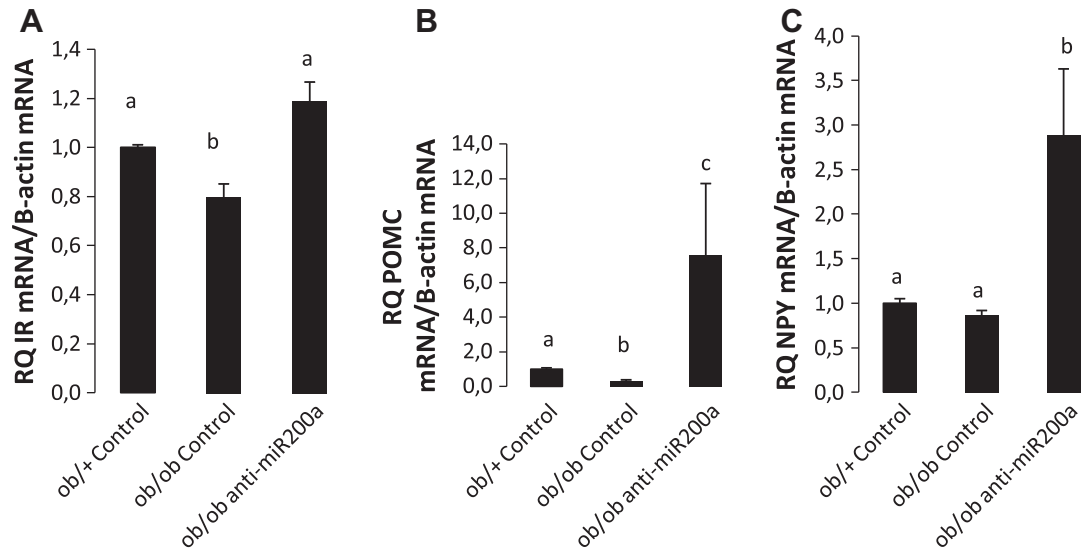


Fig. 6. Anti-miR-200a ICV treatment restored hypothalamic *insulin receptor*, *pomc* and *npv* expression levels. Using mini-osmotic pumps and intra-cerebroventricular infusion ob/ob and WT mice received either saline (0.9%) or ICV infusion of anti-miR-200a phosphorotiate (2.6 μ g/day) of ob/ob for 14 days. Following this treatment, hypothalamic *insulin receptor* (A), *pomc* (B) and *npv* (C) expression levels were determined by quantitative RT-PCR normalized to β -actin. Triplicate assays were carried out for each RNA sample ($n = 5$). The error bars show the SEM. When letters are different, this indicates with $p < 0.05$.

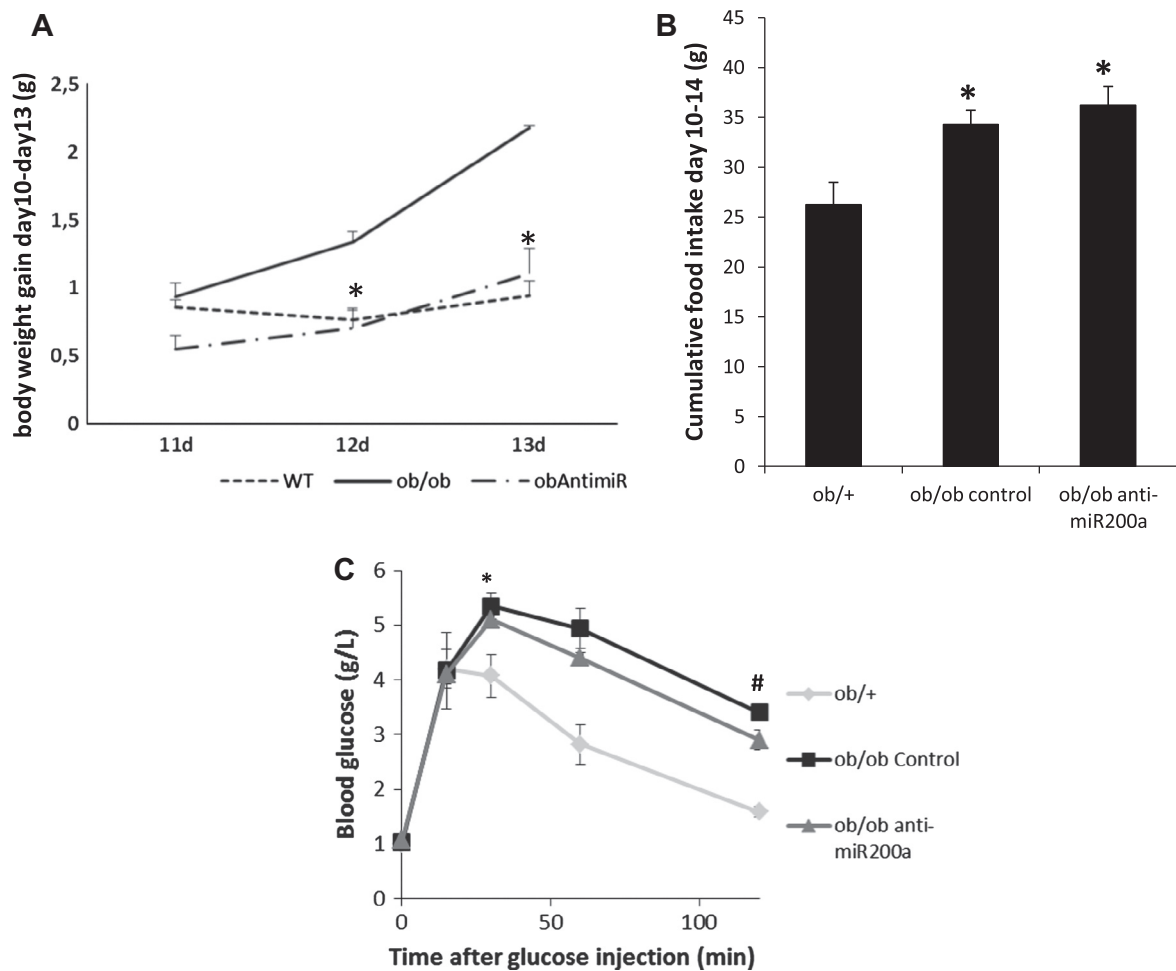


Fig. 7. Anti-miR-200a ICV treatment reduces body weight gain and ameliorates glucose tolerance. Using mini-osmotic pumps and intra-cerebroventricular infusion ob/ob and WT mice received either saline (0.9%) or ICV infusion of anti-miR-200a phosphorotiate (2.6 μ g/day) of ob/ob for 14 days. Following this treatment, body weight gain (panel A) and food intake (panel B) were determined between days 10 and 14 of the infusion. The error bars show the SEM, different letters indicate significant differences between ob/ob and ob/ob + anti-miR-200a with $p < 0.05$. (Panel C) For the oral glucose tolerance test, starved ob/+, ob/ob and ob/ob anti-miR-200a mice received by IP 2 g of glucose/kg and blood glucose levels determined according to the described time-course. The error bars show the SEM, according to ANOVA test * indicates that glycaemia of WT is lower as compared to ob/ob and ob/ob + anti-miR-200a; # indicates that glycemia of ob/ob is higher than ob/ob + anti-miR200a with $p < 0.05$.

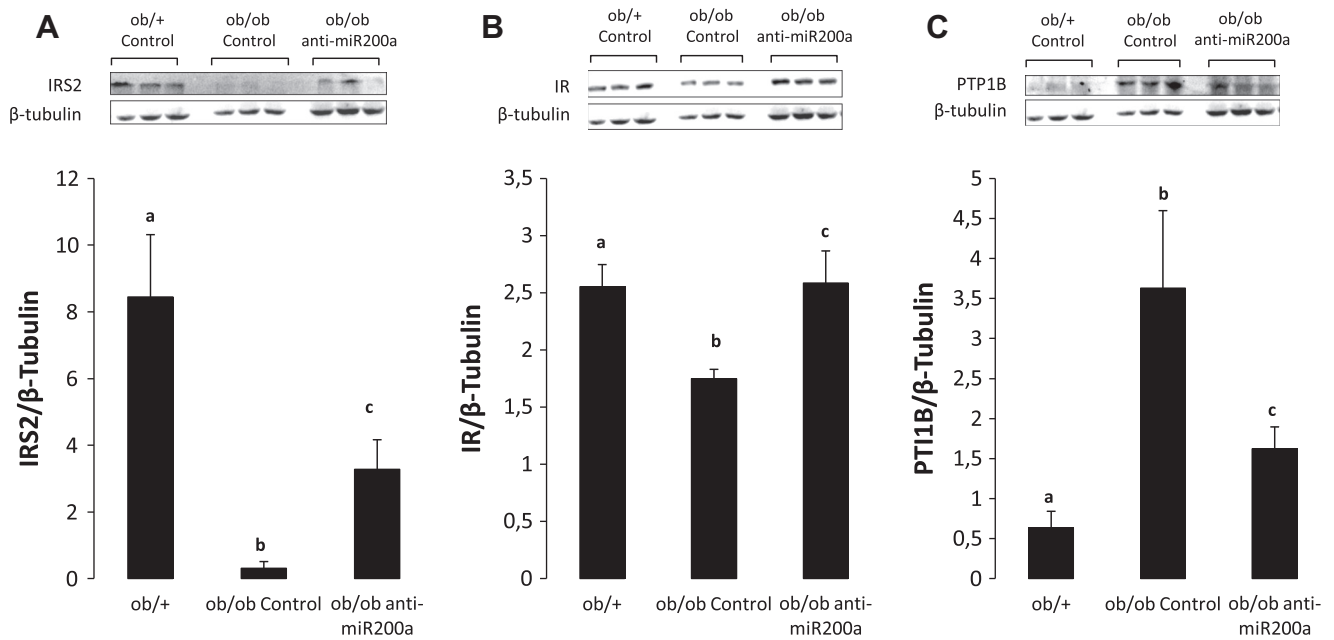


Fig. 8. Anti-miR-200a ICV treatment restored liver IRS2 and IR expression and repressed PTP-1B expression. Using mini-osmotic pumps and intra-cerebroventricular infusion ob/ob and WT mice received either saline (0.9%) or ICV infusion of anti-miR-200a phosphorotiate (2.6 µg/day) of ob/ob for 14 days. Following this treatment, liver IRS-2, IR and PTP-1B protein expression levels were determined by Western blot using adequate antibodies and normalized to β tubulin. The error bars show the SEM. Indicates significant differences between ob/ob mice treated with saline or anti-miR-200a, and different letters indicate significant differences with $p < 0.05$.

(Fig. 8B) expression in *ob/ob* liver compared to *ob/ob* mice infused with placebo. Furthermore, this treatment significantly reduced the protein expression of PTP-1B, a negative modulator of insulin signaling (Fig. 8C). To further investigate liver insulin responsiveness, crude liver membranes from *ob/ob*, *ob/+* and *ob/ob* mice treated with anti-miR-200a were stimulated by insulin and then analyzed by Western-blot using either anti-phosphotyrosine (4G10) or anti-insulin receptor antibodies. Insulin clearly induced the tyrosine phosphorylation of IR in *ob/+* but not in *ob/ob* (Fig. 9A). Importantly, anti-miR-200a ICV infusion restored the insulin-dependent insulin receptor phosphorylation in *ob/ob* mice (Fig. 9A). To investigate the impact of miR-200a on downstream insulin signaling, human neuroblastoma cell line was used. We showed that the overexpression of pre-miR-200a significantly decreased the insulin-dependent Akt phosphorylation (Fig. 9B). In addition, the over-expression of pre-miR-200a induced the down-regulation of IR expression in SH-SY5Y cells (Fig. 9C).

4. Discussion

The alteration of energy homeostasis has been attributed to the defect of leptin gene expression in *ob/ob* mice, since leptin treatment restored the normal body weight with the normalization of several metabolic and endocrine parameters (Halaas et al., 1995; Pellemounter et al., 1995). Numerous studies using transcriptomic or proteomic approaches have compared gene expression patterns of *ob/ob* mice versus wild type mice. These studies have revealed several leptin-dependent genes mainly in the adipose tissue (Zhang et al., 2008, 2011). In the present paper we aimed to determine whether the expression pattern of microRNAs is modified in the hypothalamus of *ob/ob* mice. MicroRNAs are now considered as powerful regulators of mRNA translation. Since one miRNA is able to control the translation of several mRNAs, miRNAs are thus able to canalize gene expression leading to phenotypic variability ensuring stability of phenotypes. Here, hypothalamic *ob/ob* miRNAs expression pattern is clearly modified compared to *ob/+* mice as determined by TLDA approach. Among these modified

miRNAs, *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* that belong to the same genomic cluster were up-regulated in *ob/ob* mice and this was confirmed by qRT-PCR. The bioinformatic prediction analysis indicates that these miRNAs target preferentially genes involved in carbohydrate metabolism and cell glucose homeostasis such as IRS-2, G6PC, ENOLASE-2, and PTEN (Alisi et al., 2011; Li et al., 2009; Cheung et al., 2008). Furthermore, according to mirBase, *miR-200a* targets leptin receptor gene. Interestingly, *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* have been reported to be up-regulated in the liver of rats fed high caloric diet (Alisi et al., 2011; Li et al., 2009; Cheung et al., 2008). In the present paper, we also show the up-regulation of miR-200a in the hypothalamus of diabetic *db/db* mice that exhibit non-functional leptin receptor, indicating that the expression of miR-200a is linked to the defect of leptin expression and/or action. Importantly, chronic leptin treatment down-regulated *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* in *ob/ob* hypothalamus, thus, directly linking the expression levels of these miRNAs to the leptin status of mice. Furthermore, the overexpression of *miR-200a* in human neuroblastoma cell line led to the down-regulation of long isoform leptin receptor. These findings support the hypothesis that leptin controls the expression of hypothalamic miRNAs and consequently actively participates in the gene expression pattern contributing then to a specific phenotype regarding energy homeostasis. This hypothesis may constitute a plausible mechanism explaining, at least partially, the important role of leptin in early life for the hypothalamic neural circuitry organization and inter-nuclei neuronal connections. We have then focused on *miR-200a*, because this miRNA is up-regulated in the hypothalamus of *ob/ob* and *db/db* mice linking this miRNA to leptin expression and signaling. To further establish the direct link between *miR-200a* and leptin efficiency, we showed that the down-regulation of *miR-200a* in the hypothalamus using anti-miR-200a increased leptin receptor, insulin receptor and IRS-2 expression levels. The impact of *miR-200a* is further demonstrated by the direct inhibition of luciferase activity of pmirGlo-3'UTR-IRS-2 when miR-200a is overexpressed. According to TargetScan software, *ObRb* is a potential target of miR-200 and according to our data evidenced by luciferase test. However, insulin receptor is not and this

suggests that insulin receptor may be indirectly controlled by miR-200. These findings suggest that *miR-200a* could play a key role in the onset of hypothalamic leptin and insulin resistance through, most likely, the alteration of the common IRS-2 signaling pathway. Indeed, IRS-2 is distributed in brain areas involved in energy homeostasis and autonomic function (Pardini et al., 2006). In IRS-2 KO mice, disrupted control of hypothalamic neuropeptide levels and UCP mRNA expression promoted the development of obesity (Masaki et al., 2004). This is corroborated by our finding where we have shown that hypothalamic miR-200a blockade led to the restoration of IRS-2 expression associated with reduced body weight gain without changing food intake which suggests increased energy expenditure. This is most likely attributed to the potential connection between IRS-2 and UCP expression as previously reported (Masaki et al., 2004). However, the specific deletion of neuronal IRS-2 led to mild impact on glucose homeostasis (Choudhury et al., 2005) which is in good agreement with our finding where anti-miR-200a infusion led also to mild effect of glucose tolerance. Importantly, ICV infusion of anti-miR-200a in *ob/ob* mice also restored liver insulin sensitivity as evidenced by significant

increase of insulin-dependent insulin receptor phosphorylation. The insulin sensitizing effect of *miR-200a* blockade could be attributed to the down-regulation of PTP-1B. Furthermore, in human neuroblastoma cell line, the overexpression of *miR-200a* clearly impaired insulin-dependent Akt phosphorylation, corroborating the insulin sensitizing effect of anti-miR-200a treatment. In addition, the overexpression of *miR-200a* also impaired leptin signaling in this cell line as evidenced by the down-regulation of leptin receptor leading to the alteration of leptin-dependent phosphorylation of both STAT-3 and Erk 1/2. Thus, *miR-200a* promotes the resistance towards both insulin and leptin at the neuronal level. These findings are in good agreement with our recent study describing the hypothalamic up-regulation of miR-200a in high fat fed rats that exhibit leptin resistance and insulin signaling impairment (Benoit et al., 2013). We have also shown that *miR-200a* blockade restored the expression of *fog2*, which has been described as a target of *miR-200a* and involved in insulin signaling through its interaction with PI-3 kinase (Hyun et al., 2009).

Insulin and leptin regulates at the hypothalamic level the expression of both *npv* and *pomc* (Belgardt et al., 2009). Here, we

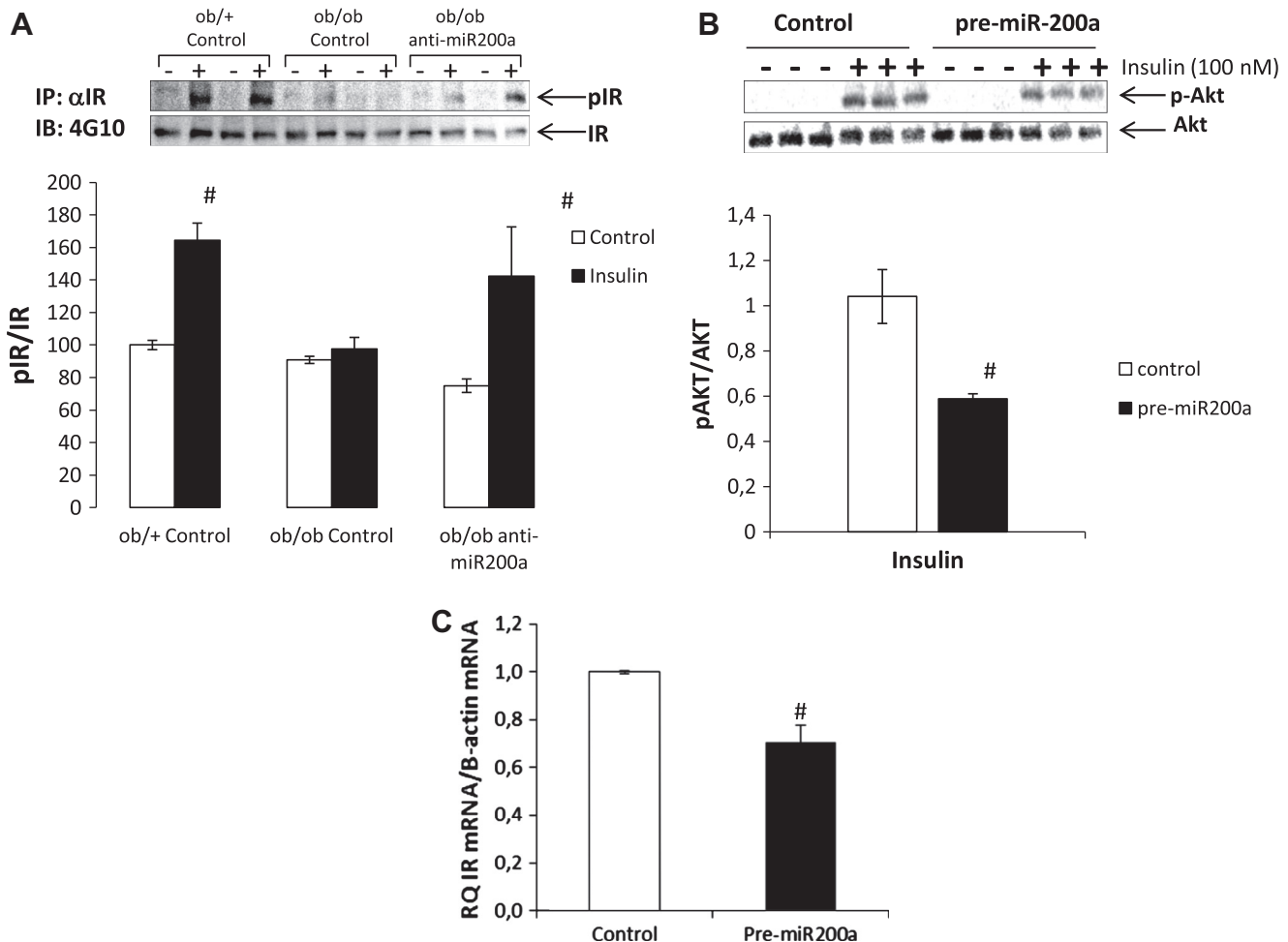


Fig. 9. Anti-miR-200a ICV treatment restored liver and human neuroblastoma insulin responsiveness. (Panel A) Crude liver membranes were prepared from WT, *ob/ob* and *ob/ob* treated with anti-miR-200a mice. Liver membranes were treated with NaCl or insulin (1 μ M) and then subjected to Western-blot revealed using anti-phosphotyrosine antibodies (4G10) or anti-insulin receptor. Insulin receptor phosphorylation was normalized to total insulin receptor and quantified using Carestream software. The results are expressed as mean $\pm$ SEM and [#] indicates significant differences ($p < 0.05$) between control and insulin-stimulated membranes. (Panel B) Neuroblastoma cell line SH-SY5Y was transfected with negative control or pre-miR-200a. Following transfection, starved cells were incubated in the absence or presence of insulin (10 nM). Then, cell lysates were subjected to Western blot using anti-phosphoAkt normalized to total Akt. The error bars show the SEM. [#] Indicates significant differences between control and pre-miR-200a transfected cells with $p < 0.05$. (Panel C) The expression of IR was measured using pRT-PCR in SH-SY5Y cells following pre-miR-200a overexpression. Results are normalized to b actin and compared to cells transfected with negative control. The error bars show the SEM. [#] Indicates significant differences between control and pre-miR-200a transfected cells with $p < 0.05$.

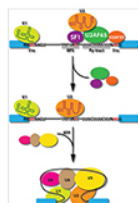
show that the expression of *pomc* is low in *ob/ob* mice and the blockade of hypothalamic miR-200a increased its expression by more than 15-folds. This increase is most likely attributed to the recovery of both insulin and leptin signaling in the hypothalamus. Interestingly, the expression of *npv* is also increased following miR200a blockade but with a lesser amplitude (3-folds), which may at least partly explain the unmodified food intake in *ob/ob* mice receiving anti-miR-200a treatment.

Taken together our findings reveal that *miR-200a*, *miR-200b* and *miR-429* expression is leptin-dependent, and that *ObRb*, *ir* and *irs-2* expression is targeted by miR-200 at the hypothalamic level. More interestingly, the infusion of anti-miR-200a restored the normal hypothalamic expression level of *ObRb*, *IR* and *IRS-2*, and liver insulin responsiveness in *ob/ob* mice. Thus, blocking these specific miRNAs and specifically *miR-200a* may, at least partially, overcome the leptin- and insulin-resistant phenotype, constituting then a potential new strategy to restore hypothalamic leptin/insulin sensitivity and subsequently delaying the onset of pre-obese state.

In conclusion, we suggest that the impairment of leptin production and/or signaling deeply impaired the miRNA expression pattern at the hypothalamic level. These findings reveal *miR-200a* as the most sensitive miRNA to the alteration of leptin production and signaling.

References

- Ahima, R.S., Hileman, S.M., 2000. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regul. Pept.* 92, 1–7.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.* 10, 1020–1027.
- Alisi, A., Da Sacco, L., Bruscalupi, G., Piemonte, F., Panera, N., De Vito, R., Leoni, S., Bottazzo, G.F., Masotti, A., Nobeli, V., 2011. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab. Invest.* 91, 283–293.
- Amar, L., Benoit, C., Beaumont, G., Vacher, C.M., Crépin, D., Taouis, M., Baroin-Tourancheau, A., 2012. MicroRNA expression profiling of hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei from single rats using Illumina sequencing technology. *J. Neurosci. Methods* 209, 134–143.
- Attig, L., Solomon, G., Ferezou, J., Abdennebi-Najar, L., Taouis, M., Gertler, A., Djiane, J., 2008. Early postnatal leptin blockade leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int. J. Obes. (Lond.)* 321, 153–160.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanisms and function. *Cell* 116, 281–297.
- Belgardt, B.F., Okamura, T., Bruning, J.C., 2009. Hormone and glucose signaling in POMC and AgRP neurons. *J. Physiol.* 587, 5305–5314.
- Benoit, C., Ould-Hamouda, H., Crépin, D., Gertler, A., Amar, L., Taouis, M., 2013. Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J. Endocrinol.* 218, 35–47.
- Benomar, Y., Roy, A.F., Aubourg, A., Djiane, J., Taouis, M., 2005. Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem. J.* 388, 929–939.
- Bouret, S.G., Simerly, R.B., 2004. Minireview: leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 145, 2621–2626.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004a. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci.* 24, 2797–2805.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004b. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108–110.
- Cheung, O., Puri, P., Eicken, C., Contos, M.J., Mirshahi, F., Maher, J.W., Kellum, J.M., Miu, H., Luketic, V.A., Sanyal, A.J., 2008. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 48, 1810–1820.
- Devaskar, S.U., Ollesch, C., Rajakumar, R.A., Rajakumar, P.A., 1997. Developmental changes in *ob* gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 44–47.
- D'Haene, B., Mestdagh, P., Hellemans, J., Vandesompele, J., 2012. MiRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol. Biol.* 822, 261–272.
- Fiore, R., Siegel, G., Schrott, G., 2008. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 471–478.
- Frederich, R.C., Lollmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B., Flier, J.S., 1995. Expression of *ob* mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J. Clin. Invest.* 96, 1658–1663.
- Greenman, Y., Kuperman, Y., Drori, Y., Asa, S.L., Navon, I., Forkosh, O., Stern, N., Chen, A., 2013. Postnatal ablation of POMC neurons induces an obese phenotype characterized by decreased food intake and enhanced anxiety-like behavior. *Mol. Endocrinol.* 27, 1091–1102.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M., 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science* 269, 543–546.
- Huang, L., Li, C., 2000. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res.* 10, 81–92.
- Hyun, S., Lee, J.H., Jin, H., Nam, J.W., Namkoong, B., Lee, G., Chung, J., Kim, V.N., 2009. Conserved microRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell* 139, 1096–1108.
- Inui, M., Martello, G., Piccolo, S., 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 252–263.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N., 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.
- Krutzfeldt, M., Stoffel, M., 2006. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab.* 4, 9–12.
- Lennox, K.A., Behlke, M.A., 2010. A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. *Pharm. Res.* 27, 1788–1799.
- Li, S., Chen, X., Zhang, H., Liang, X., Xiang, Y., Yu, C., Zan, K., Li, Y., Zhang, C.Y., 2009. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J. Lipid Res.* 50, 1756–1765.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838.
- Lu, Y., Roy, S., Nuovo, G., Ramaswamy, B., Miller, T., Shapiro, C., Jacob, S.T., Majumder, S., 2011. Anti-microRNA-222 (anti-miR-222) and -181B suppress growth of tamoxifen-resistant xenografts in mouse by targeting TIMP3 protein and modulating mitogenic signal. *J. Biol. Chem.* 286, 42292–42302.
- Masaki, T., Chiba, S., Noguchi, H., Yasuda, T., Tobe, K., Suzuki, R., Kadowaki, T., Yoshimatsu, H., 2004. Obesity in insulin receptor substrate-2-deficient mice: disrupted control of arcuate nucleus neuropeptides. *Obes. Res.* 12, 878–885.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J., 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 10, R64.
- Mistry, A.M., Swick, A., Romsos, D.R., 1999. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am. J. Physiol.* 277, R742–747.
- Pardini, A.W., Nguyen, H.T., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Williams, D.L., Kim, F., Schwartz, M.W., 2006. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res.* 1112, 169–178.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F., 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* 269, 540–543.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., Horvath, T.L., 2004. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110–115.
- Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., Stoffel, M., 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226–230.
- Poy, M.N., Sprauger, M., Stoffel, M., 2007. MicroRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes. Metab.* 9, 67–73.
- Proulx, K., Richard, D., Walker, C.D., 2002. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 143, 4683–4692.
- Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., 2008. High-throughput real-time PCR. *Methods Mol. Biol.* 429, 89–98.
- Schneeberger, M., Altirriba, J., Garcia, A., Esteban, Y., Castano, C., Garcia-Lavandera, M., Alvarez, C.V., Gomis, R., Claret, M., 2012. Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol. Metab.* 2, 74–85.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., Greenberg, M.E., 2006. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283–289.
- Shpilman, M., Niv-Spector, L., Katz, M., Varol, C., Solomon, G., Ayalon-Soffer, M., Boder, E., Halpern, Z., Elinav, E., Gertler, A., 2011. Development and characterization of high affinity leptins and antagonists. *J. Biol. Chem.* 286, 4429–4442.
- Wienholds, E., Plasterk, R.H., 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 579, 5911–5922.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Zhang, W., Della-Fera, M.A., Hartzell, D.L., Hausman, D., Baile, C.A., 2008. Adipose tissue gene expression profiles in *ob/ob* mice treated with leptin. *Life Sci.* 83, 35–42.
- Zhang, W., Ambati, S., Della-Fera, M.A., Choio, Y., Baile, C.A., 2011. Leptin modulated changes in adipose tissue protein expression in *ob/ob*. *Obesity* 19, 255–261.



An assessment of bacterial small RNA target prediction programs

Adrien Pain, Alban Ott, Hamza Amine, Tatiana Rochat, Philippe Bouloc & Daniel Gautheret

To cite this article: Adrien Pain, Alban Ott, Hamza Amine, Tatiana Rochat, Philippe Bouloc & Daniel Gautheret (2015) An assessment of bacterial small RNA target prediction programs, RNA Biology, 12:5, 509-513, DOI: [10.1080/15476286.2015.1020269](https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020269)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2015.1020269>



© 2015 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC
Adrien Pain, Alban Ott, Hamza Amine, Tatiana Rochat, Philippe Bouloc, and Daniel Gautheret
Accepted author version posted online: 11 Mar 2015.



View supplementary material [↗](#)



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 754



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 4 View citing articles [↗](#)

An assessment of bacterial small RNA target prediction programs

Adrien Pain^{†,‡}, Alban Ott[†], Hamza Amine, Tatiana Rochat[§], Philippe Bouloc, and Daniel Gautheret*

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS; Université Paris-Sud; Orsay Cedex, France

[†]These authors equally contributed to this work.

Present affiliations: [‡]Department of Parasites and Insect Vectors; Unit of Insect Vector Genetics and Genomics; CNRS Unit of Hosts, Vectors, and Pathogens (URA3012); Institut Pasteur; Paris, France; [§]Molecular Virology and Immunology (UR892); INRA; Jouy en Josas, France

Keywords: bacteria, sRNA, sRNA target prediction

Most bacterial regulatory RNAs exert their function through base-pairing with target RNAs. Computational prediction of targets is a busy research field that offers biologists a variety of web sites and software. However, it is difficult for a non-expert to evaluate how reliable those programs are. Here, we provide a simple benchmark for bacterial sRNA target prediction based on trusted *E. coli* sRNA/target pairs. We use this benchmark to assess the most recent RNA target predictors as well as earlier programs for RNA-RNA hybrid prediction. Moreover, we consider how the definition of mRNA boundaries can impact overall predictions. Recent algorithms that exploit both conservation of targets and accessibility information offer improved accuracy over previous software. However, even with the best predictors, the number of true biological targets with low scores and non-targets with high scores remains puzzling.

Introduction

Identification of regulatory small RNAs (sRNAs) in bacterial species is rapidly advancing owing to recent improvement of bio-informatics and sequencing technologies.¹ Bacterial sRNAs act usually through sequence-specific binding to target mRNAs, leading to altered stability or translational repression/activation of their targets.² In the order of 100 to 200 sRNAs are present in a typical bacterial genome and each sRNA may regulate a dozen or more targets, making the sRNA/mRNA interaction network a significant part of the overall gene regulation network. Biological functions controlled by sRNAs are diverse, related to stress

responses as well as carbon and amino acid metabolism, virulence and cellular development.³

As sRNA collections build up, the main bottleneck in understanding bacterial sRNA function has now shifted to the question of target prediction. Experimental validation of specific sRNA/mRNA pairs using reporter gene assays or compensatory mutations of binding sites is labor intensive,⁴ and high throughput *in vitro* screens are subject to high rates of false positives.⁵ On the other hand, computational target prediction is challenging since sRNAs and their target often form imperfect and relatively short RNA-RNA hybrids that are not easily distinguishable from many other hybrids formed by random pairs of transcripts. Yet, computational methods have recently benefited from new algorithms and the introduction of RNA accessibility and conservation information that improved their performances.^{6–8}

Here, we evaluate computational target prediction methods using a collection of trusted, experimentally validated sRNA/mRNA pairs in *E. coli*. We designed a benchmark system so that wet lab scientists can easily interpret it for practical purposes. We also evaluated program speeds and abilities to locate the actual duplex region in each sRNA/mRNA pair.

Results

Target predictors

Programs for the identification of RNA-RNA interactions can be grouped in 3 main categories that we term “alignment-like,” “inter-RNA” and “independent fold.” The “alignment-like” category includes programs such as Guugle⁹ and RIssearch¹⁰ that can quickly scan large sequence files for reverse complements of a given RNA sequence. While Guugle looks only for stretches of Watson-Crick or G:U matches, RIssearch implements a Turner-like energy model¹¹ and allows gaps in the base paired segments. The “inter-RNA” category includes predictors that use a nearest neighbor thermodynamic model restricted to interactions between sRNA and mRNA, neglecting intramolecular base-pairs. Representative programs in this class are Pairfold,^{12,13} RNACofold,¹⁴ TargetRNA,¹⁵ RNAplex,⁶ RNAhybrid,^{16,17} and RNAduplex.¹⁸ These programs identify intermolecular contacts and compute a binding free energy for the interaction. RNACofold

© Adrien Pain, Alban Ott, Hamza Amine, Tatiana Rochat, Philippe Bouloc, and Daniel Gautheret

*Correspondence to: Daniel Gautheret; Email: daniel.gautheret@u-psud.fr

Submitted: 09/11/2014; Revised: 02/04/2015; Accepted: 02/13/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2015.1020269>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

and Pairfold achieve this by considering the joint structure predicted after concatenating the 2 RNA sequences. The “independent fold” approach analyzes the secondary structure folding landscape of each RNA independently and models the total binding energy as a sum of 2 contributions. RNAup¹⁹ and IntaRNA⁷ are the major programs in this class. Finally, a recent generation of programs including CopraRNA^{20,21} and TargetRNA2²² combine the benefits of the “inter-RNA” class of programs to the use of conservation information. While TargetRNA2 requires conservation of the sRNA region involved in target binding, based on observations by Peer and Margalit,²³ CopraRNA uses the conservation of the interaction itself.

Another, more practical, categorization of RNA target identification software has on one hand actual target predictors, *i.e.* programs that identify and score the most favorable local interaction (CopraRNA, IntaRNA, RNAplex, RNAup, TargetRNA2) and on the other hand programs that model the full hybrid formed between the small RNA and the longer RNA (RNAhybrid, RNAduplex, RNAcofold, Pairfold). While the latter category can be suitable to microRNA/mRNA binding analysis, where the 21 nt RNA can be bound almost entirely to its target, results are more difficult to interpret when dealing with bacterial sRNAs that are generally over 100 nt long and are bound to the target over a small fraction of their size.

The pros and cons of sRNA target prediction algorithms have been reviewed.²⁴ The goal we set here is to evaluate the ability of programs to differentiate a *bona fide* sRNA/mRNA regulatory pair from a random duplex that may form between any transcripts in a cell. To this aim, we need to rank RNA-RNA duplexes and thus to rely on scores or free energy values provided by the programs. This requirement excludes programs whose energy model is too simplistic, such as Google or RIssearch. Although RIssearch does compute free energy values, the authors recommend the program to be used for fast screening of potential pairs, but not to evaluate specific interactions.

We included in our comparison programs from the major categories above, including the most recent bacterial sRNA target predictors CopraRNA, TargetRNA (in its last implementation TargetRNA2²²) and IntaRNA, programs for local hybrid prediction that can deal with both bacterial sRNAs and miRNAs (RNAup, RNAplex also known as its web server implementation RNAPredictor²⁵), and programs predicting full RNA-RNA hybrids, including Pairfold, RNAcofold, RNAhybrid and RNAduplex.

We ran IntaRNA, RNAplex, RNAup, RNAhybrid, RNAduplex, RNAcofold and Pairfold using Unix command line versions and CopraRNA and TargetRNA2 from their respective web servers (see Suppl. Methods).

Benchmark sets and search domains

Escherichia coli is the organism with the highest number of experimentally validated sRNA/target pairs. We compiled a list of 102 “trusted” sRNA/target pairs involving 22 different sRNAs (Table S1), each one being supported by at least one published experimental evidence from the list described in Methods. This includes *E. coli* pairs from the datasets of Peer and Margalit²³ and Wright et al.,²⁰ plus a few additions from the literature.^{26,27}

Bacterial small RNAs are known to interact preferentially with mRNA 5′ regions with few exceptions to this rule (e.g., see ref.^{28,29}). Within our data set, all pairs, except one, are found to occur in the mRNA region located −150/+100 nucleotides (nt) around the start codon (Fig. S1). A common practice that consists in restricting sRNA target searches to the −200/+100 region (e.g., see ref.²⁰) around the start codon of all mRNAs is thus justified at least for enteric bacteria. Indeed, restricting the search space to the 5′ region efficiently reduces false positive occurrences and computing time. However, bacterial mRNAs often have short 5′ UTRs that do not extend much upstream of the Shine-Dalgarno sequence. Therefore, since the long 200 nt upstream region may be a source of false positives, this artifact can be avoided when exact transcription starts are known. Such information requires massive, strand-specific sequencing of transcripts and is still rarely available. However, this situation is quickly changing and, for certain bacteria including *E. coli*, accurate UTR information is already available.³⁰ Thus, we asked whether a precise delineation of UTRs could improve target identification. When possible, we performed predictions on 2 target data sets: one made of arbitrary −200 / +100 nt regions around each start codon (hereafter named “default UTRs”) and one made of regions predicted from publicly available strand-specific RNA-seq data (hereafter named “real UTRs”). Note that we also included in our analysis 5′ regions of open reading frames located in polycistronic genes, as these regions are also subject to regulation as exemplified by the *manXYZ* operon mRNA targeted at 2 locations by the sRNA SgrS,³¹ or the *Staphylococcus aureus opp3* operon mRNA containing at least 2 RsaE-binding sites.³² Details of the 5′ UTR definition procedures are provided in Methods and Suppl. Methods.

Rank-based prediction performance

Our first performance measure aimed at addressing the following question: how many putative targets for a given sRNA should be experimentally tested (for instance using a reporter assay) before finding the first true target? Programs were run using the best options suggested by authors. RNA accessibility information, which is known to improve target prediction significantly, was selected when possible.^{19,33} Programs from websites (*i.e.*, CopraRNA, TargetRNA2) were run using preselected mRNA target sequences that correspond to “default UTRs” as defined above. These servers cannot take arbitrary lists of target sequences as input. Therefore tests with “real UTR” targets were limited to programs ran from the command line. Parameter details are presented in Suppl. Methods.

Putative targets were ranked by scores or free energy values provided by each program. The median rank is the median position of the highest ranking validated target among predicted targets for all sRNAs in the dataset (Fig. 1A–B). Median ranks range from 4 (CopraRNA) to 1340 (RNAcofold). Expectedly, programs designed for evaluating local interactions (CopraRNA, IntaRNA, RNAplex, RNAup, TargetRNA2) perform far better than programs computing complete hybrids. In this latter category, RNAhybrid, RNAduplex, perform significantly better due to their free energy scores restricted to intermolecular base-pairs.

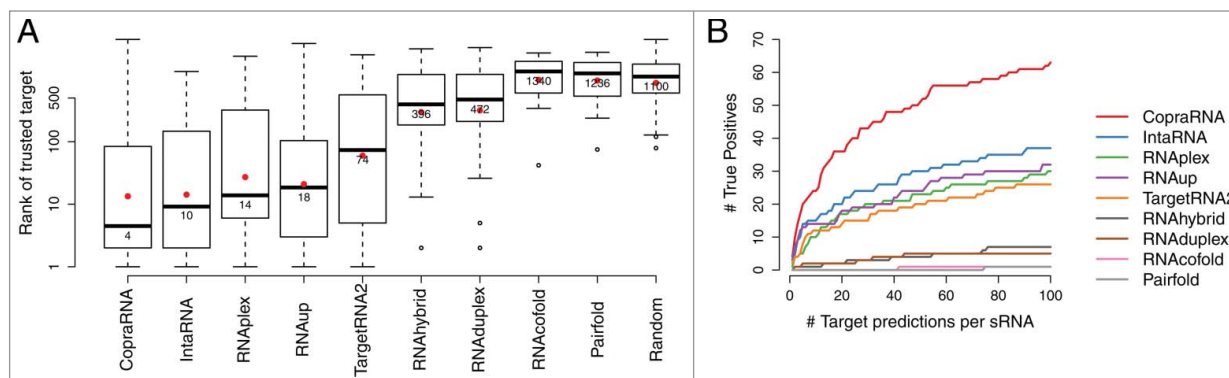


Figure 1. Two representations of target predictor performances. **(A)** Rank distribution of trusted targets (lower=better). For each program, the distribution shows the ranks of the best ranking target of each sRNA (22 sRNAs). Horizontal lines and numbers indicate median ranks, red dots indicate mean ranks. **(B)** ROC-like curves. For each program, the curve shows the number of trusted pairs predicted by the program (Y axis) among the X best ranking predictions (X-axis).

The least performing programs RNAcofold and Pairfold are both “concatenation” algorithms that are not intended to evaluate the binding energy of the complex and therefore cannot perform any better than a random ranking.

Our test probably underestimates the performance of programs since some of the pairs ranking before the first confirmed target are also possibly true targets. Nevertheless, some sRNA/target pairs rank very poorly, even by the best performing predictors (Fig. 1A), which questions their presence in our benchmark set. Indeed, some sRNA/target pairs are part of the trusted pair list because target expression is affected by the amount of the corresponding sRNA. However, this effect may occur indirectly in the absence of any contact between the 2 RNAs. To test whether putative indirect pairs may have impacted our benchmark, we considered only pairs for which we had direct evidence of sRNA/target interaction (82 pairs, see Table S1 and Methods). There was no improvement of prediction accuracy over the full data set (Fig. S2A), suggesting the presence of indirect pairs in our dataset is not a reason for the low ranking of some actual targets. Further inspection of poorly ranked trusted sRNA/target pairs shows that the same pairs tend to be missed by all predictors. Typical mispredictions involve pairs with target sites located 5' of upstream

genes such as in *RyhB/fur* mRNA³⁴ and hybrid structures formed by double kissing complexes such as in *OxyS/fhlA* mRNA.³⁵

We tested the effect of using the “real” UTR sequences (RNA-seq-based UTRs) of mRNAs instead of arbitrary upstream regions (−200 nt before AUG codon) on prediction performance (Table 1). Using “real” UTRs improved results moderately (AUC gains of 4.9% to 17.5%) albeit not significantly for most predictors. We observed a significant AUC improvement (Wilcoxon $P = 0.03$) only for concatenation methods RNAcofold and Pairfold, however this should be put into perspective as these methods had a very small AUC to start with. Yet, we may hypothesize that more accurate mRNA boundaries can improve free energy estimations of the hybrid in some cases.

The best prediction accuracy overall was obtained using CopraRNA, suggesting an advantage to a method using both RNA accessibility and conservation information, in line with the authors own estimation.²⁰ Although CopraRNA performed best overall, it should be noted that its use is limited compared to other programs since it requires an homolog set for each sRNA of interest and targets are evaluated only in a predefined list of genomes.

Assessing other predictor qualities

While the above comparison used the ranks of the best scoring targets of each sRNA, we found interesting to analyze ranks of all trusted targets combined. When all 102 trusted targets are considered, median ranks for all programs increase mathematically (Fig. S3). However, considering that our test set contains only 4–5 targets per sRNA, these new median ranks ranging from 50 to

Table 1. Area under ROC-like curve (AUC) for target prediction with 9 programs, using default UTR or “real” RNA-seq-derived UTRs

Program	AUC default UTR	AUC real UTR	AUC gain (%)
CopraRNA	46.41	na*	na*
IntaRNA	27.02	28.83	6.3
RNAplex	20.81	21.88	4.9
RNAup	22.75	27.59	17.5
TargetRNA2	18.52	na*	na*
RNAhybrid	4.14	4.38	5.5
RNAduplex	3.86	3.55	−8.7
RNAcofold	0.57	1.42	59.9
Pairfold	0.25	1.22	79.5

*Programs CopraRNA and TargetRNA2 can be run only using default UTRs.

Table 2. Recall of experimentally demonstrated base pairs (%)

IntaRNA/CopraRNA*	76.7
RNAplex	73.6
TargetRNA2	55.9
RNAup	78.9

*IntaRNA and CopraRNA predict the same hybrid region.

Table 3. Average run time for matching 1 sRNA to all 4317 *E. coli* mRNAs

TargetRNA2 (web site)	1 min
RNAplex (incl. accessibility calculation)	1 min
RNAhybrid	2 min
RNAcofold	23 min
RNAup	55 min
IntaRNA	66 min
RNA duplex	75 min
CopraRNA (website)	105 min
Pairfold	120 min

600 for the best predictors are a good indication of how predicted target sets remain populated mostly by unconfirmed targets.

We also tested how accurately each program was able to determine the correct hybrid regions assuming a correct sRNA/mRNA pair was detected. Since experimental validations of sRNA/target pairs do not always specify the duplex structure, we focused on the set of 55 pairs supported by compensatory mutations (see Methods). We excluded from this test all programs that predict a hybrid structure involving the full sRNA. **Table 2** shows the fraction of compensatory mutations that are indeed found within the predicted hybrid regions. Interestingly, this ratio is far from perfect (56% to 79%) even though we only considered correct RNA/target pairs.

Finally, we compared the speed of the different programs (**Table 3**). Program Texte vary by 2 orders of magnitude, the fastest programs are able to match a sRNA to the complete set of *E. coli* mRNAs in about one minute while some require one to 2 hours to complete the same task. The best performing predictors are generally the slowest, with the exception of RNAplex, which achieves both high prediction accuracy and fast running time.

Conclusion

RNA target prediction programs have improved continuously over the past 10 years owing to algorithmic innovation, as well as the exploitation of structural and evolutionary constraints. We confirm here that CopraRNA, a predictor that uses both RNA accessibility and evolutionary conservation of the interaction outperforms other programs in terms of ranking actual sRNA/mRNA pairs. However, conservation data is not often available and programs that predict sRNA targets based on sequence alone are still much needed. IntaRNA, RNAplex and RNAup are the best predictors in this class. The presence of RNAplex in this shortlist is surprising as this program is up to 100 times faster than competitors owing to a simplified structural model. Furthermore, our tests do not show significant accuracy gains from using RNA-seq derived UTRs instead of fixed-length 5' regions, supporting the common practice for defining mRNA target regions.

In spite of software improvements, this study is also a reminder that the list of highest scoring mRNAs for a given *E. coli* sRNA remains populated by a majority of unconfirmed targets. One possible explanation for this could be that many

true targets have not been validated yet, which is unlikely in this well-studied bacterium. Alternatively, *in vivo* sRNA-mRNA interaction can be positively affected by RNA-chaperon proteins (e.g. Hfq), which may significantly confuse computed targets ranks. Another reason that may explain the relatively poor ranking of many true targets is related to the way programs score an RNA-RNA pair. Predictors score targets based on binding free energy values (as well as conservation for CopraRNA and targetRNA2). However, a high binding energy does not necessarily imply an efficient processing of the mRNA target by the Hfq-sRNA complex. The situation in bacteria could be similar to that of miRNA-target pairs in eukaryotes, where, due to miRNA turnover³⁶ lower stability of the microRNA/target duplex may favor transient interactions and therefore an efficient down-regulation of multiple targets.³⁷ The large accuracy gain of CopraRNA obtained by introducing phylogenetic conservation in its scoring system illustrates again that there is much more than thermodynamics in understanding sRNA-based regulation.

Methods

Definition of UTR regions: «default» UTR regions were automatically extracted from MG1655 *E. coli* K12 genome, selecting the −200/+100 fragments around each start codon (4317 regions). «Real» UTR regions were extracted based on RNA-seq-derived transcriptional start site (TSS).³⁰ For each TSS, the region from the TSS to 100 nt past the start codon was extracted. Further details are provided in Suppl. methods.

Experimentally validated pairs (**Table S1**) were classified as described based on supporting experimental evidence²³: (a) sRNA affecting the level of a protein or a translational fusion; (b) sRNA gene affecting the level of a targeted mRNA; (c) sRNA and mRNA forming a stable duplex *in vitro*; (d) sRNA mutation affecting a regulation; (e) sRNA mutations affecting a regulation rescued by compensatory mutations; (f) *in vitro* chemical/enzymatic probing of the sRNA/target duplex; (g) sRNA/target duplex cleaved by RNase III; (h) sRNA preventing or allowing ribosome binding demonstrated by toe-printing assay. We considered that the criteria c) to h) demonstrated direct or near-direct interactions for 82 sRNA/mRNA duplexes

Performance measures (**Fig. 1 and S2**) were obtained by running target predictors with each sRNA against the complete set of *E. coli* mRNAs (using “default” or “real” UTRs). Ranks of trusted targets (**Fig. 1A and S2A**) were computed based on the best ranking target of each sRNA. For the “random” distribution, we performed for each sRNA a set of N random draws between one and the total number of *E. coli* mRNAs, where N is the number of known targets for this sRNA, and kept the lowest ranking value. Receiver operating characteristic (ROC)-like curves (**Fig. 1B and S2B**) were obtained by counting the number of true targets found among the best X candidates (shown on X axis). Program versions, options and command lines are provided in Suppl. methods. Accessibility information was computed prior

to RNAplex runs using RNAplfold.¹⁴ CopraRNA requires homologous sRNA sequences from other species and we used those provided by the CopraRNA server whenever possible. For IstR, RseX, RydC we provided our own sets (see Suppl. Files).

Recall of experimentally validated base pairs: 55 sRNA/target pairs have experimental support in the form of compensatory mutations. For each pair, we measured the ratio of experimentally validated bps that were included in the predicted hybrid region. This ratio was then averaged over all 55 sRNA/target pairs to produce percentages in Table 2. As TargetRNA2 could predict only 49 of the 55 experimentally supported pairs, the average value was corrected accordingly.

References

- Lu X, Goodrich-Blair H, Tjaden B. Assessing computational tools for the discovery of small RNA genes in bacteria. *RNA* 2011; 17:1635-47; PMID:21768221; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2689811>
- Gottesman S, Storz G. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:pil: a003798; PMID:20980440; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>
- Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 2011; 43:880-91; PMID:21925377; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>
- Vogel J, Bartels V, Tang TH, Churakov G, Slagter-Jager JG, Huttenhofer A, Wagner EG. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:6435-43; PMID:14602901; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg867>
- Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JC, Vogel J. Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 2008; 4:e1000163; PMID:18725932; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000163>
- Tafer H, Hofacker IL. RNAplex: a fast tool for RNA-RNA interaction search. *Bioinformatics* 2008; 24:2657-63; PMID:18434344; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn193>
- Busch A, Richter AS, Backofen R. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. *Bioinformatics* 2008; 24:2849-56; PMID:18940824; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn544>
- Will S, Joshi T, Hofacker IL, Stadler PF, Backofen R. LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs. *RNA* 2012; 18:900-14; PMID:22450757; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.029041.111>
- Gerlach W, Giegerich R. GUUGle: a utility for fast exact matching under RNA complementary rules including G-U base pairing. *Bioinformatics* 2006; 22:762-4; PMID:16403789; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btk041>
- Wenzel A, Akbasli E, Gorodkin J. RIssearch: fast RNA-RNA interaction search using a simplified nearest-neighbor energy model. *Bioinformatics* 2012; 28:2738-46; PMID:22923300; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts519>
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; 288:911-40; PMID:10329189; <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2700>
- Andronescu M, Zhang ZC, Condon A. Secondary structure prediction of interacting RNA molecules. *J Mol Biol* 2005; 345:987-1001; PMID:15644199; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.082>
- Tulpan D, Andronescu M, Chang SB, Shortreed MR, Condon A, Hoos HH, Smith LM. Thermodynamically based DNA strand design. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:4951-64; PMID:16145053; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki773>
- Bernhart SH, Tafer H, Muckstein U, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. Partition function and base pairing probabilities of RNA heterodimers. *Algorithms Mol Biol* 2006; 1:3; PMID:16722605; <http://dx.doi.org/10.1186/1748-7188-1-3>
- Tjaden B. TargetRNA: a tool for predicting targets of small RNA action in bacteria. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:W109-13; PMID:18477632; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn264>
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 2004; 10:1507-17; PMID:15383676; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.5248604>
- Kruger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:W451-4; PMID:16845047; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl243>
- Hofacker IL, Fontana W, Stadler PF, Bonhoeffer LS, Tacker M, Schuster P. Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatsh Chem* 1994; 125:167-88; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00818163>
- Muckstein U, Tafer H, Hackermüller J, Bernhart SH, Stadler PF, Hofacker IL. Thermodynamics of RNA-RNA binding. *Bioinformatics* 2006; 22:1177-82; PMID:16446276; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl024>
- Wright PR, Richter AS, Papenfort K, Mann M, Vogel J, Hess WR, Backofen R, Georg J. Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E3487-96; PMID:23980183; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1303248110>
- Wright PR, Georg J, Mann M, Sorescu DA, Richter AS, Lott S, Kleinkauf R, Hess WR, Backofen R. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res* 2014; 42 (Web Server issue):W119-23; PMID:24838564
- Kery MB, Feldman M, Livny J, Tjaden B. TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res* 2014; 42 (Web Server issue):W124-9; PMID:24753424
- Peer A, Margalit H. Accessibility and evolutionary conservation mark bacterial small-rna target-binding regions. *J Bacteriol* 2011; 193:1690-701; PMID:21278294; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01419-10>
- Backofen R, Hess WR. Computational prediction of sRNAs and their targets in bacteria. *RNA Biol* 2010; 7:33-42; PMID:20061798; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.1.10655>
- Eggenhofer F, Tafer H, Stadler PF, Hofacker IL. RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:W149-54; PMID:21672960; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr467>
- Jorgensen MG, Nielsen JS, Boysen A, Franch T, Moller-Jensen J, Valentin-Hansen P. Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2012; 84:36-50; PMID:22250746; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07976.x>
- Beisel CL, Storz G. The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2011; 41:286-97; PMID:21292161; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.027>
- Lease RA, Belfort M. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:9919-24; PMID:10954740; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.170281497>
- Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:840-6; PMID:19620966; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1631>
- Li S, Dong X, Su Z. Directional RNA-seq reveals highly complex condition-dependent transcriptomes in *E. coli* K12 through accurate full-length transcripts assembling. *BMC Genomics* 2013; 14:520; PMID:23899370; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-520>
- Rice JB, Balasubramanian D, Vanderpool CK. Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:E2691-8; PMID:22988087; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1207927109>
- Bohn C, Rigoulay C, Chabelskaya S, Sharma CM, Marchais A, Skorski P, Borezée-Durant E, Barbet R, Jacquet E, Jacq A, et al. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:6620-36; PMID:20511587; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq462>
- Richter AS, Backofen R. Accessibility and conservation: general features of bacterial small RNA-mRNA interactions? *RNA Biol* 2012; 9:954-65; PMID:22767260; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.20294>
- Vecerek B, Moll I, Blasi U. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J* 2007; 26:965-75; PMID:17268550; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601553>
- Argaman L, Altuvia S. fhlA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J Mol Biol* 2000; 300:1101-12; PMID:10903857; <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.3942>
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297:2056-60; PMID:12154197; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1073827>
- Kozomara A, Hunt S, Ninova M, Griffiths-Jones S, Ronshaugen M. Target repression induced by endogenous microRNAs: large differences, small effects. *PLoS One* 2014; 9:e104286; PMID:25141277; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104286>

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

This work was funded by Agence Nationale pour la Recherche (grant 2010-BLAN-1602-01) 'Duplex-omics'.

Supplemental Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Ghani, M.A., and DeFronzo, R.A. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 476279.
- Accili, D., Drago, J., Lee, E.J., Johnson, M.D., Cool, M.H., Salvatore, P., Asico, L.D., José, P.A., Taylor, S.I., and Westphal, H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* 12, 106–109.
- Adams, M.J., Blundell, T.L., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Vijayan, M., Baker, E.N., Harding, M.M., Hodgkin, D.C., Rimmer, B., and Sheat, S. (1969). Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature* 224, 491–495.
- Ae Park, S., Choi, M.-S., Cho, S.-Y., Seo, J.-S., Jung, U.J., Kim, M.-J., Sung, M.-K., Park, Y.B., and Lee, M.-K. (2006). Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci.* 79, 1207–1213.
- Agrawal, R., and Gomez-Pinilla, F. (2012). “Metabolic syndrome” in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J. Physiol.* 590, 2485–2499.
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., and 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.
- Ahima, R.S. (2008). Revisiting leptin’s role in obesity and weight loss. *J. Clin. Invest.* 118, 2380–2383.
- Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 1–16.
- 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., et al. (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.

- Alzamendi, A., Giovambattista, A., Raschia, A., Madrid, V., Gaillard, R.C., Rebolledo, O., Gagliardino, J.J., and Spinedi, E. (2009). Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine* 35, 227–232.
- Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermúdez-Humarán, L.G., Smirnova, N., Bergé, M., Sulpice, T., Lahtinen, S., et al. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol. Med.* 3, 559–572.
- Anand, B.K., and Brobeck, J.R. (1951). Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 77, 323–324.
- Anand, B.K., Dua, S., and Shoenberg, K. (1955). Hypothalamic control of food intake in cats and monkeys. *J. Physiol.* 127, 143–152.
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol. CB* 8, 684–691.
- Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129–157.
- Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., and Bastard, J.-P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 34, 2–11.
- Aquilante, C.L., Kosmiski, L.A., Knutsen, S.D., and Zineh, I. (2008). Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults. *Metabolism.* 57, 494–501.
- Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 191–198.
- Arner, P. (2005). Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 48, 2203–2205.

- Aronson, D., Sella, R., Sheikh-Ahmad, M., Kerner, A., Avizohar, O., Rispler, S., Bartha, P., Markiewicz, W., Levy, Y., and Brook, G.J. (2004). The association between cardiorespiratory fitness and C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* *44*, 2003–2007.
- Aruna, B., Islam, A., Ghosh, S., Singh, A.K., Vijayalakshmi, M., Ahmad, F., and Ehtesham, N.Z. (2008). Biophysical analyses of human resistin: oligomer formation suggests novel biological function. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 12457–12466.
- Asante-Appiah, E., and Kennedy, B.P. (2003). Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E663–E670.
- Backer, J.M., Schroeder, G.G., Cahill, D.A., Ullrich, A., Siddle, K., and White, M.F. (1991). Cytoplasmic juxtamembrane region of the insulin receptor: a critical role in ATP binding, endogenous substrate phosphorylation, and insulin-stimulated bioeffects in CHO cells. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 6366–6372.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* *394*, 790–793.
- Baltensperger, K., Kozma, L.M., Cherniack, A.D., Klarlund, J.K., Chawla, A., Banerjee, U., and Czech, M.P. (1993). Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. *Science* *260*, 1950–1952.
- Banerjee, M., and Saxena, M. (2012). Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *413*, 1163–1170.
- Bang, H.O., Dyerberg, J., and Nielsen, A.B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1143–1145.
- Banks, W.A. (2010). Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum Nutr.* *63*, 102–110.
- Banks, W.A., and Farrell, C.L. (2003). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *285*, E10–E15.

- Barnathan, G. (2007). Sources connues et potentielles de DHA pour les besoins de l'homme. *Ol. Corps Gras Lipides* **14**, 35–43.
- Barnes, K.M., and Miner, J.L. (2009). Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr. Protein Pept. Sci.* **10**, 96–107.
- Baron, A.D., and Brechtel, G. (1993). Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. *Am. J. Physiol.* **265**, E61–E67.
- Bastard, J.-P., Lagathu, C., Maachi, M., Tran Van Nhieu, J., Caron, M., and Capeau, J. (2005). Interleukine-6 et insulino-résistance dans l'obésité. *Médecine Nutr.* **41**, 57–62.
- Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., and Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4–12.
- Bennett, A.J., Billett, M.A., Salter, A.M., Mangiapane, E.H., Bruce, J.S., Anderton, K.L., Marenah, C.B., Lawson, N., and White, D.A. (1995). Modulation of hepatic apolipoprotein B, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and low-density lipoprotein receptor mRNA and plasma lipoprotein concentrations by defined dietary fats. Comparison of trimyristin, tripalmitin, tristearin and triolein. *Biochem. J.* **311** (Pt 1), 167–173.
- Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Migrenne, S., Lefevre, A.-L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., et al. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* **119**, 2577–2589.
- Benomar, Y., Roy, A.-F., Aubourg, A., Djiane, J., and Taouis, M. (2005a). Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem. J.* **388**, 929–939.
- Benomar, Y., Wetzler, S., Larue-Achagiotis, C., Djiane, J., Tomé, D., and Taouis, M. (2005b). In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol. Cell. Endocrinol.* **242**, 59–66.

- Benomar, Y., Gertler, A., De Lacy, P., Crépin, D., Ould Hamouda, H., Riffault, L., and Taouis, M. (2013a). Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* 62, 102–114.
- Benomar, Y., Gertler, A., De Lacy, P., Crépin, D., Ould Hamouda, H., Riffault, L., and Taouis, M. (2013b). Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* 62, 102–114.
- Benomar, Y., Amine, H., Crépin, D., Al Rifai, S., Riffault, L., Gertler, A., and Taouis, M. (2016). Central Resistin/TLR4 impairs adiponectin signaling contributing to insulin and FGF21 resistance. *Diabetes*.
- Berghoff, M., Hochberg, A., Schmid, A., Schlegel, J., Karrasch, T., Kaps, M., and Schäffler, A. (2015). Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid (CSF). *Eur. J. Clin. Invest.*
- Bergman, R.N., Finegood, D.T., and Ader, M. (1985). Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr. Rev.* 6, 45–86.
- Bernstein, L.E., Berry, J., Kim, S., Canavan, B., and Grinspoon, S.K. (2006). Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. *Arch. Intern. Med.* 166, 902–908.
- Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 393–428.
- Bertolani, C., Sancho-Bru, P., Failli, P., Bataller, R., Aleffi, S., DeFranco, R., Mazzeinghi, B., Romagnani, P., Milani, S., Ginés, P., et al. (2006). Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* 169, 2042–2053.
- Bi, P., Shan, T., Liu, W., Yue, F., Yang, X., Liang, X.-R., Wang, J., Li, J., Carlesso, N., Liu, X., et al. (2014). Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nat. Med.* 20, 911–918.
- Bickel, P.E. (2002). Lipid rafts and insulin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E1–E10.

- Bigorgne, A.E., Bouchet-Delbos, L., Naveau, S., Dagher, I., Prévot, S., Durand-Gasselin, I., Couderc, J., Valet, P., Emilie, D., and Perlemuter, G. (2008). Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 134, 1459–1469.
- Bjørbaek, C., and Kahn, B.B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 305–331.
- Björntorp, P. (1974). Effects of age, sex, and clinical conditions on adipose tissue cellularity in man. *Metabolism*. 23, 1091–1102.
- Bocarsly, M.E., Powell, E.S., Avena, N.M., and Hoebel, B.G. (2010). High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 101–106.
- Boden, G. (2004). Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 52, 375–378.
- Boden, G. (2008). Obesity and free fatty acids. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37, 635–646, viii – ix.
- Boden, G., Chen, X., Kolaczynski, J.W., and Polansky, M. (1997). Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Invest.* 100, 1107–1113.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 5789–5795.
- Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Bouret, S.G., and Simerly, R.B. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin. Genet.* 70, 295–301.
- Bray, G.A. (2004). The epidemic of obesity and changes in food intake: the Fluoride Hypothesis. *Physiol. Behav.* 82, 115–121.

Brobeck, J.R., Tepperman, J., and Long, C.N. (1943). Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat. *Yale J. Biol. Med.* 15, 831–853.

van den Brom, C.E., Huisman, M.C., Vlasblom, R., Boontje, N.M., Duijst, S., Lubberink, M., Molthoff, C.F.M., Lammertsma, A.A., van der Velden, J., Boer, C., et al. (2009). Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiovasc. Diabetol.* 8, 39.

Brown, R., Imran, S.A., Belsham, D.D., Ur, E., and Wilkinson, M. (2007). Adipokine gene expression in a novel hypothalamic neuronal cell line: resistin-dependent regulation of fasting-induced adipose factor and SOCS-3. *Neuroendocrinology* 85, 232–241.

Brüning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Hörsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., and Kahn, C.R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* 2, 559–569.

Buettner, R., Parhofer, K.G., Woenckhaus, M., Wrede, C.E., Kunz-Schughart, L.A., Schölmerich, J., and Bollheimer, L.C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 485–501.

Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L., and Tschopp, J. (1998). MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 12203–12209.

Calder, P.C. (2007). Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77, 327–335.

Calder, P.C., and Yaqoob, P. (2007). Lipid rafts--composition, characterization, and controversies. *J. Nutr.* 137, 545–547.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.

Cani, P.D., Osto, M., Geurts, L., and Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3, 279–288.

Capeau, J. (2007). The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. *J. Hepatol.* 47, 736–738.

Casaschi, A., Maiyoh, G.K., Adeli, K., and Theriault, A.G. (2005). Increased diacylglycerol acyltransferase activity is associated with triglyceride accumulation in tissues of diet-induced insulin-resistant hyperlipidemic hamsters. *Metabolism*. 54, 403–409.

Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Ramírez, B., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., Gil, M.J., Salvador, J., and Frühbeck, G. (2012). Increased tenascin C and Toll-like receptor 4 levels in visceral adipose tissue as a link between inflammation and extracellular matrix remodeling in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1880–E1889.

Certik, M., and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 1–14.

Chait, A., and Kim, F. (2010). Saturated Fatty Acids and Inflammation: Who Pays the Toll? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 692–693.

Chang, C.-Y., Kuan, Y.-H., Li, J.-R., Chen, W.-Y., Ou, Y.-C., Pan, H.-C., Liao, S.-L., Raung, S.-L., Chang, C.-J., and Chen, C.-J. (2013). Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J. Nutr. Biochem.* 24, 2127–2137.

Chartoumpekis, D.V., Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., and Papavassiliou, A.G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol. Med. Camb. Mass* 17, 736–740.

Chechi, K., Carpentier, A.C., and Richard, D. (2013). Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 24, 408–420.

Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., et al. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491–495.

Chen, L., Chen, R., Wang, H., and Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 508409.

Chen, Y.-H., Hung, P.-F., and Kao, Y.-H. (2005). IGF-I downregulates resistin gene expression and protein secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E1019–E1027.

Cheng, A., Dubé, N., Gu, F., and Tremblay, M.L. (2002). Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur. J. Biochem. FEBS* 269, 1050–1059.

Cheng, K.K.Y., Lam, K.S.L., Wang, B., and Xu, A. (2014). Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 3–13.

Cherng, J.-Y., and Shih, M.-F. (2005). Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci.* 76, 3001–3013.

Choi, K., and Kim, Y.-B. (2010). Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J. Intern. Med.* 25, 119–129.

Choi, S.M., Tucker, D.F., Gross, D.N., Easton, R.M., DiPilato, L.M., Dean, A.S., Monks, B.R., and Birnbaum, M.J. (2010). Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5009–5020.

Clark, S.F., Molero, J.C., and James, D.E. (2000). Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 275, 3819–3826.

Clément, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J.F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., et al. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92–97.

Coelho, M.S., Lopes, K.L., Freitas, R. de A., de Oliveira-Sales, E.B., Bergasmaschi, C.T., Campos, R.R., Casarini, D.E., Carmona, A.K., Araújo, M. da S., Heimann, J.C., et al. (2010). High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul. Pept.* 162, 61–67.

Cohen, A.W., Combs, T.P., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2003). Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1151–E1160.

Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., and Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295.

Cook, K.S., Groves, D.L., Min, H.Y., and Spiegelman, B.M. (1985). A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6480–6484.

Corcoran, M.P., Lamon-Fava, S., and Fielding, R.A. (2007). Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 662–677.

Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149, 6018–6027.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.

Cussac, D., Vidal, M., Leprince, C., Liu, W.Q., Cornille, F., Tiraboschi, G., Roques, B.P., and Garbay, C. (1999). A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13, 31–38.

Dalamaga, M. (2014). Resistin as a biomarker linking obesity and inflammation to cancer: potential clinical perspectives. *Biomark. Med.* 8, 107–118.

- Dalton, S., and Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 68, 597–612.
- Daquinag, A.C., Zhang, Y., Amaya-Manzanares, F., Simmons, P.J., and Kolonin, M.G. (2011). An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell* 9, 74–86.
- Daumerie, C.M., Woollett, L.A., and Dietschy, J.M. (1992). Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10797–10801.
- Davis, R.J. (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 459–467.
- Davis, J.E., Gabler, N.K., Walker-Daniels, J., and Spurlock, M.E. (2008). Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obes. Silver Spring Md* 16, 1248–1255.
- De Caterina, R., and Massaro, M. (2005). Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and pro-inflammatory genes. *J. Membr. Biol.* 206, 103–116.
- Deckelbaum, R.J., and Torrejon, C. (2012). The omega-3 fatty acid nutritional landscape: health benefits and sources. *J. Nutr.* 142, 587S – 591S.
- De Fea, K., and Roth, R.A. (1997). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 31400–31406.
- DeFronzo, R.A., and Matsuda, M. (2010). Reduced time points to calculate the composite index. *Diabetes Care* 33, e93.
- DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 *Suppl 2*, S157–S163.
- DeFronzo, R.A., Tobin, J.D., and Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* 237, E214–E223.

- Degerman, E., Landström, T.R., Wijkander, J., Holst, L.S., Ahmad, F., Belfrage, P., and Manganiello, V. (1998). Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods San Diego Calif* 14, 43–53.
- Delarue, J., Li, C.-H., Cohen, R., Corporeau, C., and Simon, B. (2006). Interaction of fish oil and a glucocorticoid on metabolic responses to an oral glucose load in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 95, 267–272.
- De Meyts, P. (2012). The insulin receptor isoform A: a mitogenic proinsulin receptor? *Endocrinology* 153, 2054–2056.
- De Meyts, P., and Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 769–783.
- Deng, R., and Chow, T.-J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc. Ther.* 28, e33–e45.
- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Hubbard, R.E., and Korber, F. (1989). Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly. *Br. Med. Bull.* 45, 4–18.
- Dey, D., Bhattacharya, A., Roy, S., and Bhattacharya, S. (2007). Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase Cepsilon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 474–479.
- Di Guglielmo, G.M., Drake, P.G., Baass, P.C., Authier, F., Posner, B.I., and Bergeron, J.J. (1998). Insulin receptor internalization and signalling. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 59–63.
- Dinarello, C.A., Simon, A., and van der Meer, J.W.M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 633–652.
- DiPilato, L.M., Ahmad, F., Harms, M., Seale, P., Manganiello, V., and Birnbaum, M.J. (2015). The Role of PDE3B Phosphorylation in the Inhibition of Lipolysis by Insulin. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2752–2760.

- Dombrowski, L., Faure, R., and Marette, A. (2000). Sustained activation of insulin receptors internalized in GLUT4 vesicles of insulin-stimulated skeletal muscle. *Diabetes* 49, 1772–1782.
- Dominguez, H., Storgaard, H., Rask-Madsen, C., Steffen Hermann, T., Ihlemann, N., Baunbjerg Nielsen, D., Spohr, C., Kober, L., Vaag, A., and Torp-Pedersen, C. (2005). Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J. Vasc. Res.* 42, 517–525.
- Dong, Y.-F., Liu, L., Lai, Z.-F., Yamamoto, E., Kataoka, K., Nakamura, T., Fukuda, M., Tokutomi, Y., Nako, H., Ogawa, H., et al. (2010). Aliskiren enhances protective effects of valsartan against type 2 diabetic nephropathy in mice. *J. Hypertens.* 28, 1554–1565.
- Dou, L., Zhao, T., Wang, L., Huang, X., Jiao, J., Gao, D., Zhang, H., Shen, T., Man, Y., Wang, S., et al. (2013). miR-200s contribute to interleukin-6 (IL-6)-induced insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 22596–22606.
- Drake, P.G., and Posner, B.I. (1998). Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase(s): role in insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 79–89.
- Drolet, R., Richard, C., Sniderman, A.D., Mailloux, J., Fortier, M., Huot, C., Rhéaume, C., and Tchernof, A. (2008). Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int. J. Obes.* 2005 32, 283–291.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., and Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300, 1574–1577.
- Dubuc, P.U. (1976). The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism.* 25, 1567–1574.
- Durrington, P.N., Bhatnagar, D., Mackness, M.I., Morgan, J., Julier, K., Khan, M.A., and France, M. (2001). An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridaemia. *Heart Br. Card. Soc.* 85, 544–548.

- Dyerberg, J., and Bang, H.O. (1979). Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet Lond. Engl.* 2, 433–435.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., and Goldfine, I.D. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747–758.
- Eck, M.J., Dhe-Paganon, S., Trüb, T., Nolte, R.T., and Shoelson, S.E. (1996). Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 85, 695–705.
- Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M., and Weinberg, R.A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45–51.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544–1548.
- Eldar-Finkelman, H., and Krebs, E.G. (1997). Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9660–9664.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 105, 1827–1832.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., and Van Obberghen, E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 15985–15991.
- Engelman, J.A., Berg, A.H., Lewis, R.Y., Lisanti, M.P., and Scherer, P.E. (2000). Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14, 1557–1569.

- Enser, M. (1972). Clearing-factor lipase in obese hyperglycaemic mice (ob-ob). *Biochem. J.* 129, 447–453.
- Erridge, C., and Samani, N.J. (2009). Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1944–1949.
- Esteve, E., Ricart, W., and Fernández-Real, J.M. (2009). Adipocytokines and Insulin Resistance. *Diabetes Care* 32, S362–S367.
- Fagerholm, S., Örtengren, U., Karlsson, M., Ruishalme, I., and Strålfors, P. (2009). Rapid Insulin-Dependent Endocytosis of the Insulin Receptor by Caveolae in Primary Adipocytes. *PLoS ONE* 4, e5985.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., and Bahouth, S.W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273–2282.
- Fan, Y., Rudert, W.A., Grupillo, M., He, J., Sisino, G., and Trucco, M. (2009). Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J.* 28, 2812–2824.
- Fantin, V.R., Lavan, B.E., Wang, Q., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1999). Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology* 140, 1329–1337.
- Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., and O'Rahilly, S. (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 879–884.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001). Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 1027–1031.
- Fedor, D., and Kelley, D.S. (2009). Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 12, 138–146.

- Ferreira, L., Teixeira-de-Lemos, E., Pinto, F., Parada, B., Mega, C., Vala, H., Pinto, R., Garrido, P., Sereno, J., Fernandes, R., et al. (2010). Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat). *Mediators Inflamm.* 2010, 592760.
- Fischer, H., Ellström, P., Ekström, K., Gustafsson, L., Gustafsson, M., and Svanborg, C. (2007). Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. *Cell. Microbiol.* 9, 1239–1251.
- Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., et al. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78–83.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., and Golenbock, D.T. (2004). Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 6, 1361–1367.
- Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I.D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3278–3288.
- Fresno, M., Alvarez, R., and Cuesta, N. (2011). Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 151–164.
- Friedman, J.M., Leibel, R.L., Siegel, D.S., Walsh, J., and Bahary, N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11, 1054–1062.
- Frontini, A., and Cinti, S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 11, 253–256.

- Fruman, D.A., Snapper, S.B., Yballe, C.M., Alt, F.W., and Cantley, L.C. (1999). Phosphoinositide 3-kinase knockout mice: role of p85alpha in B cell development and proliferation. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 624–629.
- Fu, Y., Luo, L., Luo, N., and Garvey, W.T. (2006). Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Metab.* 3, 28.
- Funaki, M. (2009). Saturated fatty acids and insulin resistance. *J. Med. Investig. JMI* 56, 88–92.
- Gammone, M.A., and D'Orazio, N. (2015). Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Mar. Drugs* 13, 2196–2214.
- Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M.J., and Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 277, 48115–48121.
- Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, D., Quon, M.J., Lefevre, M., and Ye, J. (2004). Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 2024–2034.
- Garcia, C., Fève, B., Ferré, P., Halimi, S., Baizri, H., Bordier, L., Guiu, G., Dupuy, O., Bauduceau, B., and Mayaudon, H. (2010). Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab.* 36, 327–338.
- Ghosh, S., Singh, A.K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., and Ehtesham, N.Z. (2003). The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene* 305, 27–34.
- Gingras, A.-A., White, P.J., Chouinard, P.Y., Julien, P., Davis, T.A., Dombrowski, L., Couture, Y., Dubreuil, P., Myre, A., Bergeron, K., et al. (2007). Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity. *J. Physiol.* 579, 269–284.

Girard, J., Ferré, P., and Foufelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* *17*, 325–352.

Glass, C.K., and Olefsky, J.M. (2012). Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* *15*, 635–645.

Gohda, J., Matsumura, T., and Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 2913–2917.

Golay, A., and Ybarra, J. (2005). Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *19*, 649–663.

Goldstein, B.J., Ahmad, F., Ding, W., Li, P.M., and Zhang, W.R. (1998). Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biochem.* *182*, 91–99.

Goldstein, B.J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M.F., and Harbeck, M. (2000). Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 4283–4289.

Gonzalez-Gay, M.A., De Matias, J.M., Gonzalez-Juanatey, C., Garcia-Porrúa, C., Sanchez-Andrade, A., Martin, J., and Llorca, J. (2006). Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *24*, 83–86.

González-Pérez, A., Horrillo, R., Ferré, N., Gronert, K., Dong, B., Morán-Salvador, E., Titos, E., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., Arroyo, V., et al. (2009). Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 1946–1957.

Goodpaster, B.H., Krishnaswami, S., Harris, T.B., Katsiaras, A., Kritchevsky, S.B., Simonsick, E.M., Nevitt, M., Holvoet, P., and Newman, A.B. (2005). Obesity, regional

body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch. Intern. Med.* 165, 777–783.

Gorden, P., and Gavrilova, O. (2003). The clinical uses of leptin. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 655–659.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.

Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109.

Gustavo Vazquez-Jimenez, J., Chavez-Reyes, J., Romero-Garcia, T., Zarain-Herzberg, A., Valdes-Flores, J., Manuel Galindo-Rosales, J., Rueda, A., Guerrero-Hernandez, A., and Alberto Olivares-Reyes, J. (2016). Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell. Signal.* 28, 53–59.

Haas, B., Schlinkert, P., Mayer, P., and Eckstein, N. (2012). Targeting adipose tissue. *Diabetol. Metab. Syndr.* 4, 43.

Haffar, T., Bérubé-Simard, F., and Bousette, N. (2015). Impaired fatty acid oxidation as a cause for lipotoxicity in cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 73–78.

Haimeur, A., Ulmann, L., Mimouni, V., Guéno, F., Pineau-Vincent, F., Meskini, N., and Tremblin, G. (2012). The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids Health Dis.* 11, 147.

Haj, F.G., Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B., Kahn, B.B., and Neel, B.G. (2005). Liver-specific protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) re-expression alters glucose homeostasis of PTP1B^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* 280, 15038–15046.

Han, M.S., Jung, D.Y., Morel, C., Lakhani, S.A., Kim, J.K., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339, 218–222.

- Haneklaus, M., and O'Neill, L.A.J. (2015). NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol. Rev.* 265, 53–62.
- Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 4365–4372.
- Hannan, F.A., and Culligan, K.G. (2015). Human resistin and the RELM of Inflammation in diabetes. *Diabetol. Metab. Syndr.* 7, 54.
- Hanson, R.L., Pratley, R.E., Bogardus, C., Narayan, K.M., Roumain, J.M., Imperatore, G., Fagot-Campagna, A., Pettitt, D.J., Bennett, P.H., and Knowler, W.C. (2000). Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiologic studies. *Am. J. Epidemiol.* 151, 190–198.
- Hardaway, A.L., and Podgorski, I. (2013). IL-1 β , RAGE and FABP4: targeting the dynamic trio in metabolic inflammation and related pathologies. *Future Med. Chem.* 5, 1089–1108.
- Hardy, O.T., Czech, M.P., and Corvera, S. (2012). What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 19, 81–87.
- Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P.M., Olefsky, J.M., and Kobayashi, M. (2000). A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14, 783–794.
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Thaiss, C.A., and Flavell, R.A. (2014). Inflammasomes and metabolic disease. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 57–78.
- Henquin, J.-C., Dufrane, D., and Nenquin, M. (2006). Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55, 3470–3477.
- Henriksen, J.E., Alford, F., Ward, G., Thye-Rønn, P., Levin, K., Hother-Nielsen, O., Rantza, C., Boston, R., and Beck-Nielsen, H. (2010). Glucose effectiveness and insulin sensitivity measurements derived from the non-insulin-assisted minimal model and the clamp techniques are concordant. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26, 569–578.

- Higaki, Y., Wojtaszewski, J.F., Hirshman, M.F., Withers, D.J., Towery, H., White, M.F., and Goodyear, L.J. (1999). Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 274, 20791–20795.
- Hill, C.S., and Treisman, R. (1995). Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J.* 14, 5037–5047.
- Hipskind, R.A., Rao, V.N., Mueller, C.G., Reddy, E.S., and Nordheim, A. (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354, 531–534.
- Holcomb, I.N., Kabakoff, R.C., Chan, B., Baker, T.W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H.B., Wright, B.D., Skelton, N.J., et al. (2000). FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* 19, 4046–4055.
- Hommelberg, P.P.H., Plat, J., Langen, R.C.J., Schols, A.M.W.J., and Mensink, R.P. (2009). Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E114–E120.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990.
- Horng, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2, 835–841.
- Horton, J.D., Cuthbert, J.A., and Spady, D.K. (1993). Dietary fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein (LDL) transport by altering LDL receptor protein and mRNA levels. *J. Clin. Invest.* 92, 743–749.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.

- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4854–4858.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95, 2409–2415.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., and Spiegelman, B.M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665–668.
- Hsieh, Y.-Y., Shen, C.-H., Huang, W.-S., Chin, C.-C., Kuo, Y.-H., Hsieh, M.C., Yu, H.-R., Chang, T.-S., Lin, T.-H., Chiu, Y.-W., et al. (2014). Resistin-induced stromal cell-derived factor-1 expression through Toll-like receptor 4 and activation of p38 MAPK/NF κ B signaling pathway in gastric cancer cells. *J. Biomed. Sci.* 21, 59.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703.
- Huang, J., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 412, 179–190.
- Huang, J., and Manning, B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 217–222.
- Huang, C.-Y., Lin, Y.-S., Chen, G.-C., Huang, H.-L., Chuang, S.-H., and Chao, P.-M. (2010). Upregulation of lipogenesis and protein tyrosine phosphatase-1B expression in the liver of Wistar rats with metabolic syndrome chronically induced by drinking sucrose water. *Ann. Nutr. Metab.* 57, 169–176.
- Huang, S., Rutkowsky, J.M., Snodgrass, R.G., Ono-Moore, K.D., Schneider, D.A., Newman, J.W., Adams, S.H., and Hwang, D.H. (2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J. Lipid Res.* 53, 2002–2013.

- Hubberstey, A.V., and Mottillo, E.P. (2002). Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 487–499.
- Hurd, T.W., Culbert, A.A., Webster, K.J., and Tavaré, J.M. (2002). Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. *Biochem. J.* 368, 573–580.
- Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., et al. (2012). Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 483, 350–354.
- Ilievski, V., Cho, Y., Katwala, P., Rodriguez, H., Tulowiecka, M., Kurian, D., Leoni, L., Christman, J.W., Unterman, T.G., and Watanabe, K. (2015). TLR4 Expression by Liver Resident Cells Mediates the Development of Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Experimental Periodontitis. *PloS One* 10, e0136502.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 648–657.
- Inokuchi, J. (2010). Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Lett.* 584, 1864–1871.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.
- Jackson, K.G., Maitin, V., Leake, D.S., Yaqoob, P., and Williams, C.M. (2006). Saturated fat-induced changes in Sf 60-400 particle composition reduces uptake of LDL by HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 47, 393–403.
- Jialal, I., Adams-Huet, B., Duong, F., and Smith, G. (2014). Relationship between retinol-binding protein-4/adiponectin and leptin/adiponectin ratios with insulin resistance and inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 12, 227–230.
- Jiao, P., Ma, J., Feng, B., Zhang, H., Diehl, J.A., Chin, Y.E., Yan, W., and Xu, H. (2011). FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKK β pathways. *Obes. Silver Spring Md* 19, 483–491.

Jocken, J.W.E., and Blaak, E.E. (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* 94, 219–230.

Jucker, B.M., Cline, G.W., Barucci, N., and Shulman, G.I. (1999). Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: a ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Diabetes* 48, 134–140.

Juge-Aubry, C.E., Somm, E., Giusti, V., Pernin, A., Chicheportiche, R., Verdumo, C., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, D., Dayer, J.-M., and Meier, C.A. (2003). Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes* 52, 1104–1110.

Jump, D.B. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 242–247.

Kaburagi, Y., Momomura, K., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Tamori, Y., Sakura, H., Akanuma, Y., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1993). Site-directed mutagenesis of the juxtamembrane domain of the human insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 16610–16622.

Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Ueki, K., Yachi, M., Akanuma, Y., Stephens, R.M., Kaplan, D., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1995). The role of the NPXY motif in the insulin receptor in tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and Shc. *Endocrinology* 136, 3437–3443.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 1784–1792.

Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125, 943–955.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* 9, 361–368.

Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846.

Kain, V., Kapadia, B., Viswakarma, N., Seshadri, S., Prajapati, B., Jena, P.K., Teja Meda, C.L., Subramanian, M., Kaimal Suraj, S., Kumar, S.T., et al. (2015). Co-activator binding protein PIMT mediates TNF- α induced insulin resistance in skeletal muscle via the transcriptional down-regulation of MEF2A and GLUT4. *Sci. Rep.* 5, 15197.

Kamolrat, T., Gray, S.R., and Thivierge, M.C. (2013). Fish oil positively regulates anabolic signalling alongside an increase in whole-body gluconeogenesis in ageing skeletal muscle. *Eur. J. Nutr.* 52, 647–657.

Kanarek, R.B., Aprille, J.R., Hirsch, E., Gualtiere, L., and Brown, C.A. (1987). Sucrose-induced obesity: effect of diet on obesity and brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 253, R158–R166.

Kantha, S.S. (1987). Dietary effects of fish oils on human health: a review of recent studies. *Yale J. Biol. Med.* 60, 37–44.

Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M., and Coffman, R.L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* 13, 552–559.

Kara, I., Poggi, M., Bonardo, B., Govers, R., Landrier, J.-F., Tian, S., Leibiger, I., Day, R., Creemers, J.W.M., and Peiretti, F. (2015). The paired basic amino acid-cleaving enzyme 4 (PACE4) is involved in the maturation of insulin receptor isoform B: an opportunity to reduce the specific insulin receptor-dependent effects of insulin-like growth factor 2 (IGF2). *J. Biol. Chem.* 290, 2812–2821.

Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C.F., Tilg, H., and Patsch, J.R. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 286–290.

Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9, 684–691.

Kawahito, S., Kitahata, H., and Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol.* *15*, 4137–4142.

Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* *13*, 460–469.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* *11*, 115–122.

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 5887–5894.

Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., and Natori, T. (1994). OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *24 Suppl*, S317–S320.

Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., and Nishijima, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* *275*, 2251–2254.

Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K., Hayashi, S., Yamaji, R., Inui, H., Fukusato, T., and Yamanouchi, T. (2009). Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J. Nutr.* *139*, 2067–2071.

Kawashima, J., Tsuruzoe, K., Motoshima, H., Shirakami, A., Sakai, K., Hirashima, Y., Toyonaga, T., and Araki, E. (2003). Insulin down-regulates resistin mRNA through the synthesis of protein(s) that could accelerate the degradation of resistin mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* *46*, 231–240.

Kenéz, J. (1983). [Nobel Prize for medicine in 1982]. *Orv. Hetil.* *124*, 461–463.

Kern, P.A., Saghizadeh, M., Ong, J.M., Bosch, R.J., Deem, R., and Simsolo, R.B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. *Regulation*

by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 95, 2111–2119.

Keskin, M., Kurtoglu, S., Kendirci, M., Atabek, M.E., and Yazici, C. (2005). Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 115, e500–e503.

Kharitonov, A., Schnekenburger, J., Chen, Z., Knyazev, P., Ali, S., Zwick, E., White, M., and Ullrich, A. (1995). Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J. Biol. Chem.* 270, 29189–29193.

Khodabandehloo, H., Gorgani-Firuzjaee, S., Panahi, G., and Meshkani, R. (2016). Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 167, 228–256.

Kiba, T. (2004). Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas* 29, e51–e58.

Kim, J.K. (2009). Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 560, 221–238.

Kim, F., Pham, M., Luttrell, I., Bannerman, D.D., Tupper, J., Thaler, J., Hawn, T.R., Raines, E.W., and Schwartz, M.W. (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ. Res.* 100, 1589–1596.

Kim, H.-J., Higashimori, T., Park, S.-Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y.-J., Noh, H.-L., Cho, Y.-R., Cline, G., Kim, Y.-B., et al. (2004). Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53, 1060–1067.

Kim, K.H., Lee, K., Moon, Y.S., and Sul, H.S. (2001). A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 11252–11256.

- Kim, K.-N., Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., Yi, T.-H., and Jeon, Y.-J. (2010). Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 369–375.
- Kim, S.-G., Choi, A., Ahn, C.-Y., Park, C.-S., Park, Y.-H., and Oh, H.-M. (2005). Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 190–194.
- Kim, T.H., Choi, S.E., Ha, E.S., Jung, J.G., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J., Kang, Y., and Lee, K.W. (2013). IL-6 induction of TLR-4 gene expression via STAT3 has an effect on insulin resistance in human skeletal muscle. *Acta Diabetol.* 50, 189–200.
- Kitagawa, Y., Bujo, H., Takahashi, K., Shibasaki, M., Ishikawa, K., Yagui, K., Hashimoto, N., Noda, K., Nakamura, T., Yano, S., et al. (2004). Impaired glucose tolerance is accompanied by decreased insulin sensitivity in tissues of mice implanted with cells that overexpress resistin. *Diabetologia* 47, 1847–1853.
- Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., et al. (1999). Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6286–6296.
- Klaman, L.D., Boss, O., Peroni, O.D., Kim, J.K., Martino, J.L., Zabolotny, J.M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.B., Sharpe, A.H., et al. (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5479–5489.
- Klein, S. (2004). The case of visceral fat: argument for the defense. *J. Clin. Invest.* 113, 1530–1532.
- Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., and Fasshauer, M. (2006). Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 17, 26–32.
- Kojima, H., Fujimiya, M., Terashima, T., Kimura, H., and Chan, L. (2006). Extrapankreatic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: is history repeating itself? *Endocr. J.* 53, 715–722.

Könner, A.C., and Brüning, J.C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **TEM 22**, 16–23.

Konrad, A., Lehrke, M., Schachinger, V., Seibold, F., Stark, R., Ochsenkühn, T., Parhofer, K.G., Göke, B., and Broedl, U.C. (2007). Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 1070–1074.

Koren, S., and Fantus, I.G. (2007). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 621–640.

Kozak, L.P., and Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int. J. Obes.* **2005 32 Suppl 7**, S32–S38.

Kraegen, E.W., Cooney, G.J., Ye, J., and Thompson, A.L. (2001). Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* **109**, S516–S526.

Krintel, C., Mörgelin, M., Logan, D.T., and Holm, C. (2009). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by protein kinase A in vitro promotes an increase in its hydrophobic surface area. *FEBS J.* **276**, 4752–4762.

Kris-Etherton, P.M., and Weber, J.A. (2005). Dietary guidelines 2005--contributions of registered dietitians to the evolution and dissemination of the guidelines. *J. Am. Diet. Assoc.* **105**, 1362–1364.

Kris-Etherton, P.M., and Yu, S. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1628S – 1644S.

Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., et al. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 25863–25866.

Kulkarni, R.N., Brüning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* **96**, 329–339.

- Kumada, M., Kihara, S., Ouchi, N., Kobayashi, H., Okamoto, Y., Ohashi, K., Maeda, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Maeda, N., et al. (2004). Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 109, 2046–2049.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1, 398–401.
- Kwon, H., and Pessin, J.E. (2013). Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front. Endocrinol.* 4, 71.
- Kwon, B., Lee, H.-K., and Querfurth, H.W. (2014). Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1402–1413.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417–421.
- Laakso, M., Edelman, S.V., Brechtel, G., and Baron, A.D. (1990). Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 85, 1844–1852.
- Lagathu, C., Bastard, J.-P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., and Caron, M. (2003). Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 372–379.
- Lago, F., Gómez, R., Gómez-Reino, J.J., Dieguez, C., and Gualillo, O. (2009). Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 34, 500–510.
- Lanuza-Masdeu, J., Arévalo, M.I., Vila, C., Barberà, A., Gomis, R., and Caelles, C. (2013). In vivo JNK activation in pancreatic β -cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas. *Diabetes* 62, 2308–2317.

Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594.

Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1713–1719.

Lavan, B.E., Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1997a). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* 272, 21403–21407.

Lavan, B.E., Lane, W.S., and Lienhard, G.E. (1997b). The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* 272, 11439–11443.

Laviola, L., Perrini, S., Cignarelli, A., and Giorgino, F. (2006). Insulin signalling in human adipose tissue. *Arch. Physiol. Biochem.* 112, 82–88.

Lê, K.-A., and Tappy, L. (2006). Metabolic effects of fructose. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 469–475.

Lee, E.H., Park, J.-E., Choi, Y.-J., Huh, K.-B., and Kim, W.-Y. (2008a). A randomized study to establish the effects of spirulina in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr. Res. Pract.* 2, 295–300.

Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., and Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 16683–16689.

Lee, J.Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H.S., Lee, W.H., Zhao, L., Sizemore, N., and Hwang, D.H. (2003). Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 37041–37051.

Lee, S., Lynn, E.G., Kim, J.-A., and Quon, M.J. (2008b). Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1, -3, and -4 but not -2: isoform specific determinants of specificity in insulin signaling. *Endocrinology* 149, 2451–2458.

- Lee, S., Lee, H.-C., Kwon, Y.-W., Lee, S.E., Cho, Y., Kim, J., Lee, S., Kim, J.-Y., Lee, J., Yang, H.-M., et al. (2014). Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab.* 19, 484–497.
- Legrand, P. (2007). Les Acides Gras : Structures, Fonctions, Apports Nutritionnels Conseillés. *Cah. Nutr. Diététique* 42, *Supplement 1*, 7–12.
- Lehrke, M., Reilly, M.P., Millington, S.C., Iqbal, N., Rader, D.J., and Lazar, M.A. (2004). An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med.* 1, e45.
- Lei, F., Zhang, X.N., Wang, W., Xing, D.M., Xie, W.D., Su, H., and Du, L.J. (2007). Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Obes.* 2005 31, 1023–1029.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226.
- Levy-Toledano, R., Taouis, M., Blaettler, D.H., Gorden, P., and Taylor, S.I. (1994). Insulin-induced activation of phosphatidyl inositol 3-kinase. Demonstration that the p85 subunit binds directly to the COOH terminus of the insulin receptor in intact cells. *J. Biol. Chem.* 269, 31178–31182.
- Lewis, G.F., and Rader, D.J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* 96, 1221–1232.
- Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23, 201–229.
- L'homme, L., Esser, N., Riva, L., Scheen, A., Paquot, N., Piette, J., and Legrand-Poels, S. (2013). Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. *J. Lipid Res.* 54, 2998–3008.
- Li, D. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: meta-analysis based systematic review. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 24, 10–15.

- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363, 85–88.
- Liberman, Z., and Eldar-Finkelman, H. (2005). Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 4422–4428.
- Liu, R., Bai, H., and Liu, B.W. (2001a). [Signal transduction of insulin receptor]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 32, 254–256.
- Liu, R., Bai, H., and Liu, B.W. (2001b). [Signal transduction of insulin receptor]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 32, 254–256.
- Lombardo, Y.B., Drago, S., Chicco, A., Fainstein-Day, P., Gutman, R., Gagliardino, J.J., and Gomez Dumm, C.L. (1996). Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism*. 45, 1527–1532.
- Lordan, S., Ross, R.P., and Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs* 9, 1056–1100.
- Lottenberg, A.M., Afonso, M. da S., Lavrador, M.S.F., Machado, R.M., and Nakandakare, E.R. (2012). The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1027–1040.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008a). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008b). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.

- Lukic, L., Lalic, N.M., Rajkovic, N., Jotic, A., Lalic, K., Milicic, T., Seferovic, J.P., Macesic, M., and Stanarcic Gajovic, J. (2014). Hypertension in Obese Type 2 Diabetes Patients is Associated with Increases in Insulin Resistance and IL-6 Cytokine Levels: Potential Targets for an Efficient Preventive Intervention. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* *11*, 3586–3598.
- Lye, E., Mirtsos, C., Suzuki, N., Suzuki, S., and Yeh, W.-C. (2004). The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 40653–40658.
- Lyons, T.J. (1991). Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *8*, 411–419.
- Lyons, T.J., and Jenkins, A.J. (1997). Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr. Opin. Lipidol.* *8*, 174–180.
- Lyons, T.J., Klein, R.L., Baynes, J.W., Stevenson, H.C., and Lopes-Virella, M.F. (1987). Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low-density lipoproteins. *Diabetologia* *30*, 916–923.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., and Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *332*, 392–397.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., and Miyashita, K. (2009). Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol. Med. Rep.* *2*, 897–902.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *221*, 286–289.

- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., and Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1, 1155–1161.
- Magnan, C., and Ktorza, A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinol.* 2, 241–264.
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Gores, G.J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 12093–12101.
- Mark, A.L., Shaffer, R.A., Correia, M.L., Morgan, D.A., Sigmund, C.D., and Haynes, W.G. (1999). Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J. Hypertens.* 17, 1949–1953.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508.
- Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I.R. (2007). Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 419–441.
- Masek, J., and Fabry, P. (1959). High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia* 15, 444–445.
- Massaro, M., Habib, A., Lubrano, L., Del Turco, S., Lazzerini, G., Bourcier, T., Weksler, B.B., and De Caterina, R. (2006). The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15184–15189.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., et al. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* 3, 1029–1033.

Matsuda, M., and DeFronzo, R.A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22, 1462–1470.

Matsumoto, M., Sata, M., Fukuda, D., Tanaka, K., Soma, M., Hirata, Y., and Nagai, R. (2008). Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 197, 524–533.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419.

Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H.S., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., et al. (2010). Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53, 2431–2441.

Maury, E., and Brichard, S.M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 1–16.

Maury, E., Noël, L., Detry, R., and Brichard, S.M. (2009). In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor- α contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1393–1400.

Mayer, C.M., and Belsham, D.D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151, 576–585.

- McArdle, M.A., Finucane, O.M., Connaughton, R.M., McMorrow, A.M., and Roche, H.M. (2013). Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front. Endocrinol.* 4, 52.
- McClain, D.A. (1992). Mechanism and role of insulin receptor endocytosis. *Am. J. Med. Sci.* 304, 192–201.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Melanson, K.J., Angelopoulos, T.J., Nguyen, V., Zukley, L., Lowndes, J., and Rippe, J.M. (2008). High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1738S – 1744S.
- Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M.B., Whittaker, L.J., Kong, G.K.-W., Smith, B.J., Watson, C.J., Záková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., et al. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* 493, 241–245.
- Meshkani, R., and Adeli, K. (2009). Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin. Biochem.* 42, 1331–1346.
- Miatello, R., Vázquez, M., Renna, N., Cruzado, M., Zumino, A.P., and Risler, N. (2005). Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am. J. Hypertens.* 18, 864–870.
- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* 6, 87–97.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 359–370.

- Miller, M.R., Nichols, P.D., and Carter, C.G. (2007). Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **148**, 382–392.
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Morant-Manceau, A., and Schoefs, B. (2012). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 2733–2750.
- Minn, A.H., Patterson, N.B., Pack, S., Hoffmann, S.C., Gavrilova, O., Vinson, C., Harlan, D.M., and Shalev, A. (2003). Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 641–645.
- Miralpeix, M., Sun, X.J., Backer, J.M., Myers, M.G., Araki, E., and White, M.F. (1992). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in Fao hepatoma cells. *Biochemistry (Mosc.)* **31**, 9031–9039.
- Mizuno, M., Sada, T., Kato, M., and Koike, H. (2002). Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in an animal model of type 2 diabetes. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* **25**, 271–278.
- Mohr, B. (1993). Neuropathology communication from Dr. Mohr, privat docent in Würzburg. *Obes. Res.* **1**, 334–335.
- Moller, D.E., Yokota, A., Caro, J.F., and Flier, J.S. (1989). Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **3**, 1263–1269.
- Moodie, S.A., Alleman-Sposeto, J., and Gustafson, T.A. (1999). Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 11186–11193.
- Moon, B., Kwan, J.J.-M., Duddy, N., Sweeney, G., and Begum, N. (2003). Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E106–E115.
- Moran, T.H., and Bi, S. (2006). Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**, 1211–1218.

Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M., and Ur, E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140, 5995–5998.

Morash, B.A., Ur, E., Wiesner, G., Roy, J., and Wilkinson, M. (2004). Pituitary resistin gene expression: effects of age, gender and obesity. *Neuroendocrinology* 79, 149–156.

Moro, E., Alessandrini, P., Zambon, C., Pianetti, S., Pais, M., Cazzolato, G., and Bon, G.B. (1999). Is glycation of low density lipoproteins in patients with Type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 16, 663–669.

Morrison, C.D. (2009). Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 401–408.

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.

Morton, G.J., Meek, T.H., and Schwartz, M.W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 367–378.

Mothe, I., and Van Obberghen, E. (1996). Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol. Chem.* 271, 11222–11227.

Mraz, M., Lacinova, Z., Drapalova, J., Haluzikova, D., Horinek, A., Matoulek, M., Trachta, P., Kavalkova, P., Svacina, S., and Haluzik, M. (2011). The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E606–E613.

Muniyappa, R., and Quon, M.J. (2007). Insulin action and insulin resistance in vascular endothelium. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10, 523–530.

Muniyappa, R., Madan, R., and Quon, M.J. (2000). Assessing Insulin Sensitivity and Resistance in Humans. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K.

Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.),.

Murakami, M.S., and Rosen, O.M. (1991). The role of insulin receptor autophosphorylation in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 266, 22653–22660.

Muse, E.D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B.P., McKay, R.A., Rajala, M.W., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2004). Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 114, 232–239.

Muse, E.D., Lam, T.K.T., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2007). Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117, 1670–1678.

Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612–1615.

Myers, M.G. (2008). Metabolic sensing and regulation by the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E809.

Myers, M.G., Wang, L.M., Sun, X.J., Zhang, Y., Yenush, L., Schlessinger, J., Pierce, J.H., and White, M.F. (1994). Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3577–3587.

Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., and Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest.* 108, 1359–1367.

Nakagawa, T., Tuttle, K.R., Short, R.A., and Johnson, R.J. (2005). Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 1, 80–86.

Nakahira, K., Kim, H.P., Geng, X.H., Nakao, A., Wang, X., Murase, N., Drain, P.F., Wang, X., Sasidhar, M., Nabel, E.G., et al. (2006). Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J. Exp. Med.* 203, 2377–2389.

Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., et al. (2009). Palmitate induces

insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 284, 14809–14818.

Nakashima, N., Sharma, P.M., Imamura, T., Bookstein, R., and Olefsky, J.M. (2000). The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 12889–12895.

Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Hatazaki, M., Miyatsuka, T., Matsuoka, T.-A., Kajimoto, Y., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y., and Hori, M. (2004). Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J. Biol. Chem.* 279, 45803–45809.

Navab, M., Anantharamaiah, G.M., and Fogelman, A.M. (2005). The role of high-density lipoprotein in inflammation. *Trends Cardiovasc. Med.* 15, 158–161.

Nguyen, M.T.A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 35279–35292.

Nicolosi, R.J., Stucchi, A.F., Kowala, M.C., Hennessy, L.K., Hegsted, D.M., and Schaefer, E.J. (1990). Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. In vivo studies of receptor and nonreceptor-mediated catabolism of LDL in cebus monkeys. *Arterioscler. Dallas Tex* 10, 119–128.

Nilsson, S. (2001). [Research contributions of Eskil Kylin]. *Sven. Med. Tidskr.* 5, 15–28.

Nivala, A.M., Reese, L., Frye, M., Gentile, C.L., and Pagliassotti, M.J. (2013). Fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress in vivo: differential response to the infusion of Soybean and Lard Oil in rats. *Metabolism.* 62, 753–760.

Norata, G.D., Ongari, M., Garlaschelli, K., Raselli, S., Grigore, L., and Catapano, A.L. (2007). Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 156, 279–284.

- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000034.
- Oh, D.Y., and Walenta, E. (2014). Omega-3 Fatty Acids and FFAR4. *Front. Endocrinol.* 5, 115.
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., and Olefsky, J.M. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698.
- Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B.M., and Kajimura, S. (2012). PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 15, 395–404.
- Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246.
- Oosterveer, M.H., Grefhorst, A., van Dijk, T.H., Havinga, R., Staels, B., Kuipers, F., Groen, A.K., and Reijngoud, D.-J. (2009). Fenofibrate simultaneously induces hepatic fatty acid oxidation, synthesis, and elongation in mice. *J. Biol. Chem.* 284, 34036–34044.
- Orr, S.K., and Bazinet, R.P. (2008). The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 9, 735–743.
- Orr, J.S., Puglisi, M.J., Ellacott, K.L.J., Lumeng, C.N., Wasserman, D.H., and Hasty, A.H. (2012). Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes* 61, 2718–2727.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* 278, 49751–49762.
- Otani, K., Kulkarni, R.N., Baldwin, A.C., Krutzfeldt, J., Ueki, K., Stoffel, M., Kahn, C.R., and Polonsky, K.S. (2004). Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in betaIRKO mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E41–E49.

- Ouchi, N., and Walsh, K. (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 380, 24–30.
- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 85–97.
- Ouwens, D.M., van der Zon, G.C., Pronk, G.J., Bos, J.L., Möller, W., Cheatham, B., Kahn, C.R., and Maassen, J.A. (1994). A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. *J. Biol. Chem.* 269, 33116–33122.
- Owerbach, D., Bell, G.I., Rutter, W.J., and Shows, T.B. (1980). The insulin gene is located on chromosome 11 in humans. *Nature* 286, 82–84.
- Packard, C.J. (2006). Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 412–417.
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., and Bhattacharya, S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 18, 1279–1285.
- Pal, M., Wunderlich, C.M., Spohn, G., Brönneke, H.S., Schmidt-Supprian, M., and Wunderlich, F.T. (2013). Alteration of JNK-1 signaling in skeletal muscle fails to affect glucose homeostasis and obesity-associated insulin resistance in mice. *PloS One* 8, e54247.
- Palanivel, R., Maida, A., Liu, Y., and Sweeney, G. (2006). Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* 49, 183–190.
- Pålsson-McDermott, E.M., and O’Neill, L.A.J. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113, 153–162.
- Panahi, Y., Darvishi, B., Jowzi, N., Beiraghdar, F., and Sahebkar, A. (2015). *Chlorella vulgaris*: A Multifunctional Dietary Supplement with Diverse Medicinal Properties. *Curr. Pharm. Des.* 22, 164–173.

Panchal, S.K., and Brown, L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 351982.

Panchal, S.K., Poudyal, H., Iyer, A., Nazer, R., Alam, M.A., Diwan, V., Kauter, K., Sernia, C., Campbell, F., Ward, L., et al. (2011). High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 611–624.

Parikh, P., Mani, U., and Iyer, U. (2001). Role of Spirulina in the Control of Glycemia and Lipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Med. Food* 4, 193–199.

Park, H.J., Lee, Y.J., Ryu, H.K., Kim, M.H., Chung, H.W., and Kim, W.Y. (2008). A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans. *Ann. Nutr. Metab.* 52, 322–328.

Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H., and Strålfors, P. (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* 276, 9670–9678.

Patel, L., Buckels, A.C., Kinghorn, I.J., Murdock, P.R., Holbrook, J.D., Plumpton, C., Macphee, C.H., and Smith, S.A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 472–476.

Patel, P.S., Sharp, S.J., Luben, R.N., Khaw, K.-T., Bingham, S.A., Wareham, N.J., and Forouhi, N.G. (2009). Association between type of dietary fish and seafood intake and the risk of incident type 2 diabetes: the European prospective investigation of cancer (EPIC)-Norfolk cohort study. *Diabetes Care* 32, 1857–1863.

Patel, S.D., Rajala, M.W., Rossetti, L., Scherer, P.E., and Shapiro, L. (2004). Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 304, 1154–1158.

Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., and Zick, Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane

region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 29911–29918.

Pedersen, B.K., and Febbraio, M.A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* 88, 1379–1406.

Pederson, T.M., Kramer, D.L., and Rondinone, C.M. (2001). Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50, 24–31.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540–543.

Pepys, M.B., and Hirschfield, G.M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* 111, 1805–1812.

Peraldi, P., Filloux, C., Emanuelli, B., Hilton, D.J., and Van Obberghen, E. (2001). Insulin induces suppressor of cytokine signaling-3 tyrosine phosphorylation through janus-activated kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 24614–24620.

Pereira, S.G., and Oakley, F. (2008). Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1425–1430.

Petrus, P., Rosqvist, F., Edholm, D., Mejhert, N., Arner, P., Dahlman, I., Rydén, M., Sundbom, M., and Risérus, U. (2015). Saturated fatty acids in human visceral adipose tissue are associated with increased 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 1 expression. *Lipids Health Dis.* 14, 42.

Peyron-Caso, E., Taverna, M., Guerre-Millo, M., Véronèse, A., Pacher, N., Slama, G., and Rizkalla, S.W. (2002). Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids up-regulate plasma leptin in insulin-resistant rats. *J. Nutr.* 132, 2235–2240.

Pfeiffer, A., Böttcher, A., Orsó, E., Kapinsky, M., Nagy, P., Bodnár, A., Spreitzer, I., Liebisch, G., Drobnik, W., Gempel, K., et al. (2001). Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur. J. Immunol.* 31, 3153–3164.

Piché, M.-E., Weisnagel, S.J., Corneau, L., Nadeau, A., Bergeron, J., and Lemieux, S. (2005). Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women. *Diabetes* 54, 770–777.

Piché, M.-E., Lemieux, S., Corneau, L., Nadeau, A., Bergeron, J., and Weisnagel, S.J. (2007). Measuring insulin sensitivity in postmenopausal women covering a range of glucose tolerance: comparison of indices derived from the oral glucose tolerance test with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *Metabolism*. 56, 1159–1166.

Pirvulescu, M.M., Gan, A.M., Stan, D., Simion, V., Calin, M., Butoi, E., and Manduteanu, I. (2014). Subendothelial resistin enhances monocyte transmigration in a co-culture of human endothelial and smooth muscle cells by mechanisms involving fractalkine, MCP-1 and activation of TLR4 and Gi/o proteins signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50, 29–37.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085–2088.

Porte, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Baskin, D.G., Figlewicz, D.P., and Schwartz, M.W. (1998). Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41, 863–881.

Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., et al. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1003–E1012.

Poudyal, H., Panchal, S.K., Ward, L.C., and Brown, L. (2013). Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1041–1052.

Pouliot, M.C., Després, J.P., Nadeau, A., Moorjani, S., Prud'Homme, D., Lupien, P.J., Tremblay, A., and Bouchard, C. (1992). Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41, 826–834.

- Powers, K.A., Szászi, K., Khadaroo, R.G., Tawadros, P.S., Marshall, J.C., Kapus, A., and Rotstein, O.D. (2006). Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J. Exp. Med.* 203, 1951–1961.
- Pravenec, M., Kazdová, L., Landa, V., Zidek, V., Mlejnek, P., Jansa, P., Wang, J., Qi, N., and Kurtz, T.W. (2003). Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J. Biol. Chem.* 278, 45209–45215.
- Pravenec, M., Kazdová, L., Cahová, M., Landa, V., Zídek, V., Mlejnek, P., Simáková, M., Wang, J., Qi, N., and Kurtz, T.W. (2006). Fat-specific transgenic expression of resistin in the spontaneously hypertensive rat impairs fatty acid re-esterification. *Int. J. Obes.* 2005 30, 1157–1159.
- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp. Cell Res.* 312, 727–736.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423, 550–555.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 287–293.
- Qatanani, M., Szwegold, N.R., Greaves, D.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2009). Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 531–539.
- Qi, Y., Nie, Z., Lee, Y.-S., Singhal, N.S., Scherer, P.E., Lazar, M.A., and Ahima, R.S. (2006). Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55, 3083–3090.
- Queiroz, M.L.S., Rodrigues, A.P.O., Bincoletto, C., Figueirêdo, C.A.V., and Malacrida, S. (2003). Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int. Immunopharmacol.* 3, 889–900.

- Radin, M.S., Sinha, S., Bhatt, B.A., Dedousis, N., and O'Doherty, R.M. (2008). Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia* 51, 336–346.
- Raghu, P., Ghosh, S., Soundarya, K., Haseeb, A., Aruna, B., and Ehtesham, N.Z. (2004). Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 642–646.
- Rahman, M.M., and McFadden, G. (2011). Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 291–306.
- Raichur, S., Wang, S.T., Chan, P.W., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., Chaurasia, B., Dogra, S., Öhman, M.K., Takeda, K., et al. (2014). CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* 20, 687–695.
- Rajala, M.W., and Scherer, P.E. (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144, 3765–3773.
- Rajala, M.W., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2003). Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J. Clin. Invest.* 111, 225–230.
- Rajala, M.W., Qi, Y., Patel, H.R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U.B., Sinha, M.K., Gingerich, R.L., Scherer, P.E., and Ahima, R.S. (2004). Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53, 1671–1679.
- Rajput, S., Volk-Draper, L.D., and Ran, S. (2013). TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1676–1687.
- Rameh, L.E., and Cantley, L.C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274, 8347–8350.

- Rapaport, R., Silverstein, J.H., Garzarella, L., and Rosenbloom, A.L. (2004). Type 1 and type 2 diabetes mellitus in childhood in the United States: practice patterns by pediatric endocrinologists. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 17, 871–877.
- Rask-Madsen, C., and Kahn, C.R. (2012). Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2052–2059.
- Rassa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudravalli, R., and Ross, S.R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2281–2286.
- Ravichandran, K.S., Lorenz, U., Shoelson, S.E., and Burakoff, S.J. (1995). Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSOS. *Mol. Cell. Biol.* 15, 593–600.
- Ravichandran, L.V., Esposito, D.L., Chen, J., and Quon, M.J. (2001). Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 276, 3543–3549.
- Reaven, G.M. (1988a). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
- Reaven, G.M. (1988b). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
- Reaven, G.M. (2005). Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med.* 47, 201–210.
- Reaven, G., Abbasi, F., and McLaughlin, T. (2004). Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 207–223.
- Reaven, G.M., Chen, Y.D., Jeppesen, J., Maheux, P., and Krauss, R.M. (1993). Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J. Clin. Invest.* 92, 141–146.
- Rees, D.A., and Alcolado, J.C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 22, 359–370.

- Reilly, M.P., Lehrke, M., Wolfe, M.L., Rohatgi, A., Lazar, M.A., and Rader, D.J. (2005). Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111, 932–939.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G., and Cohen, P. (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 274, 17179–17183.
- Reyna, S.M., Ghosh, S., Tantiwong, P., Meka, C.S.R., Eagan, P., Jenkinson, C.P., Cersosimo, E., Defronzo, R.A., Coletta, D.K., Sriwijitkamol, A., et al. (2008). Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 57, 2595–2602.
- Riccardi, G., Giacco, R., and Rivellese, A.A. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 23, 447–456.
- Rioux, V., and Legrand, P. (2007). Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10, 752–758.
- Robles Medina, A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, A., and Ibañez González, M.J. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.* 16, 517–580.
- Ronti, T., Lupattelli, G., and Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 64, 355–365.
- Rosenbloom, A.L., Joe, J.R., Young, R.S., and Winter, W.E. (1999). Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 22, 345–354.
- Rosenson, R.S., Tangney, C.C., Levine, D.M., Parker, T.S., and Gordon, B.R. (2004). Elevated soluble tumor necrosis factor receptor levels in non-obese adults with the atherogenic dyslipoproteinemia. *Atherosclerosis* 177, 77–81.
- Rossi, A.S., Lombardo, Y.B., Lacorte, J.-M., Chicco, A.G., Rouault, C., Slama, G., and Rizkalla, S.W. (2005). Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R486–R494.

- Rowe, D.C., McGettrick, A.F., Latz, E., Monks, B.G., Gay, N.J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. (2006). The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6299–6304.
- Rui, L., Aguirre, V., Kim, J.K., Shulman, G.I., Lee, A., Corbould, A., Dunaif, A., and White, M.F. (2001). Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* 107, 181–189.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 277, 42394–42398.
- Saberi, M., Woods, N.-B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J.C., Bandyopadhyay, G., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab.* 10, 419–429.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539–1543.
- Sacks, F.M., and Campos, H. (2003). Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4525–4532.
- Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R.M., and Whittington, P.F. (2004). Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G1035–G1043.
- Sakamoto, K., and Holman, G.D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E29–E37.
- Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. (2003). Tumor necrosis factor- α -induced IKK phosphorylation of NF-

kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 36916–36923.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.

Salvadó, L., Coll, T., Gómez-Foix, A.M., Salmerón, E., Barroso, E., Palomer, X., and Vázquez-Carrera, M. (2013). Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 56, 1372–1382.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852–871.

Sánchez-Solana, B., Laborda, J., and Baladrón, V. (2012). Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 26, 110–127.

Sanger, F., and Thompson, E.O.P. (1953). The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem. J.* 53, 353–366.

Sanger, F., and Tuppy, H. (1951). The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem. J.* 49, 463–481.

SanGiovanni, J.P., Parra-Cabrera, S., Colditz, G.A., Berkey, C.S., and Dwyer, J.T. (2000). Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. *Pediatrics* 105, 1292–1298.

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Mîinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 14599–14602.

Santos, F.R., Diamond-Stanic, M.K., Prasannarong, M., and Henriksen, E.J. (2012). Contribution of the serine kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) to oxidant-induced

insulin resistance in isolated rat skeletal muscle. *Arch. Physiol. Biochem.* **118**, 231–236.

Santuré, M., Pitre, M., Marette, A., Deshaies, Y., Lemieux, C., Larivière, R., Nadeau, A., and Bachelard, H. (2002). Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 185–196.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101.

Sarkar, A., Sreenivasan, Y., Ramesh, G.T., and Manna, S.K. (2004). beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 33768–33781.

Sasaoka, T., Rose, D.W., Jhun, B.H., Saltiel, A.R., Draznin, B., and Olefsky, J.M. (1994). Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 13689–13694.

Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**, 1087–1095.

Satoh, H., Nguyen, M.T.A., Miles, P.D.G., Imamura, T., Usui, I., and Olefsky, J.M. (2004). Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J. Clin. Invest.* **114**, 224–231.

Sbraccia, P., Wong, K.Y., Brunetti, A., Rafaeloff, R., Trischitta, V., Hawley, D.M., and Goldfine, I.D. (1990). Insulin down-regulates insulin receptor number and up-regulates insulin receptor affinity in cells expressing a tyrosine kinase-defective insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 4902–4907.

Scarda, A., Franzin, C., Milan, G., Sanna, M., Dal Prà, C., Pagano, C., Boldrin, L., Piccoli, M., Trevellin, E., Granzotto, M., et al. (2010). Increased adipogenic conversion of muscle satellite cells in obese Zucker rats. *Int. J. Obes.* **2005** **34**, 1319–1327.

- von Schacky, C., and Harris, W.S. (2007). Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc. Res.* **73**, 310–315.
- Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich, J., and Falk, W. (2009). Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* **126**, 233–245.
- Scheen, A.J., Paquot, N., Castillo, M.J., and Lefèbvre, P.J. (1994). How to measure insulin action in vivo. *Diabetes. Metab. Rev.* **10**, 151–188.
- Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J.M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* **118**, 2992–3002.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26746–26749.
- Schwartz, D.R., and Lazar, M.A. (2011). Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol. Metab.* **TEM 22**, 259–265.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671.
- Sciacchitano, S., and Taylor, S.I. (1997). Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology* **138**, 4931–4940.
- Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 96–105.
- Seino, S., and Bell, G.I. (1989). Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 312–316.
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S., and Bell, G.I. (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 114–118.

Serpillon, S., Floyd, B.C., Gupte, R.S., George, S., Kozicky, M., Neito, V., Recchia, F., Stanley, W., Wolin, M.S., and Gupte, S.A. (2009). Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H153–H162.

Serrano-Marco, L., Barroso, E., El Kochairi, I., Palomer, X., Michalik, L., Wahli, W., and Vázquez-Carrera, M. (2012). The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ agonist GW501516 inhibits IL-6-induced signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and insulin resistance in human liver cells. *Diabetologia* 55, 743–751.

Shanik, M.H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., and Roth, J. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* 31 Suppl 2, S262–S268.

Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K.-Y., Johnson, R.J., and Scarpace, P.J. (2008). Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R1370–R1375.

Sharifnia, T., Antoun, J., Verriere, T.G.C., Suarez, G., Wattacheril, J., Wilson, K.T., Peek, R.M., Abumrad, N.N., and Flynn, C.R. (2015). Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G270–G278.

Sharma, A.K., and Srinivasan, B.P. (2009). Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 38, 433–444.

Sharma, N., Okere, I.C., Barrows, B.R., Lei, B., Duda, M.K., Yuan, C.L., Previs, S.F., Sharov, V.G., Azimzadeh, A.M., Ernsberger, P., et al. (2008). High-sugar diets increase cardiac dysfunction and mortality in hypertension compared to low-carbohydrate or high-starch diets. *J. Hypertens.* 26, 1402–1410.

Sheng, C.H., Di, J., Jin, Y., Zhang, Y.C., Wu, M., Sun, Y., and Zhang, G.Z. (2008). Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine* 33, 135–143.

Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333 (Pt 3), 471–490.

Shi, H., Tzameli, I., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 34733–34740.

Shi, H., Cave, B., Inouye, K., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2006a). Overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. *Diabetes* 55, 699–707.

Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006b). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015–3025.

Shoelson, S.E., White, M.F., and Kahn, C.R. (1988). Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J. Biol. Chem.* 263, 4852–4860.

Shoelson, S.E., Herrero, L., and Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169–2180.

Simopoulos, A.P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 60, 502–507.

Simopoulos, A.P. (2014). The impact of the Bellagio Report on healthy agriculture, healthy nutrition, healthy people: scientific and policy aspects and the International Network of Centers for Genetics, Nutrition and Fitness for Health. *J. Nutr. Nutr.* 7, 191–211.

Singhal, N.S., Lazar, M.A., and Ahima, R.S. (2007). Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12924–12932.

Sinzato, Y.K., Lima, P.H.O., Campos, K.E. de, Kiss, A.C.I., Rudge, M.V.C., and Damasceno, D.C. (2009). Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Rev. Assoc. Médica Bras.* 1992 55, 384–388.

Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C.H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260, 1953–1955.

Smith, R.M., Zhang, S., White, M.F., and Jarett, L. (1996). The role of receptor kinase activity and the NPEY960 motif in insulin-accelerated receptor-mediated insulin internalization. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 16, 339–355.

Snitker, S., Fujishima, Y., Shen, H., Ott, S., Pi-Sunyer, X., Furuhashi, Y., Sato, H., and Takahashi, M. (2009). Effects of novel capsinoid treatment on fatness and energy metabolism in humans: possible pharmacogenetic implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 45–50.

Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J.G., Bandyopadhyay, G.K., Luo, J.-L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J.M., et al. (2007). JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab.* 6, 386–397.

Sondermann, H., Soisson, S.M., Boykevisch, S., Yang, S.-S., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (2004). Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* 119, 393–405.

Song, M.J., Kim, K.H., Yoon, J.M., and Kim, J.B. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 739–745.

Souza, S.C., Yamamoto, M.T., Franciosa, M.D., Lien, P., and Greenberg, A.S. (1998). BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* 47, 691–695.

de Souza, R.J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A.I., Ha, V., Kishibe, T., Uleryk, E., Budylowski, P., Schünemann, H., Beyene, J., et al. (2015). Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease,

and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 351, h3978.

Spadella, C.T., Suarez, O. a. X., Lucchesi, A.N., Marques, S.F.G., and Cataneo, A.J.M. (2010). Effects of pancreas transplantation on oxidative stress in pulmonary tissue from alloxan-induced diabetic rats. *Transplant. Proc.* 42, 2087–2091.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96.

Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A.F.H. (2003a). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet Lond. Engl.* 361, 226–228.

Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A.F.H. (2003b). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52, 812–817.

Stanley, T.L., Zanni, M.V., Johnsen, S., Rasheed, S., Makimura, H., Lee, H., Khor, V.K., Ahima, R.S., and Grinspoon, S.K. (2011). TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E146–E150.

Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N., and Baron, A.D. (1994). Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J. Clin. Invest.* 94, 1172–1179.

Steiner, D.F., and Rubenstein, A.H. (1997). Proinsulin C-Peptide-Biological Activity? *Science* 277, 531–532.

Steiner, D.F., Park, S.-Y., Støy, J., Philipson, L.H., and Bell, G.I. (2009). A brief perspective on insulin production. *Diabetes Obes. Metab.* *11 Suppl 4*, 189–196.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* *409*, 307–312.

Steppan, C.M., Wang, J., Whiteman, E.L., Birnbaum, M.J., and Lazar, M.A. (2005). Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1569–1575.

Stienstra, R., Joosten, L.A.B., Koenen, T., van Tits, B., van Diepen, J.A., van den Berg, S.A.A., Rensen, P.C.N., Voshol, P.J., Fantuzzi, G., Hijmans, A., et al. (2010). The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* *12*, 593–605.

Stienstra, R., Tack, C.J., Kanneganti, T.-D., Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2012). The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metab.* *15*, 10–18.

Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Chisholm, D.J., Pascoe, W.S., Khouri, S., and Kraegen, E.W. (1991). Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* *40*, 280–289.

Storlien, L.H., Higgins, J.A., Thomas, T.C., Brown, M.A., Wang, H.Q., Huang, X.F., and Else, P.L. (2000). Diet composition and insulin action in animal models. *Br. J. Nutr.* *83 Suppl 1*, S85–S90.

Stratford, S., Hoehn, K.L., Liu, F., and Summers, S.A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* *279*, 36608–36615.

Strawford, A., Antelo, F., Christiansen, M., and Hellerstein, M.K. (2004). Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $2\text{H}_2\text{O}$. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E577–E588.

Stumvoll, M., Mitrakou, A., Pimenta, W., Jenssen, T., Yki-Järvinen, H., Van Haeften, T., Renn, W., and Gerich, J. (2000). Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* *23*, 295–301.

- Suárez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D.J., Stevanović, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., et al. (2015). Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat. Med.* 21, 1497–1501.
- Suckale, J., and Solimena, M. (2010). The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 599–609.
- Summers, S.A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* 45, 42–72.
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73–77.
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., and White, M.F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173–177.
- Sutherland, L.N., Capozzi, L.C., Turchinsky, N.J., Bell, R.C., and Wright, D.C. (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1076–E1083.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., et al. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750–756.
- Taghibiglou, C., Carpentier, A., Van Iderstine, S.C., Chen, B., Rudy, D., Aiton, A., Lewis, G.F., and Adeli, K. (2000). Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J. Biol. Chem.* 275, 8416–8425.
- Takemura, Y., Walsh, K., and Ouchi, N. (2007). Adiponectin and cardiovascular inflammatory responses. *Curr. Atheroscler. Rep.* 9, 238–243.

- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., and Satoh, S. (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182–186.
- Tan, C., and Hou, Y. (2014). First evidence for the anti-inflammatory activity of fucoxanthin in high-fat-diet-induced obesity in mice and the antioxidant functions in PC12 cells. *Inflammation* 37, 443–450.
- Tanti, J.-F., Ceppo, F., Jager, J., and Berthou, F. (2012). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front. Endocrinol.* 3, 181.
- Taouis, M., Dagou, C., Ster, C., Durand, G., Pinault, M., and Delarue, J. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E664–E671.
- Tappy, L., and Lê, K.-A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. Rev.* 90, 23–46.
- Tarantino, G., and Caputi, A. (2011). JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease. *World J. Gastroenterol.* 17, 3785–3794.
- Tarkowski, A., Bjersing, J., Shestakov, A., and Bokarewa, M.I. (2010). Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1419–1431.
- Taylor, S.S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N.M., Yang, J., Wu, J., and Anand, G.S. (2005). Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 25–37.
- Thompson, M.J., Roe, M.W., Malik, R.K., and Blackshear, P.J. (1994). Insulin and other growth factors induce binding of the ternary complex and a novel protein complex to the c-fos serum response element. *J. Biol. Chem.* 269, 21127–21135.
- Tirosh, A., Potashnik, R., Bashan, N., and Rudich, A. (1999). Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 274, 10595–10602.

Toker, A. (2000). Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol. Pharmacol.* 57, 652–658.

Tovar, S., Nogueiras, R., Tung, L.Y.C., Castañeda, T.R., Vázquez, M.J., Morris, A., Williams, L.M., Dickson, S.L., and Diéguez, C. (2005). Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 153, R1–R5.

Tran, L.T., Yuen, V.G., and McNeill, J.H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 332, 145–159.

Tran, T.T., Gupta, N., Goh, T., Naigamwalla, D., Chia, M.C., Koohestani, N., Mehrotra, S., McKeown-Eyssen, G., Giacca, A., and Bruce, W.R. (2003). Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlations with aberrant crypt foci promotion in rats. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 12, 47–56.

Trayhurn, P., and Beattie, J.H. (2001a). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 329–339.

Trayhurn, P., and Beattie, J.H. (2001b). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 329–339.

Triantafilou, M., Morath, S., Mackie, A., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2004). Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 117, 4007–4014.

Tsukumo, D.M.L., Carvalho-Filho, M.A., Carvalheira, J.B.C., Prada, P.O., Hirabara, S.M., Schenka, A.A., Araújo, E.P., Vassallo, J., Curi, R., Velloso, L.A., et al. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1986–1998.

Tura, A., Kautzky-Willer, A., and Pacini, G. (2006). Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 72, 298–301.

Turchini, G.M., Ng, W.-K., and Tocher, D.R. (2010). *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds* (CRC Press).

Turpin, S.M., Nicholls, H.T., Willmes, D.M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C.M., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Brönneke, H.S., et al. (2014). Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* 20, 678–686.

Ueki, K., Kondo, T., and Kahn, C.R. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5434–5446.

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., and Tsubokawa, M. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756–761.

Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., et al. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.

Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389, 610–614.

Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C.J., Issels, R.D., and Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107–15112.

Vague, J. (1996). Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947. *Obes. Res.* 4, 201–203.

Van den Bergh, A., Vanderper, A., Vangheluwe, P., Desjardins, F., Nevelsteen, I., Verreth, W., Wuytack, F., Holvoet, P., Flameng, W., Balligand, J.-L., et al. (2008). Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc. Res.* 77, 371–379.

- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* *346 Pt 3*, 561–576.
- Vanhaesebroeck, B., Vogt, P.K., and Rommel, C. (2010). PI3K: from the bench to the clinic and back. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *347*, 1–19.
- Van Horn, D.J., Myers, M.G., and Backer, J.M. (1994). Direct activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase by the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 29–32.
- Vaure, C., and Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* *5*, 316.
- van de Veerdonk, F.L., Joosten, L.A.B., Shaw, P.J., Smeekens, S.P., Malireddi, R.K.S., van der Meer, J.W.M., Kullberg, B.-J., Netea, M.G., and Kanneganti, T.-D. (2011). The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2260–2268.
- Vergès, B. (2005). New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* *31*, 429–439.
- Verma, S., Li, S.-H., Wang, C.-H., Fedak, P.W.M., Li, R.-K., Weisel, R.D., and Mickle, D.A.G. (2003). Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* *108*, 736–740.
- Virkamäki, A., Ueki, K., and Kahn, C.R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *103*, 931–943.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518–1525.
- Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., and Harris, T.B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* *282*, 2131–2135.
- Vivarelli, M.S., McDonald, D., Miller, M., Cusson, N., Kelliher, M., and Geha, R.S. (2004). RIP links TLR4 to Akt and is essential for cell survival in response to LPS stimulation. *J. Exp. Med.* *200*, 399–404.

- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205–214.
- Voliovitch, H., Schindler, D.G., Hadari, Y.R., Taylor, S.I., Accili, D., and Zick, Y. (1995). Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J. Biol. Chem.* 270, 18083–18087.
- Wada, T., Sasaoka, T., Funaki, M., Hori, H., Murakami, S., Ishiki, M., Haruta, T., Asano, T., Ogawa, W., Ishihara, H., et al. (2001). Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1633–1646.
- Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 21, 697–738.
- Wallenius, V., Wallenius, K., Ahrén, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C., and Jansson, J.-O. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* 8, 75–79.
- Walrand, S., Fisch, F., and Bourre, J.-M. (2010). Tous les acides gras saturés ont-ils le même effet métabolique ? *Nutr. Clin. Métabolisme* 24, 63–75.
- Wang, Z., and Nakayama, T. (2010). Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm.* 2010, 535918.
- Wang, X.Y., Bergdahl, K., Heijbel, A., Liljebris, C., and Bleasdale, J.E. (2001). Analysis of in vitro interactions of protein tyrosine phosphatase 1B with insulin receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 173, 109–120.
- Ward, O.P., and Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627–3652.
- Warne, P.H., Vician, P.R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364, 352–355.
- Wascher, T.C., Lindeman, J.H.N., Sourij, H., Kooistra, T., Pacini, G., and Roden, M. (2011). Chronic TNF- α neutralization does not improve insulin resistance or

endothelial function in “healthy” men with metabolic syndrome. *Mol. Med. Camb. Mass* 17, 189–193.

Waters, S.B., Yamauchi, K., and Pessin, J.E. (1993). Functional expression of insulin receptor substrate-1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* 268, 22231–22234.

Watts, G.F., and Chan, D.C. (2010). Mechanisms for therapeutic correction of dyslipidaemia in insulin resistance and diabetes. *Atheroscler. Suppl.* 11, 61–64.

Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., and Pagliassotti, M.J. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E275–E281.

Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holderman, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C., and Kuijper, J.L. (1995). Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J. Clin. Invest.* 96, 2065–2070.

Weiss, M., Steiner, D.F., and Philipson, L.H. (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.),.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115, 1111–1119.

Welty, F.K., Alfaddagh, A., and Elajami, T.K. (2016). Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 167, 257–280.

Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., and Ting, J.P.-Y. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 12, 408–415.

Wen, H., Ting, J.P.-Y., and O’Neill, L.A.J. (2012). A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat. Immunol.* 13, 352–357.

- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837–847.
- White, M.F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S2–S17.
- White, M.F., Maron, R., and Kahn, C.R. (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318, 183–186.
- White, M.F., Shoelson, S.E., Keutmann, H., and Kahn, C.R. (1988). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 2969–2980.
- Whiteman, E.L., Cho, H., and Birnbaum, M.J. (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 13, 444–451.
- Wilden, P.A., Kahn, C.R., Siddle, K., and White, M.F. (1992). Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J. Biol. Chem.* 267, 16660–16668.
- Wilk, S., Jenke, A., Stehr, J., Yang, C.-A., Bauer, S., Göldner, K., Kotsch, K., Volk, H.-D., Poller, W., Schultheiss, H.-P., et al. (2013). Adiponectin modulates NK-cell function. *Eur. J. Immunol.* 43, 1024–1033.
- Wilkinson, M., Wilkinson, D., Wiesner, G., Morash, B., and Ur, E. (2005). Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* 81, 19–30.
- Williams, C.M., and Burdge, G. (2006). Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc. Nutr. Soc.* 65, 42–50.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., and Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.* 74, 683–701.
- Winzell, M.S., Wulff, E.M., Olsen, G.S., Sauerberg, P., Gotfredsen, C.F., and Ahrén, B. (2010). Improved insulin sensitivity and islet function after PPARdelta activation in diabetic db/db mice. *Eur. J. Pharmacol.* 626, 297–305.

- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., et al. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900–904.
- Witztum, J.L., Mahoney, E.M., Branks, M.J., Fisher, M., Elam, R., and Steinberg, D. (1982). Nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* **31**, 283–291.
- Wolf, G., Trüb, T., Ottinger, E., Groninga, L., Lynch, A., White, M.F., Miyazaki, M., Lee, J., and Shoelson, S.E. (1995). PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J. Biol. Chem.* **270**, 27407–27410.
- Wölfling, B., Neumeier, M., Buechler, C., Aslanidis, C., Schölmerich, J., and Schäffler, A. (2008). Interfering effects of insulin, growth hormone and glucose on adipokine secretion. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* **116**, 47–52.
- Wong, S.W., Kwon, M.-J., Choi, A.M.K., Kim, H.-P., Nakahira, K., and Hwang, D.H. (2009). Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **284**, 27384–27392.
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., and Zhang, C. (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* **11**, 2667–2681.
- Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., and Zhang, C. (2014). Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* **12**, 4883–4897.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 6668–6672.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003a). TRAM is specifically involved in the Toll-like

receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 1144–1150.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., et al. (2003b). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640–643.

Yamamoto-Honda, R., Kadowaki, T., Momomura, K., Tobe, K., Tamori, Y., Shibasaki, Y., Mori, Y., Kaburagi, Y., Koshio, O., and Akanuma, Y. (1993). Normal insulin receptor substrate-1 phosphorylation in autophosphorylation-defective truncated insulin receptor. Evidence that phosphorylation of substrates might be sufficient for certain biological effects evoked by insulin. *J. Biol. Chem.* 268, 16859–16865.

Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., et al. (1996). Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3074–3084.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769.

Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., et al. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 13, 332–339.

Yasuda, K., Nishikawa, W., Iwanaka, N., Nakamura, E., Seino, Y., Tsuda, K., and Ishihara, A. (2002). Abnormality in fibre type distribution of soleus and plantaris muscles in non-obese diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 1001–1008.

Yekollu, S.K., Thomas, R., and O'Sullivan, B. (2011). Targeting curcumin to inflammatory dendritic cells inhibits NF- κ B and improves insulin resistance in obese mice. *Diabetes* 60, 2928–2938.

Yenush, L., Makati, K.J., Smith-Hall, J., Ishibashi, O., Myers, M.G., and White, M.F. (1996). The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. *J. Biol. Chem.* 271, 24300–24306.

Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Tenner, A.J., Tomiyama, Y., et al. (2000). Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96, 1723–1732.

Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.* 123, 3404–3408.

Youm, Y.-H., Adijiang, A., Vandanmagsar, B., Burk, D., Ravussin, A., and Dixit, V.D. (2011). Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* 152, 4039–4045.

Zabolotny, J.M., Haj, F.G., Kim, Y.-B., Kim, H.-J., Shulman, G.I., Kim, J.K., Neel, B.G., and Kahn, B.B. (2004). Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J. Biol. Chem.* 279, 24844–24851.

Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C., and Greenberg, A.S. (2002). Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51, 2929–2935.

Zhang, X., Xu, A., Chung, S.K., Cresser, J.H.B., Sweeney, G., Wong, R.L.C., Lin, A., and Lam, K.S.L. (2011). Selective inactivation of c-Jun NH₂-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes* 60, 486–495.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

Zhao, L., and Vogt, P.K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27, 5486–5496.

Zheng, C., Yang, Q., Xu, C., Shou, P., Cao, J., Jiang, M., Chen, Q., Cao, G., Han, Y., Li, F., et al. (2015). CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E7239–E7248.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.

Zick, Y. (2001). Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* 11, 437–441.

Zick, Y. (2005). Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2005, pe4.

Zigman, J.M., and Elmquist, J.K. (2003). Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144, 3749–3756.