



HAL
open science

Rôle du système ANP/GC-A dans le maintien de l'homéostasie énergétique et le développement du diabète de type 2

Deborah Carper

► **To cite this version:**

Deborah Carper. Rôle du système ANP/GC-A dans le maintien de l'homéostasie énergétique et le développement du diabète de type 2. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30126 . tel-03364362

HAL Id: tel-03364362

<https://theses.hal.science/tel-03364362>

Submitted on 4 Oct 2021

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Deborah CARPER

Le 30 octobre 2020

**Rôle du système ANP/GC-A dans le maintien de l'homéostasie
énergétique et le développement du diabète de type 2**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

Cédric MORO

Jury

Mme Hélène DUEZ, Rapporteur

M. Xavier PRIEUR, Rapporteur

M. Ez-Zoubir AMRI, Examineur

Mme Anaïs BRIOT, Examinatrice

Mme Isabelle CASTAN-LAURELL, Présidente du jury

M. Cédric MORO, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma reconnaissance et toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou de loin, à réaliser mes travaux de thèse et à obtenir le merveilleux titre de docteur.

Je remercie tout d'abord mon jury de thèse, mes deux rapporteurs **Hélène Duez** et **Xavier Prieur**, mes deux examinateurs **Zoubir Amri** et **Anaïs Briot** ainsi que ma présidente de jury **Isabelle Castan-Laurell**. Merci à tous d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et merci pour les discussions enrichissantes lors de la soutenance. Un grand merci aussi aux membres de mon comité de thèse, **Audrey Carrière** et **Xavier Fioramonti**, votre écoute et votre bienveillance m'ont énormément touchée.

Je remercie **Dominique Langin** et **Cédric Moro** pour m'avoir accueillie dans leur équipe. Cédric (« Toulouse, 40 ans »), mon directeur de thèse, je te remercie de m'avoir prise en stage avec toi en M2 puis de m'avoir offert la possibilité de continuer en thèse. Merci d'avoir cru en mes capacités, de m'avoir accordé ta confiance, de m'avoir permis de travailler sur un sujet si intéressant et de réaliser un panel aussi varié d'expériences. J'ai toujours été impressionnée par tes qualités scientifiques. Tu es un scientifique brillant. C'est peut-être l'avis qu'on tous les thésards pour leur mentor, mais en ce qui me concerne, tu n'as jamais arrêté de m'impressionner. Ces 3 années ½ avec toi, m'ont énormément appris, sur la science mais également sur l'aspect humain et je te souhaite sincèrement de toujours garder cette flamme qui brule en toi pour la science. Un énorme merci pour tout !

Au labo j'ai eu la chance de rencontrer la belle **Sophie Bonnel**. Tu es très vite passée de « collègue » à « vraie amie ». Tu es une amie extraordinaire, toujours présente, généreuse, sans jugement et bienveillante. Merci mille fois d'être toi et merci pour tout ton soutien ces années de thèse. **Claire Laurens**, toi aussi tu es devenue une amie. Tu as toujours été là pour me conseiller, m'aider, me soutenir au quotidien au labo. Je ne te remercierai jamais assez et je n'oublierai pas tout ce que tu as fait pour moi. **Julie Vion** et **Benjamin Lair** merci pour les petits moments de complicité et de partage lors des congrès, des réunions ou encore lors des repas le midi. Je vous souhaite vraiment de vous épanouir dans vos vies futures. **Aline Mairal**, merci de m'avoir prise sous ton aile à mon arrivée au labo. Je suis fière d'avoir appris mes premières manip avec toi, on ne peut rêver mieux comme formatrice. Merci pour ta patience et ta gentillesse, merci pour ta bienveillance, merci pour ton humour et merci pour ta bonne humeur sans faille. Tu es LE pilier de l'équipe pour le côté matériel, organisationnel et pratique mais aussi pour l'ambiance. Qui dans l'équipe n'a pas déjà ri grâce à toi ? alors merci pour tout ça, merci d'avoir été là et je souhaite à tous les étudiants, tous les thésards, d'avoir une Aline dans leur équipe. **Virginie Bourlier**, je te remercie pour ton aide surtout sur les rapports de stage ou préparations aux oraux. Ta rigueur, ta clarté, ta précision m'ont été d'une très grande aide. D'un point de vue un peu plus personnel, merci d'avoir eu des petits mots bienveillants quand tu voyais que j'en avais besoin, tu étais toujours dans le juste et tombais aux bons moments. **Geneviève Tavernier**, merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes

REMERCIEMENTS

questionnements, de relire mes rapports, de m'avoir aidée à préparer ces satanées poudres la première fois que j'ai fait du tampon KRHA. **Boris Monge-Roffarello**, même si tu es parti du labo au cours de ma thèse, je n'oublie pas les moments partagés avec toi, les repas que ce soit à la cantine le midi ou le soir l'un chez l'autre, merci de m'avoir accompagnée le long de cette thèse et j'espère sincèrement pour toi que ta brasserie marchera ! Je remercie aussi les stagiaires avec qui j'ai pu travailler au cours de cette thèse, je pense notamment à **Anisha Parmar**, **Jorge Ayala** et à **Laurène Mazeyrie**. Vous m'avez beaucoup appris sur la pédagogie, l'organisation des idées, la confiance, ce sont des qualités très utiles dans la vie professionnelle mais également personnelle. Laurène, j'aurais tellement apprécié travailler avec toi plus longtemps cette année, le confinement en mars nous en a empêchées mais je suis heureuse de voir que ça ne t'a pas découragée pour faire une thèse. Bravo à toi et tu verras, tout se passera bien. Merci également à **Laurent Monbrun** et **Marie Marquès** pour votre aide sur le projet et à **Nathalie Viguerie**, **Emilie Montastier**, **Sylvie Caspar-Baugil**, **Dominique Larrouy**, **Etienne Mouisel**, **Pierre-Damien Denechaud**, **Emeline Reczens**, **Jeremy Dufau** et **Camille Bergoglio** pour nos discussions.

Au cours de cette thèse j'ai également eu la chance d'interagir avec d'autres personnes : **Jean-Philippe Pradère** un grand merci pour ton soutien et ta bienveillance, les discussions scientifiques ou non avec toi m'ont toujours fait plaisir et ont toujours été enrichissantes. Tu t'es toujours montré disponible et réconfortant. Tu n'imagines pas le soutien que tu m'as apporté. Merci à **Bernard Masri** pour tes blagues, ta bonne humeur et tes encouragements. **Elena Morin**, ce fut un plaisir de te former à l'isolement des mitochondries, j'ai vraiment apprécié ce moment de partage scientifique avec toi et te souhaite une très belle thèse. Et puis **Enzo Piccolo**, Enz-Enz, tu as toi aussi été un pilier, un ami. Tout au long de cette thèse nous avons pu partager nos doutes, nos angoisses, nos peurs mais aussi nos joies et nos réussites. Les pauses café avec toi me manqueront mais il est évident que nous garderons contact. **Damien Lagarde**, un vrai plaisir aussi d'avoir croisé ta route, nos discussions scientifiques enflammées m'ont toujours remotivée et collaborer avec toi a été tout autant enrichissant que plaisant. Merci à **Yannis Sainte-Marie** pour ta constante gentillesse. **Frédéric Martins**, **Alexandre Lucas**, merci aussi pour vos explications, vos conseils. Un merci aussi à ceux qui nous entourent au quotidien, **Mathieu Paillisson** et **Xavier Sudre** de la zootechnie, **Emeline Pastor** et **Karine Moreira** de l'administration, **Sophie Fonvielle** et **Lydia Pasteur** du magasin, **Jean-Jérôme Soueix** de l'informatique.

Je voudrais maintenant remercier mes proches.

Tout d'abord, je remercie **mes parents** puisque sans eux je ne serais pas là. Vous m'avez appris à toujours me dépasser, à donner le meilleur de moi-même et vous avez été et êtes toujours de bons modèles de courage.

REMERCIEMENTS

Je remercie mes amis les plus anciens, *ma famille gersoise* : **Sylvain Fourquet, Ambre Vicente, Dyliaana Renard, Théo Pallas, Julien Palacin, Laurent Saint-Jeannet, Marc Cahuzac, Anthony Gabouloff, Mikael Belotti** et vos chéri(e)s bien-sûr. Nous avons grandi ensemble, nous sommes devenus des adultes main dans la main. On ferait n'importe quoi les uns pour les autres, une vraie famille soudée, unique et précieuse. Merci de faire partie de ma vie et d'avoir toujours été là, années après années.

Un grand merci à *ma famille de Pau*. **Sandrine Lafargue, Frédéric Delfau, Pierre-Louis Lopez, Cindy Espitalier, Paul-Emile Lopez, Nadège Lafargue, Philippe Lafargue, papi Jeannot** et mamie **Janine Lafargue, Stéphane Bessagnet, Clément** et **Hugo Bessagnet**. A votre rencontre j'ai été bouleversée par votre bienveillance, votre gentillesse et par l'amour qui règne dans cette famille. Vous m'y avez, dès le départ, fait une place. Même si maintenant ça fait 10 ans, je n'oublie jamais la chance que j'ai de vous avoir rencontrés et d'avoir une famille comme la vôtre. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté et pour tout le soutien toutes ces années d'études.

Je remercie *mes amis de fac* : **Emilie Cerezo, Alexia Tasca, Alexandre Nicolas, Alicia Perez et Laetitia Bugarel**. Toutes ces années d'études sont passées si vite à vos côtés. Grâce à vous, elles sont associées à de beaux souvenirs. Merci pour le soutien, l'aide, le bonheur que vous m'avez apporté et que vous m'apportez toujours malgré la distance qui nous sépare. Et un très gros merci à Emilie, sans toi je ne serai pas arrivée jusqu'au doctorat, c'est sûr !

Je remercie également *mes amis de « soirées »* : **Jean-Baptiste Larié-Kerboull, Alain Tarrano, Adrien Hourriez, Mickael Beddiaf, Cyrielle Remot, Célia Quemerais, Clément Panassie, Alan Clavier, Geoffroy Laventure**. Même si on s'est rencontrés lors de soirées, notre amitié n'est pas réduite au partage d'un loisir commun, c'est bien plus que ça et vous me l'avez prouvé ces derniers mois de thèse. Merci pour votre soutien, pour vos mots réconfortants, pour vos encouragements et pour tous ces fabuleux moments passés ensemble.

Pour terminer, je tiens sincèrement à dire un très grand merci à tous les établissements dans lesquels j'ai pu sortir ces 8 années d'études : **La Plage, Le Duplex, Le Cosmopolitain, Le Cri de la mouette, Le Bikini, Le Connexion, Le Downtown, le Rex**, mais surtout mon lieu préféré sur cette terre : **L'Autre**. Merci pour toute la joie, tout le bonheur, toutes les découvertes musicales, toutes les rencontres. Les sorties pour moi ce n'est pas juste une occasion de faire la fête, c'est mon seul vrai plaisir, mon seul exutoire, c'est mon oxygène. Sans vous, je n'aurais pas tenu le coup ces 8 années d'études, j'en suis sûre. Mille mercis bien chaleureux.

Le jour de ma soutenance de thèse restera gravé dans ma mémoire comme ayant été un jour plein d'amour, d'amitié, de bienveillance et d'attentions de votre part à mon égard. Je ne l'oublierai jamais, je ne pouvais pas rêver mieux pour clôturer ces longues années d'études.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	15
INTRODUCTION.....	17
Partie I : Le système ANP/GC-A	19
I- Les peptides natriurétiques : des hormones cardiaques	19
1) Découverte des peptides natriurétiques	19
2) Mécanisme de sécrétion des peptides natriurétiques.....	19
A) ANP	20
B) BNP	21
3) Régulation des peptides natriurétiques	22
A) Régulation transcriptionnelle de Nppa et Nppb	22
B) Régulation de la sécrétion des peptides natriurétiques.....	23
II- Le récepteur biologiquement actif des PN : le GC-A	25
1) Structure du GC-A	26
2) Signalisation du GC-A	26
A) Activation du GC-A	26
B) Production de GMPc, un second messenger.....	27
C) Les protéines kinases GMPc dépendantes	28
3) Régulation du GC-A	29
A) Régulation transcriptionnelle de GC-A.....	29
B) Désensibilisation du GC-A.....	29
a. La désensibilisation homologue	29
b. La désensibilisation hétérologue	30
C) Internalisation, dégradation et recyclage du GC-A	30
III- Dégradation des peptides natriurétiques.....	31
1) Le récepteur de clairance, NPRC	31
A) Structure du NPRC.....	31
B) Internalisation du NPRC.....	31
C) Signalisation du NPRC.....	32
2) Dégradation enzymatique des peptides natriurétiques	32
A) La néprilysine.....	32
B) L'enzyme dégradant l'insuline.....	33
IV- Fonctions du système ANP/GC-A dans la sphère cardiovasculaire et rénale.....	34
1) Effets endocrines de l'ANP	34
A) Natriurèse et diurèse.....	34
B) Vasodilatation.....	34
a. Relaxation des cellules musculaires lisses	34
b. Perméabilité endothéliale	35
C) Inhibition du système rénine angiotensine aldostérone.....	35
D) Rôles dans le système nerveux central	36
2) Effets locaux de l'ANP	36
A) Anti-hypertrophie cardiaque.....	36
B) Fibrose atriale	36
3) Modulation des peptides natriurétiques en conditions physiologiques et pathologiques	37
A) Conditions physiologiques.....	37
B) Conditions pathologiques.....	38

Partie II : La thermogénèse sans frisson.....	41
I- La production de chaleur	41
1) Deux sites de production de chaleur	41
A) Les adipocytes bruns	41
a. Redécouverte du tissu adipeux brun chez l'Homme	41
b. Structure du tissu adipeux brun.....	43
B) Les adipocytes beiges	43
a. Distribution anatomique du tissu adipeux blanc.....	43
b. Morphologie des adipocytes blancs et beiges	44
c. Origine des adipocytes beiges	45
C) Distinctions d'adipocytes entre l'Homme et la souris.....	46
2) Activité thermogénique.....	47
A) La thermogénèse dépendante d'UCP1.....	47
a. La chaîne de transfert des électrons.....	47
b. Le découplage de la respiration par UCP1	48
B) La thermogénèse indépendante d'UCP1.....	49
a. Le cycle calcique.....	49
b. Le cycle créatine.....	50
II- La mobilisation de substrats pour alimenter la thermogénèse	50
1) Le glucose	50
2) Acides gras et triglycérides	51
A) La lipolyse dans les tissus adipeux blancs et bruns	52
B) La lipogenèse <i>de novo</i> dans le BAT.....	52
C) Les lipoprotéines riches en triglycérides	53
3) Autres substrats énergétiques	54
III- Contrôle de la thermogénèse par le système β-adrénergique.....	54
1) Le système β-adrénergique : principal contrôle de la thermogénèse.....	54
A) Les récepteurs β -adrénergiques.....	54
a. Les récepteurs β -adrénergiques chez la souris	55
b. Les récepteurs β -adrénergiques chez l'Homme	55
B) Voie de signalisation des β -AR.....	56
2) Le système β-adrénergique est dispensable pour la thermogénèse sans frisson	56
IV) Rôle de l'ANP dans les fonctions adipocytaires	57
1) L'ANP, un facteur lipolytique puissant	57
2) Rôle de l'ANP dans la thermogénèse	58
Partie III : Le diabète de type 2.....	61
I- L'insuline : au cœur du diabète de type 2	61
1) Rôles physiologiques de l'insuline dans le contrôle de la glycémie.....	61
A) Voies activées par l'insuline	62
a. L'absorption de glucose.....	62
b. La glycogénogenèse.....	62
c. La Lipogenèse <i>de novo</i>	63
B) Voies inhibées par l'insuline	63
a. La lipolyse	63
b. La néoglucogenèse	63
C) Régulation négative physiologique du signal insulinique.....	63
a. Internalisation du complexe insuline/IR	63
b. Les protéines phosphatases	64
c. Les lipides phosphatases.....	64
2) Le diabète de type 2 : insulino-résistance.....	65
A) Physiopathologie du diabète de type 2.....	65
B) L'obésité, premier facteur de risque du diabète de type 2.....	66

II- Principaux acteurs responsables de l'insulinorésistance.....	67
1) La lipotoxicité	67
2) L'inflammation	69
3) Le stress du réticulum endoplasmique	70
4) Le stress oxydant	72
A) Contrôle du stress oxydant	72
B) Rôle bénéfique des ROS dans la signalisation à l'insuline	72
C) Rôle délétère des ROS dans la signalisation à l'insuline.....	73
III- La fonction mitochondriale musculaire : implication dans le DT2 ?.....	74
1) Activité mitochondriale.....	74
2) Biogenèse mitochondriale.....	75
3) Dynamique mitochondriale	76
4) Mitophagie	77
5) Typologie des fibres musculaires	78
6) Lien causal d'une altération mitochondriale dans l'insulinorésistance ?.....	80
IV- Le système ANP/GC-A dans le diabète de type 2.....	81
1) Altérations du système ANP/GC-A associées au diabète de type 2.....	81
A) Les niveaux plasmatiques d'ANP dans le diabète de type 2	81
B) L'expression du GC-A et du NPRC dans le diabète de type 2	82
2) Rôles de l'ANP dans les fonctions musculaires	84
OBJECTIFS	87
RESULTATS.....	91
PARTIE I : Rôle de l'ANP dans la thermogenèse sans frisson.....	93
Introduction	93
Article 1.....	94
Discussion	129
PARTIE II : Rôle du système ANP/GC-A dans le développement du diabète de type 2.....	133
I – Temps de jeune optimal avant la réalisation d'un ITT chez la souris.....	133
Introduction	133
Article 2.....	134
Discussion	153
II – Conséquence d'une altération du système ANP/GC-A sur le métabolisme énergétique	157
Introduction	157
Article 3.....	158
Discussion	203
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	209
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	217
ANNEXES.....	241
I- Les peptides natriurétiques : nouvelle cible dans le développement du diabète de type 2 ?.	243
II- GDF15 est sécrété par le muscle squelettique pendant un exercice et induit la lipolyse chez l'Homme	247
ABSTRACT	279

LISTE DES ABREVIATIONS

aa: acides amines
acétylCoA: *acetyl-coenzyme A*
Ach: *acetylcholine*
ADNmt: ADN mitochondrial
ADNn: ADN nucléaire
ADP: *adenosine diphosphate*
AG: acides gras
Akt: *protein kinase B*
AMPC: *cyclic adenosine monophosphate*
Ang II: *angiotensin II*
ANGPTL4: *angiopoietin-like 4*
ANP: atrial natriuretic peptide
ANT: *adenine nucleotide translocator*
AP-1: *activator protein 1*
AS160: *Akt substrate*
ASO: antisense oligonucleotide
AT1: *angiotensin II type 1*
ATF-2: *activating transcription factor 2*
ATF4: *activating transcription factor 4*
ATF6: *activating transcription factor 6*
ATGL: *adipose TG lipase*
ATP: *adenosine triphosphate*
BAT: tissu adipeux brun
BiP: *binding immunoglobulin protein*
BNP: b-type natriuretic peptide
CAT: catalase
CGI-58: *comparative gene identification-58*
CHOP: *C/EBP homologous protein*
ChREBP: *carbohydrate response element binding protein*
Cidea: *cell death inducing DFFA like effector A*
CML: cellules de muscle lisse
CNP: c-type natriuretic peptide
CPT1b: *carnitine palmitoyltransferase 1B*
CRE: *cAMP response elements*
CREB: *CRE-binding protein*
DG: diacylglycérols
DGAT2: *diacylglycerol O-acyltransferase 2*
DNL: lipogenèse *de novo*
DRP1 : *dynamain-related protein-1*
DT2: diabète de type 2
EDL: *extensor digitorum longus*
EGF: *epidermal growth factor*.
eIF2 α : *eukaryotic translation initiation factor 2, subunit α*
ET-1: *endothelin 1*
eWAT: WAT epididymaire
FOXO1: *Forkhead box 1*
G6Pase: *glucose 6-phosphatase*

GATA4: *GATA binding protein 4*
 GC: guanylyl cyclase
 GC-A: *guanylyl cyclase A*
 GC-B: *guanylyl cyclase B*
 GDP: *guanosine diphosphate*
 GLUT1: *glucose transporter 1*
 GLUT4: *glucose transporter 4*
 GMPc: *cyclic guanosine monophosphate*
 GP: *glycogen phosphorylase*
 GPx: glutathion peroxydase
 GS : *glycogen synthase*
 GSH: glutathion réduit
 GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*
 GSSH: glutathion oxydé
 GTP: *guanosine triphosphate*
 HFD: régime hyperlipidique
 HK2: *hexokinase 2*
 hMADS: *human multipotent adipose-derived stem cells*
 HNF4 α : *hepatocyte nuclear factor 4 α*
 iBAT: BAT interscapulaire
 IC: insuffisance cardiaque
 IDE : *insulin-degrading enzyme*
 IDF: fédération internationale du diabète
 IKK: *I κ B kinase*
 IL-6: *interleukine-6*
 IL-8: *interleukine-8*
 IMCL: lipides intramyocellulaires
 IP₃R: *inositol 1, 4, 5 triphosphate receptor*
 IR: *insulin receptor*.
 IRE1: *inositol-requiring enzyme 1*
 IRS: *insulin receptor substrate*
 ITT: test de tolérance à l'insuline
 iWAT: WAT inguinal
 JNK: *cJUN NH2-terminal kinase*
 KHD: domaine homologue aux kinases
 LAR: *leukocyte common antigen-related protein*
 LC3: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*
 LHS: lipase hormono sensible
 LPL: *lipoprotein lipase*
 MCP1: *monocyte chemoattractant protein-1*
 MEF2: *myocyte enhancer factor 2*
 MET: microscopie électronique à transmission
 Mfn1: mitofusine 1
 Mfn2: mitofusine 2
 MG: monoacylglycérols
 MGL: *monoacylglycerol lipase*
 MHC: myosine
 mTORC2: *mTOR Complex 2*
 NEP: *neprilysin*
 NF-AT3: *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4*
 NF-Y: *nuclear transcription factor Y*
 NF- κ B: nuclear factor κ B

NIH: institut national de la santé
 NO: *nitric oxide*
 Nppa: *natriuretic peptide A*
 Nppb: *natriuretic peptide B*
 Npr1: *natriuretic peptide receptor 1*
 Npr3: *natriuretic peptide receptor 3*
 NPRC: *natriuretic peptide receptor C*
 NRF1: *nuclear respiratory factor 1*
 NRF2: *nuclear factor erythroid 2*
 NRF2: *nuclear respiratory factor 2*
 NRSE: *neuron restrictive silencer element*
 OMS: organisation mondiale de la santé
 OPA1: *optic atrophy 1*
 OXPHOS: *oxidative phosphorylation*
 p38MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinases*
 PCSK6: *proprotein convertase subtilisin/kexin-6*
 PDE: phosphodiesterase
 PDE3B: *phosphodiesterase 3B*
 PDGFR α : *platelet derived growth factor receptor α*
 PDK1: *PIP3-dependant kinase 1*
 PEPCK: *phosphoenolpyruvate carboxykinase*
 PERK: *PKR-like ER kinase*
 PGC1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*
 PH: *pleckstrin homology*
 PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*
 PIP2: *phosphatidylinositol biphosphate*
 PIP3: *phosphatidylinositol triphosphate*
 PKA: protéine kinase AMPc dépendante
 PKC: *protein kinase c*
 PKG: protéines kinases GMPc dépendantes
 PKM: *pyruvate kinase muscle isoform*
 PLC: *phospholipase C*
 PLIN1: *perilipin 1*
 PN: peptides natriurétiques
 PP2A: *protein phosphatase 2A*
 PPAR δ : *peroxisome proliferator-activated receptor δ*
 Prdm16: *PR domain containing 16*
 PTB: *phospho-tyrosine binding*
 PTEN: *phosphatase and tensin homologue*
 PTP: protéine phosphatase
 PTP1B: *protein tyrosine phosphatase 1B*
 RCPG: récepteurs couplés aux protéines G
 RE: réticulum endoplasmique
 ROS: espèces réactives de l'oxygène
 rpWAT: WAT rétropéritonéal
 RS: réticulum sarcoplasmique
 RyR2 : *ryanodin receptor 2*
 ScWAT: WAT sous-cutané
 Ser: sérine
 SERCA: *Ser Ca²⁺-ATPase*
 SHIP2: *Src homologoy 2 SH2 domain-containing inositol 5' phosphatase 2*
 Smad3: *SMAD family member 3*

SOCS3: *suppressor of cytokine signalling 3*
SOD: superoxyde dismutase
Sp1: *specificity protein 1*
SRE: *serum-responsive element*
SREBP1c: *sterol regulatory element-binding proteins 1c*
SSRE: *shear stress-responsive element*
SVF: fraction stroma-vasculaire
T3 : *triiodothyronine*
TAC: constriction aortique transversale
TB: T-box
TFAM: *mitochondrial transcription factor*
TG: tryglycérides
TGF- β : *transforming growth factor β*
Thr: thréonine
TMEM26: *transmembrane protein 26*
TNFR1: *TNF receptor 1*
TNF- α : *tumor necrosis factor- α*
TRB3: *tribbles pseudokinase 3*
TRE: *thyroid hormone-responsive element*
TRL: lipoprotéines riches en tyglycérides
Tyr: tyrosines
UCP: uncoupling protein
UCP1: *uncoupling protein 1*
UPR: *unfolded protein response*
VLDL: very low density lipoprotein
vWAT: WAT viscéral
WAT: tissu adipeux blanc
XBP1: *X box-binding protein1*
XBP1s: *X box-binding protein1 spliced*
 α -AR: α -adrenergic receptor
 β -AR: β -adrenergic receptor
 β -gal: β -galactosidase

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DE L'ANP ET DU BNP.	20
FIGURE 2 : MECANISME DE SYNTHESE DE L'ANP ET DU BNP.....	22
FIGURE 3 : STRUCTURE ET SIGNALISATION DU RECEPTEUR AUX PN, LE GC-A.	27
FIGURE 4 : MECANISMES DE DEGRADATION DES PN.	33
FIGURE 5 : EFFETS PRINCIPAUX DE L'ANP DANS LA REGULATION DE LA VOLEMIE ET LA PRESSION SANGUINE.....	37
FIGURE 6 : LOCALISATION ANATOMIQUE DU TISSU ADIPEUX BLANC SOUS-CUTANE, DU TISSU ADIPEUX BLANC VISCERAL ET DU TISSU ADIPEUX BRUN, CHEZ LA SOURIS ET L'HOMME.	42
FIGURE 7 : DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ENTRE LES ADIPOCYTES BLANCS, BEIGES ET BRUNS.....	44
FIGURE 8 : REPRESENTATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE.	47
FIGURE 9 : CHAINE DE TRANSFERT DES ELECTRONS ET DECOUPLAGE PAR UCP1.	49
FIGURE 10 : MOBILISATION ET UTILISATION DE GLUCOSE ET D'ACIDES GRAS AU COURS D'UNE EXPOSITION AU FROID.	53
FIGURE 11 : HYPOTHESE EXPLIQUANT L'EFFET LIPOLYTIQUE PRIMATE SPECIFIQUE DE L'ANP.	58
FIGURE 12 : VOIES D'ACTIVATION DE LA THERMOGENESE ET DE LA LIPOLYSE PAR LA NORADRENALINE ET L'ANP.	59
FIGURE 13 : EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'INSULINE DANS LA REGULATION DE LA GLYCEMIE.	61
FIGURE 14 : VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINE ET REGULATION DU SIGNAL INSULINIQUE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE. - : INHIBE ; + : ACTIVE. EN ROUGE SONT REPRESENTES LES REGULATEURS NEGATIFS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE.	64
FIGURE 15 : REPRESENTATION DES DEFAUTS LIES A L'INSULINE DANS LES DIABETES DE TYPE 1 ET 2.	66
FIGURE 16 : ACTEURS MAJEURS RESPONSABLES DE LA MISE EN PLACE DE L'INSULINORESISTANCE.	67
FIGURE 17 : REPRESENTATION DE LA BIOGENESE, DE LA FUSION ET DE LA FISSION MITOCHONDRIALE ET DE LA MITOPHAGIE.	78
FIGURE 18 : ALTERATION DU SYSTEME ANP/GC-A DANS L'OBESITE ET LE DIABETE DE TYPE 2.....	84
FIGURE 19 : L'ANP EST UN ACTIVATEUR ENDOCRINE DE LA THERMOGENESE SANS FRISSON.	132
FIGURE 20 : LE TEMPS DE JEUNE OPTIMAL AVANT LA REALISATION D'UN TEST DE TOLERANCE A L'INSULINE CHEZ LA SOURIS EST DE 2H.	155
FIGURE 21 : LE DEFICIT DU SYSTEME ANP/GC-A EST CAUSAL D'UNE INSULINORESISTANCE, UNE DIMINUTION DES CAPACITES D'ENDURANCE ET UNE ALTERATION DES ADAPTATIONS MUSCULAIRES A L'ENTRAINEMENT PHYSIQUE.	207

INTRODUCTION

Partie I : Le système ANP/GC-A

I- Les peptides natriurétiques : des hormones cardiaques

1) Découverte des peptides natriurétiques

Ce sont 25 ans après la découverte de l'existence de granules de sécrétion dans l'oreillette cardiaque que de Bold *et al.* ont établi que le cœur est une glande endocrine. En effet, en 1981 ces chercheurs ont découvert qu'une injection intraveineuse d'homogénat auriculaire induit une diminution rapide de la pression sanguine et une augmentation de l'excrétion d'eau et de sodium dans le rein de rats (de Bold et al. 1981). Afin d'identifier les molécules libérées par l'oreillette cardiaque à l'origine des effets rénaux, les auteurs ont purifié, à partir du tissu atrial, plusieurs peptides ayant des activités natriurétiques et vasorelaxantes. Ces peptides, forment la famille des peptides natriurétique (PN). Chez les mammifères, les PN regroupent, dans l'ordre chronologique de découverte, l'ANP (*atrial natriuretic peptide*), le BNP (*B-type natriuretic peptide*) et le CNP (*C-type natriuretic peptide*). Le CNP ne sera pas abordé dans cette thèse. Tous les membres de la famille des PN partagent une structure en anneau de 17 acides aminés (aa) reliés par un pont disulfure, qui est hautement conservée entre les espèces (Inagami et al. 1987). Cette structure circulaire est primordiale pour la liaison du PN à ses récepteurs et son activité biologique.

Chez un sujet sain au repos, les niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP sont respectivement d'environ 3-20 pM et 1-15pM. La demie vie de l'ANP est de 2 minutes alors que celle du BNP est de 20 minutes (Mukoyama et al. 1991; Yandle et al. 1986). L'ANP est très conservé entre les espèces alors que le BNP, avec seulement 35% d'homologie entre l'Homme et les espèces murines, est le PN le plus variable (Lincoln R. Potter et al. 2009).

2) Mécanisme de sécrétion des peptides natriurétiques

Dans le cœur, l'oreillette est la source majeure de production de l'ANP et du BNP. Ils peuvent également être synthétisés dans les ventricules mais en condition physiologique, on estime une expression de l'ANP, 250 à 1000 fois plus élevée dans l'oreillette que dans le ventricule. Les expressions ventriculaires de l'ANP et du BNP augmentent en condition pathologique telle que l'insuffisance cardiaque (Mukoyama et al. 1991; Nakagawa, Nishikimi, et Kuwahara 2019). Les cardiomyocytes de l'oreillette et des ventricules ne présentent pas le

même phénotype endocrine et ont des capacités de stockage et de sécrétion de peptides différentes (Goetze 2010).

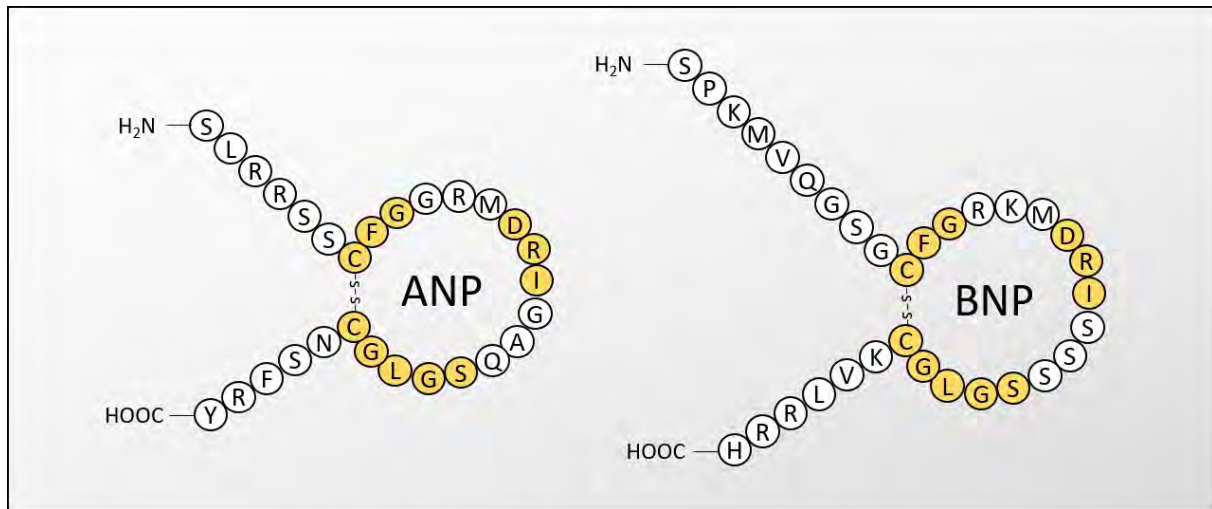


Figure 1 : Structure de l'ANP et du BNP. Les PN contiennent une structure en anneau reliée par un pont disulfure. Les acides aminés communs à tous les PN ont été colorés en jaune. Adapté de (Lincoln R. Potter, Abbey-Hosch, et Dickey 2006)

A) ANP

La synthèse de l'ANP est semi constitutive : 40% d'ANP néo-synthétisés sont directement et sans stimulation libérés dans la circulation sanguine et les 60% restants sont stockés dans les granules de sécrétion (Iida et Shibata 1994).

Les mécanismes de biosynthèse et de sécrétion d'ANP dans les ventricules ne sont pas encore connus. Dans l'oreillette, l'ANP est sécrété sous forme d'une prépro-hormone (prépro-ANP) de 151 aa, codée par le gène *Nppa* (*natriuretic peptide A*). *Nppa* est un gène de 2,7 kpb contenant 3 exons et 2 introns, localisé sur le chromosome 1 chez l'humain et le chromosome 4 chez la souris. L'exon 1 code pour la région 5' non traduite, le peptide signal et les 16 premiers acides aminés du pro-ANP. L'exon 3 code pour la tyrosine terminale du pro-ANP chez l'humain et les 3 derniers acides aminés chez la souris. L'exon 2 code pour tout le reste de la prohormone (Vesely 2002). Suite à la transcription du *Nppa* en prépro-ANP, ce dernier est clivé en pro-ANP, une structure de 126 aa, qui passe de l'appareil de Golgi aux granules de sécrétion immatures puis matures pour y être stocké jusqu'à relargage (Woodard et Rosado 2008). Au moment de l'exocytose dans le tissu atrial, le pro-ANP est clivé par la corine, une protéase sérine transmembranaire, générant ainsi 2 formes détectables dans le plasma : l' α -

ANP biologiquement actif constitué de 28 aa et le NT-ProANP forme inactive constituée de 98 aa. La corine est synthétisée sous forme de zymogène inactif et est activée par clivage protéolique par la PCSK6 (*proprotein convertase subtilisin/kexin-6*) lorsqu'elle se trouve à la surface de la cellule (S. Chen et al. 2015).

Il y a une forte homologie du gène *Nppa* entre les espèces, comme l'ANP, et la séquence codant pour le pro-ANP est très conservée entre les humains et les rongeurs.

B) BNP

Le mécanisme de sécrétion du BNP diffère de celui de l'ANP bien que des similitudes existent. Contrairement à l'ANP, le BNP est totalement et directement sécrété dans la circulation sanguine : on parle de sécrétion constitutive.

Le gène codant le BNP est le *Nppb* (*natriuretic peptide B*), localisé sur les chromosomes 1 et 4 respectivement chez l'humain et la souris. Le *Nppb* humain contient 3 exons et 2 introns. L'exon 1 du *Nppb* code pour la région 5' non traduite et une partie du prépro-BNP. L'exon 3 code pour les 5 derniers acides aminés et la région 3' non traduite. L'exon 2 code pour tout le reste du peptide (LaPointe 2005). Comme l'ANP, il est synthétisé par les cardiomyocytes sous forme de prépro-BNP de 134 aa puis converti en pro-BNP de 108 aa. Dans l'appareil de Golgi, le pro-BNP est glycosylé au niveau de 7 sites dans sa région N-terminale : Thréonine (Thr)36, Sérine (Ser)37, Ser44, Thr48, Ser53, Thr58, et Thr71. Le pro-BNP O-glycosylé est transporté à travers le réseau Golgien pour y être clivé puis sécrété en forme biologiquement active (BNP) et inactive (NT-proBNP) de 32aa et 76aa respectivement (Schellenberger et al. 2006). La corrélation entre les taux plasmatiques de BNP et de NT-proBNP est de 92%. De plus, la demi-vie du NT-proBNP est de 60-120min pour le NT pro-BNP, ce qui est 4 à 6 fois supérieur à celle du BNP. L'une des enzymes impliquées dans le clivage du proBNP en BNP est la furine qui est une endoprotéase majoritairement exprimée dans l'appareil trans-Golgi. La corine est également capable de cliver le pro-BNP en BNP (Yan et al. 2000). Cependant dans le plasma humain on retrouve également du pro-BNP, non clivé, qui résulte certainement de la présence d'O-glycosylations situées sur les résidus Thr71 et Thr48 près du site de clivage. Chez le rat cependant les sites d'O-glycosylation sont localisés loin du site de clivage ce qui pourrait expliquer le niveau plus élevé de BNP chez le rat par rapport à l'Homme (Nakagawa, Nishikimi, et Kuwahara 2019).

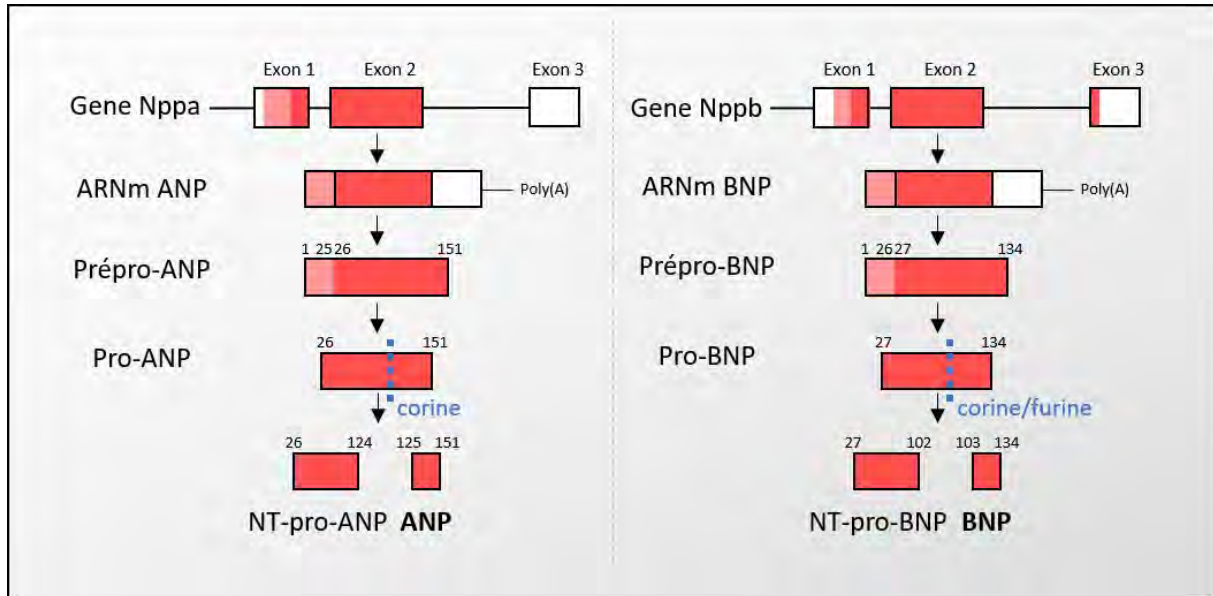


Figure 2 : Mécanisme de synthèse de l'ANP et du BNP. Les gènes des PN (*Nppa* et *Nppb*) sont transcrits en ARNm, eux-mêmes traduits en prépro-hormone (prépro-ANP et préproBNP). Suite à des clivages par la corine et/ou la furine, les PN sont sécrétés sous une forme active (ANP et BNP) et une forme N-Terminale inactive (NT-proANP et NT-proBNP).

3) Régulation des peptides natriurétiques

A) Régulation transcriptionnelle de *Nppa* et *Nppb*

Le gène *Nppb* est localisé à 12-15 kb en amont du gène *Nppa* chez la souris et à 8 kb en amont du gène *Nppa* chez l'humain. La proximité de ces gènes suggère que des éléments régulateurs pourraient contrôler leurs deux expressions. Les promoteurs du *Nppa* et du *Nppb* contiennent des sites de liaison GATA permettant la liaison de plusieurs facteurs de transcription. Dans des cultures de cardiomyocytes humain ou murin, la mutation des sites GATA du *Nppb* réduit considérablement la transcription de ce gène. GATA4 (*GATA binding protein 4*), un facteur de transcription important pour le développement cardiaque, active la transcription des gènes *Nppa* et *Nppb* en se liant au site GATA. Le facteur de transcription NF-AT3 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4*) agit avec GATA4 pour transduire les effets de la phényléphrine, un puissant vasoconstricteur, sur le promoteur du *Nppb* (Molkentin et al., 1998). En parallèle, le facteur de transcription MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), qui se lie aux séquences d'ADN riches en A/T, est recruté par GATA4 pour synergiquement activer la transcription de *Nppa* (Morin et al. 2000). Cependant, chez les souris déficientes pour GATA4, les niveaux cardiaques d'ANP ne sont pas différents de ceux

de souris sauvages. L'expression de *Nppa* ne semble donc pas uniquement dépendre de la liaison de GATA4 au niveau des régions promotrices, ou d'autres mécanismes peuvent éventuellement masquer la diminution de l'expression de *Nppa*.

D'autre part, plusieurs sites de liaison AP-1 (*activator protein 1*) et CRE (*cAMP response elements*) sont impliqués dans la régulation de l'activité du promoteur du *Nppa* et du *Nppb* (Rosenzweig et al. 1991). Les sites AP-1 peuvent lier des membres de la famille Jun et Fos alors que les sites CRE peuvent lier des facteurs induits par l'AMPc (*cyclic adenosine monophosphate*) comme CREB (*CRE-binding protein*). Des éléments de liaison homéobox-NK, CA₂G, SRE (*serum-responsive element*), TB (T-box) dans le promoteur de *Nppa* ont également été identifiés. Dans la région promotrice du *Nppb*, on retrouve différents autres sites de liaison : des sites M-CAT impliqués dans les effets β -adrénergiques et de la phényléphrine, plusieurs sites SSRE (*shear stress-responsive element*) et des sites TRE (*thyroid hormone-responsive element*) liant les hormones thyroïdiennes et l'ET-1 (*endothelin 1*) (Faquan Liang et al. 2003). Un élément répresseur de transcription NRSE (*neuron restrictive silencer element*) est aussi localisé dans le promoteur de l'ANP et du BNP (Kuwahara et al. 2001; E. Ogawa et al. 2002).

B) Régulation de la sécrétion des peptides natriurétiques

Initialement il a été pensé que la libération des PN était due à une augmentation de la pression artérielle. Cependant, des expériences au cours desquelles la pression au niveau de l'oreillette a été maintenue constante, ont montré que c'est l'étirement de la paroi cardiaque le déterminant majeur de la production de PN *in vivo* (de Bold, Bruneau, et Kuroski de Bold 1996). En plus de cette stimulation mécanique, plusieurs facteurs ont été identifiés comme modulateurs de la sécrétion de peptides natriurétiques dont certains sont présentés ci-dessous.

Hormones thyroïdiennes. La présence du site de liaison TRE dans les régions promotrices de *Nppa* et *Nppb* suggère un effet direct de la T₃ (*triiodothyronine*) sur la transcription des PN. Il a été montré que la T₃ augmente l'expression d'ARNm de pro-ANP dans des myocytes en culture d'oreillette et de ventricules cardiaques. De plus, l'expression atriale de *Nppa* est de l'ordre de 41% en hypothyroïdie et de 176% en hyperthyroïdie comparé à l'euthyroïdie. L'expression ventriculaire du *Nppa* dans l'hypothyroïdie et l'hyperthyroïdie est de 31% et

178% respectivement (Pw, Kd, et Jg 1988). Le BNP est modulé de la même façon par la T3 (Kohno et al. 1993).

Glucocorticoïdes. La dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse ayant un rôle anti-inflammatoire et immunosuppresseur, augmente les niveaux d'expression du *Nppa* dans les cardiomyocytes de l'oreillette et du ventricule de rats et de façon dose dépendante (Gardner et al. 1988).

Endothéline 1. L'ET-1, un puissant vasoconstricteur, augmente la sécrétion d'ANP et la transcription de *Nppa* dans des cardiomyocytes isolés de rats. Chez des rats perfusés, l'ET-1 augmente la sécrétion d'ANP en réponse à un étirement de l'oreillette cardiaque. Lorsque l'ET-1 est neutralisée par un anticorps, l'induction de la sécrétion d'ANP par étirement de la paroi cardiaque est atténuée ce qui montre un rôle paracrine essentiel de l'ET-1 dans ce processus (Skvorak, Nazian, et Dietz 1995).

Angiotensine (1-7). L'angiotensine (1-7) est un peptide cardiovasculaire qui a des effets vasodilatateurs, natriurétiques et anti-fibrotiques. Une étude a montré que ce peptide augmente la sécrétion d'ANP lors d'une stimulation auriculaire par une voie de signalisation impliquant l'axe Ras/PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/Akt (*protein kinase B*) (T. Ogawa et al. 1999).

Catécholamines. La noradrénaline stimule la sécrétion d'ANP via les récepteurs α -adrénergiques (α -AR) et β -adrénergiques (β -AR) mais avec une prédominance pour l'activité des β -AR (Schiebinger, Baker, et Linden 1987). Une étude réalisée *in vitro* sur de l'oreillette de cochon de guinée, a montré que l'adrénaline et la noradrénaline augmentent de façon dose-dépendante la sécrétion d'ANP. (Speake et al. 1993).

Opiïdes. La dynorphine augmente la sécrétion d'ANP par les cardiomyocytes de l'oreillette *in vitro*, de façon dose dépendante via l'activation sélective du récepteur aux opioïdes κ (K. Yamada, Yoshida, et Shimada 1991). Les mêmes effets ont été relevés pour la nociceptine, un peptide ayant la même séquence d'acides aminés que la dynorphine, via l'activation de son récepteur NOP (Nociceptin (N/OFQ) receptor) (Kim et al. 2002). Des rats traités à la morphine, ont des niveaux plasmatiques d'ANP environs 8 fois supérieurs à ceux de rats non traités et cette induction est complètement abolie par un prétraitement à la naloxone, un antagoniste des opioïdes (Gutkowska et al. 1986).

Hormones neurohypophysaires. L'ocytocine augmente la sécrétion d'ANP en se liant à ses récepteurs cardiaques. Il est proposé que l'augmentation du volume sanguin active des barorécepteurs dans le cerveau qui induiraient la libération d'ocytocine de la neurohypophyse. L'ocytocine circulerait jusqu'au cœur où elle induirait la libération d'ANP pour que celui-ci applique ses effets vasodilatateurs et cardiaques (Gutkowska et al. 1997)

Angiotensine II. Plusieurs études ont montré que l'Ang II (*angiotensin II*) induit la sécrétion d'ANP. Cependant, il a été décrit plus récemment que l'angiotensine générée de façon endogène suite à un étirement atrial, diminue la sécrétion d'ANP via son récepteur AT1 (*angiotensin II type 1*) (Oh et al. 2011).

Oxyde nitrique. Le NO (*nitric oxide*) est un vasodilatateur puissant qui augmente les niveaux de production de GMPc (*cyclic guanosine monophosphate*) dans le muscle cardiaque et les cellules musculaires lisses. Au cours d'une élévation de la pression artérielle, les niveaux plasmatiques d'ANP sont élevés. En présence d'Ach (*acetylcholine*) cette sécrétion d'ANP induite par l'augmentation de pression est diminuée (Speake et al. 1993). Lorsque l'activité du NO est inhibée, la diminution de la sécrétion d'ANP par l'ACh est abolie. Ces résultats démontrent que le NO participe à l'inhibition de la sécrétion de l'ANP (Skvorak et Dietz 1997).

Hormones sexuelles. Les niveaux plasmatiques de PN présentent un dimorphisme sexuel. Ils sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes. Une étude récente a montré que la suppression de la production de testostérone chez l'homme est associée à une augmentation des niveaux plasmatiques de NT-proBNP qui est atténuée lors d'un traitement à la testostérone (Bachmann et al. 2019). Les mêmes effets de la testostérone sur les niveaux plasmatiques de NT-proBNP ont été déterminés chez des femmes traitées ou non à la testostérone (E. Lin et al. 2012). Ces résultats indiquent une inhibition de la production de PN par les hormones androgènes.

II- Le récepteur biologiquement actif des PN : le GC-A

Les peptides natriurétiques régulent une variété de paramètres physiologiques et pathologiques. Il existe 3 récepteurs différents aux peptides natriurétiques : le GC-A (*guanylyl cyclase A*), le GC-B (*guanylyl cyclase B*) et le NPRC (*natriuretic peptide receptor C*). Les récepteurs GC-A et GC-B sont des récepteurs membranaires à activité guanylyl cyclase intrinsèque induisant la synthèse de GMPc, un second messager intracellulaire. Le NPRC lui

n'est pas un récepteur guanylyl cyclase. C'est un récepteur impliqué dans la clairance des peptides natriurétiques et qui est également couplé à une protéine Gi. L'ANP et le BNP sont capables de se lier au GC-A, au GC-B et au NPRC mais avec une plus forte affinité pour GC-A (Lincoln R. Potter, Abbey-Hosch, et Dickey 2006). Intéressée par le système ANP/GC-A, le GC-B ne sera pas abordé dans cette thèse.

1) Structure du GC-A

Le GC-A est le premier récepteur membranaire GC cloné chez les mammifères (Lowe et al. 1989). Le gène codant pour le GC-A, *Npr1* (*natriuretic peptide receptor 1*), contient 22 exons et 21 introns (Takahashi et al. 1998) et est localisé sur le chromosome 1 des humains, comme *Nppa* et *Nppb*, et sur le chromosome 3 des souris.

Le GC-A est une protéine de 130 Kda composée d'un domaine de liaison extracellulaire N-terminal d'environ 441 aa, d'un domaine transmembranaire hydrophobe de 20-25 aa et d'un domaine intracellulaire C-terminal d'environ 567 aa. Le domaine intracellulaire contient un domaine homologue aux kinases (KHD) d'environ 250 aa, un domaine d'environ 60 aa qui participe à l'homodimérisation du récepteur et un domaine catalytique guanylyl cyclase (GC) c-terminal d'environ 250 aa. Le KHD présente des homologies de séquences au domaine catalytique des protéines kinases et lie l'ATP mais sa fonction est toujours inconnue.

Le GC-A est un récepteur exprimé par de nombreux tissus, les muscles lisses vasculaires, l'endothélium, le cœur, la glande surrénale, les reins, les poumons, la rate, le système nerveux central, les tissu adipeux, les muscle squelettiques, le foie et le pancréas (Kuhn 2016).

2) Signalisation du GC-A

A) Activation du GC-A

Le GC-A est activé par l'ANP, le BNP et le CNP avec l'ordre d'affinité préférentielle suivant : ANP>BNP>CNP (Suga et al. 1992). Peu de choses sont connues sur le mécanisme d'activation du GC-A néanmoins il a été montré qu'en absence de ligand, le GC-A forme un homodimère ou un homotétramère et que son KHD est fortement phosphorylé sur au moins 6 résidus dont les résidus Ser497, Ser502, Ser506, Ser513, Thr500 et Thr513. Lors de la liaison du ligand, un changement de conformation du récepteur a lieu. La liaison de l'ANP au GC-A induit une rotation intermoléculaire de l'homodimère qui induirait une rotation similaire de chacun des

domaines catalytiques GC. Ce changement de conformation du récepteur permettrait la levée de l'inhibition du domaine KHD sur l'activité GC. Une fois le domaine GC activé, celui-ci va produire un second messenger, du GMPc à partir de GTP (*guanosine triphosphate*) (H. Ogawa et al. 2004).

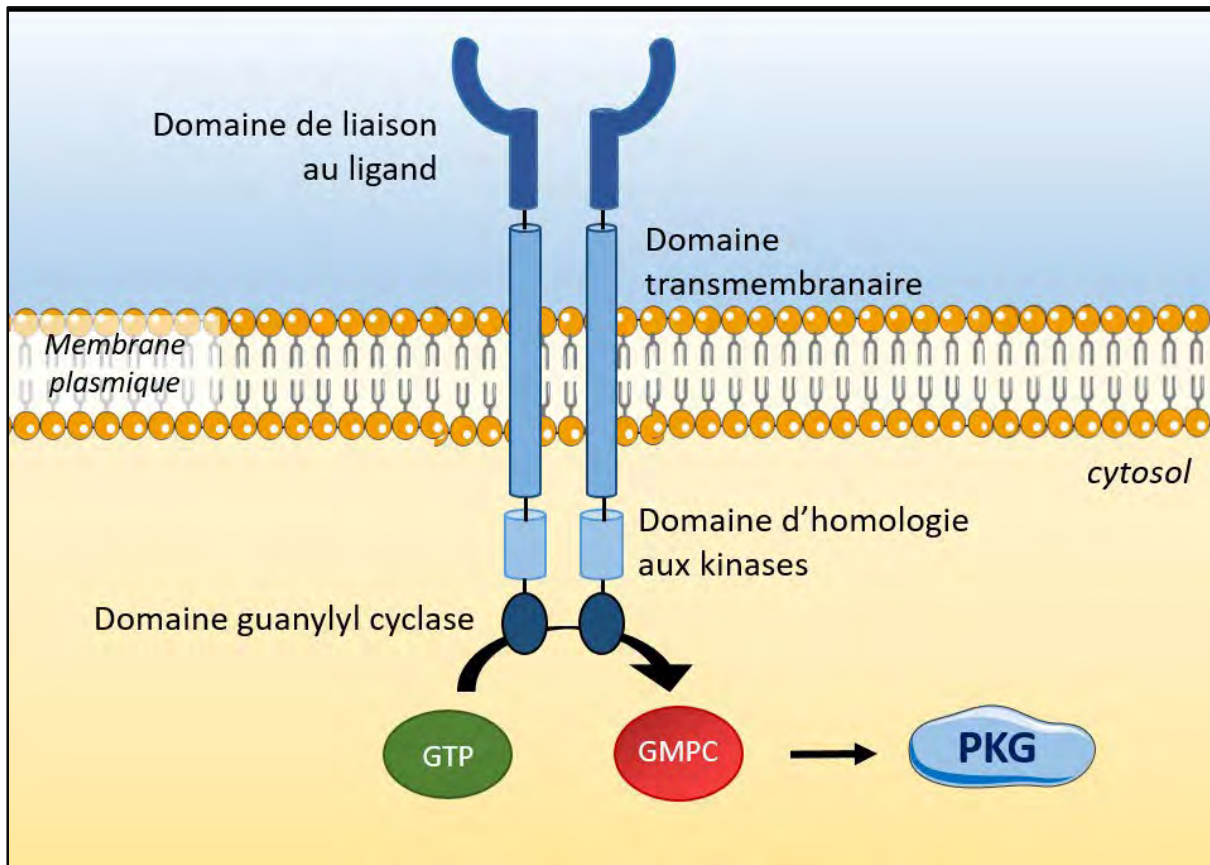


Figure 3 : Structure et signalisation du récepteur aux PN, le GC-A. Le GC-A est un récepteur composé d'un domaine de liaison au ligand, un domaine transmembranaire, un domaine d'homologie aux kinases et un domaine guanylyl cyclase. Lorsque le récepteur est activé, du GMPc est produit à partir de GTP, ce qui induit l'activation de PKG.

B) Production de GMPc, un second messenger

Les PN induisent leurs effets par la production de GMPc initialement identifié dans l'urine de rat en 1963 (Ashman et al. 1963). Le GMPc est synthétisé à partir de GTP par les GC membranaires ou solubles. Les GC-A et GC-B sont les deux seuls récepteurs GC membranaires exprimés chez les mammifères. Les GC solubles peuvent être activés par le NO. Une fois produit, le GMPc peut se lier à trois familles de protéines : les protéines kinases GMPc dépendantes (PKG), les phosphodiésterases (PDE) et les canaux de liaison nucléotide

cyclique/ions. Seules les PKG, qui représentent les médiateurs principaux de la signalisation GMPc, seront discutées dans cette thèse.

C) Les protéines kinases GMPc dépendantes

Chez les mammifères deux sous-types de PKG ont été identifiés : La PKG I qui comprend deux isoformes la PKG I α et la PKG I β , et la PKG II. La PKG I est un homodimère cytosolique largement exprimé dans les tissus. Les deux isoformes de la PKG I sont détectées dans les mêmes tissus chez l'humain. Cependant, dans le système vasculaire, les reins et la glande adrénaie on retrouve principalement la PKG I α et dans l'utérus on retrouve seulement la PKG I β . La PKG I α a une affinité pour le GMPc \approx 10 fois supérieure à celle de la PKG I β et légèrement inférieure à celle de la PKG II. La PKG II est un homodimère membranaire. Absente du système cardiovasculaire elle est abondante dans le cerveau, l'intestin et est également exprimée dans les poumons, les reins et les os. Les deux PKGs ne sont retrouvées ensemble que dans un seul type cellulaire, les chondrocytes.

Toutes les PKGs sont composées d'un domaine N-terminal, un domaine régulateur et un domaine catalytique. La PKG I et la PKG II diffèrent principalement par leurs domaines N-terminaux. En effet, la PKG-I contient un site acétylé alors que la PKG II contient un site myristoylé requis pour sa liaison à la membrane (Lucas et al. 2000). Le domaine régulateur contient deux sites de liaison au GMPc, un domaine auto-inhibiteur permettant l'inactivation de la PKG en absence de GMPc et un domaine de dimérisation. Dans la partie catalytique des PKG, il y a deux domaines majeurs, un domaine de liaison magnésium/ATP (*adenosine triphosphate*) et un domaine de liaison aux protéines substrats. En absence de GMPc, l'activité catalytique des PKGs est supprimée par une auto-inhibition. Le site catalytique est en contact direct avec un domaine auto-inhibiteur localisé près du domaine N-terminal. En présence de GMPc, celui-ci se fixe aux sites de liaison du GMPc présents sur le domaine régulateur des PKGs. La conformation de la PKG est modifiée et le domaine catalytique contenant le site de liaison aux protéines substrats devient accessible (Francis et al. 2010).

3) Régulation du GC-A

A) Régulation transcriptionnelle de GC-A

Trois sites de liaison au facteur de transcription Sp1 (*specificity protein 1*) et un motif CCAAT sont présents en amont du promoteur du *Npr1*, sans présence apparente de boîte TATA (Yamaguchi, Rutledge, et Garbers 1990). Le facteur de transcription nucléaire ubiquitaire NF-Y (*nuclear transcription factor Y*) et Sp1 coopèrent et sont essentiels dans la régulation de la transcription de *Npr1*. En effet, une mutation dans les sites de liaison Sp1 et CCAAT (site de liaison de NF-Y) élimine complètement l'activité promotrice de GC-A alors que la surexpression des facteurs de transcription qui s'y lient l'augmente (F. Liang, Schaufele, et Gardner 2001). De manière intéressante, l'ANP autorégule son récepteur par l'inhibition de l'expression et de la synthèse du *Npr1*. En effet, l'accumulation intracellulaire de GMPc, par une boucle de rétro-inhibition, diminue la transcription du gène *Npr1* (L. Cao, Wu, et Gardner 1995; L. M. Zhang, Tao, et Newman 1993). Plus de 10 ans après cette découverte, l'équipe de Martel a démontré chez le rat l'existence d'un élément de régulation-*cis* appelé élément de réponse au GMPc (cGMP-RE) localisé dans le promoteur du gène *Npr1* qui permet le contrôle transcriptionnel de ce gène par le GMPc (Martel, Hamet, et Tremblay 2010). Cette séquence présente 95% d'homologie avec la souris et 75% d'homologie avec l'humain (Hum David et al. 2004).

B) Désensibilisation du GC-A

L'insuffisance cardiaque (IC) est caractérisée par des niveaux circulants d'ANP et de BNP très élevés. Cependant la réponse à ces hormones est altérée. Ceci indique une boucle de rétro-inhibition qui diminue la synthèse de GC-A suite à la signalisation intracellulaire induite par la fixation de l'ANP, c'est la désensibilisation homologue. Il existe également un autre mécanisme de régulation appelé la désensibilisation hétérologue qui est une désensibilisation du récepteur consécutive d'une activation par une autre molécule que son ligand.

a. La désensibilisation homologue

Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'exposition chronique de GC-A à des concentrations élevées d'ANP peut induire une désensibilisation homologue, certainement due à une déphosphorylation du récepteur et notamment du KHD (Joubert, Labrecque, et De

Léan 2001; L. R. Potter et Garbers 1992, 1994). En effet, lorsque le GC-A est modifié pour être constitutivement phosphorylé sur ses six sites de phosphorylation, le récepteur est réceptif aux ligands et résistant à la désensibilisation homologue (L. R. Potter et Hunter 1999).

b. La désensibilisation hétérologue

Une exposition à des hormones de croissance comme l'Ang II et l'ET-1 induit également une désensibilisation de GC-A. Ce processus semble impliquer la PKC (*protein kinase c*) puisque des activateurs de PKC miment cette réponse. Quand des cellules mésangiales glomérulaires sont traitées à l'ANP, la production de GMPc est activée. Au cours d'un traitement à l'ANP, l'ajout d'Ang II inhibe cette production de GMPc en deux temps: durant la phase initiale elle active une PDE dépendante du calcium (Ca^{2+}) et de la calmoduline puis l'inhibition est maintenue dans le temps via l'activation d'une PKC inhibitrice de la GC (Haneda et al. 1991). Ces résultats confortent ceux trouvés précédemment dans des cellules de muscle lisse (CML) aortique (Smith et Lincoln 1987). De plus, l'ET-1 inhibe également la production de GMPc par l'ANP dans des CML via l'activation de PKC (Jaiswal 1992).

L'activation de la PKC se fait via la signalisation PLC (*phospholipase C*) et engendre la déphosphorylation du KHD du GC-A soit par activation d'une phosphatase soit par inhibition d'une kinase (L. R. Potter et Garbers 1994). Lors de la désensibilisation hétérologue, la déphosphorylation d'un seul site est impliquée alors que dans la désensibilisation homologue, tous les sites sont déphosphorylés.

C) Internalisation, dégradation et recyclage du GC-A

La signalisation induite par l'ANP peut également être régulée/réprimée par internalisation puis dégradation via la voie lysosomale du complexe ANP/GC-A. On estime qu'environ 60% des complexes internalisés seraient soumis à cette voie de dégradation, le reste serait recyclé à la membrane plasmique (Pandey, 2002). L'internalisation du complexe ANP/GC-A a longtemps été débattue cependant une étude récente a démontré que l'ANP entraîne l'internalisation du GC-A via une voie dépendante de la clathrine. Cette voie implique le regroupement du « cargot » ligand/récepteur dans les fosses de clathrine et l'invagination de la membrane plasmique, formant ainsi des vésicules recouvertes de clathrine (Somanna et al. 2018).

III- Dégradation des peptides natriurétiques

1) Le récepteur de clairance, NPRC

A) Structure du NPRC

Le NPRC est le plus abondant des récepteurs aux PN (Maack, 1992). Il est exprimé dans de nombreux tissus comme le cœur, les poumons, le foie, les reins, le placenta, les muscles lisses aortiques, les cellules endothéliales, le système nerveux central, les adipocytes, les muscles squelettique, le foie (Lincoln R. Potter, Abbey-Hosch, et Dickey 2006). Le NPRC est codé par le gène *Npr3* (*natriuretic peptide receptor 3*) localisé sur les chromosomes 5 et 15 respectivement chez l'humain et la souris et il est constitué de 8 exons et 7 introns (Rahmutula et al. 2002). Contrairement au GC-A, ce récepteur est un homodimère dépourvu de domaine GC qui n'induit pas la synthèse de GMPc mais qui est impliqué dans la dégradation des PN. Avec un poids moléculaire de 65 kb, il est composé d'un domaine extracellulaire de 436 aa, un domaine transmembranaire de 23 aa et un domaine intracellulaire de 37 aa (Fuller et al. 1988). Le domaine extracellulaire du NPRC présente 30% d'homologie avec celui du GC-A (van den Akker 2001). L'affinité du NPRC est plus forte pour l'ANP que pour le BNP chez l'humain et le rat (Potter et al., 2006) ce qui peut expliquer la demi-vie plus longue du BNP comparée à l'ANP.

B) Internalisation du NPRC

C'est l'utilisation d'un analogue de l'ANP, le C-ANP4-23, qui a permis la découverte de la clairance des PN par le NPRC en 1987 (Maack et al. 1987). Dépourvu de la structure en anneau, le C-ANP4-23 est un agoniste sélectif et spécifique du NPRC. Il a été montré que dans le rein, le C-ANP4-23 occupe environ 99% des sites de liaison de l'ANP mais n'induit pas d'effet détectable sur ce tissu. Or, lors d'une infusion d'ANP chez le rat, une augmentation de l'excrétion de sodium et une diminution de la pression sanguine sont observées. De plus, quand les rats sont infusés avec du C-ANP4-23, les niveaux plasmatiques ainsi que les effets de l'ANP endogène sont augmentés, ce qui suggère l'existence d'un récepteur qui induirait la dégradation de l'ANP (Almeida et al. 1989). Des expériences complémentaires ont confirmé cette hypothèse et ont montré que le NPRC induit l'internalisation des PN et leur hydrolyse lysosomale pour les éliminer de la circulation.

L'internalisation du NPRC est constitutive, elle a lieu même en absence de ligand. Lorsque l'on bloque la synthèse *de novo* du NPRC, les niveaux de récepteurs situés à la surface des cellules ne sont pas modifiés ce qui indique un recyclage important des NPRC internalisés (Nussenzveig, Lewicki, et Maack 1990).

C) Signalisation du NPRC

Longtemps considéré comme un simple récepteur de clairance, le NPRC a également un rôle physiologique. Il a été montré que le C-ANP4-23 inhibe l'activité adénylyl cyclase (AC) dans des CML vasculaires d'une façon dose dépendante et sans affecter les niveaux de GMPC. Lorsque la liaison du C-ANP4-23 au NPRC est bloquée par un ASO (*antisense oligonucleotide*), l'inhibition de l'AC est atténuée de façon dose et temps dépendante (Palaparti, Li, et Anand-Srivastava 2000). De plus, d'autres études ont révélé que l'inhibition de l'activité AC via le NPRC implique son domaine cytoplasmique de 37 aa. Ce domaine lie et active les protéines Gi1/2, inhibitrices de l'AC, grâce à une séquence de 17 aa (Anand-Srivastava, Sehl, et Lowe 1996; Murthy et al. 2000). Cependant l'importance physiologique de cette voie activée par le NPRC est peu connue à ce jour.

2) Dégradation enzymatique des peptides natriurétiques

Les PN sont dégradés par des protéases extracellulaires et notamment la NEP (*neprilysin*) et l'IDE (*insulin-degrading enzyme*). Le BNP peut également être dégradé par la DPP4 et la méprine A mais peu de choses restent connues à ce jour sur la relevance physiologique de ces enzymes sur les concentrations plasmatiques de PN.

A) La néprilysine

La NEP est une métalloprotéase transmembranaire dépendante du zinc qui clive et dégrade plusieurs peptides sur des acides aminés de résidus hydrophobes comme les enképhalines, les angiotensines, l'ocytocine. Elle est localisée à la membrane des cardiomyocytes, fibroblastes, CML, cellules endothéliales et au niveau de la lumière du tubule proximal rénal (Vanneste et al. 1988). Sept sites de clivage de l'ANP par la NEP ont été identifiés (R^4-S^5 , C^7-F^8 , $R^{11}-M^{12}$, $R^{14}-I^{15}$, $G^{16}-A^{17}$, $G^{20}-L^{21}$ and $S^{25}-F^{26}$) mais l'attaque initiale arrive entre la cystéine (C^7) et la phénylalanine (F^8). Elle coupe la structure en anneau ce qui désactive le peptide (Stephenson et Kenny 1987; Vanneste et al. 1988). La NEP clive le BNP humain au niveau des liaisons M^5-

V⁶ puis au niveau de la liaison R¹⁷-I¹⁸ qui ne se trouvent pas dans la structure en anneau. De manière générale, la NEP cible préférentiellement l'ANP (Kenny, Bourne, et Ingram 1993).

B) L'enzyme dégradant l'insuline

L'IDE est une métalloprotéase dépendante du zinc ubiquitaire impliquée dans la dégradation d'enzymes telles que l'insuline et l'EGF (*epidermal growth factor*). Elle présente également une forte affinité pour l'ANP (Müller et al. 1991). L'IDE clive séquentiellement l'ANP, premièrement au niveau des site S²⁵-F²⁶, puis au niveau des sites R³-R⁴, D¹³-R¹⁴ et termine entre C⁷ et F⁸ (Müller et al. 1992). De la même manière, le BNP est clivé au niveau des sites R²⁴-R²⁵ puis G⁶-R⁷ et D¹⁰-R¹¹. L'IDE clive rapidement l'ANP le rendant incapable d'induire une augmentation de GMPc intracellulaire. L'IDE a une meilleure affinité pour les PN que la NEP (Kenny, Bourne, et Ingram 1993).

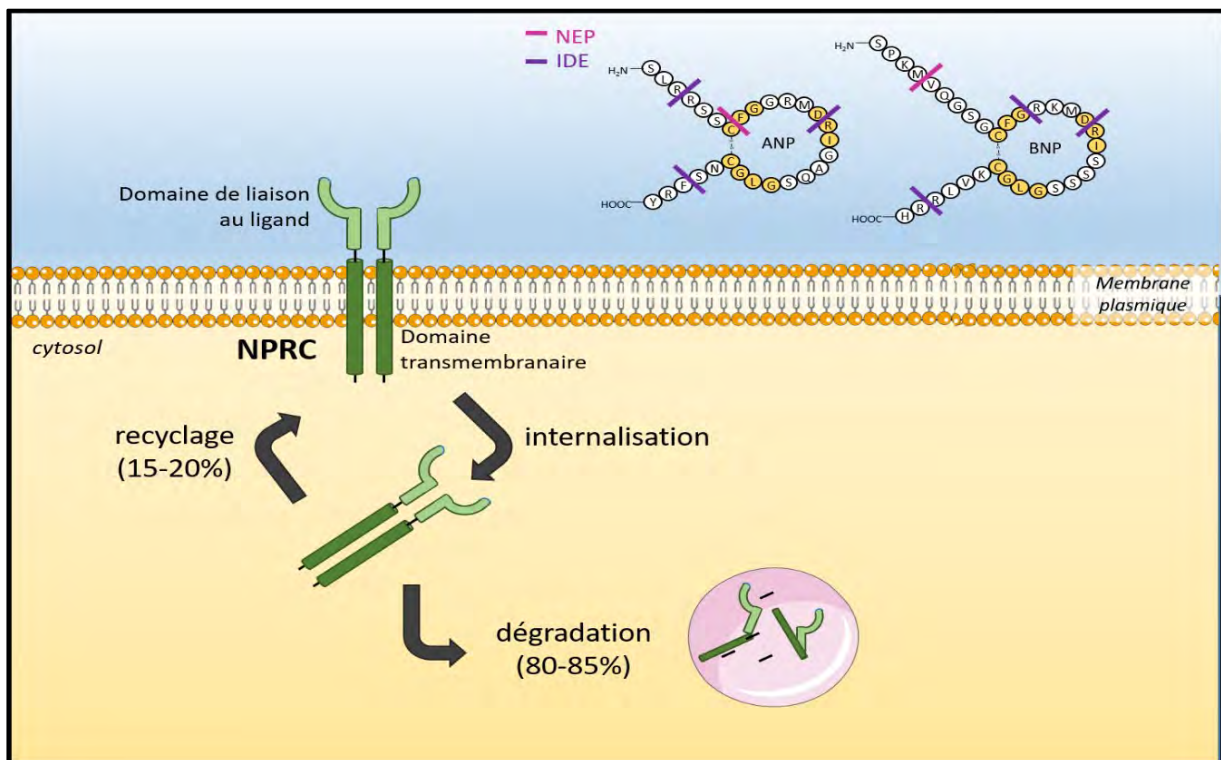


Figure 4 : Mécanismes de dégradation des PN. Les PN peuvent être dégradés via leur liaison au NPRC. Le NPRC est internalisé puis soit dégradé soit recyclé à la membrane plasmique. Les PN peuvent aussi être dégradés par clivages enzymatiques. En rose sont représentés les sites de clivage de la NEP et en violet les sites de clivage de l'IDE.

IV- Fonctions du système ANP/GC-A dans la sphère cardiovasculaire et rénale

Le système ANP/GC-A est majoritairement étudié pour son rôle dans l'homéostasie des fluides et la fonction cardiaque. En effet, l'ANP a un effet hypotenseur et hypovolémique par des actions diurétiques et natriurétiques, par une vaso-relaxation des CML et l'augmentation de la perméabilité endothéliale, ainsi que par l'antagonisme du système rénine-angiotensine. Il exerce également des effets autocrines et paracrines sur le cœur afin d'inhiber l'hypertrophie et la fibrose cardiaque.

1) Effets endocrines de l'ANP

A) Natriurèse et diurèse

Comme leurs noms l'indiquent les PN induisent la natriurèse c'est à dire l'excrétion de sodium (Na^+) qui s'accompagne également de la diurèse, l'excrétion d'urine. En effet, dans le rein, l'ANP augmente le niveau de filtration glomérulaire en stimulant la vasodilatation des artérioles afférentes et en inhibant leur vasoconstriction. Aussi, il inhibe la réabsorption de Na^+ dans le canal collecteur médullaire rénal en inhibant le canal Na^+ apical et le canal Na^+/K^+ -ATPase basolatéral. De plus, l'ANP inhibe le système rénine/angiotensine/aldostérone qui se répercute à trois niveaux. Ceci diminue à la fois le transport de sodium et d'eau dans le tubule proximal induit par l'Ang II, la sécrétion de rénine par les cellules granulaires juxtaglomérulaires et la synthèse d'aldostérone par la glande adrénale (Lugnier et al. 2019). Ces effets de l'ANP sur le rein sont exclusivement induits par le GC-A car ils sont complètement perdus chez des animaux GC-A déficients (Kishimoto, Dubois, et Garbers 1996).

B) Vasodilatation

a. Relaxation des cellules musculaires lisses

L'ANP a un effet vasorelaxateur via l'activation du GC-A et de la PKG I. En effet, les souris déficientes pour PKG I (PKG I KO) ne présentent pas de vasodilatation en réponse à une élévation en GMPc induite par l'ANP ou le NO (Pfeifer et al. 1998). De plus, la délétion spécifique de GC-A dans les CML abolie totalement les effets vasodilatateurs de l'ANP (Holtwick et al. 2002). La PKG I stimule la relaxation des CML en diminuant le niveau de Ca^{2+}

intracellulaire par des phosphorylations activatrices ou inhibitrices de différents canaux calciques. En effet, une fois activée, la PKG I stimule SERCA (*Ser Ca²⁺-ATPase*), le canal faisant entrer le Ca^{2+} cytoplasmique et inhibe le récepteur IP₃R (*inositol (1, 4, 5) triphosphate receptor*) responsable de la sortie du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS). D'autre part, la PKG I stimule la sortie et inhibe l'entrée du Ca^{2+} intracellulaire par l'activation ou l'inhibition de canaux Ca^{2+} /ATPase membranaires. Aussi, la PKG I active par phosphorylation le canal K^+ / Ca^{2+} causant ainsi une hyperpolarisation membranaire. Cette hyperpolarisation inhibe l'influx calcique par les canaux voltages calciques (Carvajal et al. 2000).

b. Perméabilité endothéliale

L'administration d'ANP synthétique à des souris augmente la perméabilité microvasculaire à l'albumine et diminue la volémie. Ces effets sont absents chez des souris ayant une délétion de GC-A spécifiquement dans les cellules endothéliales (EC GC-A KO). Les souris EC GC-A KO ont une hypervolémie chronique avec un volume plasmatique augmenté de 11 à 13%. En comparaison, les souris GCA-KO, qui ont une délétion systémique et globale de GC-A, le volume plasmatique est augmenté d'environ 30%. Ces résultats indiquent que la modulation de la perméabilité endothéliale par le système ANP/GC-A est critique dans les actions hypovolémique de l'ANP (Sabrane et al. 2005).

C) Inhibition du système rénine angiotensine aldostérone

L'ANP régule la pression sanguine en partie par l'inhibition du système rénine-angiotensine II-aldostérone. La rénine est une enzyme sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires rénales. Elle clive l'angotensinogène en angiotensine I qui est ensuite converti en Ang II. L'Ang II stimule la vasoconstriction et la libération d'aldostérone, une hormone importante dans la régulation de la réabsorption de Na^+ dans le canal collecteur cortical rénal. Des doses physiologiques d'ANP diminuent fortement les niveaux de rénine et d'aldostérone. Dans la glande adrénale, l'ANP diminue les niveaux d'Ach, d'Ang II et d'aldostérone. Les souris déficientes pour GC-A (GC-A KO) présentent des niveaux plasmatiques d'aldostérone 2 fois plus élevés que des souris WT ce qui suggère l'implication du GC-A dans les effets de l'ANP sur l'aldostérone. L'inhibition de la sécrétion de rénine requiert la PKG II. Les souris déficientes pour la PKG II ont des niveaux d'expression de rénine plus élevés que des souris WT et sont résistantes à l'inhibition de la sécrétion de rénine induite par l'augmentation de GMPc (Wagner et al. 1998).

D) Rôles dans le système nerveux central

L'ANP a d'abord été trouvé dans l'hypothalamus qui est la source principale des PN dans le cerveau. Il est également présent dans le cortex cérébral, le cervelet, l'aire limbique, le bulbe olfactif, le thalamus et le striatum (Hodes et Lichtstein 2014). En accord avec un rôle hypovolémique, l'ANP induit une diminution de la soif. En 1992, une étude a montré qu'une infusion d'ANP chez des individus sains diminue la prise hydrique (Burrell, Palmer, et Baylis 1992). De plus, l'injection intra-ventriculaire d'ANP induit une inhibition de la soif de façon dose dépendante chez des rats, associée à une diminution de l'appétence pour le sel. Il est suggéré que c'est en modulant la sécrétion d'hormones telles que l'arginine, la vasopressine et l'Ang II, connues pour augmenter la prise hydrique, que l'ANP diminue la soif (Bartness et Ryu 2015).

2) Effets locaux de l'ANP

A) Anti-hypertrophie cardiaque

Les souris GC-A KO ou déficientes pour l'ANP (ANP KO) présentent une hypertrophie cardiaque sans modification de la pression sanguine, même lorsqu'elles sont traitées par un anti-hypertenseur depuis la naissance (Knowles et al. 2001). La délétion de GC-A spécifiquement dans les cardiomyocytes induit également une hypertrophie cardiaque (Holtwick et al. 2003). A l'inverse, les souris transgéniques surexprimant l'ANP ont des cœurs plus petits (Barbee et al. 1994). Ces résultats ont permis de montrer que le système ANP/GC-A joue un rôle anti-hypertrophique dans le cœur, de façon indépendante de ses rôles dans la pression sanguine et dans l'homéostasie des fluides. Plusieurs mécanismes ont été suggérés *in vitro* mais des analyses complémentaires sont nécessaires pour adresser cette question.

B) Fibrose atriale

L'ANP antagonise l'action pro-fibrotique du TGF- β (*transforming growth factor β*), de l'Ang II et de l'ET-1. En effet, la fibrose myocardique induite chez des rats est diminuée suite à l'administration d'ANP (Tsuneyoshi et al. 2004). Dans des modèles de souris pro-fibrotiques par sur-activation de TGF- β ou par constriction aortique transversale (TAC), la délétion du récepteur de clairance NPRC supprime la fibrose atriale (Rahmutula et al. 2019). L'effet anti-fibrotique de l'ANP résulterait d'une activation intracellulaire de la PKG, suite à la liaison de

l'ANP sur son récepteur GC-A. La PKG phosphoryle la protéine Smad3 (*SMAD family member 3*) ce qui empêche sa translocation dans le noyau. De par l'activation de la PKG, l'induction de la fibrose par le TGF- β , qui nécessite l'activation de gène pro-fibrotiques via Smad3 dans le noyau, est alors bloquée (Li et al. 2008).

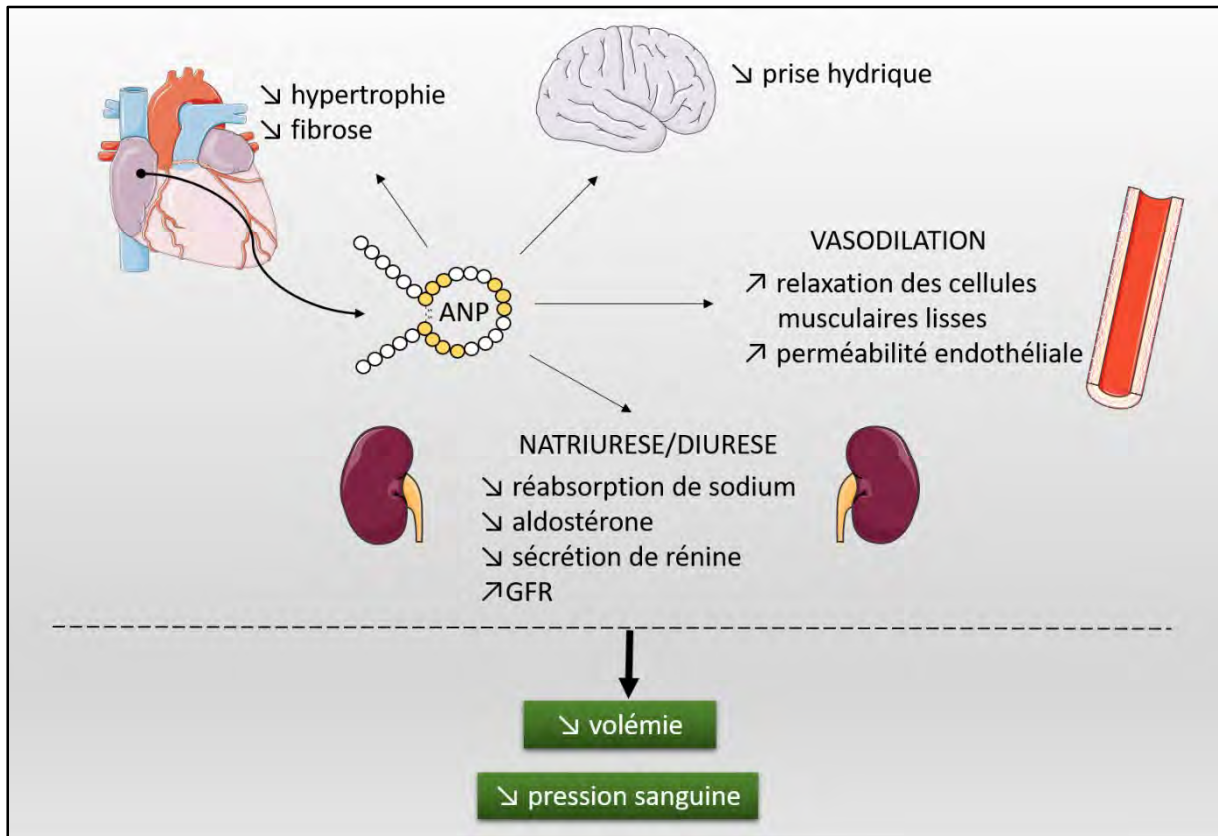


Figure 5 : Effets principaux de l'ANP dans la régulation de la volémie et la pression sanguine.

3) Modulation des PN en conditions physiologiques et pathologiques

A) Conditions physiologiques

L'activité physique : 7 jours d'inactivité physique mimée par un *bed rest* ou un *head-down bed rest* induisent une diminution marquée de la concentration plasmatique de pro-ANP chez des jeunes hommes en bonne santé (Gauquelin et al. 1996; Zois et al. 2017). A l'inverse, au cours d'un exercice physique, la sécrétion d'ANP est augmentée (Haufe et al. 2015). En effet, un exercice aigu sur un vélo augmente les niveaux plasmatiques d'ANP d'un facteur 2, qui résulte probablement d'une augmentation de la pression de remplissage cardiaque (Barletta et al. 1998).

Une immersion dans l'eau : L'immersion dans l'eau jusqu'au cou induit une augmentation du volume sanguin central, de la pression veineuse centrale et une distension de l'oreillette cardiaque. Les niveaux plasmatiques d'ANP sont alors augmentés jusqu'à 3 fois à la fin de la troisième heure d'immersion (Epstein, Norsk, et Loutzenhiser 1989). Cependant, après 12h d'immersion dans de l'eau thermoneutrale (34,5°C), l'excrétion rénale de sodium est diminuée et corrèle avec une diminution des concentrations plasmatiques d'ANP chez l'Homme (Stadeager et al. 1992).

Une exposition au froid. Une exposition au froid pendant 2 et 4 semaines à 6°C augmente les niveaux plasmatiques ainsi que le contenu atrial d'ANP chez des rats. Chez l'Homme, l'exposition au froid pendant 2h à 10°C augmente également les niveaux plasmatiques d'ANP. Dans ces études les auteurs suggèrent que l'induction de la sécrétion d'ANP par le froid est une réponse compensatoire à l'élévation de la pression sanguine et aux changements de la balance des fluides corporels. L'ANP pourrait ainsi contribuer à l'activation de la diurèse fréquemment observée au froid (Hassi et al. 1991; Yuan et al. 2009).


B) Conditions pathologiques

Insuffisance cardiaque. Comme les PN sont sécrétés par un étirement de la paroi cardiaque, il n'est pas surprenant de voir leurs niveaux plasmatiques augmentés au cours d'une IC chronique. En condition physiologique, les niveaux plasmatiques du BNP sont très faibles mais ils deviennent très élevés lors d'une IC. Comme le BNP a une demi-vie plus longue que l'ANP et que ses niveaux corrèlent avec la sévérité de la pathologie, le BNP est utilisé comme marqueur de l'IC depuis de nombreuses années. Le NT-proBNP ayant une demi-vie plus longue que le BNP, c'est ce BNP inactif qui est quantifié dans le diagnostic de l'IC et des risques de mortalité associés (Wong, Guo, et Zhang 2017).


Hémorragie. Chez des patients atteints d'hypovolémie, les niveaux plasmatiques d'ANP sont augmentés puis ils diminuent à nouveau après traitement (Putensen et al. 1992). Cependant de façon inattendue, une hémorragie sévère de 50% du volume sanguin total chez le rat induit une augmentation des niveaux plasmatiques d'ANP associée à une diminution de l'expression rénale de NPRC (Frajewicki et al. 1997). L'implication physiologique de cette augmentation reste inconnue.

Choc septique. Au cours d'un choc septique, défini par une hypotension persistante, les niveaux plasmatiques d'ANP sont 5 fois supérieurs à ceux de patients sains (Mitaka et al. 1993, 1; Witthaut et al. 2003).

Hypertension pulmonaire. Les patients atteints d'hypertension pulmonaire voient leurs niveaux de NT-proANP augmentés 5 à 10 fois comparés à ceux de patients sains (Wiedemann et al. 2001). De plus, l'hypoxie, pouvant causer l'hypertension pulmonaire, induit la transcription et la sécrétion d'ANP par les cardiomyocytes. La sécrétion d'ANP est un mécanisme compensatoire, de par les effets vasodilatateurs de l'ANP, pour moduler le développement de l'hypertension pulmonaire et le remodelage vasculaire. Les souris ANP KO ou GC-A KO développent une hypertension pulmonaire plus sévère que des souris sauvages au cours d'une exposition chronique à une hypoxie (Y.-F. Chen 2005).



Dans cette première partie nous avons abordé la physiologie du système ANP/GC-A qui est principalement connu pour ses effets dans l'homéostasie des fluides et la physiologie cardiaque. Cependant les actions endocrines du cœur induites par ce système ANP/GC-A ne s'arrêtent pas à l'axe rénal et cardiovasculaire. En effet, ces vingt dernières années, plusieurs rôles des PN dans les tissus métaboliques tels que le tissu adipeux et le muscle squelettique ont été découverts. Dans la partie suivante nous nous intéressons aux effets connus du système ANP/GC-A dans le tissu adipeux qui est un l'acteur principal de la thermogénèse sans frisson.



Partie II : La thermogénèse sans frisson

Plusieurs mécanismes se mettent en place chez les endothermes afin de maintenir une température corporelle stable malgré une fluctuation de la température environnementale. La thermoneutralité correspond à la température à laquelle la régulation de la température interne est achevée, c'est-à-dire sans activation de production ou de perte de chaleur. Lorsque la température ambiante est inférieure, deux mécanismes se mettent en place afin de maintenir leur température corporelle à une valeur physiologique et constante. Il y a la thermogénèse avec frisson qui implique la contraction de muscles squelettiques (dont je ne parlerai pas dans cette thèse) et la thermogénèse de non frisson qui implique la production de chaleur dans les tissus adipeux (Cannon et Nedergaard 2004). La thermogénèse sans frisson est un événement physiologique au cours duquel l'homéostasie énergétique est finement régulée.

I- La production de chaleur

1) Deux sites de production de chaleur

A) Les adipocytes bruns

a. Redécouverte du tissu adipeux brun chez l'Homme

Pendant longtemps il était pensé que le tissu adipeux brun (BAT) existait seulement chez les rongeurs, les mammifères hibernants et les nouveau-nés humains mais des études au début des années 1990 ont révélé l'existence de ce tissu chez des adultes humains. Les anatomistes suggéraient la présence d'une glande au-dessus des épaules et le côté du cou d'adultes et reportaient des similarités morphologiques avec le BAT interscapulaire (iBAT) des rongeurs (Bonnot 1908; Rasmussen 1922). Cette idée était partagée par des études post-mortem qui soulevaient la possibilité de présence de BAT chez des adultes humains tard dans la vie (Heaton 1972), mais le manque de techniques pour le prouver et déterminer son importance physiologique a ralenti l'étude de ce tissu. C'est l'utilisation de ^{18}F -FDG-PET/CT scan (18F-fluoro-2-deoxy-d-glucose (^{18}F -FDG) *positron emission tomography computed tomography* (PET/CT)) dans les années 2000 qui a permis de mettre en évidence l'existence de BAT actif chez l'individu adulte. Le PET/CT scan, qui permet d'observer l'activité

métabolique associée au captage de molécules radiomarquées par les tissus *in vivo* au cours d'un examen de radiologie, a permis une avancée considérable dans le diagnostic du cancer. En 2009, trois équipes dont celle de Wouter van Marken Lichtenbelt ont démontré moléculairement et physiologiquement la présence de BAT actif chez l'adulte humain en réponse à une exposition au froid (Cypess et al. 2009; van Marken Lichtenbelt et al. 2009; Virtanen et al. 2009). Il est maintenant bien établi que la majorité voire tous les adultes humains possèdent du BAT. Chez l'Homme et notamment les nouveau-nés et enfants en bas âge, on retrouve le iBAT qui permet la production de chaleur juste après la naissance et qui disparaît progressivement. Chez l'adulte, les dépôts de BAT se trouvent au niveau des régions cervicales, supraclaviculaires, paravertébrales et suprarénales permettant ainsi le réchauffement du sang destiné au cerveau (Sidossis et Kajimura 2015). Chez le rongeur, le BAT est surtout localisé au niveau des régions supraclaviculaires, interscapulaires et perirénales. Le dépôt le plus abondant, le plus facile d'accès et donc le plus étudié chez la souris est l'iBAT (F. Zhang et al. 2018).

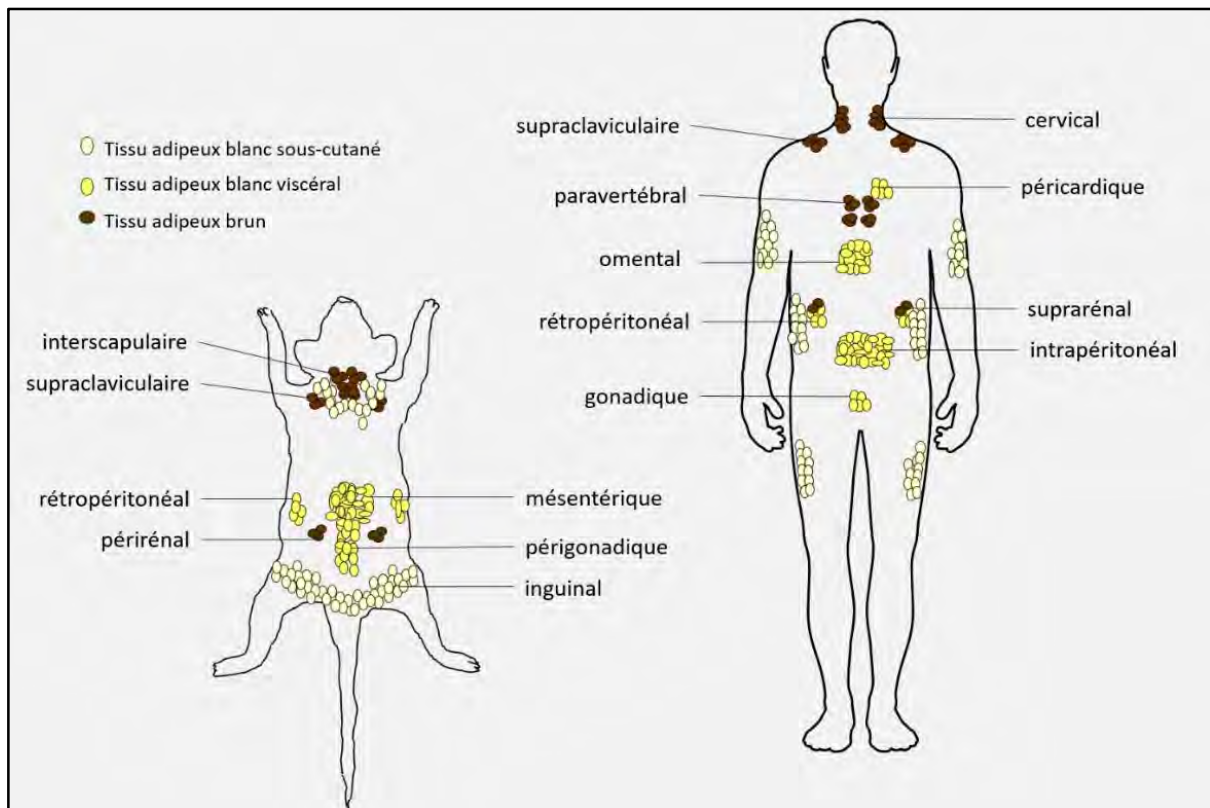


Figure 6 : Localisation anatomique du tissu adipeux blanc sous-cutané, du tissu adipeux blanc viscéral et du tissu adipeux brun, chez la souris et l'Homme. Adapté de (Schoettl, Fischer, et Ussar 2018)

b. Structure du tissu adipeux brun

Le BAT est un tissu très vascularisé et innervé par le système nerveux sympathique. Majoritairement composé d'adipocytes bruns, il contient également des cellules immunes, des cellules vasculaires telles que des cellules endothéliales et des péricytes, et des progéniteurs préadipocytaires. Les adipocytes bruns sont de forme polygonale et de petite taille (15-60 μ m). Ils contiennent de multiples petites gouttelettes lipidiques multiloculaires, un grand nombre de mitochondries et un noyau ovale central (Peirce, Pellegrinelli, et Vidal-Puig 2016).

Les adipocytes bruns qui composent le BAT sont connus pour être homogènes. Cependant une étude récente du groupe de Cinti a rapporté l'existence de deux populations distinctes d'adipocytes bruns. Suite à une exposition au froid ou à l'administration d'un agoniste du récepteur β 3-adrénérique (β 3-AR), les adipocytes expriment soit des niveaux élevés soit des niveaux faibles d'UCP1 constituant ainsi le « phénomène Harlequin » (Cinti et al. 2002). Grâce à l'utilisation de techniques récentes, le séquençage d'ARN de cellule unique et les modèles murins capables de tracer différentes populations cellulaires, Song *et al.* ont, de façon élégante, caractérisé cette hétérogénéité. Deux populations d'adipocytes bruns ont été identifiées : des cellules avec une forte activité thermogénique et une forte expression d'adiponectine et d'UCP1 et d'autre part des cellules avec une faible activité thermogénique et une faible expression d'adiponectine et d'UCP1. Ces dernières comparées aux premières, ont des gouttelettes lipidiques plus grosses, un contenu mitochondrial plus faible et sont spécialisées dans le stockage d'acides gras (AG) (Oguri et Kajimura 2020; Song et al. 2020).

B) Les adipocytes beiges

a. Distribution anatomique du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc (WAT) est composé de préadipocytes, d'adipocytes, de cellules immunes et de cellules vasculaires qui sont entourés de matrice extracellulaire. Ce tissu est réparti dans tout l'organisme sous forme de plusieurs dépôts que l'on peut catégoriser en tissu adipeux sous-cutané (scWAT) et tissu adipeux viscéral (vWAT). Chez l'Homme, le scWAT est situé sous la peau et représente 80% de la masse grasse chez un individu mince. Le vWAT lui n'en représente que 10-20% et est localisé en intrapéritonéal, intra-abdominal mais aussi péricardiaque, périvasculaire et rétropéritonéal (rpWAT). Chez la souris on retrouve du scWAT

dans la partie antérieure interscapulaire, sous-scapulaire, axillo-thoracique et cervicale et la partie postérieure dorso-lombaire, inguinale (iWAT) et fessière. Le vWAT est localisé de la même façon que chez l'Homme avec un dépôt adipeux en plus au niveau péri-gonadique (eWAT).

b. Morphologie des adipocytes blancs et beiges

Dans le WAT, on retrouve deux populations d'adipocytes qui ont des morphologies et des fonctions différentes : les adipocytes blancs et les adipocytes beiges. Les adipocytes blancs ont une forme sphérique, une grande taille (25-200 μ m) et sont peu vascularisés. Ils se composent d'une gouttelette lipidique uniloculaire, peu de mitochondries et un noyau aplati et périphérique. Leur rôle principal est le stockage et la libération d'AG. Les adipocytes beiges possèdent des caractéristiques d'adipocytes blancs et bruns. En effet, en condition basale ils ont une forme sphérique mais sont plus petits que les adipocytes blancs et ils contiennent une gouttelette lipidique uniloculaire et peu de mitochondries. Après stimulation thermogénique, leurs caractéristiques morphologiques se rapprochent d'avantage de celles des adipocytes bruns, avec l'apparition de plusieurs petites gouttelettes lipidiques et une augmentation du nombre de mitochondries (El Hadi et al. 2019). Leur fonction principale est alors la production de chaleur. Cette émergence d'adipocytes beiges dans le tissu adipeux blanc est ce qu'on appelle le brunissement

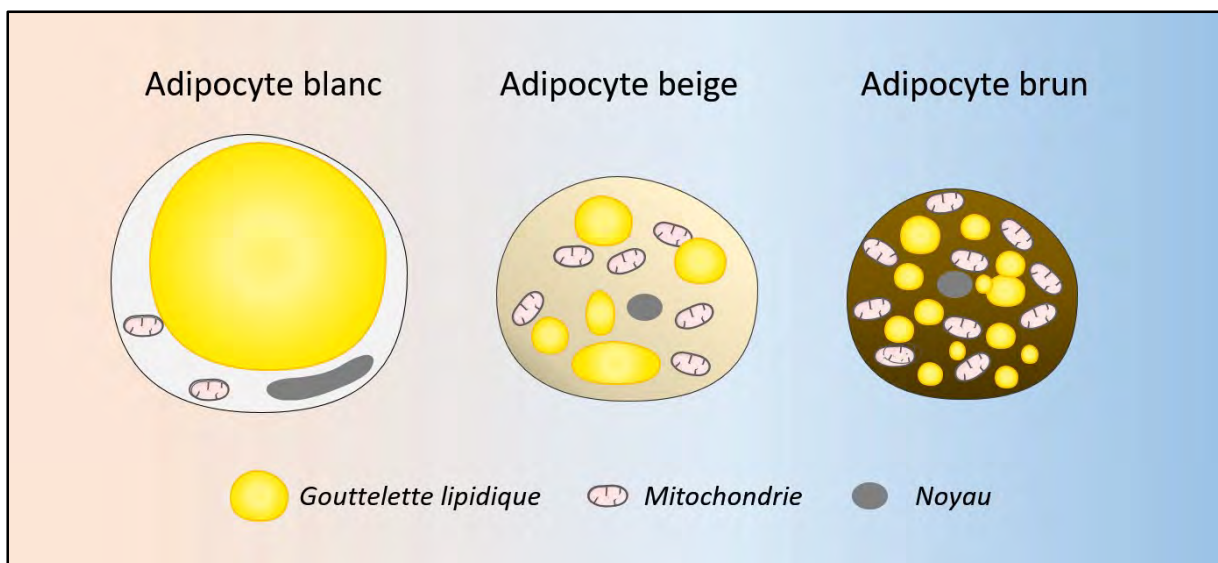


Figure 7 : Différences morphologiques entre les adipocytes blancs, beiges et bruns.

c. Origine des adipocytes beiges

Les travaux de Patrick Seale et Bruce Spiegelman ont montré que Prdm16 (*PR domain containing 16*) est un co-régulateur de transcription qui contrôle le développement d'adipocytes bruns et que la surexpression de Prdm16 dans le WAT favorise l'émergence d'adipocytes beiges. Prdm16 étant fortement exprimé dans le scWAT de souris comparé au niveau d'expression dans le vWAT, nous savons que le brunissement est plus élevé dans le scWAT que dans le vWAT (Seale et al. 2011, 16). Néanmoins, l'origine de ces adipocytes beiges reste non élucidée et est un sujet débattu. Deux mécanismes sont suggérés : la génération d'adipocytes beiges à partir de progéniteurs ou la conversion d'adipocytes blancs matures en adipocytes beiges.

→ Les adipocytes beiges proviennent de la transdifférenciation d'adipocytes blancs

Plusieurs études proposent l'apparition d'adipocytes beiges à partir de la transdifférenciation d'adipocytes blancs, c'est-à-dire la différenciation d'adipocytes blancs en adipocytes beiges sans étape de dédifférenciation.

Une acclimatation au froid n'augmente pas la densité de préadipocytes, le nombre d'adipocytes ou encore le contenu en ADN dans le WAT, ce qui suggère que les mécanismes de prolifération cellulaire ne sont pas impliqués dans le brunissement (Barbatelli et al. 2010; Cousin et al. 1996; Lee et al. 2015). Pour tracer l'origine d'adipocytes beiges induits par le froid, l'équipe de Lee a tagué les cellules exprimant un marqueur de progéniteurs adipocytaires, PDGFR α (*platelet derived growth factor receptor α*). En parallèle, l'utilisation de souris adiponectin-CreERT2 a permis le marquage spécifique des adipocytes matures via l'expression d'un gène rapporteur. A l'aide de ces deux « marquages » ils ont observé qu'une exposition au froid n'augmente pas la prolifération ou le recrutement de préadipocytes dans l'iWAT. En revanche, presque tous les adipocytes beiges induits par le froid dérivent d'adipocytes matures exprimant le gène rapporteur 10-17 jours plus tôt, et sont donc des adipocytes blancs matures transdifférenciés (Lee et al. 2015).

→ Les adipocytes beiges proviennent de la différenciation *de novo* de précurseurs adipocytaires.

La notion d'émergence d'adipocytes beiges à partir de la différenciation de précurseurs dans le WAT a émergé des travaux de l'équipe de Bruce Spiegelman. Ils ont découvert

plusieurs populations distinctes de précurseurs d'adipocytes blancs et beiges qui expriment différents gènes. La lignée de cellules beiges exprime peu d'UCP1 (*uncoupling protein 1*) en condition basale mais les niveaux peuvent être augmentés de façon similaire à ceux des lignées de cellules brunes. Ces précurseurs d'adipocytes beiges expriment CD137 et TMEM26 (*transmembrane protein 26*) qui ont été identifiés comme nouveaux marqueurs spécifiques d'adipocytes beiges (J. Wu et al. 2012). D'autre part, l'équipe de Philipp Scherer a développé le modèle de souris AdipoChaser qui permet de marquer de façon inductible les adipocytes matures *in vivo*. Ce modèle est la combinaison de 3 lignées transgéniques : *adiponectin-rtTA*, *TRE-Cre*, *Rosa26-loxP-stop-loxP-lacZ*. En présence de doxycycline, dans les adipocytes matures exprimant l'adiponectine, rtTA active le promoteur TRE qui induit l'expression de la Cre. Cette Cre élimine les sites loxP placés autour de la cassette STOP ce qui permet l'expression du gène rapporteur LacZ. Les cellules exprimant LacZ peuvent être colorées en bleu avec un substrat β -galactosidase (β -gal). Après un traitement à la doxycycline, les souris AdipoChaser ont été exposées au froid et dans le scWAT, certains adipocytes sont négatifs pour la coloration β -gal ce qui montre qu'ils n'étaient pas présents en amont, pendant le traitement à la doxycycline. Ces cellules LacZ négatives expriment la perilipine, un marqueur spécifique de la gouttelette lipidique, UCP1 et le marqueur d'adipocytes beiges Cited1. Les cellules LacZ positives n'expriment que la perilipine. Ces résultats indiquent qu'une fraction des adipocytes beiges induits par une exposition au froid apparaissent via la différenciation *de novo* de cellules autres que des adipocytes matures (Q. A. Wang et al. 2013).

C) Distinctions d'adipocytes entre l'Homme et la souris

Le clonage et l'analyse de l'expression de gènes dans des adipocytes bruns et beiges de rongeurs a permis de déterminer la nature du BAT humain. De façon intéressante, le BAT d'adultes humains est enrichi en marqueurs moléculaires sélectifs des adipocytes beiges et au contraire il exprime très peu de marqueurs sélectifs d'adipocytes bruns murins (Lidell et al. 2013; Sharp et al. 2012; J. Wu et al. 2012). Les compositions adipocytaires des BAT humains et murins sont alors différentes.

2) Activité thermogénique

A) La thermogénèse dépendante d'UCP1

a. La chaîne de transfert des électrons

Les mitochondries convertissent l'énergie issue du glucose et des acides gras (AG) en énergie utilisable par la cellule sous forme d'ATP. Cette conversion nécessite 3 grandes étapes :

- La production d'acétylCoA (*acetyl-coenzyme A*) à partir de glucose ou d'AG cytosoliques : en présence d'oxygène le glucose est transformé en pyruvate au cours de la glycolyse. Ce pyruvate entre ensuite dans la mitochondrie et est oxydé et décarboxylé en acétyl-CoA. D'autre part, suite à leur entrée dans la cellule, les AG sont transformés en acyl-CoA. L'acyl-CoA entre dans la mitochondrie et est oxydé en acétyl-CoA au cours de la β -oxydation.
- Le cycle de Krebs : l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs qui comprend 8 réactions enzymatiques permettant la production de cofacteurs réduits NADH, et $FADH^2$
- La chaîne de transfert des électrons: Le NADH, et le $FADH^2$ générés par le cycle de Krebs ou au cours d'autres réactions métaboliques, alimentent la chaîne de transfert des électrons au cours de laquelle l'ATP est produit.

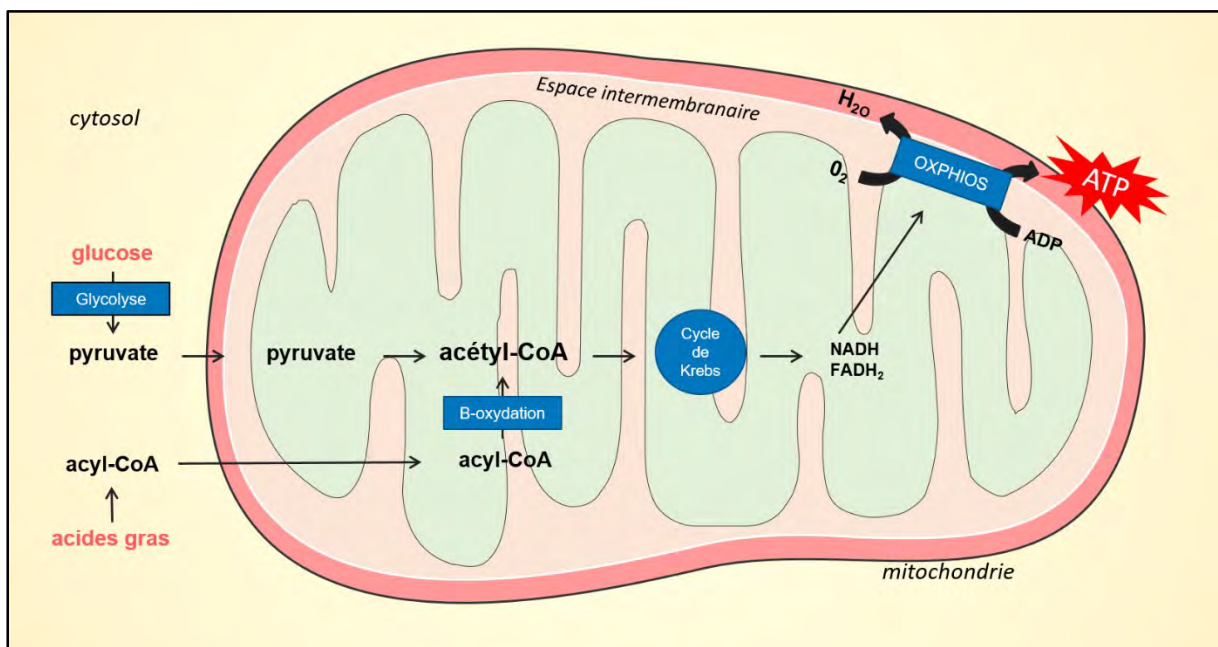


Figure 8 : Représentation de la fonction mitochondriale.

La chaîne de transfert des électrons est constituée de 5 complexes protéiques, dits complexes OXPHOS (*oxidative phosphorylation*), localisés dans la membrane interne mitochondriale. Le NADH et le FADH₂ issus de la glycolyse, la β -oxydation et le cycle de Krebs sont transférés dans la matrice interne pour être réoxydés en NAD⁺ et FAD par les complexes I et II. Les complexes I et II transfèrent les électrons issus de cette oxydation à l'ubiquinone, un porteur d'électron mobile qui transporte alors les électrons reçus au complexe III. Lors de ces transferts d'électrons, le complexe I pompe des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire ce qui génère un gradient de concentration de protons à travers la membrane interne. Le complexe III, en injectant des protons dans l'espace intermembranaire, transfère des électrons à un autre transporteur d'électrons mobile, le cytochrome C. Le cytochrome C porte les électrons au complexe IV, l'accepteur final d'électrons qui a pour rôle de réduire le dioxygène produit en eau. Les protons présents dans l'espace intermembranaire pourront se rendre dans la matrice intracellulaire seulement par leur passage dans le complexe V ou ATP synthase, ce qui génère à partir d'ADP (*adenosine diphosphate*), de l'ATP (Lewis et al. 2019).

b. Le découplage de la respiration par UCP1

Les mécanismes biologiques de la production de chaleur dans les adipocytes thermogéniques ont été largement étudiés dans les années 1970. La découverte de la production de chaleur dans la mitochondrie par un procédé de découplage via une protéine unique a eu lieu en 1976 et 4 ans ont été nécessaires pour que cette protéine soit isolée : cette protéine est UCP1 (C. S. Lin et Klingenberg 1980; Nicholls 1976). UCP1 permet le passage de protons de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale en dissipant le gradient créé par l'activité de la chaîne respiratoire et en libérant de l'énergie sous forme de chaleur. Les protons ne passant pas par l'ATP synthase, la chaîne respiratoire est découplée.

La régulation de l'activation ou de l'inhibition de l'activité d'UCP1 n'est pas totalement connue cependant certains facteurs régulateurs ont été proposés. En effet, l'inhibition de l'activité d'UCP1 à l'état basal se fait par la liaison sur UCP1 de nucléotides tels que l'ADP, l'ATP, le GDP (*guanosine diphosphate*) et le GTP bloquant ainsi le passage de protons. D'autre part, il a été montré que les AG libérés lors d'une exposition au froid activent UCP1 mais leur mode d'action n'est pas clairement défini (Cannon et Nedergaard 2004).

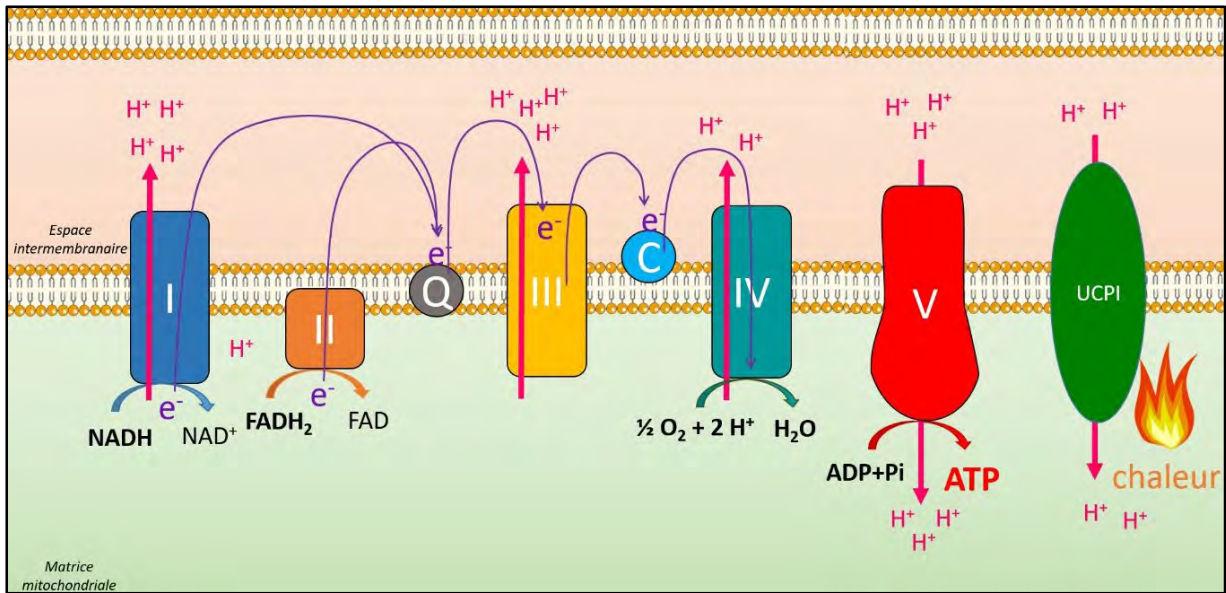


Figure 9 : Chaîne de transfert des électrons et découplage par UCP1. H⁺ : proton ; e⁻ : électron ; Q : ubiquinone ; C : cytochrome C ; I, II, III, IV V : complexes OXPHOS

B) La thermogénèse indépendante d'UCP1

Il a longtemps été pensé que la protéine UCP1 est indispensable pour la production de chaleur, cependant l'utilisation de souris déficientes pour UCP1 (UCP1 KO) a montré le contraire. En effet, les souris UCP1 KO acclimatées au froid arrivent à produire de la chaleur pour maintenir leur température corporelle au cours d'une exposition au froid. Des mécanismes thermogéniques compensatoires de l'absence d'UCP1 ont alors été suggérés (Roesler et Kazak 2020; Ukropec et al. 2006).

a. Le cycle calcique

Le groupe de Leslie Kozak a suggéré en 2006 un rôle possible du cycle calcique dans le brunissement de l'iWAT (Ukropec et al. 2006) mais c'est l'équipe de Shingo Kajimura qui l'a démontré 11 années plus tard. En effet, sur-exprimer PRDM16 dans des adipocytes beiges de souris UCP1 KO permet à ces souris de défendre leur température corporelle au cours d'une exposition au froid. Par l'analyse de séquençage d'ARNm suivi de nombreuses investigations *in vivo* et *in vitro*, les auteurs ont identifié l'implication du cycle calcique dans cette activation de la thermogénèse indépendante d'UCP1. En effet, en absence d'UCP1, le calcium libéré par le RS via RyR2 (*ryanodin receptor 2*) est récupéré par la pompe SERCA2b de façon ATP dépendante. Ce cycle calcique augmente l'utilisation de glucose et les dépenses énergétiques (Ikeda, 2017).

b. Le cycle créatine

Lors d'une exposition au froid l'activité créatine kinase et l'expression de gènes du métabolisme de la créatine augmentent dans les adipocytes beiges des souris. Le cycle de la créatine est un mécanisme qui convertit l'ATP mitochondrial en ADP et induit donc une augmentation de la respiration. Des souris dont le tissu adipeux est déplété en créatine (due à une délétion génétique d'une étape de la biosynthèse de la créatine ou de son transport), présentent une diminution de leur activation thermogénique induite par le système adrénérgique. L'induction du système créatine est présente même chez des souris UCP1 KO ce qui suggère qu'il s'agit d'un mécanisme compensatoire à l'absence d'UCP1 (Kazak et al. 2015).

II- La mobilisation de substrats pour alimenter la thermogénèse

Un approvisionnement important de substrats est nécessaire pour alimenter la production de chaleur dans les adipocytes bruns et beiges. Des mécanismes au niveau de l'organisme entier se mettent alors en place pour permettre d'une part la production de substrats énergétiques et notamment de glucose, AG et triglycérides (TG) et d'autre part l'entrée et l'utilisation de ces substrats dans les cellules thermogéniques.

1) Le glucose

L'utilisation de ^{18}F -FDG-PET/CT scan a permis d'observer le transport de glucose dans le BAT. Celui-ci est augmenté d'un facteur ≈ 12 chez l'Homme après une exposition au froid alors qu'il est inchangé dans le WAT et le muscle squelettique (Orava et al. 2011). L'entrée de glucose dans le BAT est réalisée par 2 transporteurs : GLUT1 (*glucose transporter 1*) insulino-indépendant et GLUT4 (*glucose transporter 4*) insulino-dépendant. Suite à une exposition au froid, les expressions de GLUT1 et GLUT4 sont plus élevées dans le BAT que dans les autres tissus (Bartelt et al. 2011) ce qui permet un apport privilégié de glucose dans BAT. Les niveaux d'expression de GLUT4 et sa translocation à la membrane plasmique sont augmentés suite à une exposition au froid *in vivo* (Gasparetti, 2003).

Suite à son entrée dans la cellule, le glucose est métabolisé en pyruvate, c'est la glycolyse. La glycolyse contient 10 étapes enzymatiques dont la première est assurée par la HK2 (*hexokinase 2*) et la dernière par la PKM (*pyruvate kinase muscle isoform*). L'expression des

enzymes clés de la glycolyse, HK2 et PKM, ainsi que l'activité de la HK2 sont doublées dans le BAT de rats exposés au froid (Cooney et Newsholme 1982; Watanabe et al. 1987). En 2015, par une analyse transcriptomique à grande échelle du BAT de souris, il a été montré que les expressions de beaucoup d'enzymes de la glycolyse sont augmentées par le froid (Hao et al. 2015). D'autre part, la délétion de HK2 et PKM *in vitro* bloque la glycolyse et diminue la respiration mitochondriale, un reflet de l'activité des mitochondries et donc de la production de chaleur (Winther et al. 2018). Aussi, il a été montré que suite à une exposition au froid, la protéine mTORC2 (*mTOR Complex 2*) est activée via la voie AMPc/PI3K et que mTORC2 en activant Akt induit l'entrée de glucose et la glycolyse dans le BAT (Albert et al. 2016). Ces études semblent indiquer une augmentation de la glycolyse dans le BAT suite à une exposition au froid. De plus il a récemment été montré que la glycolyse intracellulaire joue un rôle important dans la régulation de la thermogénèse du BAT. En effet, l'inhibition de la glycolyse bloque la stimulation optogénétique de la thermogénèse dans le BAT (Jeong, Chang, et Jo 2018).

En 1985, une étude a démontré qu'une exposition au froid stimule la néoglucogénèse hépatique chez des rats. Le BAT utilise du glucose pour produire de la chaleur, il serait alors physiologiquement pertinent de penser que le foie produit et apporte du glucose au BAT lors d'une exposition au froid (Shiota, Tanaka, et Sugano 1985). Cependant, à ma connaissance aucune étude ne l'a encore clairement démontré.

2) Acides gras et triglycérides

Les AG activent UCP1 (Fedorenko, 2012) et fournissent du carburant pour la production de chaleur (Cannon and Nedergaard, 2004). Afin de permettre aux adipocytes bruns et beiges d'être approvisionnés en AG pour produire de la chaleur, l'utilisation de ceux-ci est augmentée (Bartelt et al. 2011). Il existe 4 sources principales d'AG pour les adipocytes thermogéniques: les AG endogènes générés par la lipolyse intracellulaire dans le BAT, les AG exogènes provenant de la lipolyse du WAT, les AG exogènes délivrés par les lipoprotéines riches en triglycérides (TG) (TRL) circulantes comme les chylomicrons intestinaux ou les VLDL (very low density lipoprotein) provenant du foie (Bartelt 2011, Young, 2013), et enfin les AG provenant de la lipogénèse *de novo* (DNL).

A) La lipolyse dans les tissus adipeux blancs et bruns

La lipolyse est l'hydrolyse d'une molécule de TG en 3 molécules d'AG et 1 molécule de glycérol par l'action d'enzymes hydrolytiques : les lipases. Chez les mammifères, 3 lipases agissent séquentiellement pour chacune libérer un acide gras. L'ATGL (*adipose TG lipase*) convertit les TG en diacylglycérols (DG) qui sont ensuite hydrolysés en monoacylglycérols (MG) par la LHS (lipase hormono sensible), puis clivés en glycérol et AG par la MGL (*monoacylglycerol lipase*). Les AG ainsi générés peuvent être directement utilisés par la cellule productrice ou bien être libérés dans la circulation sanguine.

Une exposition au froid induit l'activation de l'ATGL et de la LHS dans le BAT et le WAT reflétant ainsi l'activation de la lipolyse (Zechner, 2012). Les AG générés dans le BAT sont directement utilisés par celui-ci alors que les AG fournis par le WAT sont libérés dans la circulation sanguine.

De façon intéressante, plusieurs études réalisées chez la souris ont montré que la lipolyse dans les adipocytes bruns, contrairement à celle dans les adipocytes blancs, n'est pas essentielle pour la thermogénèse induite par le froid. En effet, la déficience en ATGL dans le BAT ne compromet pas la réponse thermogénique des souris à une exposition au froid. Cependant lorsque la déficience en ATGL est induite seulement dans le WAT, les souris sont intolérantes au froid, à moins qu'elles ne soient nourries (Schreiber et al. 2017). Les mêmes conclusions ont été tirées par l'équipe de Liqing Yu avec l'utilisation de souris déficientes pour CGI-58 (*comparative gene identification-58*), un co-activateur de l'ATGL et donc de la lipolyse, spécifiquement dans le BAT ou le WAT (Shin et al. 2017). Cette équipe a également montré que l'inhibition de la lipolyse intra adipocytes bruns reprogramme le BAT à utiliser plus de glucose et stimule le brunissement du WAT (Shin 2017).

B) La lipogenèse *de novo* dans le BAT

Au cours d'une exposition au froid, le BAT joue un rôle catabolique prédominant en utilisant et oxydant les lipides pour produire de la chaleur. Cependant paradoxalement il a été montré qu'il joue également un rôle anabolique en synthétisant des AG à partir de substrats non lipidiques et notamment de carbohydrates, c'est la lipogenèse *de novo* (DNL). Sachez-Gurmaches *et al.* ont montré chez la souris que la voie de la DNL est l'une des plus induites par une exposition à des températures inférieures à la thermoneutralité, et notamment à des

températures de 22°C et 4°C, et que Akt2 stimule la DNL par l'activation de la transcription de ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) (Sanchez-Gurmaches, 2018).

C) Les lipoprotéines riches en triglycérides

Les AG peuvent également provenir des TRLs, comprenant les chylomicrons intestinaux, ou encore des VLDL hépatiques. Afin de pouvoir entrer dans les cellules adipeuses, les AG sont libérés des TRLs par l'action de la LPL (*lipoprotein lipase*) puis transportés à travers la membrane plasmique par la protéine CD36 (Khedoe et al. 2015). Suite à une exposition au froid, l'expression et l'activité de la LPL dans le BAT sont augmentées. En parallèle, l'expression de la protéine ANGPTL4 (*Angiopoietin-like 4*), inhibitrice de l'activité de la LPL, est diminuée dans le BAT et augmentée dans le WAT ce qui permet aux AG d'être adressés plutôt dans le BAT (Dijk et al. 2015). L'absence d'ANGPTL4 dans le BAT augmente l'oxydation des AG et la production de chaleur (Singh et al. 2018). Les souris déficientes pour CD36, ne parviennent plus à faire entrer d'AG dans les adipocytes bruns/beiges ce qui les rend intolérantes au froid (Putri et al. 2015). L'entrée des AG dans les adipocytes thermogéniques est alors essentielle pour la production de chaleur.

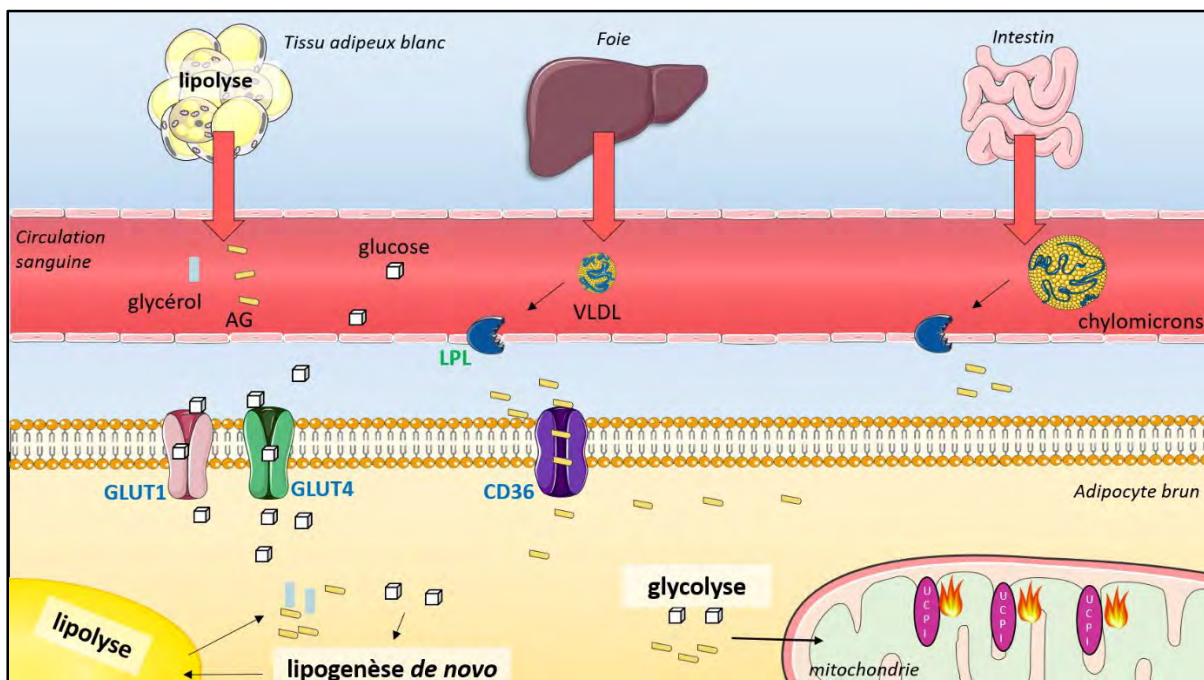


Figure 10 : Mobilisation et utilisation de glucose et d'acides gras au cours d'une exposition au froid. Les AG peuvent provenir de la lipolyse dans le BAT, de la lipolyse dans le WAT ou de l'hydrolyse de TG par le LPL, présents dans les VLDL ou les chylomicrons. Pour entrer dans les adipocytes bruns, le glucose passe par les transporteurs GLUT1 et GLUT4. Les AG passent par CD36. Dans le BAT il y a également une activation de la DNL et de la glycolyse.

3) Autres substrats énergétiques

L'équipe de Claudio Villanueva a identifié les acylcarnitines comme nouvelle source d'énergie pour la thermogénèse du BAT. En réponse à une exposition au froid, les AG libérés par la lipolyse induisent dans le foie l'activation du récepteur nucléaire HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*) qui stimule l'oxydation hépatique des AG au cours de laquelle les acylcarnitines sont générées. Les acylcarnitines sont ensuite libérées dans la circulation sanguine comme l'atteste l'augmentation de leurs niveaux plasmatiques en réponse au froid. Ces acylcarnitines sont ensuite utilisés par le BAT et le muscle squelettique et plus faiblement par le WAT et le foie (Simcox et al. 2017).

III- Contrôle de la thermogénèse par le système β -adrénergique

1) Le système β -adrénergique : principal contrôle de la thermogénèse

La thermogénèse sans frisson est principalement induite par le système nerveux sympathique notamment via la noradrénaline et les récepteurs β -AR. En effet, lors d'une exposition au froid, des signaux afférents des thermorécepteurs de la peau arrivent à l'hypothalamus. La première réponse induite est une vasoconstriction afin de relocaliser l'afflux sanguin au niveau du tronc contenant tous les organes vitaux. La dissipation de chaleur est diminuée mais aussi les signaux afférents sont augmentés par la diminution de la température de la peau, afin que le centre régulateur thermogénique s'active. L'hypothalamus répond également par la libération de catécholamines, notamment la noradrénaline, au niveau des terminaisons nerveuses situées dans le tissu adipeux (Jiang et al., 2017). La noradrénaline se fixe dans le BAT et le WAT sur ses récepteurs β -AR pour induire une réponse thermogénique et lipolytique.

A) Les récepteurs β -adrénergiques

Les β -AR sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) associés aux protéines Gs. Il existe trois types de récepteurs β -AR : le β 1-AR, β 2-AR et le β 3-AR. La noradrénaline lie les récepteurs β -AR dans l'ordre croissant de préférence suivant : β 1-AR > β 2-AR > β 3-AR.

a. Les récepteurs β -adrénergiques chez la souris

Dans les adipocytes bruns matures de souris, bien que le β 1-AR soit exprimé, c'est le β 3-AR qui est le plus abondant des β -AR (Nahmias et al. 1991). L'expression du β 3-AR est restreinte aux adipocytes matures alors que le β 1-AR est aussi exprimé dans la SVF (fraction stromovasculaire) qui contient les progéniteurs adipocytaires (Collins et al. 1994). Le β 3-AR engendre l'activation de la thermogénèse induite par les catécholamines, dans le BAT et le WAT murin (Jia et al. 2019; Labbé et al. 2016; Mirbolooki et al. 2014; Yoshitomi et al. 1998). Le brunissement du WAT est induit par les catécholamines via les récepteurs β 1-AR et β 3-AR. En effet, il a été montré que le β 1-AR est nécessaire à la formation de nouveaux adipocytes beiges et que le β 3-AR recrute des adipocytes beiges via la transdifférenciation d'adipocytes blancs matures (Bronnikov, Houstěk, et Nedergaard 1992; Fukano et al. 2016; Y. Jiang, Berry, et Graff 2017; Jimenez et al. 2003). Le β 2-AR est présent seulement dans les préadipocytes mais il n'est pas impliqué dans la thermogénèse des adipocytes murins (Mattsson et al. 2011).

b. Les récepteurs β -adrénergiques chez l'Homme

Chez l'Homme, les 3 récepteurs β -AR sont exprimés dans les dépôts adipeux. Le β 1-AR et le β 2-AR sont exprimés dans le WAT et le BAT mais le β 3-AR bien qu'exprimé dans le BAT est très faiblement voire pas exprimé dans le WAT (Evans et al. 2019). Deux études très récentes se sont alors intéressées à l'implication des β 1-AR et β 2-AR dans l'activation thermogénique du BAT chez l'Homme. Dans des hMADS (*human multipotent adipose-derived stem cells*), un modèle cellulaire d'adipocytes bruns humains, le niveau d'expression du β 3-AR est trois fois plus faible que celui du β 1-AR (Mattsson et al. 2011). Riis-Vestergaard *et al.* ont également montré que, dans des biopsies et dans des cellules différenciées de BAT humain, le β 1-AR est plus exprimé que le β 2-AR et le β 3-AR. De plus, ils ont montré que l'induction de la lipolyse et de l'expression d'UCP1 dans une lignée immortalisée d'adipocytes bruns humains semble être réalisée par le β 1-AR (Riis-Vestergaard et al. 2020). Ces auteurs suggèrent alors que le β 1-AR est responsable de la régulation adrénérgique de l'activité du BAT chez l'Homme. Cependant, l'équipe d'André Carpentier vient de publier que c'est le récepteur β 2-AR qui contrôle la thermogénèse dans les adipocytes bruns humains. En effet les auteurs montrent dans des cultures primaires d'adipocytes bruns humains que les inductions de l'expression d'UCP1, de la respiration et de la lipolyse stimulées par la noradrénaline sont chacune abolies lorsque l'expression du β 2-AR est fortement diminuée mais qu'elles ne changent pas lorsque ce sont

les expressions du β 1-AR et β 3-AR qui sont réprimées (Blondin et al. 2020). Au vu de ces deux publications, d'autres études sont alors requises afin de clarifier l'implication des récepteurs β -AR dans le contrôle de la thermogénèse chez l'Homme.

B) Voie de signalisation des β -AR

Suite à la liaison de la noradrénaline sur son récepteur β -AR, la protéine Gs active l'AC ce qui induit une accumulation d'AMPc intracellulaire et l'activation de protéine kinase AMPc dépendante (PKA). La voie AMPc/PKA active le facteur de transcription CREB, qui va activer à son tour la protéine p38MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinases*). La p38MAPK activée phosphoryle le facteur de transcription ATF2 (*activating transcription factor 2*) qui en se fixant sur l'élément de réponse CRE au niveau des promoteurs des gènes de UCP1 et PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*) induit leur transcription (W. Cao et al. 2004).

Pour induire la lipolyse, la PKA activée phosphoryle la LHS sur plusieurs résidus sérine : Ser-563, Ser-659 et Ser-660, ce qui cause l'activation et la translocation de cette lipase du cytosol vers la gouttelette lipidique. La PKA phosphoryle également la PLIN1 (*perilipin 1*) présente sur la gouttelette lipidique. Une fois phosphorylée, PLIN1 permet un meilleur accès des lipases à la gouttelette lipidique en s'en éloignant et elle active aussi la LHS (Duncan et al. 2007).

2) Le système β -adrénergique est dispensable pour la thermogénèse sans frisson

Le système β -adrénergique est connu pour être le régulateur principal de la thermogénèse sans frisson cependant plusieurs études chez la souris démontrent que ce système, bien qu'important, est dispensable.

En 2003, Jimenez *et al* ont montré avec des souris dépourvues du β 3-AR (β 3-AR KO), que l'absence de β 3-AR n'affecte pas l'induction de l'expression d'UCP1 par le froid dans le BAT (Jimenez et al. 2003). En accord avec ces résultats, une autre étude a démontré que le β 3-AR est dispensable pour l'activation transcriptionnelle du programme thermogénique dans les adipocytes bruns et beiges. En effet, des souris β 3-AR KO exposées au froid présentent des niveaux d'expression d'UCP1, PGC1 α et Cidea (*cell death inducing DFFA like effector A*) dans leurs dépôts adipeux équivalents à ceux de souris sauvages (WT) (de Jong et al. 2017). De plus,

ces souris β 3-AR KO sont capables de maintenir leur température corporelle au cours d'une exposition aiguë au froid (5h) (Preite et al. 2016).

Par ailleurs, les souris déficientes pour les trois récepteurs β -AR (β -less) ne survivent pas à une exposition à un froid aigu (4°C). Cependant, ces souris s'acclimatent bien à une exposition à un froid moyen (10°C) comme l'attestent l'activation du programme thermogénique dans le BAT et le recrutement d'adipocytes bruns dans le WAT de ces souris (Razzoli et al. 2016). En accord avec cette étude, une autre équipe a montré qu'après une exposition à 10°C , l'expression de gènes du programme thermogénique dans le scWAT des souris β -less est identique à celle de souris WT (Ye et al. 2013). Ces études révèlent alors que le système nerveux sympathique n'est pas le seul à contribuer à l'activation de la thermogénèse sans frisson, ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués.

IV) Rôle de l'ANP dans les fonctions adipocytaires

1) L'ANP, un facteur lipolytique puissant

La présence de GC-A et de NPRC dans le tissu adipeux a été mise en évidence en 1989 dans des adipocytes de rats puis en 1996 dans des adipocytes humains (Sarzani et al. 1996). Malgré la démonstration de production de GMPc induite par l'ANP dans les adipocytes en 1989 (Jeandel et al. 1989), ce n'est qu'en 2000 qu'une réponse biologique a été observée. En effet, Sengenès *et al.* ont démontré un effet lipolytique de l'ANP *in vitro* dans des adipocytes isolés et *in situ*, par microdialyse, dans du tissu adipeux blanc humain. L'ANP a un potentiel lipolytique supérieur à celui du BNP. Cette réponse lipolytique a un potentiel similaire aux catécholamines et est induite à partir de 100pM d'ANP ce qui correspond à une dose physiologique (C. Sengenès et al. 2000). Suite à un traitement d'adipocytes humains par 100nM d'ANP pendant 1 heure, les niveaux de glycérol sont augmentés 7,2 fois (Souza et al. 2011). L'effet lipolytique de l'ANP passe par l'activation du GC-A qui induit la production de GMPc, l'activation de la PKG et la phosphorylation de la LHS et de la PLIN1 (C. Sengenès et al. 2000; Coralie Sengenès et al. 2002; Coralie Sengenès et al. 2003). Cette voie GMPc/PKG est complètement indépendante de la voie AMPc/PKA induite par les catécholamines (Galitzky et al. 2001). Au cours d'un exercice physique l'ANP est sécrété et induit la mobilisation lipidique ce qui montre que c'est un système physiologique (Cedric Moro et al. 2004).

L'effet lipolytique de l'ANP a été décrit comme primate spécifique. En effet, contrairement aux adipocytes d'humains et de macaques, les adipocytes de souris, rats, lapins et chiens ne répondent pas à l'ANP. Cette spécificité serait expliquée par un ratio de récepteurs GC-A/NPRC beaucoup plus faible dans les adipocytes d'espèces non primates avec une prédominance de NPRC par rapport au GC-A (Coralie Sengenès et al. 2002). En accord avec cette hypothèse, le traitement d'adipocytes par 1 μ M d'ANP pendant 15 minutes induit une augmentation de GMPc intracellulaire d'un facteur 2,8 chez le rat contre un facteur 258 chez l'humain (Coralie Sengenès et al. 2002). Aussi, cette hypothèse est confortée par le fait que les adipocytes de souris délétés pour le NPRC (NPRC KO) répondent à l'ANP (Bordicchia et al. 2012).

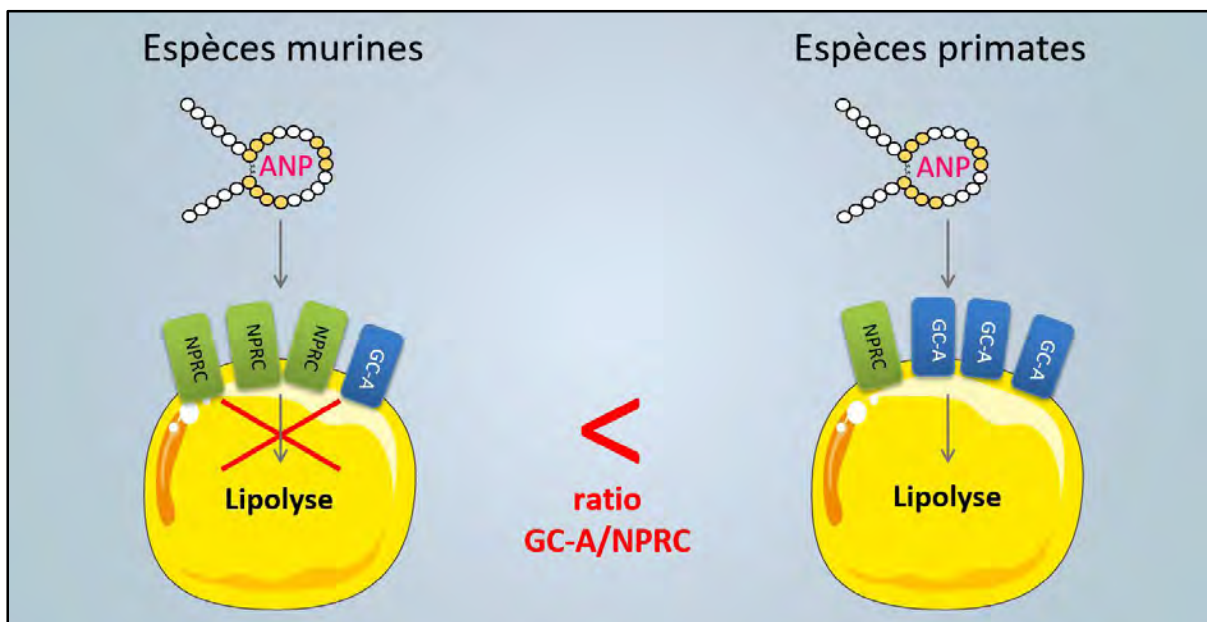


Figure 11 : Hypothèse expliquant l'effet lipolytique primate spécifique de l'ANP. Le ratio de GC-A/NPRC serait trop faible dans les adipocytes d'espèces murines pour que l'ANP puisse induire un effet lipolytique. Dans les adipocytes humains, le ratio GC-A/NPRC est supérieur à celui des adipocytes murins. < : inférieur

2) Thermogénèse

En plus d'induire la lipolyse, les PN ont la capacité d'induire un programme thermogénique dans les adipocytes. En effet, Bordicchia *et al.* ont montré que l'ANP induit ce programme thermogénique *in vitro* dans des adipocytes humains et murins. L'ANP et le BNP lient le GC-A présent sur les adipocytes et stimule la production de GMPc. Le GMPc produit active la PKG qui phosphoryle les mêmes cibles que la PKA et notamment la p38MAPK. La p38MAPK activée

phosphoryle les facteurs de transcription ATF2 et PGC1- α qui une fois activés induisent la transcription de UCP1 (Bordicchia et al. 2012). Dans cette même étude, il a été montré que chez les souris NPRC KO, qui présentent une élévation des niveaux plasmatiques de PN, le niveau d'expression adipocytaire d'UCP1 est augmenté.

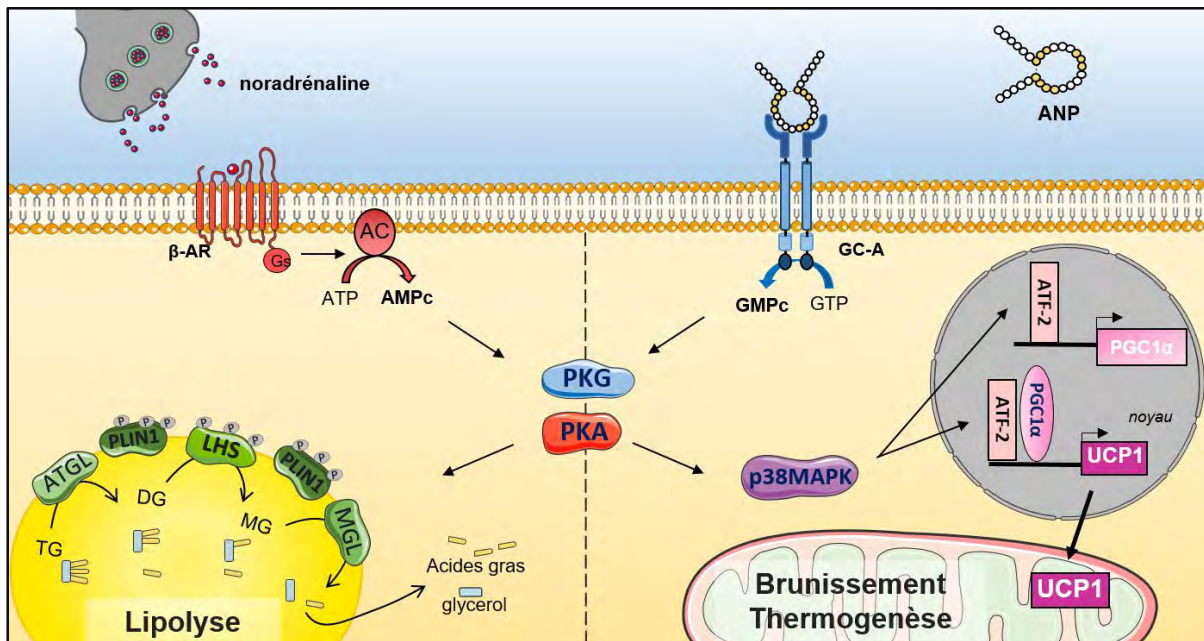




Figure 12 : Voies d'activation de la thermogénèse et de la lipolyse par la noradrénaline et l'ANP.



La thermogénèse sans frisson est une condition physiologique au cours de laquelle le métabolisme énergétique est « challengé ». Afin de maintenir une température corporelle stable tout en maintenant l'homéostasie énergétique de l'organisme, un ensemble de mécanismes dans différents tissus se mettent en place. Le système nerveux sympathique est connu comme étant le régulateur principal de la thermogénèse. Cependant des études suggèrent l'implication d'autres systèmes. Au vu des effets lipolytiques et thermogéniques in vitro du système ANP/GC-A, le cœur pourrait être un acteur majeur dans la mobilisation de substrats et la production de chaleur nécessaires au maintien d'une température corporelle stable lorsque la température environnementale baisse. Cette hypothèse sera abordée dans la première partie des résultats obtenus au cours de cette thèse.

Par ailleurs, nous allons voir dans la partie suivante, que le cœur, via le système ANP/GC-A pourrait également être impliqué dans les altérations de l'homéostasie glucidique et lipidique observées au cours du diabète de type 2 et de l'obésité



Partie III : Le diabète de type 2

I- L'insuline : au cœur du diabète de type 2

1) Rôles physiologiques de l'insuline dans le contrôle de la glycémie

L'insuline est une hormone produite et sécrétée en réponse à une élévation de la glycémie par les cellules β des îlots de Langerhans situés dans le pancréas. Bien qu'elle agisse sur une grande majorité de tissus, elle cible principalement les organes clés du métabolisme énergétique, qui expriment fortement son récepteur IR (*insulin receptor*). Ayant un rôle hypoglycémiant, l'insuline induit le transport et l'utilisation de glucose ainsi que la lipogenèse et diminue la lipolyse dans le tissu adipeux ; elle induit le transport et l'utilisation de glucose ainsi que la glycogénogenèse dans le muscle squelettique ; elle réprime la néoglucogenèse tandis qu'elle favorise la lipogenèse et la glycogénogenèse dans le foie.

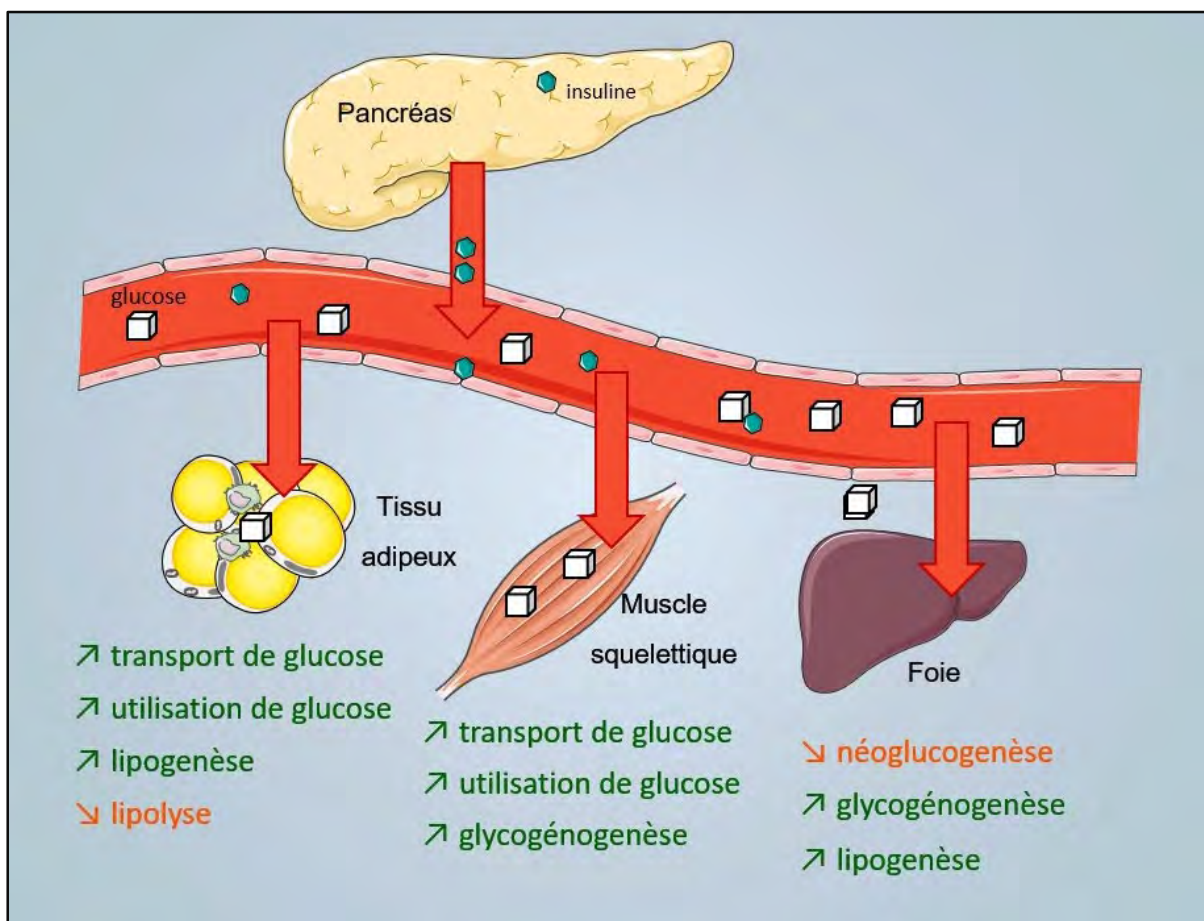


Figure 13 : Effets physiologiques de l'insuline dans la régulation de la glycémie.

A) Voies activées par l'insuline

a. L'absorption de glucose

Par la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique, l'insuline fait entrer le glucose dans les tissus adipeux, les muscles squelettiques et le cœur afin que le glucose présent dans la circulation sanguine soit utilisé et/ou stocké.

Pour induire ses effets, l'insuline se lie à son récepteur transmembranaire à tyrosine kinase, IR. La liaison de l'insuline sur l'IR entraîne un changement de conformation de celui-ci, qui aboutit à l'autophosphorylation du récepteur sur ses résidus tyrosines (Tyr) localisés dans la partie intracellulaire. Le récepteur phosphorylé recrute des protéines IRS (*insulin receptor substrate*). IRS1/2 sont les protéines de la famille IRS les plus importantes, grâce à leur domaine PH (*pleckstrin homology*) elles sont localisées près de la membrane plasmique. Suite à l'activation de l'IR, IRS1 s'ancre à l'IR via son domaine PTB (*phospho-tyrosine binding*) et est phosphorylée sur ses résidus Tyr. La PI3K, via sa sous-unité p85, est recrutée près d'IRS1 et se fixe sur ses domaines phosphorylés. La PI3K est une enzyme qui catalyse la phosphorylation de PIP2 (*phosphatidylinositol biphosphate*) en un second messenger lipidique PIP3 (*phosphatidylinositol triphosphate*). La liaison de p85 à l'IRS1 active la sous unité catalytique p110 de la PI3K menant ainsi à la phosphorylation de PIP2 en PIP3. PIP3 active la protéine PDK1 (*PIP3-dependant kinase 1*) qui à son tour recrute et induit la phosphorylation d'Akt. Akt phosphoryle ensuite la protéine activatrice des protéines GTPase, AS160 (*Akt substrate*) qui permet alors la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique (De Meyts 2000).

b. La glycogénogenèse

Le glycogène est la principale forme de stockage du glucose et est trouvé principalement dans les muscles squelettiques et le foie. Le glycogène musculaire est exclusivement utilisé par le muscle alors que le glycogène hépatique peut servir à la synthèse *de novo* de glucose (néoglycogénèse) libéré ensuite dans la circulation sanguine. L'insuline active la glycogénogenèse par l'inhibition de GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*), une enzyme présente en amont d'Akt. La GSK3 β inhibe la GS (*glycogen synthase*) et donc la synthèse de glycogène. L'insuline active également la PP1 qui déphosphoryle la GS et la GP (*glycogen phosphorylase*) les rendant respectivement activée et inhibée (Srivastava et Pandey 1998).

c. La Lipogenèse *de novo*

L'insuline active la DNL dans le tissu adipeux et le foie via l'activation de la voie PI3K/mTORC1 qui active ensuite le facteur de transcription SREBP1c (*sterol regulatory element-binding proteins 1c*), un régulateur de la transcription de gènes lipogéniques (Sanders et Griffin 2016).

B) Voies inhibées par l'insuline

a. La lipolyse

L'insuline est l'hormone anti-lipolytique la plus puissante et agit rapidement cependant les mécanismes impliqués ne sont pas entièrement élucidés. L'un des mécanismes décrits est que l'effet anti-lipolytique de l'insuline passe par l'activation d'Akt et de la PDE3B (*phosphodiesterase 3B*) qui dégrade l'AMPC et inhibe la voie PKA induite par les catécholamines. Cependant, en situation de faible tonus adrénergique l'insuline exerce quand même ses effets anti-lipolytiques, ce qui suggère que son action peut avoir lieu indépendamment de l'inhibition de la voie AMPC-PKA (Strålfors et Honnor 1989).

b. La néoglucogénèse

La néoglucogénèse a lieu majoritairement dans le foie (90% du glucose synthétisé) mais elle est également présente dans les reins et l'intestin. L'insuline induit l'activation de la kinase Akt qui transloque dans le noyau pour inhiber les deux facteurs de transcription FOXO1 (*Forkhead box 1*) et PGC1- α . Les transcriptions des gènes codants pour la PEPCCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) et la G6Pase (*glucose 6-phosphatase*), deux enzymes limitantes de la néoglucogénèse hépatique sont alors inhibées (Hatting et al. 2018).

C) Régulation négative physiologique du signal insulinique

a. Internalisation du complexe insuline/IR

Afin de stopper la transduction du signal insulinique, le complexe insuline/IR est internalisé par le système endosomal. Suite à l'internalisation du complexe, le milieu intra-endosomal est acidifié. Cette acidification dissocie l'insuline de l'IR pour dégrader l'insuline. L'IR est déphosphorylé et inactivé par une protéine phosphatase (PTP) pour ensuite être soit recyclé à la membrane plasmique soit dégradé (Posner 2017).

b. Les protéines phosphatases

En parallèle de l'internalisation du complexe ligand/récepteur, la signalisation insulinaire peut également être contrôlée par les phosphatases PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) et LAR (*leukocyte common antigen-related protein*) qui sont respectivement cytoplasmiques et transmembranaires. Elles induisent la déphosphorylation des résidus Tyr de l'IR et d'IRS1. Les souris PTP1B déficientes (PT1B KO), présentent une augmentation de leur sensibilité à l'insuline associée à une augmentation de la phosphorylation de IR dans le muscle squelettique et le foie (Elchebly et al. 1999). D'autre part, les souris déficientes pour la phosphatase LAR (LAR KO), ont des glycémies et des insulïnémies plus faibles que des souris sauvages ce qui suggère une amélioration de leur sensibilité à l'insuline (Ren et al. 1998).

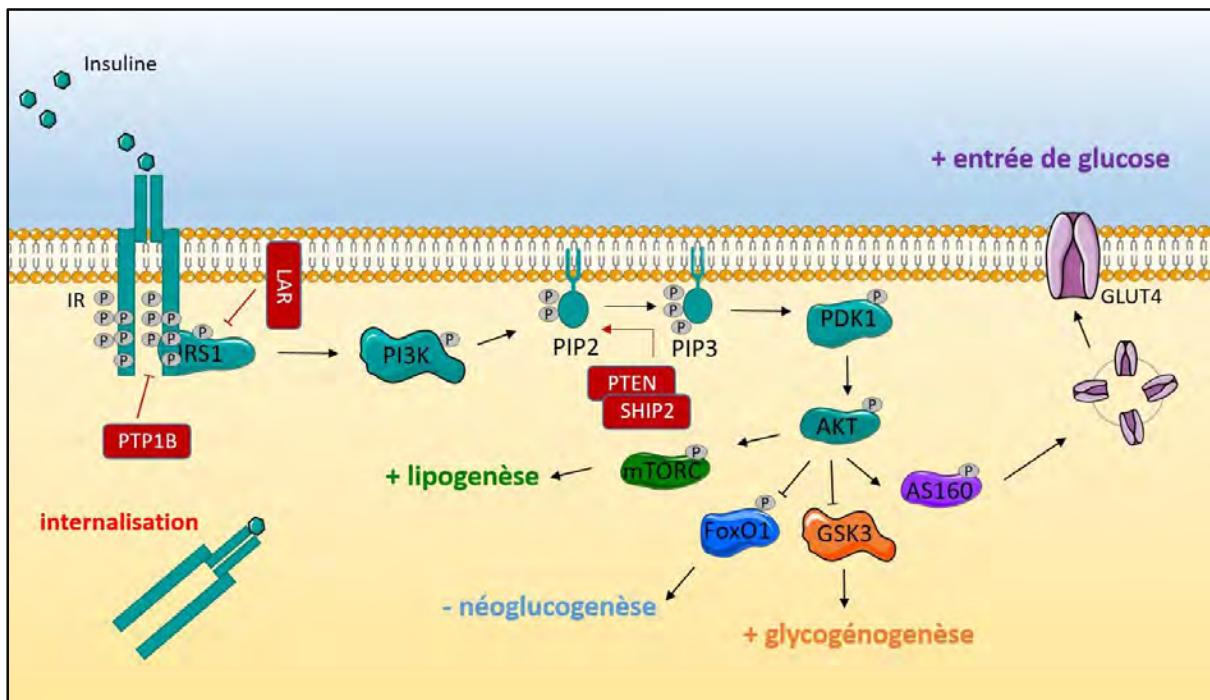


Figure 14 : Voies de signalisation de l'insuline et régulation du signal insulinaire en condition physiologique. - : inhibe ; + : active. En rouge sont représentés les régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'insuline.

c. Les lipides phosphatases

PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) et SHIP2 (*Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5' phosphatase 2*) antagonisent l'activité de la PI3K en déphosphorylant PIP3 en PIP2. La délétion totale ou spécifique de PTEN dans le muscle squelettique, le foie ou

le tissu adipeux induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline des souris (Boucher, Kleinriders, et Kahn 2014). Les souris déficientes pour SHIP2 sont hypoglycémiques, résistantes à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (HFD) et ont leur activation d'Akt par l'insuline augmentée (Sleeman et al. 2005). A l'inverse, une surexpression de SHIP2 chez la souris conduit à une diminution de l'activation d'Akt en réponse à l'insuline, dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique (Kagawa et al. 2008).

2) Le diabète de type 2 : insulino-résistance

A) Physiopathologie du diabète de type 2

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique (selon l'OMS [organisation mondiale de la santé] une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/l), ainsi que des métabolismes glucidiques, lipidiques et protéiques altérés en raison d'une insuffisance complète ou partielle de la sécrétion et/ou action de l'insuline.

Himsworth nota il y a plus de 80 ans, qu'une injection de glucose associée à une injection d'insuline chez des diabétiques produisait 2 réponses différentes selon les patients. Certains diabétiques répondaient à l'injection d'insuline, c'est-à-dire que leur glycémie, augmentée par l'injection de glucose, revenait à une valeur basale après l'injection d'insuline : ce sont les diabétiques de type 1. Chez les autres patients l'injection de glucose induisait une augmentation de la glycémie qui n'était pas diminuée suite à l'injection d'insuline, ils étaient alors insulino-insensibles ou plutôt insulino-résistants : ce sont les diabétiques de type 2 (Himsworth 1936). L'insulino-résistance est l'absence de réponse de tissus cibles à des concentrations physiologiques d'insuline, ce qui altère la régulation de la glycémie qui reste alors élevée (DeFronzo, 1985). Le pancréas, afin de compenser ce manque de réponse à l'insuline, va produire plus d'insuline pour normaliser la glycémie. On se retrouve alors avec une glycémie normale et une hyperinsulinémie : c'est l'état prédiabétique. Lorsque le pancréas ne parvient plus à compenser l'insulino-résistance, il y a hyperinsulinémie et hyperglycémie : c'est le diabète de type 2 (DT2). Le DT2 est la forme de diabète la plus répandue puisqu'elle compte pour 90-95% des patients diabétiques (Tripathi, 2006).

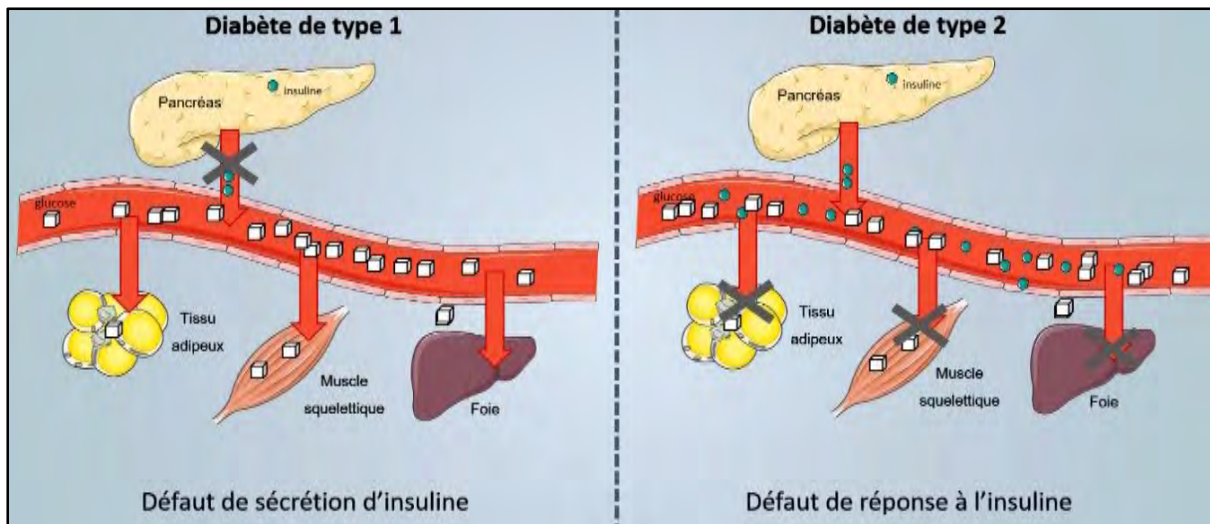


Figure 15 : Représentation des défauts liés à l'insuline dans les diabètes de type 1 et 2.

Le DT2 est maintenant considéré comme une pandémie puisque la fédération internationale du diabète (IDF) estime qu'un adulte sur onze âgé de 20 à 79 ans (soit 463 millions d'adultes) était diabétique en 2015 et qu'un adulte sur deux (soit 232 millions de personnes) avait un diabète non diagnostiqué. Il est également estimé que 4,2 million d'adultes sont décédés du diabète ou de ses complications en 2019, ce qui correspond à un décès toutes les 8 secondes. Le diabète est un des enjeux de santé qui prend le plus d'ampleur du 21^{ème} siècle ; le nombre d'adultes diabétiques a plus que triplé ces 20 dernières années. Les prévisions de l'IDF estiment le nombre d'adultes diabétiques à 578 millions en 2030 et 700 million en 2045 (International Diabetes Federation. IDF 2015).

B) L'obésité, premier facteur de risque du diabète de type 2

Les raisons pour lesquelles la pandémie du diabète est en plein essor sont multiples et incluent le vieillissement, l'urbanisation et la sédentarité de la population. Le facteur de risque le plus important pour le DT2 est l'obésité (Forouzanfar et al. 2015). L'obésité et le surpoids sont définis par l'OMS par un indice de masse corporelle (IMC) (correspondant au poids / par la taille au carré, exprimé en kg/m²) compris entre 25 et 30 pour des personnes en surpoids et supérieur à 30 pour des personnes obèses. En 2016, dans le monde on comptait 39% d'adultes en surpoids et 13% d'adultes obèses. En France il y avait 60% et 22% d'adultes en surpoids et obèses respectivement. De façon très inquiétante, on observe également de plus en plus d'enfants obèses. Dans le monde en 2016, 18 % des enfants/adolescents âgés de 5 à 19 ans étaient en surpoids ou obèses (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) 2017). D'après

l'OMS le mode de vie est responsable en grande majorité du développement de l'obésité, avec notamment une alimentation très calorique contenant beaucoup de produits transformés ainsi qu'un manque d'activité physique.

II- Principaux acteurs responsables de l'insulinorésistance

Comprendre la physiopathologie du DT2 et notamment les mécanismes responsables de l'apparition de l'insulinorésistance, est essentiel à l'identification de moyens préventifs ou curatifs de cette pathologie. Les quatre facteurs majeurs connus pour altérer la voie de signalisation de l'insuline sont la lipotoxicité, l'inflammation, le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydant.

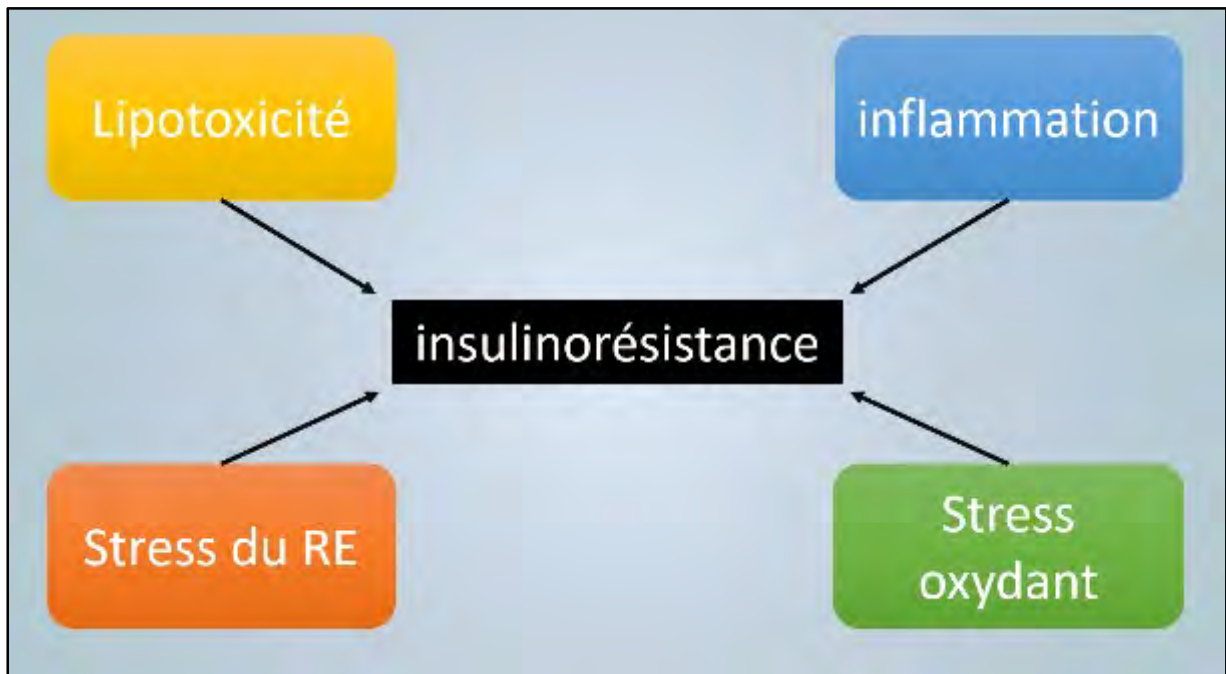


Figure 16 : Acteurs majeurs responsables de la mise en place de l'insulinorésistance.

1) La lipotoxicité

Suite à un repas, les AG peuvent être directement utilisés dans les cellules pour fournir de l'énergie, ou ils peuvent être stockés dans le tissu adipeux afin d'être libérés dans la circulation sanguine pendant des périodes de jeûne ou d'exercice. Les adipocytes s'adaptent à la quantité d'AG à stocker par l'augmentation de leur taille (l'hypertrophie) et par l'augmentation de leur nombre via la synthèse de nouveaux adipocytes (l'hyperplasie). Cependant, lorsque les apports en AG sont trop élevés de manière chronique, ces derniers ne peuvent plus être

stockés dans les adipocytes et s'accumulent dans d'autres tissus comme le muscle, le foie et le pancréas. Cette accumulation ectopique de lipides est ce qu'on appelle la lipotoxicité. Parmi les lipides qui s'accumulent de façon ectopique, on retrouve les TG mais aussi des intermédiaires lipidiques comme les DG et les céramides. Les rats Zucker, génétiquement rendus obèses, ont une augmentation des niveaux de DG de 82% dans le foie et 136% dans le muscle squelettique, par rapport à des rats sauvages. Ils présentent également une augmentation du contenu en céramides de 26% et 52% dans le foie et le muscle squelettique respectivement (Turinsky, O'Sullivan, et Bayly 1990).

Par ailleurs, il a été montré chez des individus sains qu'une augmentation de la concentration en AG plasmatique induite par une infusion de lipides induit une insulino-résistance musculaire (Boden et al. 2001). De plus, le contenu en lipides intramyocellulaires (IMCL) est fortement associé à l'insulino-résistance chez des personnes sédentaires (Cédric Moro, Bajpeyi, et Smith 2008). A l'inverse, une diminution du contenu en IMCL est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Brøns et Grunnet 2017). Les rôles et mécanismes d'action des DG et des céramides diffèrent dans l'insulino-résistance.

Les DG induisent une résistance à l'insuline par l'activation des membres de la famille des PKC. Les PKC ont la capacité de phosphoryler les protéines IRS1 sur des résidus sérines (Ser307) ce qui empêche leur phosphorylation sur des résidus Tyr suite à leur liaison à l'IR. L'insulino-résistance hépatique induite par les DG passe par l'activation de la PKC ϵ . La diminution de l'expression de la PKC ϵ par l'utilisation d'un ASO prévient l'insulino-résistance hépatique chez des souris soumises à un régime hyperlipidique. Il semblerait que la PKC ϵ phosphoryle l'IR sur le résidu Thr 1160 ce qui déstabilise la configuration de la tyrosine kinase du récepteur et toutes les actions de l'insuline en aval (M. C. Petersen et al. 2016). Dans le muscle, des études suggèrent que les DG activent la PKC θ et la PKC ϵ qui altèrent ensuite la signalisation de l'insuline. Cependant de nombreuses études semblent réfuter le rôle des DG dans l'insulino-résistance (Jayasinghe, Tankeu, et Amati 2019).

Les céramides altèrent la signalisation de l'insuline en ciblant Akt. Deux mécanismes ont été proposés : les céramides peuvent activer la PP2A (*protein phosphatase 2A*) une Ser/Thr phosphatase, qui peut ensuite déphosphoryler Akt. Ils peuvent également activer la PKC ζ qui peut phosphoryler les résidus Thr34 et Ser34 présents sur le domaine PH d'Akt, empêchant

ainsi son recrutement à la membrane plasmique où elle est normalement activée (Sokolowska et Blachnio-Zabielska 2019).

2) L'inflammation

Il est maintenant bien connu que l'obésité est associée une inflammation chronique de bas grade, et que l'inflammation participe à l'apparition de l'insulinorésistance. Au cours de l'obésité, les adipocytes hypertrophiés et stressés, secrètent des adipokines pour recruter des macrophages dans leur microenvironnement. Ces macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), l'IL-6 (*interleukine-6*) et l'IL-8 (*interleukine-8*) mais également des chémoattractants comme MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) qui va permettre de recruter d'autres macrophages. Des études sur des individus obèses ont montré une association entre les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-8 et la diminution de la sensibilité à l'insuline (Luca et Olefsky 2008).

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les monocytes et les macrophages mais aussi les adipocytes. C'est le premier des marqueurs de l'inflammation qui a été reconnu comme impliqué dans l'insulinorésistance. En effet, le TNF- α diminue l'expression de l'ARNm de GLUT4 dans des cultures d'adipocytes et de myocytes. De plus, il a été montré que le traitement d'adipocytes ou de myocytes avec du TNF- α réduit les niveaux de phosphorylation d'IRS1 sur un résidu Ser diminuant ainsi la signalisation induite par l'insuline (Hotamisligil et al. 1996). Par ailleurs, une étude récente a montré que des cellules hépatocytaires HepG2 n'exprimant que 53% de la protéine TNF- α , ont des niveaux de phosphorylation d'IRS1 sur le résidu Tyr632 plus élevés. Ceci montre qu'une réduction de l'expression de TNF- α dans des cellules hépatocytaires améliore la sensibilité à l'insuline (Alipourfard, Datukishvili, et Mikeladze 2019). En accord avec ceci, des souris déficientes pour TNF- α ou déficientes pour le récepteur du TNF- α , TNFR1 (*TNF receptor 1*), ne développent pas d'insulinorésistance suite à un régime hyperlipidique (Uysal et al. 1997).

L'IL-6 est une cytokine sécrétée par plusieurs types cellulaires mais principalement par les adipocytes et les macrophages du tissu adipeux au cours d'un DT2. Un traitement chronique d'adipocytes murins 3T3-L1 avec de l'IL-6 induit une résistance à l'insuline et supprime le transport de glucose. Plusieurs mécanismes reliant IL-6 et la voie de signalisation de l'insuline

ont été suggérés et notamment l'induction de l'expression de SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*). SOCS3 est une protéine inhibitrice de la signalisation de l'insuline par la diminution de la phosphorylation de IR, IRS1 et Akt (Lagathu et al. 2003). IL-6 est également responsable du recrutement de macrophages dans le tissu adipeux, ce qui peut augmenter l'inflammation et impacter la sensibilité à l'insuline (Kraakman et al. 2015). IL-6 a aussi un effet pro-lipolytique. Dans le foie, IL-6 inhibe la phosphorylation d'IRS-1 sur un résidu Tyr ce qui inhibe la transduction du signal de l'insuline. Lorsque les niveaux d'expression de IL-6 sont diminués chez la souris par l'utilisation d'un anticorps neutralisant, la sensibilité hépatique est augmentée (Cai et al. 2005). Bien que l'effet de l'IL-6 sur la sensibilité à l'insuline dans le foie et le tissu adipeux soit bien connu, son effet musculaire est débattu. En effet, certaines études montrent que l'IL-6 améliore la sensibilité à l'insuline alors que d'autres démontrent l'inverse (Akbari et Hassan-Zadeh 2018).

3) Le stress du RE

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'un des plus grands organites des cellules eucaryotes. Il est constitué d'un réseau de tubules et sacs membranaires interconnectés par un espace fermé appelé la lumière du RE. Ce réseau, en continuité de l'enveloppe nucléaire est dispersé dans tout le cytoplasme. Le RE est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires qui affectent l'homéostasie de l'organisme entier. Il a un rôle majeur dans la synthèse, le repliement et la maturation de plus d'un tiers des protéines produites dans la cellule. Lorsque l'une de ses fonctions est altérée (par exemple une synthèse protéique excessive ou une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE) on parle de stress du RE. Une réponse cellulaire est alors activée afin d'augmenter les capacités de repliement des protéines et de diminuer la charge de protéines non repliées : c'est la voie UPR (*unfolded protein response*). La réponse UPR est assurée par au moins trois protéines transmembranaires : IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*PKR-like ER kinase*) et ATF6 (*activating transcription factor 6*). En condition normale, ces protéines sont maintenues dans une forme inactive par liaison avec la chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*) localisée dans la lumière du RE. Au cours d'un stress du RE, BiP se dissocie de ces protéines ce qui induit leur activation :

- IRE1 s'autophosphoryle, ce qui démarque son activité endoribonucléase responsable de l'épissage non conventionnel de l'ARNm de XBP1 (*X box-binding protein1*) et

sa traduction en XBP1s. IRE1 est également responsable de la dégradation d'ARNm localisés dans le RE, ce qui permet une diminution d'accumulation de protéines dans le RE.

- PERK phosphoryle eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2, subunit α*), un facteur d'initiation de la traduction. La synthèse protéique globale est alors inhibée et la charge de nouvelles protéines dans le RE diminue. L'activation d'eIF2 α permet également la traduction d'ATF4 (*activating transcription factor 4*) qui induit la transcription de gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés et l'apoptose comme la protéine CHOP (*C/EBP homologous protein*). En parallèle, PERK phosphoryle aussi NRF2 (*nuclear factor erythroid 2*), un facteur de transcription impliqué dans la réponse anti-oxydante.

- ATF6 transloque du RE vers l'appareil de Golgi où elle est clivée. La partie N-terminale de ATF6 migre vers le noyau et active la transcription des gènes codant pour des chaperonnes du RE (comme BiP), des composants de l'apoptose et des protéines foldases (Flamment et al. 2012).

Si la réponse UPR n'est pas suffisante et que le stress du RE persiste, alors elle conduira à la mort de la cellule par apoptose (C. Xu, Bailly-Maitre, et Reed 2005).

En 2004, un lien direct entre le stress du RE et l'insulinorésistance *in vivo* a été reporté pour la première fois. En effet, il a été montré que des souris ob/ob, génétiquement rendues obèses, et des souris sous HFD présentaient une augmentation de la phosphorylation de eIF2 α et de PERK, marqueurs du stress du RE, dans le foie et le tissu adipeux (Özcan et al. 2004). Le stress du RE a été majoritairement étudié dans l'insulinorésistance hépatique. Il peut altérer la voie de signalisation de l'insuline de trois façons : la modification de la transcription d'enzymes hépatiques clés dans la néoglucogenèse et la lipogenèse, la stimulation de kinases de stress qui interfèrent directement avec la voie de l'insuline et l'induction d'accumulation de lipides dans le foie. IRE1 active JNK (*cJUN NH2-terminal kinase*) et IKK (*I κ B kinase*) qui phosphorylent IRS1 sur des résidus Ser ce qui altère la voie de signalisation de l'insuline (Urano et al. 2000). Le facteur nucléaire NF- κ B (*nuclear factor κ B*) peut également être activé par PERK et ATF6. Aussi, il a été montré que ATF4 et CHOP, activés par le stress du RE, induisent l'expression de TRB3 (*tribbles pseudokinase 3*) qui est impliqué dans l'insulinorésistance (Ohoka et al. 2005, 3). En effet, son expression est augmentée dans le foie de souris diabétiques et de patients insulinorésistants (Oberkofler et al. 2010). La diminution de l'expression de TRB3 hépatique améliore la tolérance au glucose alors que sa surexpression

induit une résistance à l'insuline (Koo et al. 2004, 1). Les mécanismes impliqués restent cependant encore inconnus. Le traitement de cellules adipocytaires 3T3-L1 avec des agents inducteurs de stress du RE induit une diminution de la signalisation de l'insuline. Néanmoins cette inhibition n'inclut pas la voie IRE1/JNK comme dans les hépatocytes (L. Xu, Spinas, et Niessen 2010). Dans le muscle squelettique, le rôle du stress du RE dans l'insulinorésistance est incertain.

4) Le stress oxydant

A) Contrôle du stress oxydant

Le stress oxydant résulte d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par rapport au niveau d'antioxydants. Les ROS incluent le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($\cdot OH$). En condition basale, la mitochondrie est le principal site de production des ROS. Très tôt il a été montré que 2 à 5% de l'oxygène (O_2) consommé par la mitochondrie peut être réduit et transformé en $O_2^{\cdot-}$ (Boveris et Chance 1973). En effet, l' $O_2^{\cdot-}$ est généré par une réduction d'oxygène incomplète dans la chaîne de transfert des électrons ou par l'action d'un système enzymatique. Il est produit au niveau des complexes I et III de la chaîne de transfert des électrons (Muller, Liu, et Van Remmen 2004). L'anion superoxyde joue un rôle de précurseur, il subit des dismutations enzymatiques ou spontanées générant ainsi de l' H_2O_2 qui lui est impliqué dans les signalisations induites par les ROS (Stone et Yang 2006). La quantité de ROS dans la cellule est contrôlée par des enzymes anti-oxydantes : la glutathion peroxydase (GPx), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT). La GPx catalyse la réduction de H_2O_2 ou de hydro peroxyde organique (ROOH) en eau (H_2O) et en alcool (ROH) respectivement, en utilisant du glutathion réduit (GSH). Suite à cette réaction, le GSH va être transformé en disulfure de glutathion oxydé (GSSH). La SOD catalyse la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 . La CAT convertit ensuite l' H_2O_2 en H_2O et O_2 .

B) Rôle bénéfique des ROS dans la signalisation à l'insuline

Le rôle des ROS dans l'apparition de l'insulinorésistance n'est pas clairement défini. Certaines études montrent que dans des modèles cellulaires d'insulinorésistance il y a systématiquement une élévation de la quantité de ROS (Houstis, 2006) mais d'autres études suggèrent l'opposé. En effet, l' H_2O_2 est capable d'exercer des effets opposés, stimulation ou

inhibition de la voie de l'insuline, en fonction de sa concentration et/ou de son site de production par rapport à différents composants de la voie de signalisation de l'insuline (Rindler, 2013). De façon intéressante il a été montré qu'une augmentation de la quantité de ROS dans le muscle squelettique augmente la signalisation insulinaire *in vitro* et *in vivo* et atténue le développement de l'insulinorésistance. *In vitro* un traitement de cellules à l' H_2O_2 induit les effets de l'insuline par une activation de l'IR (Hayes et Lockwood 1987; Kadota et al. 1987) et/ou par l'inhibition de protéines tyrosine phosphatases (Heffetz et al. 1990). L'étude de Loh, sur les souris GPx1 KO mises en HFD, montre que cette délétion en GPx1 augmente les niveaux de H_2O_2 intracellulaires qui oxydent la phosphatase lipidique PTEN. Ceci aboutit à l'inhibition de la déphosphorylation de PIP3 en PIP2 qui court-circuite la translocation de GLUT4 à la membrane induite par l'insuline. En effet, l'oxydation de PTEN augmente ainsi la voie de signalisation PI3K/Akt, la phosphorylation d'AS160 et donc le transport membranaire de glucose (Loh et al. 2009). Cette étude est en accord avec les travaux réalisés 5 ans auparavant qui montrent qu'une surexpression de GPx1 *in vivo* induit une insulinorésistance, une hyperglycémie et une hyperinsulinémie des souris (McClung et al. 2004).

C) Rôle délétère des ROS dans la signalisation à l'insuline

Chez des individus obèses ou en surpoids, les mitochondries musculaires émettent deux fois plus de H_2O_2 que chez des individus sains. Chez des rats en HFD pendant 3 semaines il y a 4 fois plus de H_2O_2 produits par les mitochondries musculaires qu'en régime standard (Anderson et al. 2009). Cette surproduction d' H_2O_2 est associée à une altération de la voie de signalisation de l'insuline et du transport de glucose (Hey-Mogensen et al. 2012; Souto Padron de Figueiredo et al. 2015). Plusieurs études montrent l'implication de protéines MAPK, activées en réponse à des stress, dans l'effet des H_2O_2 sur l'insulinorésistance musculaire. Par exemple, des études *in vitro* ont montré l'association entre l'induction de l'insulinorésistance par les ROS et l'activation de la JNK (Blair et al. 1999; Hirosumi et al. 2002). Par la suite, l'équipe de Santos a démontré que l'activation de la JNK est partiellement nécessaire pour l'induction de l'insulinorésistance par le H_2O_2 dans du muscle squelettique isolé de rat. Le traitement de muscle squelettique isolé de rat par de l' H_2O_2 induit une phosphorylation et donc l'activation de la JNK, associée à une diminution du transport de glucose. L'effet de l' H_2O_2 est inhibé partiellement par l'ajout d'un inhibiteur de JNK ce qui montre que la JNK joue un rôle important dans l'induction de l'insulinorésistance en réponse à un stress oxydant dans le

muscle squelettique (Santos et al. 2012). De la même manière, il a été montré que p38MAPK et GSK-3 β sont impliquées (Archuleta et al. 2009; Dokken et al. 2008). JNK induit l'insulinorésistance par la phosphorylation d'IRS1/2 sur un résidu Ser307 inhibant ainsi l'interaction de IRS1 avec le récepteur à l'insuline et donc de la cascade de signalisation de l'insuline (Solinas et Becattini 2016).

III- La fonction mitochondriale musculaire : implication dans le DT2 ?

Les mitochondries sont des organites cellulaires eucaryotes responsables de la production d'énergie sous forme d'ATP à partir de glucose, de lipides et de protéines. Souvent décrites comme les « centrales énergétiques » elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique. Il y a plus de 40 ans, la dysfonction mitochondriale a été décrite dans le contexte d'une intolérance au glucose mais le rôle des mitochondries dans l'insulinorésistance n'a émergé qu'à la fin des années 1990 (T. Yamada et al. 1975). Des études réalisées chez l'Homme décrivent qu'une diminution de la capacité oxydative mitochondriale, qui résulte d'une diminution du contenu et/ou de la fonction des mitochondries, induit une oxydation lipidique insuffisante et mène à une accumulation ectopique de lipides et une insulinorésistance (Kelley et al 1999, Simoneau et al 1999). Cependant la question qui reste débattue est si le dysfonctionnement mitochondrial observé est bien une cause ou alors une conséquence du développement du DT2.

1) Activité mitochondriale

Plusieurs équipes ont montré, par l'utilisation de différentes techniques, une diminution de l'activité enzymatique oxydative et de protéines de la chaîne respiratoire dans les muscles d'individus obèses insulinorésistants ou diabétiques de types 2 (David E. Kelley et al. 2002; Morino et al. 2005; Ritov et al. 2005; Simoneau et al. 1999). Par exemple, en 2003, une étude a montré une diminution d'environ 30% de la production mitochondriale d'ATP associée à une augmentation de 80% du contenu en lipides dans le muscle de sujets insulinorésistants comparé à des sujets insulinosensibles (K. F. Petersen et al. 2004). Dans une autre étude, la fonction mitochondriale a été mesurée *in vivo* par l'analyse de la vitesse de resynthèse de la phosphocréatine suite à un exercice physique. La respiration mitochondriale peut être évaluée par la mesure de la consommation d'ADP et par la production d'ATP. La

phosphocréatine est utilisée par la créatine kinase pour produire de l'ADP. Au cours d'un exercice physique, plus la respiration est élevée, plus l'utilisation de phosphocréatine est élevée et plus longue sera la resynthèse de cette dernière. En utilisant cette technique, les auteurs ont observé une diminution de la fonction mitochondriale chez des patients diabétiques de type 2 mais sans modification du contenu lipidique intramusculaire (Schrauwen-Hinderling et al. 2007). L'activité de la citrate synthase, l'enzyme limitante du cycle de Krebs, est également mesurée pour déterminer la fonction mitochondriale. Cette activité est diminuée dans des myotubes provenant de patients diabétiques comparée à celle dans des myotubes provenant d'individus insulinosensibles (Ørtenblad et al. 2005). Toutes ces techniques permettent d'observer la fonction mitochondriale globale dans le muscle mais elles ne permettent pas de discriminer si les défauts observés résultent d'une diminution de l'activité de chaque mitochondrie ou bien d'une diminution du nombre de celles-ci. L'activité respiratoire de mitochondries isolées à partir de biopsies musculaires est également diminuée chez des patients diabétiques par rapport à des individus sains (Mogensen et al. 2007). Ceci démontre que la fonction mitochondriale est altérée dans le muscle squelettique de patients insulino-résistants. En parallèle, ce défaut d'activité mitochondriale peut s'accompagner d'un défaut de synthèse, de dynamique et/ou d'une dégradation de l'organite.

2) Biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est un processus finement régulé. Les cellules peuvent augmenter leur contenu en ADN mitochondrial (ADNmt), leur masse et leur activité mitochondriale en réponse à différentes conditions qui nécessitent une augmentation de la production d'énergie, comme par exemple une exposition au froid ou un exercice physique. Cette biogenèse implique une coordination d'acteurs nucléaires et mitochondriaux. Le régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale est PGC-1 α (Puigserver et al. 1998). PGC-1 α régule l'expression des facteurs de transcription NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*) et NRF2 (*nuclear respiratory factor 2*) qui contrôlent l'expression de nombreuses protéines mitochondriales. Par exemple, NRF1 contrôle l'expression de TFAM (*mitochondrial transcription factor*) qui est une protéine se liant à l'ADNmt, essentielle pour la maintenance, la réplication et la transcription de celui-ci (Larsson et al. 1998).

Dans les muscles squelettiques de patients diabétiques de type 2, une étude a décrit une diminution de la quantité d'ADNmt, ainsi qu'une diminution du nombre de mitochondries

subsarcolemmales observées au microscope électronique à transmission (MET), par rapport à des sujets insulinosensibles de même âge, même poids et même sexe (Ritov et al. 2005). D'autres études ont montré, en plus d'une diminution du nombre de mitochondries, une diminution de leur taille dans les muscles d'individus diabétiques de type 2 (David E. Kelley et al. 2002; Morino et al. 2005; Ritov et al. 2005). Les diminutions du nombre et de la taille des mitochondries peuvent être expliquées par un défaut de la biogenèse mitochondriale. En effet, il a été observé une diminution de l'expression de PGC1 α et une diminution de l'expression des protéines de la chaîne respiratoire dans les muscles de sujets insulino-résistants (Heilbronn et al. 2007). Ces résultats sont en accord avec des analyses de biopuces (*microarray*) qui ont montré, dans le muscle de patients diabétiques de type 2, une diminution de l'expression de gènes étant sous le contrôle transcriptionnel de PGC1 α et codant pour des enzymes clés du métabolisme oxydatif (Mootha et al. 2003; Patti et al. 2003). De plus, l'expression de NRF1 est diminuée dans le muscle de patients diabétiques de type 2 (Patti et al. 2003). De façon intéressante, un variant du gène de PGC1 α , Gly482Ser a également été associé au DT2 (Ek et al. 2001; Hara et al. 2002). L'ensemble de ces études démontrent une altération de la biogenèse mitochondriale dans les muscles squelettiques de patients diabétiques de type 2.

3) Dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organites dynamiques. En effet, le maintien d'un réseau mitochondrial cellulaire fonctionnel est dépendant de la balance entre les cycles de fusion et fission. Ces cycles sont gouvernés par les perturbations métaboliques cellulaires et ils répondent aux fluctuations du statut énergétique de la cellule. La fusion de deux mitochondries pour n'en former qu'une passe d'abord par la fusion des membranes mitochondriales externes sous l'action des GTPases mitofusines (Mfn), Mfn1/2. Puis la protéine OPA1 (*optic atrophy 1*) permet la fusion des membranes mitochondriales internes. La fission correspond à la fragmentation et la séparation des mitochondries et elle est initiée par la protéine cytosolique soluble DRP1 (*dynamamin-related protein-1*) (Mishra et al. 2015).

Plusieurs études ont mis en évidence une dérégulation de la dynamique mitochondriale, attestée par une augmentation ou une diminution de la fusion et de la fission, dans le DT2. De façon intéressante, Bach *et al.* ont observé, en absence de différence dans la masse

mitochondriale, une diminution de 25% du réseau mitochondrial dans le muscle squelettique de rats obèses Zucker comparé aux rats contrôles. Cette étude indique un défaut de la dynamique mitochondriale, de fusion et/ou fission, bien distinct d'un défaut du nombre ou de la taille des mitochondries. L'expression protéique de Mfn2 dans le muscle squelettique humain est positivement corrélée avec la sensibilité à l'insuline (Bach et al. 2005) et le contenu en protéines de fusion Mfn2 et OPA1 est diminué dans le muscle squelettique de patients diabétiques de type 2 (Joseph et al. 2012; Zorzano et al. 2010). Par ailleurs, dans le muscle squelettique de rongeurs en HFD, une augmentation d'un facteur quatre de l'expression de DRP1 a été observée (Leduc-Gaudet et al. 2018). A l'inverse, l'inhibition de la fission mitochondriale, par l'inhibition de DRP1, améliore *in vitro* la signalisation à l'insuline dans le muscle et *in vivo* la sensibilité à l'insuline systémique de souris obèses (Jheng et al., 2012). L'insulinorésistance musculaire semble alors être associée à une diminution de la fusion et à une augmentation de la fission des mitochondries.

4) Mitophagie

La mitophagie est un processus de protection de la cellule qui permet la dégradation des mitochondries défectueuses ou anormales et le recyclage de leurs composants essentiels. La mitophagie est d'autant plus importante que la fusion d'une mitochondrie défectueuse avec une mitochondrie saine entraînerait une propagation du défaut mitochondrial. La mitophagie, en fragmentant les mitochondries, permet leur encapsulation et leur dégradation dans des autophagosomes (Youle et Narendra 2011). Les acteurs principaux et indispensables de la mitophagie sont la protéine kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) et l'ubiquitine ligase E3 parkine. Lorsqu'une mitochondrie est défectueuse, elle subit une dépolarisation qui interrompt l'activité protéolytique de PINK1. PINK1 s'accumule alors dans la mitochondrie et phosphoryle ses cibles dont la parkine. La parkine ubiquitine la membrane mitochondriale externe et induit le recrutement de p62. p62 étant liée à la protéine autophagosomale LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), elle rapproche l'autophagosome de la mitochondrie permettant ainsi la mitophagie (Rovira-Llopis et al. 2017).

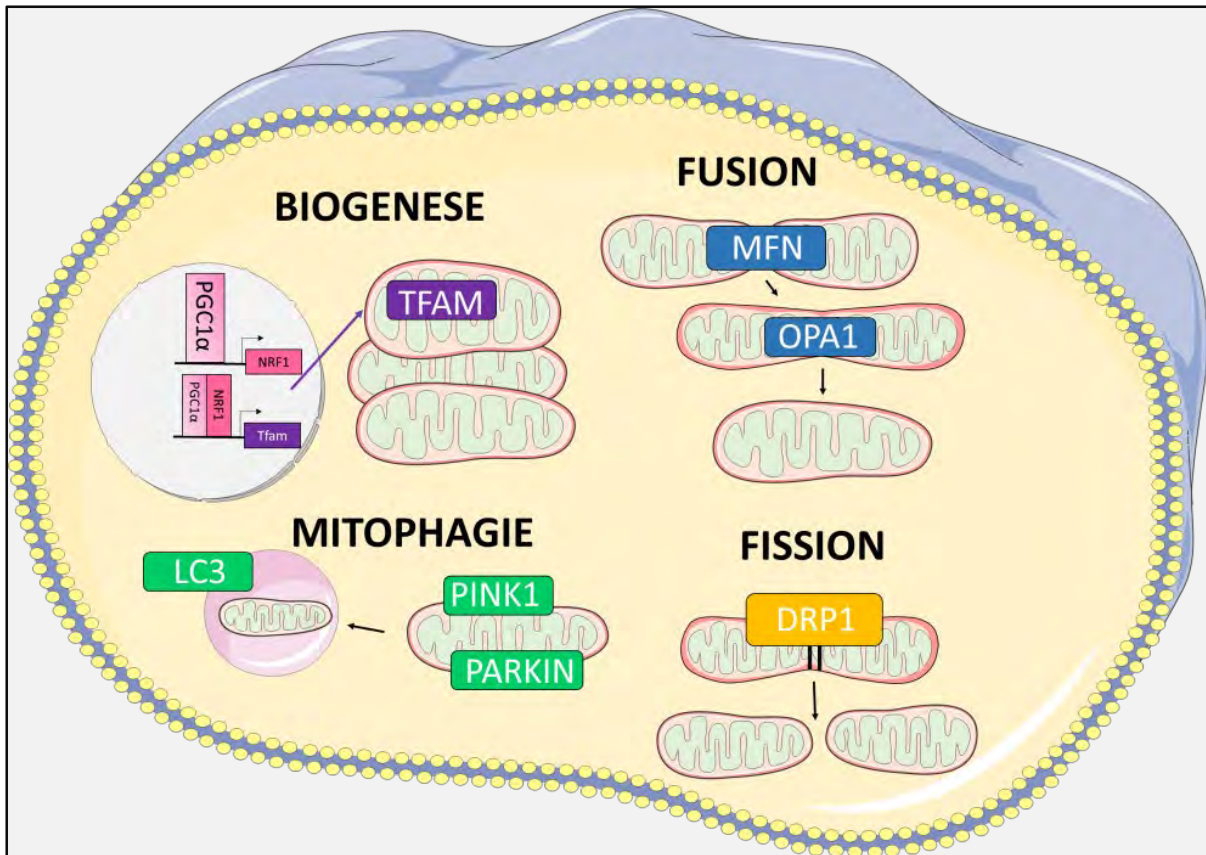


Figure 17 : Représentation de la biogenèse, de la fusion et de la fission mitochondriale et de la mitophagie.

5) Typologie des fibres musculaires

Le muscle squelettique est un tissu hétérogène composé de différents types de fibres définies selon l'expression des isoformes de chaînes de myosines (MHC). Il y a les fibres de type I, les fibres de type IIa, les fibres de type IIb et les fibres de type IIx. Leurs différences sont présentées dans le tableau 1. Les fibres de type I sont dites oxydatives. De couleur rouge, elles ont un contenu mitochondrial et une sensibilité à l'insuline importants. Au contraire les fibres de type IIb sont dites glycolytiques. De couleur blanche, elles contiennent moins de mitochondries mais ont un contenu en glycogène plus important. Les fibres de type IIa ont des propriétés intermédiaires entre les fibres de type I et IIb. La composition des muscles squelettiques peut changer au cours de la vie adulte pour s'adapter à différents besoins physiologiques, c'est la plasticité musculaire.

	Type I	Type IIa	Type IIb/IIx
Vitesse et durée de contraction	Lente et longue	Intermédiaire	Très rapide et brève
Contenu en mitochondries	+++	++	+
Diamètre	+	++	+++
Contenu en glycogène	+	++	+++
Contenu en lipides	+++	++	+
Capacité oxydative	+++	++	+
Capacité glycolytique	+	++	+++
Sensibilité à l'insuline	+++	++	+
Quantité de GLUT4 à la membrane	+++	++	+
Production de ROS	+	++	+++

Tableau 1. Principales caractéristiques des différents types de fibres musculaires.

Chez le rongeur et l'Homme, l'absorption de glucose induite par l'insuline est plus élevée dans les muscles contenant une majorité de fibres de type I que dans les muscles principalement composés de fibres glycolytiques de type IIb (Gaster et al. 2001, 4; James, Jenkins, et Kraegen 1985). En effet, les muscles rouges contiennent plus de GLUT4 à leur membrane plasmique que les muscles blancs, à la fois en condition basale et stimulée à l'insuline (Marette et al. 1992). La liaison de l'insuline à son récepteur et le transport de glucose sont plus élevés dans les muscles rouges (*soleus*) que les muscles blancs (*plantaris* et *EDL (extensor digitorum longus)*) (Bonen, Tan, et Watson-Wright 1981). Par clamp euglycémique, une corrélation positive et négative relie l'action de l'insuline avec le pourcentage de fibre I et de fibres IIb respectivement (Lillioja et al. 1987). Chez l'Homme, il a été montré que les muscles de patients diabétiques de type 2 contiennent moins de fibres de type I et plus de fibres mixtes de type IIa or la proportion des fibres de type I corrèle avec le niveau de résistance à l'insuline (Stuart et al. 2013). La fraction de fibres oxydatives est diminuée de 16% tandis que la fraction de fibres glycolytiques est augmentée de 49% dans le muscle squelettique de patients diabétiques (Oberbach et al. 2006). He *et al.* dans leur étude

n'ont pas montré de différence de composition de fibres dans les muscles squelettiques de patients diabétiques comparés à des patients insulinosensibles. Cependant, dans chaque type de fibres musculaires de patients diabétiques l'activité enzymatique oxydative est plus faible et l'activité enzymatique glycolytique est inchangée. Ceci induit un ratio enzymes glycolytiques/enzymes oxydatives plus élevé avec le DT2 (He, Watkins, et Kelley 2001). Aussi, les fibres de type IIb ont des propriétés qui potentialisent la production mitochondriale de ROS. La fuite mitochondriale de radical libre (H_2O_2 produit/ O_2 consommé) est deux à trois fois supérieure dans le *gastrocnémien* blanc majoritairement composés de fibres de type IIb par rapport au *soleus* majoritairement composés de fibres type I, malgré un contenu mitochondrial plus faible. Normalisé au contenu mitochondrial, la capacité de production de H_2O_2 est plus élevée dans les fibres blanches que dans les fibres rouges alors que l'activité GPx, responsable de l'élimination de H_2O_2 dans la mitochondrie, est identique dans les différents types de fibres (Anderson et Neuffer 2006). Le *soleus* a des niveaux d'émission de H_2O_2 équivalents à 20% de ceux de l'EDL (Pinho et al. 2017). La proportion des différents types de fibres musculaires est alors importante pour le contrôle de la sensibilité à l'insuline.

6) Lien causal d'une altération mitochondriale dans l'insulinorésistance ?

Dans le muscle des patients diabétiques de type 2, l'altération de la fonction mitochondriale est belle et bien présente, cependant il n'est pas clair si la dysfonction mitochondriale est suffisante *per se* pour induire une insulinorésistance. Un ensemble d'études, semblent réfuter ce lien de causalité.

La délétion de PGC1 α , totale ou spécifique dans le muscle squelettique chez la souris, induit une diminution du nombre de mitochondries et de la capacité respiratoire dans les muscles squelettiques, mais elle n'est pas accompagnée d'une résistance à l'insuline (Handschin et al. 2007; Leone et al. 2005). D'autre part, les souris déficientes spécifiquement dans le muscle squelettique pour TFAM, un facteur de transcription impliqué dans la biogenèse mitochondriale, ne sont pas résistantes à l'insuline malgré une altération sévère de la chaîne respiratoire (Wredenberg et al. 2006). D'après ces résultats, on ne peut pas dire qu'un rôle causal existe entre, un déficit de la biogenèse mitochondriale ou une altération de la chaîne respiratoire, et le développement d'une insulinorésistance. De façon très surprenante, des études ont même montré une augmentation de la biogenèse mitochondriale chez des modèles murins insulinorésistants. En effet, des rats nourris en HFD présentent une

insulinorésistance musculaire concomitante à une augmentation du nombre de mitochondries, attestée par une augmentation de l'expression de PGC1 α (Hancock et al. 2008). Aussi, une étude a montré que chez la souris soumise à un HFD, l'accumulation intramusculaire de lipides et l'insulinorésistance induite ne sont pas dues à une diminution de la capacité oxydative mitochondriale, mais sont au contraire accompagnées par une augmentation des capacités oxydatives (Turner et al. 2007). Les auteurs suggèrent que l'élévation de la quantité d'AG induit une activation de PPAR δ (*peroxisome proliferator-activated receptor δ*) qui engendre l'activation post-transcriptionnelle de PGC1 α , ce qui stimulerait la biogénèse mitochondriale.

IV- Le système ANP/GC-A dans le diabète de type 2

1) Altérations du système ANP/GC-A associées au diabète de type 2

A) Les niveaux plasmatiques d'ANP dans le diabète de type 2

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une altération des niveaux plasmatiques des PN chez des patients atteints de DT2. Et notamment une corrélation inverse entre les concentrations plasmatiques de BNP/pro-ANP et le DT2 (T. J. Wang et al. 2004). En effet, les niveaux plasmatiques de BNP et d'ANP sont respectivement 18% et 13% plus faibles chez les hommes insulinorésistants et respectivement 23% et 10% plus faibles chez les femmes insulinorésistantes par rapport à des individus insulinosensibles (T. J. Wang et al. 2007). Aussi, une étude récente a montré chez des patientes ayant développé un diabète gestationnel que les niveaux plasmatiques de NT-proBNP diminuent parallèlement à la tolérance au glucose (De Souza et al. 2018). Le syndrome métabolique est également associé à des niveaux plasmatiques de NT-proBNP et NT-proANP plus faibles (35pg/ml versus 48 pg/ml). En accord avec ces études, Wang *et al.* ont montré en 2004 que, chez des hommes atteints d'un syndrome métabolique, les niveaux de BNP et d'ANP sont respectivement 24% et 16% inférieurs à ceux d'individus sans syndrome métabolique. Chez la femme, la diminution observée en présence d'un syndrome métabolique est de 29% pour le BNP et de 18% pour l'ANP (T. J. Wang et al. 2004). D'autre part, dans l'étude *Dallas Heart Study*, les niveaux plasmatiques de NT-proBNP et BNP sont négativement associés à la quantité de graisse viscérale et de graisse hépatique mais positivement associés à une adiposité centrale faible,

indépendamment de l'âge, du sexe et du statut d'obésité (Neeland et al. 2013). A l'inverse, la perte de poids corporel suite à une chirurgie bariatrique est associée à une augmentation des niveaux plasmatiques de NT-proBNP (Chen-Tournoux et al. 2010).

De façon intéressante, des études ont également montré que les niveaux plasmatiques de PN prédisent le risque de développer un DT2 (Lazo et al. 2013; Magnusson et al. 2012) et notamment que des niveaux faibles de PN augmentent le risque d'apparition du DT2 et de l'obésité (Huth et al. 2020). Par exemple, l'étude *Malmö Diet and Cancer*, qui a réalisé un suivi pendant 16 ans de plus de 1800 individus non diabétiques, a montré que des niveaux plasmatiques faibles de MR-ANP (*mid-regional-ANP*) prédisent le développement d'un futur DT2. Dans la même cohorte, le variant rs5068 dans le gène *Nppa*, qui engendre une augmentation des niveaux plasmatiques d'ANP, est associé à une diminution de 12% du risque d'incidence du diabète (Jujic et al. 2014). D'autres études sur ce variant rs5068 ont montré qu'il est associé à un BMI, une circonférence de la taille et une prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique plus faibles (Cannone et al. 2013, 2013). L'étude longitudinale, *Atherosclerosis Risk in Communities*, réalisée sur plus de 7000 individus non diabétiques suivis pendant 12 ans, a montré que les individus ayant les niveaux les plus élevés de NT-proBNP (>114 pg/mL) développaient moins de DT2 que ceux ayant des niveaux faibles (<31 pg/mL) (Lazo et al. 2013). De plus le variant génétique rs198389 induisant une augmentation de 20% des niveaux plasmatiques de BNP est associé à 15% de risque en moins de développer un DT2 (Pfister et al. 2011). Aussi, il a été montré que des faibles niveaux plasmatiques de NT-proBNP sont prédictifs du risque de survenue d'une hypoglycémie sévère chez des patients diabétiques de type 2. En effet, les patients ayant subi une hypoglycémie sévère avaient des niveaux plasmatiques de NT-proBNP de 70pg/ml alors que les patients n'ayant pas vécu de phase d'hypoglycémie sévère avaient des niveaux plasmatiques de 270 pg/ml (Davis et al. 2019).

B) L'expression du GC-A et du NPRC dans le diabète de type 2

Le ratio de GC-A/NPRC détermine l'activité biologique des PN puisque le GC-A est le récepteur biologiquement actif alors que le NPRC est le récepteur de clairance. Plusieurs études mettent en évidence une diminution de ce ratio dans les tissus métaboliques de patients diabétiques de type 2 et/ou obèses.

Une corrélation positive existe entre l'expression protéique de GC-A et la sensibilité à l'insuline chez l'Homme (Kovacova et al. 2016). Alors que l'expression de GC-A est diminuée dans le muscle squelettique d'individus obèses, l'expression de NPRC est augmentée chez des individus intolérants au glucose ou diabétiques de type 2 (Coué et al. 2015). Aussi, l'expression de GC-A est diminuée et celle de NPRC est augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané d'individus diabétiques de type 2 par rapport à des individus tolérants au glucose (Kovacova et al. 2016). En accord avec ces données, il a été montré une diminution du ratio GC-A/NPRC dans le tissu adipeux et le muscle squelettique de souris db/db comparées à des souris sauvages (Coué et al. 2015).

Le ratio GC-A/NPRC est également altéré chez des individus obèses. Le ratio GC-A/NPRC dans le vWAT et le scWAT est négativement corrélé avec l'insulinémie, le BMI, le pourcentage de masse grasse et l'HOMA-IR (Dinas et al. 2018; Gentili et al. 2017). L'expression adipocytaire de l'ARNm de GC-A est négativement corrélée au pourcentage de masse grasse et au BMI chez des volontaires sains et par comparaison, elle est diminuée chez des patients obèses (Dinas et al. 2018). De même, l'expression de GC-A est diminuée dans le muscle squelettique, le WAT et le BAT de souris soumises à un HFD comparées à des souris en régime standard (Coué et al. 2015). Les souris ob/ob ont une diminution de l'expression de GC-A et une augmentation de l'expression de NPRC dans leur WAT, comparées à des souris minces (Nakatsuji et al. 2010). Les souris NPRC^{-/-} sont plus minces et ont une meilleure tolérance au glucose que les souris sauvages (W. Wu et al. 2017). A l'inverse, l'expression de NPRC est plus élevée dans le tissu adipeux d'individus obèses comparés à des individus normo-pondérés (Dessi-Fulgheri, Sarzani, et Rappelli 1998; Gentili et al. 2017).

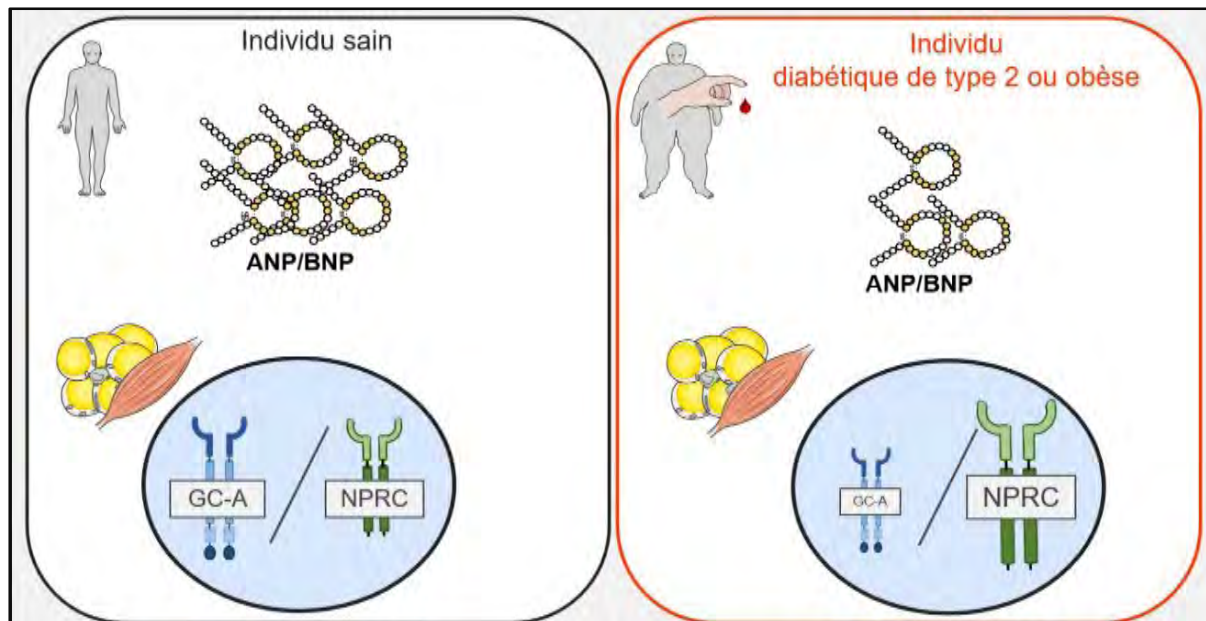



Figure 18 : Altération du système ANP/GC-A dans l'obésité et le diabète de type 2.

2) Rôles de l'ANP dans les fonctions musculaires


Chez l'homme, l'expression de GC-A corrèle positivement avec l'expression de PGC1 α dans les muscles squelettiques (Engeli et al. 2012). Un traitement chronique aux PN augmente les capacités oxydatives dans le muscle squelettique humain. En effet, Engeli *et al.* ont montré qu'un traitement de 48h avec de l'ANP ou du BNP sur des myotubes humains induit la transcription et l'expression protéique de PGC1 α et des protéines OXPHOS. Un traitement chronique à l'ANP et au BNP augmente également l'oxydation de palmitate et la respiration de myotubes humains (Engeli et al. 2012). Les niveaux plasmatiques de pro-ANP sont positivement associés à l'oxydation lipidique au cours d'un exercice chez des jeunes adultes en bonne santé (Thomsen et al. 2019).

Le rôle des PN dans le métabolisme oxydatif a été étudié en utilisant des modèles murins. Un prétraitement avec du BNP protège le muscle squelettique de l'ischémie-reperfusion en restaurant l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et en diminuant la production de ROS. En effet, l'ischémie-reperfusion dans la patte arrière de rats Wistar diminue la respiration mitochondriale par la diminution de l'activité des complexes OXPHOS, ce qui induit un stress oxydant dans le muscle squelettique. Cependant, lorsque les rats sont prétraités avec du BNP, ces effets musculaires délétères sont inhibés (Talha et al. 2013). En accord avec ces résultats, des souris transgéniques exprimant 100 fois plus de BNP plasmatique que des souris sauvages,

montrent une augmentation de l'oxydation lipidique et de la consommation d'oxygène musculaire. Ceci s'explique par une augmentation des capacités oxydatives, qui est attestée par une élévation de l'expression de PGC1 α , de CPT1b (*carnitine palmitoyltransferase 1B*), de l'ATP synthase et du nombre de copie d'ADNmt dans leurs muscles squelettiques (Miyashita et al. 2009). A l'inverse, des souris déficientes pour le NPRC (NPRC KO) présentent une augmentation des capacités oxydatives dans le muscle squelettique avec une augmentation du transport de glucose. De façon intéressante, il a également été montré une augmentation de l'expression de *Myh7*, un gène retrouvé dans les fibres de type I, dans le *gastrocnémien* des souris NPRC KO comparées aux souris WT. Cela suggère que l'amélioration des capacités oxydatives dans le muscle squelettique des souris NPRC KO peut-être due à une augmentation du nombre de fibres de type I qui sont plus insulinosensibles et qui ont une meilleure capacité oxydative que les fibres glycolytiques (Ishikawa et al. 2019). Par ailleurs, la muscline est une myokine ayant une forte homologie avec l'ANP. Par compétition d'élimination, elle diminue la liaison de l'ANP sur le NPRC, ce qui augmente la signalisation de l'ANP. Les souris déficientes pour la muscline (Ostn-KO) ont des niveaux plasmatiques d'ANP ainsi qu'une concentration intramusculaire en GMPc augmentés comparées à des souris WT. Il a également été montré chez ces souris Osnt-KO, une diminution des capacités d'endurance qui est associée à une diminution de l'expression des complexes OXPHOS, une diminution du contenu musculaire en mitochondries et de l'activité de la respiration mitochondriale ainsi qu'une augmentation de fibres de type IIb dans le *gastrocnémien*. *In vitro* les auteurs ont montré que l'ANP induit une augmentation de l'expression de PGC1 α et de ces cibles liés à la biogénèse mitochondriale TFAM, NRF1 et NRF2 et concluent donc que les effets de la muscline passent par la voie ANP/GMPc (Subbotina et al. 2015).



La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques contre le développement du DT2 est d'un intérêt majeur étant donné la croissance rapide de cette pandémie. Au vu du déficit du système ANP/GC-A présent chez les patients diabétiques de type 2 et des effets de l'ANP dans les capacités oxydatives musculaires in vitro, un déficit du système ANP/GC-A pourrait jouer un rôle causal dans l'apparition du diabète de type 2. Cette question sera abordée dans la deuxième partie des résultats



OBJECTIFS

Depuis ces 20 dernières années, le rôle de l'ANP n'est plus étudié seulement dans les sphères cardiovasculaires et rénales mais il est également étudié dans les tissus métaboliques que sont les tissus adipeux et les muscles squelettiques. En effet, des études *in vitro* montrent que l'ANP a une activité lipolytique importante dans le tissu adipeux ainsi que la capacité d'induire une augmentation de l'activité thermogénique dans les adipocytes. Par ailleurs, d'autres études *in vitro* montrent que l'ANP induit une augmentation des capacités oxydatives musculaires. Des études épidémiologiques indiquent également qu'un déficit du système ANP/GC-A est présent chez des patients atteints de DT2 ou d'obésité. L'ensemble de ces études suggère un rôle des peptides natriurétiques dans le métabolisme énergétique. Le sujet de ma thèse a alors été de déterminer la relevance de ces études, *in vivo*.

Pour cela, nous avons eu comme objectifs de :

- 1- Etudier le rôle de l'ANP dans l'activation de la thermogénèse sans frisson *in vivo* chez la souris.**
- 2- Etudier le rôle causal d'un déficit du système ANP/GC-A dans le développement de l'insulinorésistance chez la souris.**

RESULTATS

PARTIE I : Rôle de l'ANP dans la thermogénèse sans frisson

Introduction

La pensée dogmatique est que l'activation thermogénique du BAT est principalement contrôlée par le système nerveux sympathique (noradrénaline/ β -AR). Cependant plusieurs études montrent que chez des souris déficientes pour ce système, l'induction du programme thermogénique dans les tissus adipeux, suite à une exposition au froid, persiste. Ceci suggère l'implication d'autres systèmes importants dans le contrôle de la thermogénèse sans frisson. Depuis les années 2000, l'ANP est connu pour être un puissant facteur lipolytique. De plus, il a été montré *in vitro* que l'ANP peut également induire un programme thermogénique dans des adipocytes blancs et bruns. **Cette première partie de thèse a donc consisté à déterminer si l'ANP participe au contrôle de la thermogénèse de non frisson *in vivo* chez la souris.** Pour répondre à cette question, nous avons soumis des souris déficientes pour l'ANP à une exposition au froid et nous avons analysé les mécanismes mis en place au cours de la thermogénèse sans frisson.

Article 1

Atrial natriuretic peptide orchestrates a coordinated physiological response to fuel non shivering thermogenesis

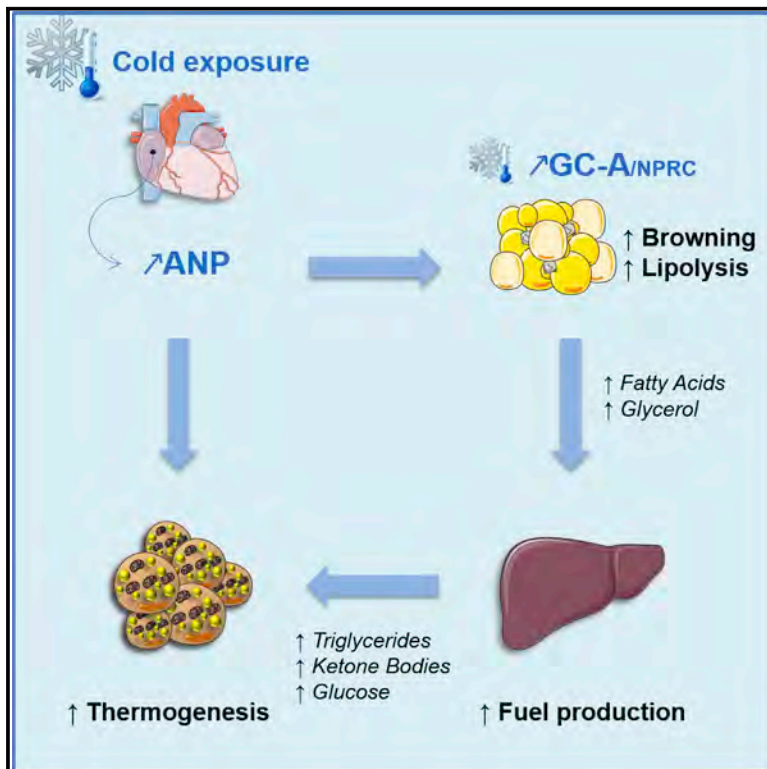
Deborah Carper, Marine Coue, Emmani Nascimento, Valentin Barquissau, Damien Lagarde, Carine Pestourie, Claire Laurens, Justine Vily Petit, Maud Soty, Laurent Monbrun, Marie-Adeline Marques, Yannick Jeanson, Yannis Sainte-Marie, Aline Mairal,, Sébastien Dejean, Geneviève Tavernier, Nathalie Viguerie, Virginie Bourlier, Frank Lezoualc'h, Audrey Carrière, Wim H.M. Saris, Arne Astrup, Louis Casteilla, Gilles Mithieux, Wouter van Marken Lichtenbelt, Dominique Langin, Patrick Schrauwen and Cedric Moro

Cell Reports, 32(8):108075, 25 Aug. 2020

doi: 10.1016/j.celrep.2020.108075

Atrial Natriuretic Peptide Orchestrates a Coordinated Physiological Response to Fuel Non-shivering Thermogenesis

Graphical Abstract



Authors

Deborah Carper, Marine Coué, Emmani B.M. Nascimento, ..., Dominique Langin, Patrick Schrauwen, Cedric Moro

Correspondence

cedric.moro@inserm.fr

In Brief

The classical view is that brown adipose tissue (BAT) is mainly activated by the sympathetic nervous system. Carper et al. here demonstrate that the cardiac hormone atrial natriuretic peptide is released upon cold exposure and required to activate BAT thermogenesis and white fat browning in mice and humans.

Highlights

- Cold exposure induces the ANP receptor GCA in BAT and WAT
- ANP substantially contributes to BAT thermogenesis during cold exposure
- WAT lipolysis and liver substrate production depend on ANP during cold exposure
- ANP increases thermogenesis in human BAT and WAT adipocytes



Article

Atrial Natriuretic Peptide Orchestrates a Coordinated Physiological Response to Fuel Non-shivering Thermogenesis

Deborah Carper,^{1,2} Marine Coué,^{1,2} Emmani B.M. Nascimento,³ Valentin Barquissau,^{1,2} Damien Lagarde,^{2,4} Carine Pestourie,⁵ Claire Laurens,^{1,2} Justine Vily Petit,⁶ Maud Soty,⁶ Laurent Monbrun,^{1,2} Marie-Adeline Marques,^{1,2} Yannick Jeanson,⁴ Yannis Sainte-Marie,^{1,2} Aline Mairal,^{1,2} Sébastien Déjean,⁷ Geneviève Tavernier,^{1,2} Nathalie Viguerie,^{1,2} Virginie Bourlier,^{1,2} Frank Lezoualc'h,^{1,2} Audrey Carrière,^{2,4} Wim H.M. Saris,³ Arne Astrup,⁸ Louis Casteilla,^{2,4} Gilles Mithieux,⁶ Wouter van Marken Lichtenbelt,³ Dominique Langin,^{1,2,9} Patrick Schrauwen,³ and Cedric Moro^{1,2,10,*}

¹INSERM, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

²University of Toulouse, UPS, Toulouse, France

³NUTRIM School for Nutrition and Translational Research in Metabolism, Maastricht University Medical Center, Maastricht, the Netherlands

⁴INSERM, UMR1031, STROMA Lab, CNRS, EFS, ENVY, INSERM U1031, ERL 5311, Toulouse, France

⁵CREFRE, University of Toulouse, INSERM UMS006, UPS, ENVY, Team Non Invasive Exploration, Toulouse, France

⁶INSERM U1213, Nutrition, Diabète et Cerveau, Lyon, France

⁷Toulouse Mathematics Institute, UMR 5219, CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France

⁸Department of Nutrition, Exercise and Sports, Faculty of Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

⁹Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

¹⁰Lead Contact

*Correspondence: cedric.moro@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108075>

SUMMARY

Atrial natriuretic peptide (ANP) is a cardiac hormone controlling blood volume and pressure in mammals. It is still unclear whether ANP controls cold-induced thermogenesis *in vivo*. Here, we show that acute cold exposure induces cardiac ANP secretion in mice and humans. Genetic inactivation of ANP promotes cold intolerance and suppresses half of cold-induced brown adipose tissue (BAT) activation in mice. While white adipocytes are resistant to ANP-mediated lipolysis at thermoneutral temperature in mice, cold exposure renders white adipocytes fully responsive to ANP to activate lipolysis and a thermogenic program, a physiological response that is dramatically suppressed in ANP null mice. ANP deficiency also blunts liver triglycerides and glycogen metabolism, thus impairing fuel availability for BAT thermogenesis. ANP directly increases mitochondrial uncoupling and thermogenic gene expression in human white and brown adipocytes. Together, these results indicate that ANP is a major physiological trigger of BAT thermogenesis upon cold exposure in mammals.

INTRODUCTION

Warm-blooded animals have acquired the ability to maintain a constant core body temperature in fluctuating temperature environments through an adaptive physiological process called thermogenesis. Brown adipose tissue (BAT) is considered the major site of non-shivering thermogenesis and heat production, which allows rodents to maintain eutheria at temperatures below thermoneutrality (Nedergaard and Cannon, 2010).

Thermogenic fat cells include brown and beige adipocytes, cells that play a critical role in defending against hypothermia, obesity, and diabetes through dissipating chemical energy as heat in part through mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) (Kajimura et al., 2015). Thermogenic genes can be readily induced in brown and beige adipocytes within white adipose tissue (WAT) in response to cold exposure (Cannon and Nedergaard, 2004; Harms and Seale, 2013; Wu et al., 2012). When activated, thermogenic adipocytes consume a large

amount of circulating triglycerides, glucose, and non-esterified fatty acid (NEFA) (Heine et al., 2018). The long-standing prevailing view is that cold sensation is primarily transmitted through the sympathetic nervous system. BAT and WAT are innervated by sympathetic fibers (Jiang et al., 2017), which, upon cold exposure, release norepinephrine to acutely activate thermogenesis and lipolysis. Norepinephrine activates β_3 -adrenergic receptors and cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase (PKA), which elicit a signaling cascade via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) co-activator 1 α (PGC1 α) to increase the transcription of UCP1 and thermogenic genes in brown adipocytes (Cao et al., 2004). In WAT, β_3 -adrenergic signaling activates adipocyte lipolysis through adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL). WAT lipolysis is essential to provide fatty acid (FA) fuels in the fasting state to sustain high respiration rates in BAT (Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017).



Yet, recent studies indicate that β_3 -adrenergic receptor is dispensable in brown and beige adipocyte for cold-induced transcriptional activation of thermogenic genes in mice (de Jong et al., 2017). Studies in mice lacking all three β -adrenergic receptors (so-called β -less mice) inferred the existence of non-adrenergic signaling pathways contributing to brown/beige adipocyte recruitment and activation (Bachman et al., 2002; Jiang et al., 2017). Studies over the past few years identified a variety of circulating factors and hormones that may control beige adipocyte development of which cardiac natriuretic peptides (NPs) are of particular interest. NPs control blood volume and pressure in mammals (Kuhn, 2016) and were shown to be potent lipolytic hormones in human WAT (hWAT) (Moro et al., 2004; Sengenès et al., 2000). Moreover, NPs induce the transcription of *PGC1 α* and *UCP1* via cGMP-dependent protein kinase (PKG) *in vitro* in human adipocytes (Bordicchia et al., 2012). Chronic B-type NP (BNP) infusion in mice induces *Pgc1 α* and *Ucp1* in BAT and inguinal WAT (iWAT) (Bordicchia et al., 2012). However, although NPs induce a transcriptional thermogenic program in adipocytes, it is unclear if they are necessary and required for physiological activation of brown/beige adipocytes during acute cold exposure. Here, we show that cardiac atrial NP (ANP) is a critical physiological endocrine regulator of non-shivering thermogenesis in mammals.

RESULTS

ANP Is Required for Non-shivering Thermogenesis during Acute Cold Exposure

[^{18}F]Fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography (^{18}F -FDG PET/CT) imaging indicate that acute cold exposure at 4°C for 5 h induces the recruitment of several BAT depots in the neck (anterior cervical) and clavicular areas (clavicular, axillary, supraspinal, interscapular, infrascapular, anterior subcutaneous, ventral spinal, and perirenal) in wild-type mice (Figures 1A and S1A). This is consistent with a recent study reporting similar recruitment of BAT depots in response to 7-day treatment with a β_3 -adrenergic agonist (Zhang et al., 2018). BAT activation upon cold exposure was associated with a 3- to 4-fold increase of cardiac *Nppa* (ANP) expression (Figure 1B) and a 2-fold increase of plasma ANP (Figure 1C), while no change in cardiac *Nppb* (BNP) expression (Figure 1D) and plasma BNP (Figure 1E) was observed. Thus, this demonstrates that ANP rather than BNP behaves as a physiological endocrine ligand of guanylyl cyclase A (GCA) in response to cold stress. Cold exposure increases blood pressure and cardiac filling pressure, which are the main physiological stimuli of cardiac ANP secretion (Yuan et al., 2009).

To delineate the role of ANP in non-shivering thermogenesis, we next challenged ANP null mice (*Nppa*^{-/-}) at 4°C. *Nppa*^{-/-} mice had no detectable cardiac *Nppa* expression (Figure S1B) and no functional compensation by either cardiac *Nppb* expression (Figure S1C) or plasma BNP (Figure S1D) upon cold exposure. ANP deficiency was associated with the development of cardiac hypertrophy, as shown by the increased heart weight to body weight ratio (Figure S1E) and left ventricular mass (Figure S1F). Since an intact cardiac function is required for functional non-shivering thermogenesis upon acute cold exposure

(Schreiber et al., 2017), we show here that cardiac hypertrophy in *Nppa*^{-/-} mice does not alter systolic function, since left ventricular ejection fraction remains comparable to wild-type littermates (*Nppa*^{+/+}) (Figure S1G). *Nppa*^{-/-} mice had normal rectal temperature at room temperature (RT; 21°C) (Figure 1F) and at thermoneutrality (30°C) (Figure 1H) compared with their wild-type littermates but became cold intolerant upon acute cold exposure (Figure 1G). Since BAT is the main site of non-shivering thermogenesis, we measured BAT activity and recruitment by ^{18}F -FDG PET/CT in *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice at RT and 4°C (Figure 1H). Acute cold remarkably increased BAT ^{18}F -FDG uptake and metabolic volume, while cold-induced BAT ^{18}F -FDG uptake (5.9 versus 12.7 fold, $p < 0.01$) (Figure 1I) and ^{18}F -FDG metabolic volume (Figure 1J) (4.8- versus 9.7-fold, $p < 0.05$) were both severely blunted in *Nppa*^{-/-} versus *Nppa*^{+/+} mice. This effect may be ascribed to the lack of ANP, since the expression level of genes involved in ANP signaling such as *Gca*, NP clearance receptor (*Nprc*), and cGMP-dependent protein kinase (*Prkg1*) was comparable in BAT of *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice (Figure S1I). Fractional ^{18}F -FDG uptake by the hindlimb muscle quadriceps was reduced in *Nppa*^{-/-} mice at 21°C and very low at 4°C (<1% of BAT) but remained unchanged between both genotypes (Figure 1K). Since β -adrenergic receptors (Bachman et al., 2002) (Figures S1J, S1K, and S1L) and adenosine receptors (Gnad et al., 2014) (Figures S1M and S1N) have been linked to BAT thermogenesis, we measured their gene expression levels and did not find significant changes between genotypes. Altogether, ANP deficiency severely blunts physiological BAT activation and recruitment.

ANP Deficiency Induces BAT Morphological and Molecular Changes

Histological analysis of BAT morphology revealed the presence and accumulation of multiple and large lipid droplets in *Nppa*^{-/-} compared with *Nppa*^{+/+} mice after cold exposure (Figure 2A). The BAT morphology of *Nppa*^{-/-} mice at 4°C resembles the one observed at thermoneutral temperature (30°C) in both genotypes (Figure S2A), which is characteristic of a dysfunctional BAT. Since BAT is a highly vascularized tissue (Kajimura et al., 2015) and GCA activation can modulate angiogenesis in some vascular beds (Mallela et al., 2013), we next investigated BAT vascularization through lectin staining. No visual difference in BAT capillary density was observed between *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} (Figure S2B). Compared to what is observed after 4°C exposure, no visual difference in BAT morphology (Figure S2A) and expression levels of thermogenic genes (Figure S2C) were noted at RT between *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice. In contrast, cold-induced *Ucp1* (Figure 2B) and *Pgc1 α* (Figure 2C) gene expression was severely blunted in *Nppa*^{-/-} mice. We further confirmed a significant reduction of UCP1 protein content in interscapular BAT (iBAT) at 4°C in *Nppa*^{-/-} mice (Figure 2D). Consistent with an impaired cold-induced BAT activation, we observed a blunted cold-mediated response of two canonical PPAR-target genes (Mandard et al., 2004; de la Rosa Rodríguez and Kersten, 2017), carnitine palmitoyl transferase-1B (*Cpt1b*) (Figure 2E) and perilipin 2 (*Plin2*) (Figure 2F), in *Nppa*^{-/-} mice. Previous work has shown that PGC1 α , once induced by acute cold, co-activates PPAR γ , a crucial nuclear receptor

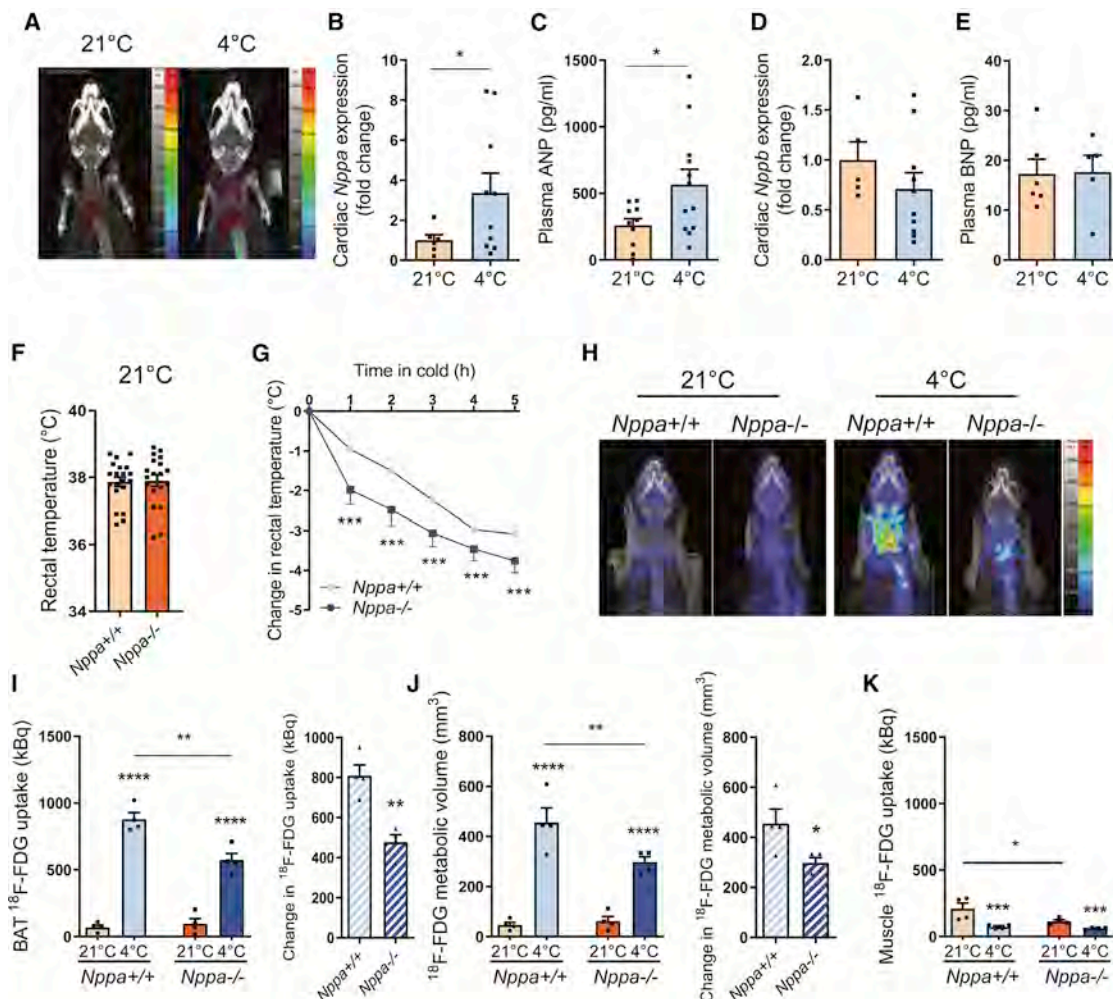


Figure 1. ANP Is Required for Non-shivering Thermogenesis during Acute Cold Exposure

(A) Representative ^{18}F -FDG PET/CT images of BAT recruitment around the neck in wild-type (WT) mice at room temperature (RT) (21°C) and exposed for 5 h to 4°C.

(B) Relative cardiac *Nppa* (ANP) expression in WT mice housed at RT (n = 6) and after acute cold exposure (5 h at 4°C) (n = 10).

(C) Plasma ANP levels in WT mice housed at RT (n = 10) and after acute cold exposure (n = 12).

(D) Relative cardiac *Nppb* (BNP) expression in WT mice housed at RT (n = 5) and after acute cold exposure (n = 10).

(E) Plasma BNP levels in WT mice housed at RT (n = 6) and after acute cold exposure (n = 5).

(F) Rectal temperature in *Nppa*^{+/+} (n = 19) and *Nppa*^{-/-} mice (n = 20) housed at RT.

(G) Change in rectal temperature from baseline in *Nppa*^{+/+} (n = 7) and *Nppa*^{-/-} (n = 5) mice during 5-h cold exposure.

(H) Representative ^{18}F -FDG PET/CT images of the neck/shoulder area indicating BAT activity in *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice at RT and during cold exposure.

(I) Quantitative scatterplot graph of BAT ^{18}F -FDG uptake and cold-induced BAT ^{18}F -FDG uptake of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice at RT and during cold exposure (n = 4).

(J) Quantitative scatterplot graph of BAT ^{18}F -FDG metabolic volume and cold-induced ^{18}F -FDG metabolic volume of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice at RT and during cold exposure (n = 4).

(K) Muscle ^{18}F -FDG uptake of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice at RT and during cold exposure (n = 4).

Results are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

orchestrating the transcriptional program for substrate oxidation and thermogenesis in BAT (Puigserver et al., 1998). Brown fat lipid accumulation in *Nppa*^{-/-} mice seems to occur independently of changes in NEFA transport through *Cd36* (Figure 2G) and lipoprotein lipase (*Lpl*) (Figure 2H) gene expression, which were similarly induced by cold exposure in both genotypes. In the same line, no change in protein content of the rate-limiting

enzymes ATGL (Figure 2I) and HSL (Figure 2J), as well as *de novo* lipogenesis genes such as carbohydrate responsive-element binding protein- β (*Chrebp* β), acetyl-coA carboxylase 1 (*Acc1*), and FA synthase (*Fas*) (Figures S2D–S2F) were noted in *Nppa*^{-/-} versus wild-type control. Reduced cold-induced BAT activation and glucose uptake were associated with a significant increase of cold-induced *Glut1* expression (Figure S2G), while no

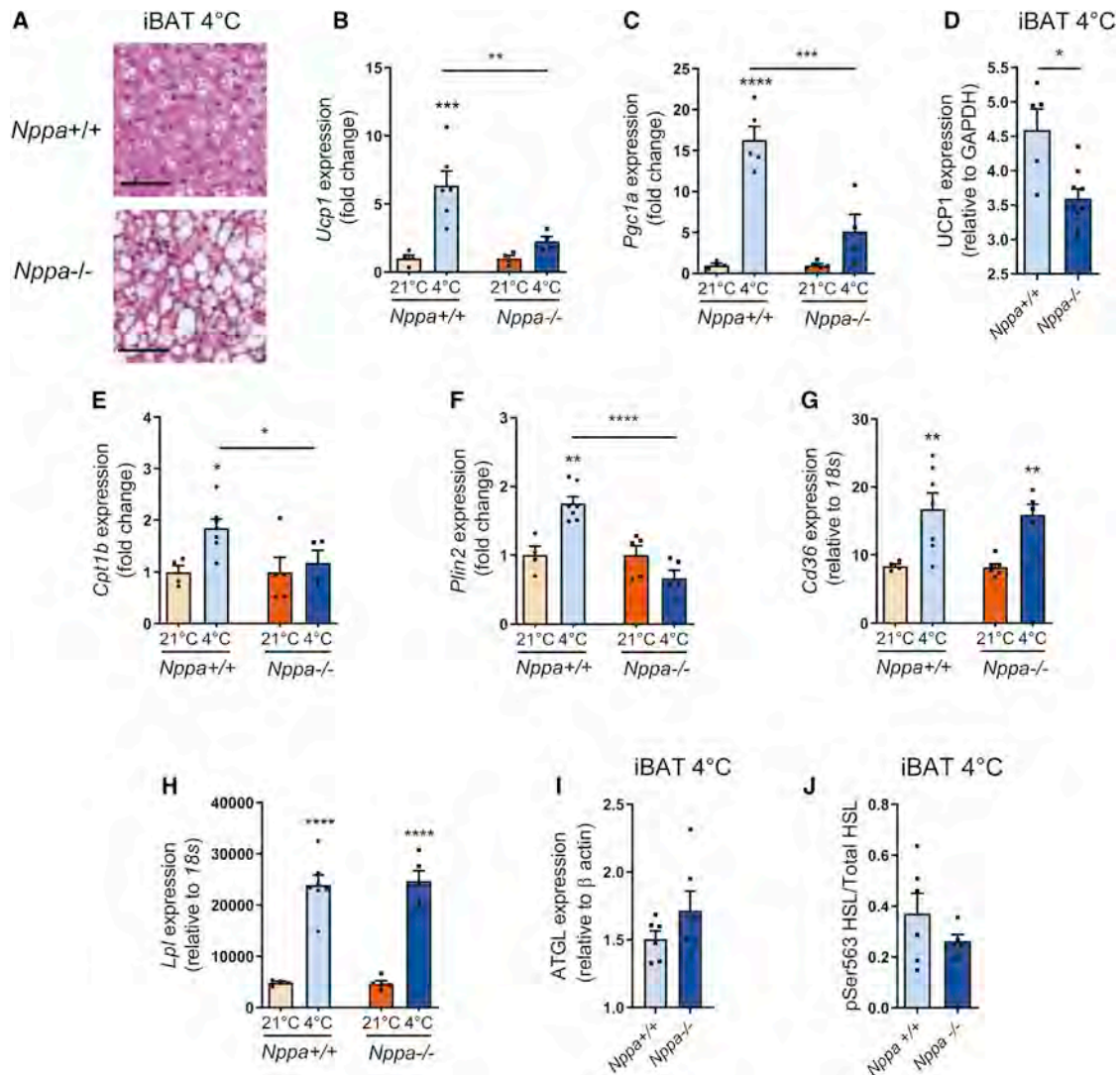


Figure 2. ANP Deficiency Induces BAT Morphological and Molecular Changes

(A) Representative hematoxylin and eosin staining of interscapular BAT (iBAT) sections of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure. Scale bar, 50 μ m. (B and C) Relative mRNA levels of *Ucp1* (B) and *Pgc1 α* (C) in iBAT from *Nppa*^{+/+} (n = 4) and *Nppa*^{-/-} (n = 6) mice housed at RT or after cold exposure. (D) Relative UCP1 protein content in iBAT of *Nppa*^{+/+} (n = 5) and *Nppa*^{-/-} (n = 9) mice after cold exposure. (E–H) Relative mRNA levels of *Cpt1b* (E), *Plin2* (F), *Cd36* (G), and *Lpl* (H) in iBAT from *Nppa*^{+/+} (n = 5) and *Nppa*^{-/-} (n = 7) mice housed at RT or after cold exposure. (I) Relative ATGL protein content in iBAT of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure (n = 6). (J) Relative pSer563 HSL protein content in iBAT of *Nppa*^{+/+} (n = 6) and *Nppa*^{-/-} (n = 5) mice after cold exposure. Results are shown as mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

change in *Glut4* (Figure S2H) was observed in *Nppa*^{-/-} mice. Of note, acute changes in *Glut1* mRNA were not associated with significant changes in total GLUT1 protein in BAT of cold-exposed mice (Figure S2I). Finally, all observed differences of cold-induced gene expression in *Nppa*^{-/-} mice appeared independent of changes in BAT mitochondrial respiration measured *ex vivo* in isolated mitochondria (Figure S2J).

Collectively, ANP deficiency causes marked morphological and cellular alterations of BAT biology and impairs cold-induced thermogenic genes activation which seems independent of changes in FA uptake and triglycerides (TG) hydrolysis.

ANP Is Required for Beige Adipocyte Recruitment during Acute Cold Exposure

Previous studies have shown that the ratio of GCA to NRPC expression determines cardiac NP biological activity in human and mice adipose tissue (AT) (Coué et al., 2015, 2018; Kovacova et al., 2016; Rydén et al., 2016). Thus, genetic ablation of adipose NRPC increases NP signaling through GCA in mice (Bordicchia et al., 2012). Here, we show that acute cold exposure induces WAT changes in NP receptor expression compared to mice housed at thermoneutral temperature in a depot-specific manner. Acute cold exposure upregulated the ratio of GCA to

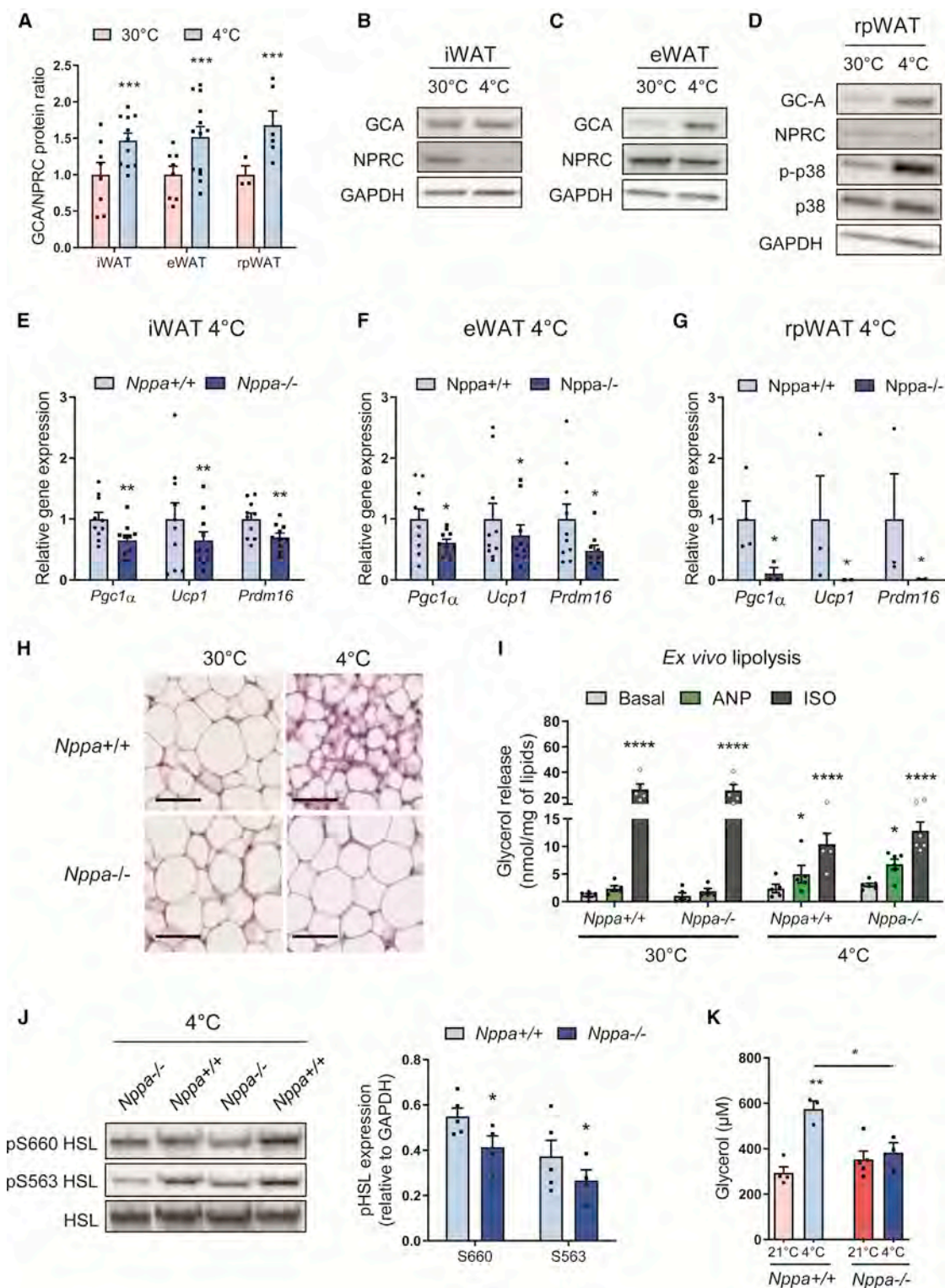


Figure 3. ANP Is Required for Beige Adipocyte Recruitment and Lipolysis during Acute Cold Exposure

(A) GCA-to-NPRC protein ratio in iWAT, eWAT, and rpWAT of WT mice housed at thermoneutral temperature (30°C) (n = 8) or after acute cold exposure (5 h at 4°C) (n = 13).

(B and C) Representative immunoblot of GC-A, NPRC and GAPDH in iWAT (B) and eWAT (C) of WT mice housed at 30°C or after acute cold exposure.

(D) Representative immunoblot of GC-A, NPRC, p-p38, p38, and GAPDH in rpWAT of WT mice housed at 30°C or after acute cold exposure.

(legend continued on next page)

NPRC mRNA (Figure S3A) and protein expression (Figure 3A) in the three WAT depots tested. As previously described (Bordicchia et al., 2012), we noted that NPRC protein was significantly diminished in iWAT (Figures 3B and S3B), while GCA protein remained unchanged (Figures 3B and S3C). Conversely, acute cold exposure upregulated GCA protein expression specifically in epididymal WAT (eWAT) (Figures 3C and S3C) and retroperitoneal WAT (rpWAT) (Figure 3D), while NPRC remained unaffected (Figures 3C, 3D, and S3B). Of interest, increased *Gca* gene expression was also observed in primary mouse adipocytes exposed to cold in culture (31°C) (Figure S3D), while *Nprc* remained unchanged (Figure S3E), demonstrating a cell-autonomous increase of the GCA-to-NPRC ratio in cold-exposed white adipocytes (Figure S3F). Cold-induced upregulation of GCA-to-NPRC ratio coincided with a sharp increase of p38 MAPK phosphorylation (Figure S3D) and robust induction of its downstream transcriptional targets, UCP1 and PGC1 α , in iWAT (Figure S3G), eWAT (Figure S3H), rpWAT (Figure S3I), and iBAT (Figure S3J). The induction of beige adipocytes in WAT, the so-called browning/beigeing process, is highly adipose depot dependent in mice (Frontini and Cinti, 2010; Ohno et al., 2012). iWAT and rpWAT undergo the most profound induction of UCP1 (>30-fold), whereas eWAT exhibits a weak response (<10-fold). Cold-induced transcriptional activation of thermogenic genes was suppressed by ~40% in iWAT (Figure 3E) and eWAT (Figure 3F) and severely impaired in rpWAT (Figure 3G) of ANP null mice compared to wild-type mice. The GCA-to-NPRC mRNA ratio was robustly induced in all WAT depots, with a more pronounced induction in rpWAT (~24-fold) compared to iWAT (~1.75-fold) and eWAT (~2.25-fold) upon cold exposure (Figure S3K). Moreover, rpWAT is sensitive to browning (Jankovic et al., 2015) and anatomically close to the kidneys, one main physiological site of action of ANP (Kuhn, 2016). Thus, our data show that ANP-induced thermogenic gene expression is WAT depot dependent, with rpWAT being the most responsive depot. Along with PGC1 α and UCP1, we observed a significant reduction of PR domain containing 16 (PRDM16) mRNA levels. The thermogenic activity of brown and beige adipocytes is conferred by a core gene program controlled by the master transcriptional regulator PRDM16 shown to physically interact with PGC1 α to transactivate UCP1 transcription (Seale et al., 2007). Consistent with cold-induced thermogenic gene expression, wild-type mice exposed to acute cold showed augmented iWAT thermogenic gene expression compared to mice housed at thermoneutrality, as evidenced by increased emergence of smaller adipocytes containing multilocular lipid droplets and hematoxylin and eosin (H&E) staining, a physiological response that was suppressed in ANP null mice (Figure 3H). Similarly to BAT, we did not find significant changes

in the level of expression of cold-regulated genes involved in the control of beige adipocyte thermogenesis such as $\beta 1ar$ (Figure S3L), $\beta 2ar$ (Figure S3M), $\beta 3ar$ (Figure S3N), and *Serca2b* (Ikeda et al., 2017) (Figure S3O). No major change in genes involved in NP signaling and thermogenesis was observed in iWAT (Figures S4A and S4B) and eWAT (Figures S4C and S4D) at 30°C and 21°C between genotypes. No visual histomorphological differences in iWAT, eWAT, and rpWAT were noted at thermoneutrality (Figure S4E) and RT (Figure S4F) between *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice. Overall, our data emphasize that upon a physiological cold stress, cardiac ANP released significantly contributes to thermogenic adipocytes activation in WAT.

ANP Is Required for White Adipocyte Lipolysis during Acute Cold Exposure

Since acute exposure to 4°C upregulates the ratio of GCA to NPRC protein in WAT, we hypothesized that white adipocytes would become sensitive to ANP-induced lipolysis in cold conditions. Former studies indicated that murine adipocytes are resistant to the lipolytic effect of ANP (Sengenès et al., 2002), while genetic ablation of NPRC in mice restores a lipolytic effect of ANP (Bordicchia et al., 2012). Here, we demonstrate that acute cold exposure renders white adipocytes fully responsive to ANP-mediated lipolysis, whereas in mice housed at thermoneutral temperature, ANP shows no lipolytic effect as previously observed. Acute cold exposure increased ANP-mediated glycerol (Figure 3I) and NEFA (Figure S4G) release by 2- to 3-fold compared to basal conditions in adipocytes isolated from eWAT, while the effect of isoproterenol remained unchanged compared to thermoneutral temperature. The cold-mediated *ex vivo* WAT lipolytic capacity was comparable between wild-type and ANP null mice (Figure 3I). This is in agreement with the lack of change of GCA (Figure S4H) and NPRC (Figure S4I) protein expression in eWAT of ANP null versus wild-type mice, indicating no functional compensation. However, cold-exposed ANP null mice had a significant downregulation of HSL phosphorylation at Ser-660 and Ser-563 in eWAT (Figure 3J), two main activating sites targeted by both PKA and PKG in response to catecholamines and ANP stimulation (Sengenès et al., 2003). This suggests that the lack of ANP *in vivo* associates with a lower cold-induced activation of HSL in eWAT of ANP null mice. This translated into a severely defective cold-induced lipolysis in ANP knockout (KO) mice as reflected by the changes in plasma glycerol (Figure 3K) and NEFA (data not shown) concentrations between thermoneutral temperature and acute cold. Recent studies challenged the established view that intracellular lipolysis of lipid droplets inside BAT is rate limiting for non-shivering thermogenesis. Rather, these studies showed that WAT lipolysis

(E–G) Relative mRNA levels of *Pgc1a*, *Ucp1*, and *Prdm16* in iWAT (n = 10) (E), eWAT (n = 10) (F), and rpWAT (n = 3–5) (G) from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after acute cold exposure.

(H) Representative hematoxylin and eosin staining of iWAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C or after cold exposure. Scale bar, 50 μ m.

(I) *Ex vivo* adipocyte lipolysis in eWAT of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C or after acute cold exposure under basal, ANP (10 μ M)-stimulated, and isoproterenol (1 μ M)-stimulated conditions (n = 5).

(J) Representative immunoblot and quantitative bar graph of pS660 HSL, pS563 HSL, and HSL total protein in eWAT of *Nppa*^{+/+} (n = 5) and *Nppa*^{-/-} (n = 4) mice after cold exposure.

(K) Plasma glycerol levels of *Nppa*^{+/+} (n = 5) and *Nppa*^{-/-} (n = 3) mice housed at 30°C and after acute cold exposure.

Results are shown as mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

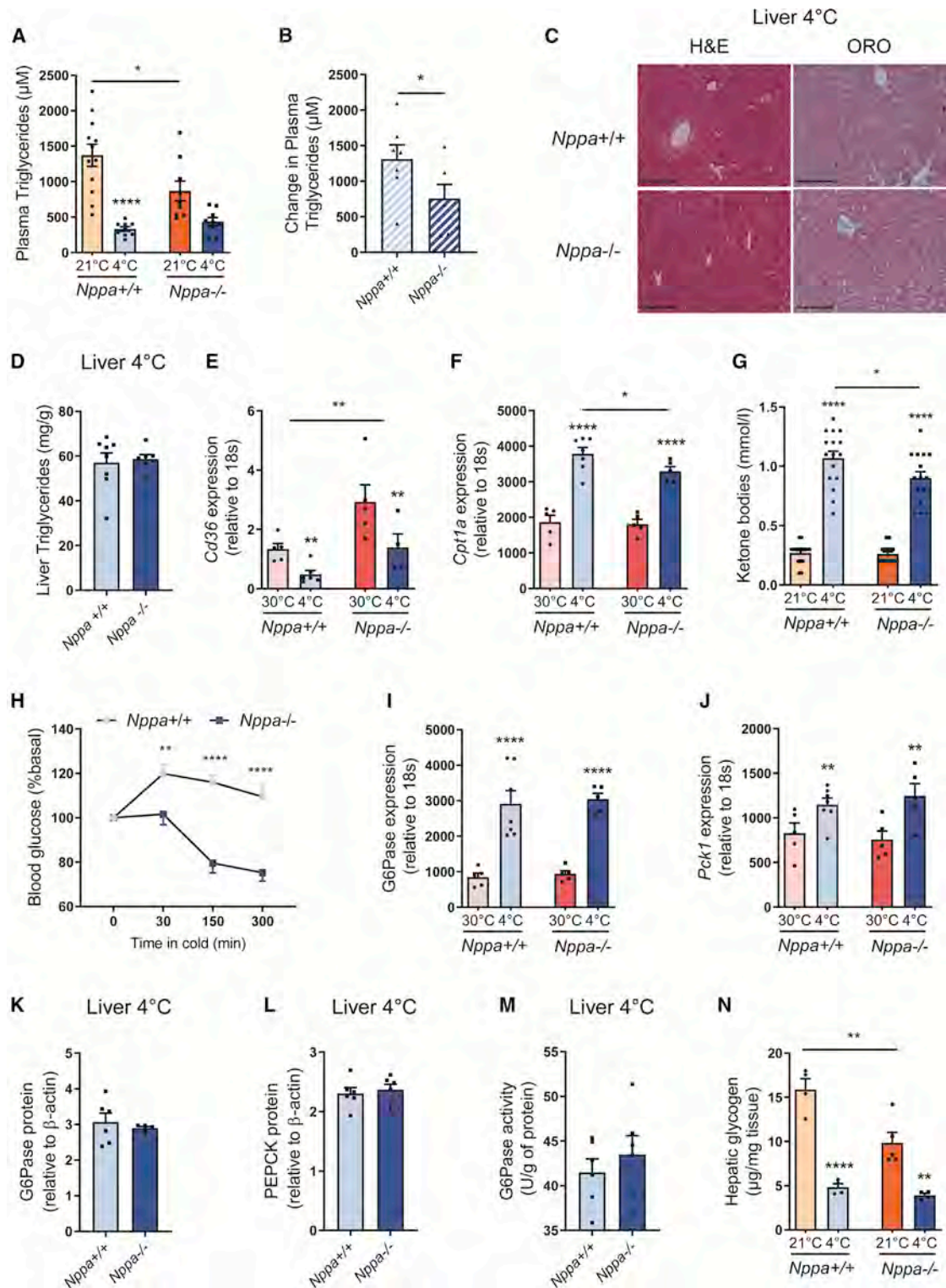


Figure 4. ANP Deficiency Impairs Plasma Triglycerides and Glucose Responses to Cold

(A) Plasma triglycerides levels of *Nppa*^{+/+} (n = 12) and *Nppa*^{-/-} (n = 9) mice housed at RT and after acute cold exposure.

(B) Change in plasma triglycerides levels of *Nppa*^{+/+} (n = 7) and *Nppa*^{-/-} (n = 6) mice housed at RT after acute cold exposure.

(C) Representative hematoxylin and eosin and oil red O (ORO) staining of liver from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure. Scale bar, 200 μm .

(D) Liver triglycerides content of *Nppa*^{+/+} (n = 8) and *Nppa*^{-/-} (n = 7) mice after acute cold exposure.

(legend continued on next page)

is essential to fuel BAT with FA for heat production during fasting (Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017). Together, this suggests that the blunted cold-induced lipolytic response could contribute to the observed defective BAT activity and thermogenesis of ANP null mice. Altogether, our data stress that physiological release of ANP during cold exposure induces lipolysis to fuel BAT thermogenesis.

ANP Deficiency Impairs Plasma Triglycerides and Glucose Responses to Cold

Previous work suggested that besides NEFA, circulating TG and glucose are major substrates for BAT thermogenesis (Heine et al., 2018). In this study, we found reduced blood glucose levels upon cold exposure after 2 h (Figure S5A) while observing a time-dependent reduction of circulating insulin (Figure S5B) and circulating TG levels (Figure S5C) during a time course of cold exposure. We further observed decreased levels of circulating TG (Figure 4A) and a blunted cold-induced reduction of circulating plasma TG in *Nppa*^{-/-} mice (Figure 4B). This occurred despite no significant difference in liver TG content between genotypes (Figures 4C and 4D). Lipolysis-derived NEFA availability is a major determinant of liver TG production (Samuel and Shulman, 2016). In line with a recent study (Simcox et al., 2017), hepatic genes related to lipid metabolism were strongly altered during cold exposure (Figures 4E, 4F, and S5D–S5G). Cold suppressed *Cd36* (Figure 4E) and *Pparα* (Figure S5D) mRNA levels while briskly inducing *Ppargc1a* (Figure S5E), *Atgl* (Figure S5F), and *Fgf21* (Figure S5G). Of interest, altered lipolysis in ANP-deficient mice was associated with a compensatory increase of liver *Cd36* gene expression (Figure 4E), while both liver *Cpt1a* mRNA levels (Figure 4F) and plasma ketone bodies levels (Figure 4G) were significantly reduced in *Nppa*^{-/-} mice. This reveals a blunted NEFA utilization in the liver of ANP-deficient mice. In mirror of cold-induced NEFA utilization in liver, we observed a suppressed expression of *de novo* lipogenesis genes such as *Chrebp* (Figure S5H), *Acly* (Figure S5I), *Elovl3* (Figure S5J), and *Fas* (Figure S5K) that was similar in control and ANP-deficient mice.

Because lipolysis-derived NEFA availability is also a strong determinant of endogenous glucose production in mice (Perry et al., 2015), we investigated glucose metabolism in cold-exposed mice. Remarkably, ANP null mice were not able to maintain their blood glucose levels in a normal physiological range (Figure 4H). This phenomenon was independent of changes in glucose-6-phosphatase (*G6pase*) (Figure 4I) and phosphoenolpyruvate carboxy-kinase-1 (*Pck1*) (Figure 4J) mRNA levels, protein content (Figures 4K and 4L), and G6Pase activity (Figure 4M) in liver of ANP KO mice versus control. Importantly, we observed a sharp liver glycogen depletion upon acute

cold exposure (~70%) in control mice (Figure 4N). Thus, total liver glycogen content was reduced by 38% in *Nppa*^{-/-} mice compared to their wild-type littermates (Figure 4N), thus coinciding with the inability to maintain normal blood glucose levels during cold exposure. In summary, our data together indicate that ANP deficiency impairs liver TG and glycogen metabolism, thus contributing to reduced substrate availability to fuel BAT thermogenesis.

Cold Induces ANP and GC-A Is Associated with Brown/Beige Thermogenic Markers in Human Subcutaneous Abdominal WAT in Humans

To further examine if ANP could play a role in cold-induced activation of BAT in humans, we determined circulating plasma NP levels in human volunteers exposed to mild cold. Thus, recent studies using ¹⁸F-FDG PET/CT revealed that acute cold exposure readily activates BAT in humans (Blondin et al., 2017; van Marken Lichtenbelt et al., 2009); however, the physiological cues orchestrating human BAT (hBAT) activation are still unclear. In a study in which 1-h cold exposure at 16°C increased mean blood pressure, BAT activity, and systemic lipolysis in lean healthy male volunteers (Figure 5A) (Vosselman et al., 2015), we measured a significant increase of plasma ANP levels by 1.7-fold (Figure 5B), whereas plasma BNP concentrations remained strictly unchanged (Figure 5C). In light of the previous findings in human primary BAT-derived adipocytes, this suggests that ANP is a cold-induced endocrine activator of BAT function in humans. Thus, in agreement with mice data, this implies that ANP behaves as the physiological endocrine ligand of GCA in response to cold stress in humans.

There is a large variability of white fat browning/beigeing in human individuals, particularly those with obesity (Coué et al., 2018). We next investigated the relationship between mRNA levels of GCA and markers of browning/beigeing in subcutaneous abdominal AT in a cohort of middle-aged individuals with a wide range of body mass index selected for a high baseline expression of UCP1 (n = 79). Correlation matrix analysis revealed that GCA was highly correlated with previously reported brown/beige-specific markers involved in mitochondrial oxidative metabolism, mitochondrial biogenesis, glucose, and FA metabolism (Coué et al., 2018) (Figure 5D). An optimal reordering of the correlation matrix based on hierarchical clustering revealed that GCA clustered with several brown/beige-specific gene markers such as *PPARα*, sirtuin 3 (*SIRT3*), carbonic anhydrase 4 (*CA4*), forkhead box K2 (*FOXK2*), and *PPARγ* co-activator 1β (*PPARGC1B*) (dotted line box, Figure 5D). The top-ranking genes displaying the highest correlations with GCA were the beige-specific marker *CA4* (Figure 5E), the lipid droplet-associated protein perilipin 5 (*PLIN5*) (Figure 5F), the transcription factor

(E and F) Relative mRNA levels of *Cd36* (E) and *Cpt1a* (F) in iBAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C or after cold exposure (n = 5).

(G) Plasma ketone bodies levels of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at RT and after acute cold exposure (n = 16).

(H) Change in blood glucose from baseline in *Nppa*^{+/+} (n = 13) and *Nppa*^{-/-} (n = 10) mice during 5-h cold exposure.

(I and J) Relative mRNA levels of *G6pase* (I) and *Pck1* (J) in liver from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C (n = 5) or after cold exposure (n = 7).

(K and L) Relative *G6pase* (K) and *PEPCK* (L) protein content in liver of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure (n = 6).

(M) *G6pase* activity in liver of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure (n = 6).

(N) Hepatic glycogen content in liver of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at RT (n = 5) or after cold exposure (n = 4).

Results are shown as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, and ****p < 0.0001.

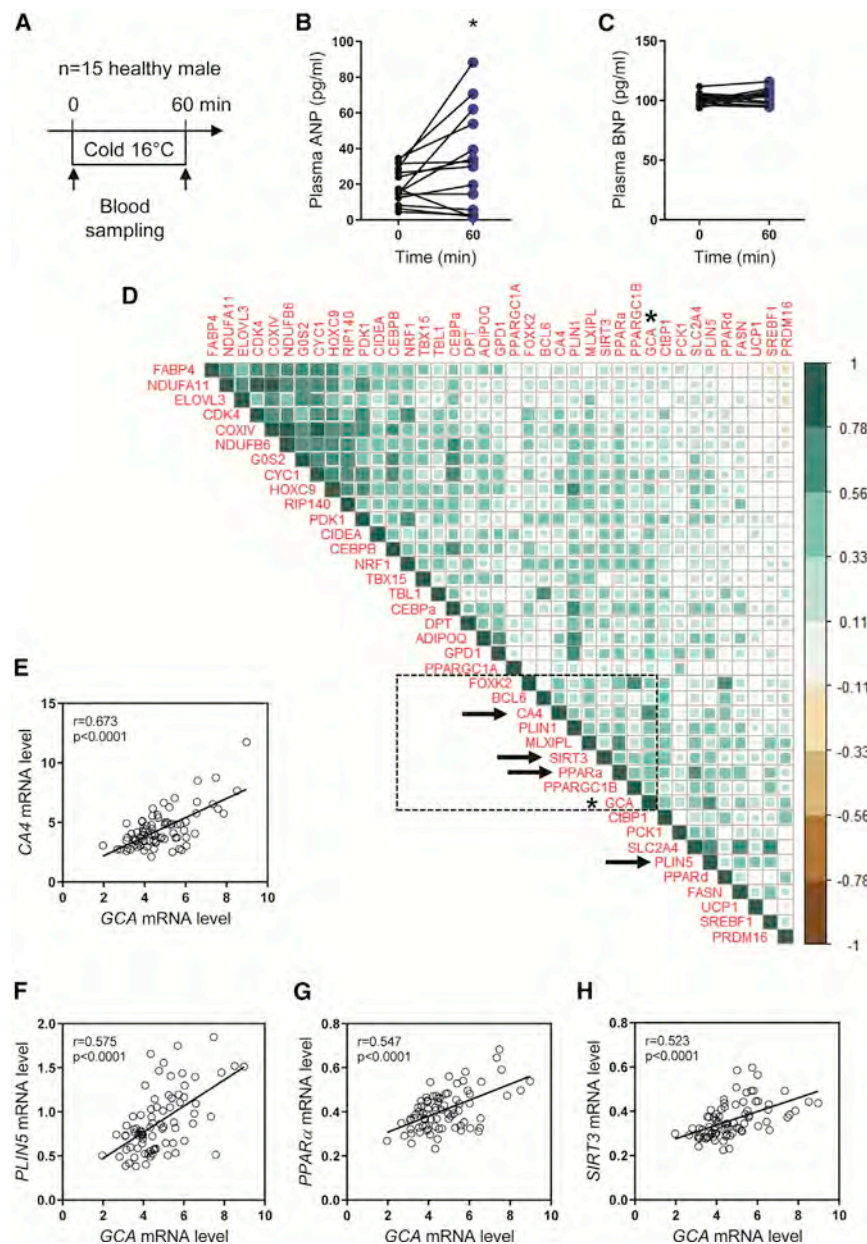


Figure 5. GC-A Is Associated with Brown/Beige and Thermogenic Markers in Human Subcutaneous Abdominal WAT

(A) Study design of acute cold exposure in human healthy volunteers.

(B) Plasma ANP levels in human healthy volunteers before and after 60-min cold exposure ($n = 14$).

(C) Plasma BNP levels in human healthy volunteers before and after 60-min cold exposure ($n = 15$).

(D) Correlation matrix of the 39 brown/beige-specific gene markers significantly correlated with GCA. Color intensity and spread are directly proportional to correlation coefficients as shown by the vertical scale. The dot line boxplot indicates a gene cluster containing GCA (indicated by an asterisk).

(E–H) Univariate linear regression between GCA mRNA level and *CA4* (E), *PLIN5* (F), *PPAR α* (G), and *SIRT3* (H) mRNA levels in human WAT ($n = 79$).

* $p < 0.05$ versus time point 0.

van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Nedergaard et al., 2007; Virtanen et al., 2009). It was suggested that these hBAT depots are in fact composed of UCP1-positive adipocytes bearing a transcriptional signature of beige rather than brown adipocytes as found in rodents (Wu et al., 2012).

Here, we differentiated adipocytes derived from hBAT (prevertebral) or hWAT (neck) *in vitro* from the same subject using four independent donors as previously described (Broeders et al., 2015; Wu et al., 2012). mRNA expression levels of *UCP1*, *PRDM16*, cell-death-inducing DFFA-like effector A (*CIDEA*), and nuclear respiratory factor 1 (*NRF1*) were significantly higher in brown/beige compared to white adipocytes (Figure S6A). Thus, we also observed a higher gene expression level of the NP-signaling components *NPRC*, *PRKGI*, and phosphodiesterase 5A (*PDE5A*) in BAT biopsy-derived adipocytes (Figure S6B).

PPAR α (Figure 5G), and the brown-specific mitochondrial *SIRT3* (Figure 5H), all genes highly expressed in BAT and involved in metabolic pathways supporting thermogenic function (Coué et al., 2018). Thus, correlations between GCA and brown/beige-specific markers support a role for ANP/GCA signaling in bona fide thermogenic adipocytes of human subcutaneous abdominal WAT.

ANP Activates Mitochondrial Uncoupling in BAT and a Thermogenic Program in Human Primary Brown/Beige and White Adipocytes

^{18}F -FDG PET/CT revealed the existence of active BAT in the supraclavicular and neck areas of adult humans that can be readily activated by cold exposure (Cypess et al., 2009;

We next measured mitochondrial oxygen consumption under ATP synthase inhibition by oligomycin treatment to focus on mitochondrial uncoupled respiration (state 4). We have previously shown that β -adrenergic stimulation leads to pronounced mitochondrial uncoupling in human primary brown/beige adipocytes, which is markedly less in human primary white adipocytes, illustrating the unique feature of human adipocytes derived from the neck region (Broeders et al., 2015). Interestingly, we here show that ANP dose-dependently activates uncoupled mitochondrial respiration to ~50% of the effect of norepinephrine (NE) in human brown/beige adipocytes (Figures 6A and 6B). This effect was markedly lower in WAT-derived adipocytes (Figures 6C and 6D). ANP at the lowest dose of 100 nM nearly doubled maximal uncoupled respiration measured under carbonilcyanide

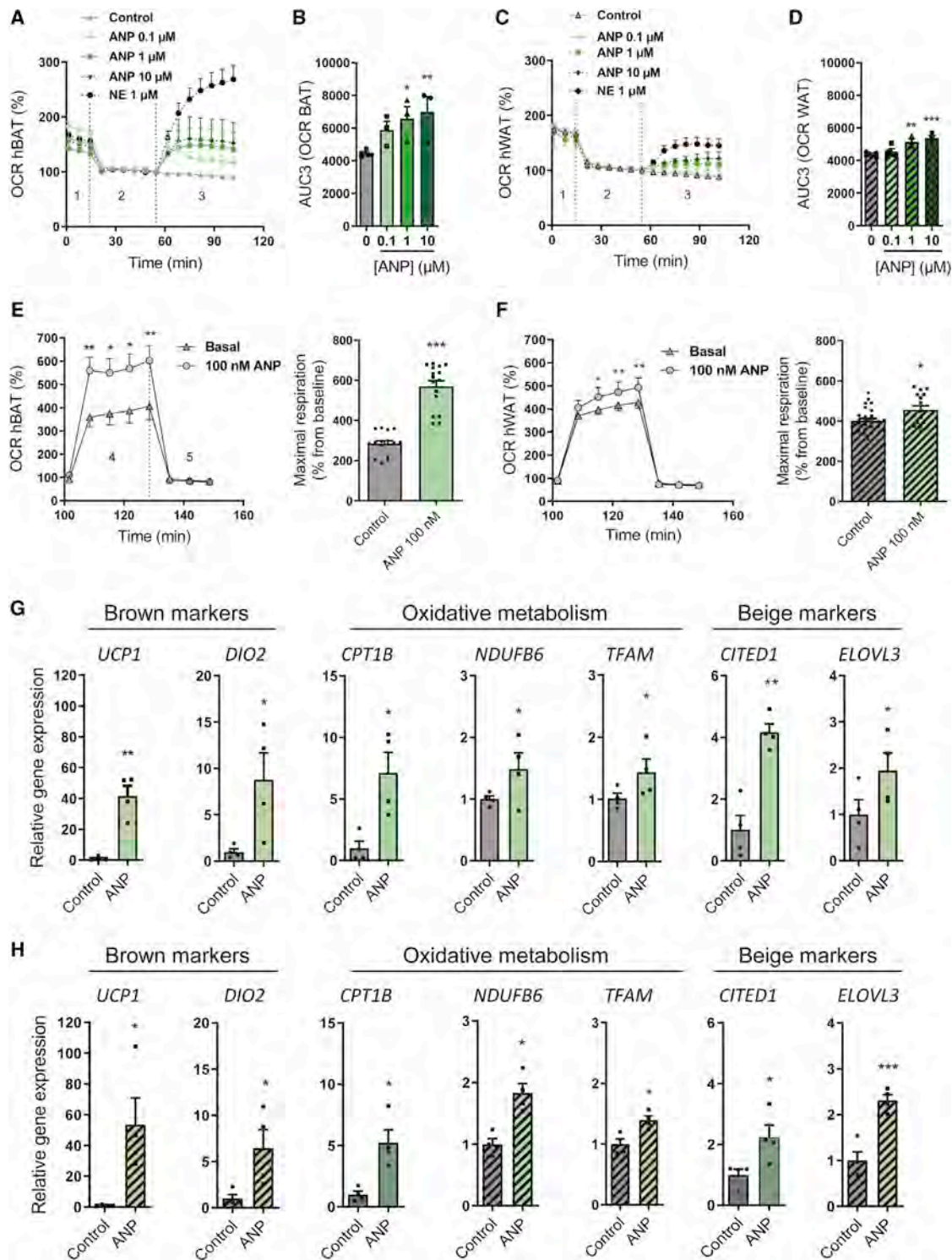


Figure 6. ANP Activates Mitochondrial Uncoupling in BAT and a Thermogenic Program in Human Primary Brown/Beige and White Adipocytes

(A) Oxygen consumption rate (OCR) of human primary brown/beige adipocytes (hBATs) in the absence (control) or presence of ANP (0.1 μM, 1 μM, or 10 μM) and NE (1 μM) for 3 h (n = 4). 1, basal respiration; 2, oligomycin; 3, treatments with different doses of ANP and NE.

(B) Area under the curve (AUC) of treatment-induced OCR calculated during phase 3 (uncoupled respiration during oligomycin inhibition of ATP synthase) in (A). (C) OCR of human primary white adipocytes (hWAT) in the absence (control) (n = 6) or presence of ANP (0.1 μM, 1 μM, or 10 μM) and NE (1 μM) for 3 h (n = 4). 1, basal respiration; 2, oligomycin; 3, treatments with different doses of ANP and NE.

(legend continued on next page)

p-trifluoromethoxyphenylhydrazide (FCCP) in human brown/beige adipocytes (Figure 6E). A similar but weaker effect was observed in hWAT adipocytes (Figure 6F). This reveals that ANP can directly activate mitochondrial uncoupling and respiration in human primary brown/beige adipocytes. We next examined if ANP could induce a transcriptional thermogenic program in human brown/beige and white primary adipocytes as observed *in vivo* in mice. ANP treatment briskly increased mRNA levels of *UCP1* both in human WAT and BAT adipocytes (Figure S6C). A peak was observed after 3-h treatment with levels returning to baseline after 48-h and 72-h treatment for *UCP1* and *CPT1B* in human brown/beige adipocytes (Figures S6D and S6E) and white (Figures S6F and S6G) adipocytes. Interestingly, acute treatment (3 h) with ANP at 100 nM increased to a variable degree (from 1.5- to 50-fold) a number of brown markers (e.g., *UCP1* and deiodinase type 2 [*DIO2*]), beige markers (e.g., Cbp/P300 interacting transactivator with Glu/Asp-rich C-terminal domain 1 [*CITED1*] and elongation of very long chain FAs protein 3 [*ELOVL3*]), and mitochondrial oxidative metabolism markers (*CPT1B*, NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6 [*NDUFB6*]), and transcription factor A, mitochondrial [*TFAM*] in brown/beige adipocytes (Figure 6G) and white adipocytes (Figure 6H). Taken together, these results indicate that ANP has the capacity to activate a thermogenic program in human primary brown/beige and white adipocytes, and mitochondrial uncoupling in brown/beige adipocytes. This implies that ANP mimetics and/or pharmacological compounds able to increase ANP/GCA signaling may be attractive strategies to activate BAT in humans.

DISCUSSION

The current classical view in mammals is that brown/beige fat is primarily activated by norepinephrine released from sympathetic nerves upon cold exposure. However, the fact that the nonselective β -agonist isoproterenol fails to activate BAT in humans (Vosselman et al., 2012), combined with the observation that the β_3 -adrenergic receptor is dispensable for cold-induced thermogenic gene activation in mice (de Jong et al., 2017), points toward the existence of alternative non-adrenergic regulatory systems that control BAT activation and function in response to cold. We here show that ANP, a cardiac hormone controlling blood volume and pressure, is required for cold-induced brown/beige adipocyte activation.

Previous work demonstrated that ANP contributes to cold-induced diuresis in healthy humans (Hassi et al., 1991). In response to cold, contraction of superficial blood vessels will limit heat loss, and as a consequence, blood will be shunted away toward deeper large blood vessels that will increase cardiac filling pressure of the right atrium (i.e., increased cardiac

preload). As a result, ANP secretion will be induced to normalize the increase in cardiac preload by enhancing diuresis. Herein, we demonstrate that ANP released upon cold exposure, but not BNP, will activate BAT to produce heat and maintain eutheria. BNP, the product of *Nppb*, is marginally expressed in the right atria of the heart compared to ANP (Kuhn, 2016). This likely explains why cardiac BNP expression and circulating levels are poorly affected by changes in cardiac filling pressure such as induced by cold exposure in this study.

In previous studies, the complete lack of all three β -adrenergic receptors (β -less mice) (Bachman et al., 2002) or sympathetic innervations in WAT through pharmacological ablation by 6-hydroxydopamine (Rohm et al., 2016) or genetic invalidation of tyrosine kinase receptor A (Jiang et al., 2017) was shown to suppress partially but not completely cold-induced *UCP1* expression. Although β -less mice develop hypothermia, it is still unclear to what extent BAT activity is hampered by the lack of β -adrenergic receptors. In this study, we show using ^{18}F -FDG PET/CT that the lack of ANP abrogates approximately half of BAT ^{18}F -FDG glucose uptake and >60% of transcriptional activation of *Ucp1* and *Pgc1 α* in BAT in response to acute cold exposure. The accumulation of multiple lipid droplets in cold-exposed BAT (i.e., BAT steatosis) of ANP null mice is a sign of dysfunctional BAT, as observed in other mouse models (Bachman et al., 2002; Seale et al., 2007; Simcox et al., 2017). A failure to adequately activate BAT and *UCP1* in ANP-deficient mice will lead to fat storage within lipid droplets in face of increased FA supply. This accumulation of multiple lipid droplets in BAT of ANP null mice is not observed at RT for which the cold stress represents a too-moderate challenge to unmask prototypical BAT-related phenotypes.

Recent studies indicate that BAT activation upon cold exposure is intimately linked to WAT lipolysis in fasted mice (Ikeda et al., 2017; Simcox et al., 2017), thus highlighting the need for a thermogenic factor to activate lipolysis. Although ANP is a powerful lipolytic hormone in human adipocytes, previous studies could not reveal a lipolytic effect of ANP in mouse adipocytes (Sengenès et al., 2002). We here reconcile these studies, demonstrating that cold exposure briskly increases ANP receptor GCA gene and protein expression in WAT, thus rendering mouse adipocytes responsive to ANP-mediated lipolysis. Importantly, we here demonstrate a cell-autonomous upregulation of GCA in primary mouse WAT adipocytes cultured at 31°C instead of 37°C. This indicates that acute cold is sufficient to upregulate GCA expression in white adipocytes independently of systemic neuroendocrine factors. We next show that cold-induced systemic lipolysis, reflected by increased plasma glycerol levels and HSL activation by phosphorylation in eWAT, is blunted in ANP null mice.

Besides NEFA derived from WAT lipolysis, circulating TGs have been shown as major BAT substrates during cold exposure (Heine

(D) AUC of treatment-induced OCR calculated during phase 3 in (uncoupled respiration during oligomycin inhibition of ATP synthase) (C).

(E) Maximal OCR (induced by FCCP) of hBAT in absence (control) or presence of ANP 100 nM (n = 4 independent donors). 4, FCCP; 5, rotenone and antimycin A.

(F) Maximal OCR (induced by FCCP) of hWAT in absence (control) or presence of ANP 100 nM (n = 4 independent donors). 4, FCCP; 5, rotenone and antimycin A. (G) Relative mRNA levels of brown (*UCP1* and *DIO2*), brown/beige (*CPT1B*, *NDUFB6*, and *TFAM*), and beige (*CITED1* and *ELOVL3*) markers in hBAT in the absence (control) or presence of ANP 100 nM (n = 4).

(H) Relative mRNA levels of brown (*UCP1* and *DIO2*), brown/beige (*CPT1B*, *NDUFB6*, and *TFAM*), and beige (*CITED1* and *ELOVL3*) markers in hWAT in the absence (control) or presence of ANP 100 nM (n = 4).

Results are shown as mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 versus control.

et al., 2018). We here unravel a strong defect in plasma TG production and/or utilization in *Nppa*^{-/-} mice during cold exposure despite a robust induction of *Lpl* in BAT of cold-exposed *Nppa*^{-/-} mice similar to control littermates. In line with a recent study (Simcox et al., 2017), we observed drastic changes in expression of lipid metabolism genes in liver of cold-exposed mice. Cold exposure turns on FA oxidative gene networks while downregulating lipid synthesis gene programs such as *de novo* lipogenesis. This leads to substantial FA utilization by the liver thus producing ketone bodies. Remarkably, cold-induced upregulation of *Cpt1a*, a rate-limiting enzyme in mitochondrial FA oxidation, and ketone bodies production was impaired in *Nppa*^{-/-} mice. This together with a reduced cold-induced lipolysis in *Nppa*^{-/-} mice largely contributes to this observed hepatic phenotype.

Previous works also highlighted that glucose is an important substrate for BAT during cold exposure in mice (Heine et al., 2018) and humans (Ouellet et al., 2012). Of importance, we observed that *Nppa*^{-/-} mice fail to maintain their blood glucose levels during acute cold exposure when compared to wild-type mice. This effect appears independent of changes in protein content and enzyme activity of PEPCK and G6Pase, which are rate-limiting enzymes in hepatic glucose production. Thus, this could be reasonably explained by a reduced glycogenolysis during cold exposure due to reduced liver glycogen content in *Nppa*^{-/-} mice. In addition, a blunted ANP-mediated lipolysis in WAT during cold exposure reduces NEFA availability and therefore liver endogenous glucose production (Perry et al., 2015). Our findings are consistent with a previous study, which showed a stimulatory effect of ANP on gluconeogenesis in perfused rat livers (Rashed et al., 1992). Thus, the lack of ANP could result in a blunted gluconeogenesis in cold-exposed mice. Collectively, a reduced availability and utilization of circulating NEFA, ketone bodies, TG, and glucose may largely contribute to impair BAT thermogenesis in cold-exposed *Nppa*^{-/-} mice.

In summary, we identify cardiac ANP as a physiological endocrine activator of non-shivering thermogenesis in mammals. These data uncover an intriguing evolutionary interconnection between cardiac activity and non-shivering thermogenesis. While the sympathetic nervous system remains the best-known mediator of cold-induced thermogenesis and BAT recruitment in mammals, our findings shed light on alternative pathways that have been conserved across species to maintain euthermy. They may open the path to potential pharmacological strategies targeted to enhance ANP/GCA signaling for human BAT recruitment to improve metabolic profile in individuals with obesity and type 2 diabetes.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead Contact
 - Materials Availability
 - Data and Code Availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Clinical studies and human subjects

- Mice
- Human primary adipocytes culture
- Mouse primary adipocytes culture

- METHOD DETAILS

- Blood analyses
- Echocardiography
- ¹⁸F-FDG PET/CT
- Cellular cooling
- Adipocyte lipolysis
- Histology
- Immunofluorescence
- Hepatic glycogen content
- Hepatic triglycerides content
- Mitochondrial respiration
- SeaHorse
- Real-time qPCR
- Western blot

- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108075>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from INSERM, Société Francophone du Diabète, and the European Foundation for the Study of Diabetes (C.M.) and the Commission of the European Communities (FP6-513946 DiOGenes and HEALTH-F2-2011-278373 DIABAT) (D. Lagarde). D.C. is supported by a PhD fellowship from INSERM/Occitanie Region. We are very grateful to Caroline Nevoit, Sarah Gandarillas, and Candy Escassut (CREFRE) for technical assistance in PET/CT imaging. We also thank Alexandre Lucas (APC core facility), Frédéric Martins (GET-TQ core facility), Lucie Fontaine (Histology core facility), and Dr. Jean-Philippe Pradère and Enzo Piccolo (Liver ORO staining) for their technical support. D.L. is a member of Institut Universitaire de France. We warmly acknowledge Pr. Max Lafontan for critical reading of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, D.C. and C.M.; Methodology, D.C. and C.M.; Investigation, D.C., M.C., E.B.M.N., V.B., D.A.L., C.P., C.L., J.V.P., M.S., L.M., M.-A.M., Y.J., Y.S.-M., A.M., S.D., G.T., N.V., V.B., F.L., A.C., W.H.M.S., and A.A.; Resources, G.M., W.v.M.L., P.S., D.L.; Writing – Original Draft, D.C. and C.M.; Writing – Review & Editing, D.C., E.B.M.N., A.C., L.C., G.M., W.v.M.L., P.S., D.L., and C.M.; Supervision, D.C. and C.M.; Funding Acquisition, D.L. and C.M.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: May 31, 2018

Revised: February 12, 2020

Accepted: August 5, 2020

Published: August 25, 2020

REFERENCES

Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., and Lowell, B.B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297, 843–845.

- Barquissau, V., Léger, B., Beuzelin, D., Martins, F., Amri, E.-Z., Pisani, D.F., Saris, W.H.M., Astrup, A., Maoret, J.-J., Iacovoni, J., et al. (2018). Caloric restriction and diet-induced weight loss do not induce browning of human subcutaneous white adipose tissue in women and men with obesity. *Cell Rep.* **22**, 1079–1089.
- Blondin, D.P., Tingelstad, H.C., Noll, C., Frisch, F., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, E.E., Richard, D., Haman, F., and Carpentier, A.C. (2017). Dietary fatty acid metabolism of brown adipose tissue in cold-acclimated men. *Nat. Commun.* **8**, 14146.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* **122**, 1022–1036.
- Broeders, E.P., Nascimento, E.B., Havekes, B., Brans, B., Roumans, K.H., Tailleux, A., Schaart, G., Kouach, M., Charton, J., Deprez, B., et al. (2015). The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity. *Cell Metab.* **22**, 418–426.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359.
- Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3057–3067.
- Coué, M., Badin, P.M., Vila, I.K., Laurens, C., Louche, K., Marqués, M.A., Bourlier, V., Mouisel, E., Tavernier, G., Rustan, A.C., et al. (2015). Defective natriuretic peptide receptor signaling in skeletal muscle links obesity to type 2 diabetes. *Diabetes* **64**, 4033–4045.
- Coué, M., Barquissau, V., Morigny, P., Louche, K., Lefort, C., Mairal, A., Carpené, C., Viguerie, N., Amer, P., Langin, D., et al. (2018). Natriuretic peptides promote glucose uptake in a cGMP-dependent manner in human adipocytes. *Sci. Rep.* **8**, 1097.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517.
- de Jong, J.M.A., Wouters, R.T.F., Boulet, N., Cannon, B., Nedergaard, J., and Petrovic, N. (2017). The β_3 -adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **312**, E508–E518.
- de la Rosa Rodriguez, M.A., and Kersten, S. (2017). Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1862** (10 Pt B), 1212–1220.
- Frontini, A., and Cinti, S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* **11**, 253–256.
- Gnad, T., Scheibler, S., von Kügelgen, I., Scheele, C., Kilić, A., Glöde, A., Hoffmann, L.S., Reverte-Salisa, L., Horn, P., Mutlu, S., et al. (2014). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* **516**, 395–399.
- Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252–1263.
- Hassi, J., Rintamäki, H., Ruskoaho, H., Leppäluoto, J., and Vuolteenaho, O. (1991). Plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in men during a 2-hour stay in a cold room. *Acta Physiol. Scand.* **142**, 481–485.
- Heine, M., Fischer, A.W., Schlein, C., Jung, C., Straub, L.G., Gottschling, K., Mangels, N., Yuan, Y., Nilsson, S.K., Liebscher, G., et al. (2018). Lipolysis triggers a systemic insulin response essential for efficient energy replenishment of activated brown adipose tissue in mice. *Cell Metab.* **28**, 644–655.e4.
- Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J.P., Maki, H., Homma, M., Shinoda, K., Chen, Y., Lu, X., Maretich, P., et al. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat. Med.* **23**, 1454–1465.
- Jankovic, A., Golic, I., Markelic, M., Stancic, A., Otasevic, V., Buzadzic, B., Korac, A., and Korac, B. (2015). Two key temporally distinguishable molecular and cellular components of white adipose tissue browning during cold acclimation. *J. Physiol.* **593**, 3267–3280.
- Jiang, Y., Berry, D.C., and Graff, J.M. (2017). Distinct cellular and molecular mechanisms for β_3 adrenergic receptor-induced beige adipocyte formation. *eLife* **6**, e30329.
- Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Seale, P. (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab.* **22**, 546–559.
- Kovacova, Z., Tharp, W.G., Liu, D., Wei, W., Xie, H., Collins, S., and Pratley, R.E. (2016). Adipose tissue natriuretic peptide receptor expression is related to insulin sensitivity in obesity and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* **24**, 820–828.
- Kuhn, M. (2016). Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiol. Rev.* **96**, 751–804.
- Larsen, T.M., Dalskov, S.M., van Baak, M., Jebb, S.A., Papadaki, A., Pfeiffer, A.F., Martinez, J.A., Handjieva-Darlenska, T., Kunešová, M., Pihlgård, M., et al.; Diet, Obesity, and Genes (Diogenes) Project (2010). Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2102–2113.
- Mallela, J., Ravi, S., Jean Louis, F., Mulaney, B., Cheung, M., Sree Garapati, U., Chinnasamy, V., Wang, C., Nagaraj, S., Mohapatra, S.S., and Mohapatra, S. (2013). Natriuretic peptide receptor A signaling regulates stem cell recruitment and angiogenesis: a model to study linkage between inflammation and tumorigenesis. *Stem Cells* **31**, 1321–1329.
- Mandard, S., Müller, M., and Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 393–416.
- Monteillet, L., Gjorgjieva, M., Silva, M., Verzieux, V., Imkirene, L., Duchamp, A., Guillou, H., Mithieux, G., and Rajas, F. (2018). Intracellular lipids are an independent cause of liver injury and chronic kidney disease in non alcoholic fatty liver disease-like context. *Mol. Metab.* **16**, 100–115.
- Moro, C., Crampes, F., Sengenès, C., De Glisezinski, I., Galitzky, J., Thalamos, C., Lafontan, M., and Berlan, M. (2004). Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J.* **18**, 908–910.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (2010). The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab.* **11**, 268–272.
- Nascimento, E.B.M., Sparks, L.M., Divoux, A., van Gisbergen, M.W., Broeders, E.P.M., Jörgensen, J.A., Schaart, G., Bouvy, N.D., van Marken Lichtenbelt, W.D., and Schrauwen, P. (2018). Genetic Markers of Brown Adipose Tissue Identity and In Vitro Brown Adipose Tissue Activity in Humans, *26* (Obesity (Silver Spring)), pp. 135–140.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E444–E452.
- 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.
- Ouellet, V., Labbé, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E.E., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 545–552.
- Perry, R.J., Camporez, J.G., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.M., et al. (2015). Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* **160**, 745–758.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J.S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., et al. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656–663.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839.
- Rajas, F., Jourdan-Pineau, H., Stefanutti, A., Mrad, E.A., Iynedjian, P.B., and Mithieux, G. (2007). Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic

- tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* 127, 555–565.
- Rashed, H.M., Nair, B.G., and Patel, T.B. (1992). Regulation of hepatic glycolysis and gluconeogenesis by atrial natriuretic peptide. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 640–645.
- Rohm, M., Schäfer, M., Laurent, V., Üstünel, B.E., Niopek, K., Algire, C., Hautzinger, O., Sijmonsma, T.P., Zota, A., Medrikova, D., et al. (2016). An AMP-activated protein kinase-stabilizing peptide ameliorates adipose tissue wasting in cancer cachexia in mice. *Nat. Med.* 22, 1120–1130.
- Rydén, M., Bäckdahl, J., Petrus, P., Thorell, A., Gao, H., Coue, M., Langin, D., Moro, C., and Arner, P. (2016). Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity. *Int. J. Obes.* 40, 714–720.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 126, 12–22.
- Schreiber, R., Diwoky, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsirirot, N., Abdellatif, M., Kolb, D., Hoeks, J., Kershaw, E.E., Sedej, S., et al. (2017). Cold-induced thermogenesis depends on ATGL-mediated lipolysis in cardiac muscle, but not brown adipose tissue. *Cell Metab.* 26, 753–763–e7.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6, 38–54.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 14, 1345–1351.
- Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Moulin, A., Berlan, M., Bouloumié, A., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2002). Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R257–R265.
- Sengenès, C., Bouloumié, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 48617–48626.
- Shin, H., Ma, Y., Chanturiya, T., Cao, Q., Wang, Y., Kadegowda, A.K.G., Jackson, R., Rumore, D., Xue, B., Shi, H., et al. (2017). Lipolysis in brown adipocytes is not essential for cold-induced thermogenesis in mice. *Cell Metab.* 26, 764–777.e5.
- Simcox, J., Geoghegan, G., Maschek, J.A., Bensard, C.L., Pasquali, M., Miao, R., Lee, S., Jiang, L., Huck, I., Kershaw, E.E., et al. (2017). Global analysis of plasma lipids identifies liver-derived acylcarnitines as a fuel source for brown fat thermogenesis. *Cell Metab.* 26, 509–522.e6.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhomerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S., and Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518–1525.
- Vosselman, M.J., van der Lans, A.A.J.J., Brans, B., Wierds, R., van Baak, M.A., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2012). Systemic β -adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes* 61, 3106–3113.
- Vosselman, M.J., Hoeks, J., Brans, B., Pallubinsky, H., Nascimento, E.B., van der Lans, A.A., Broeders, E.P., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2015). Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men. *Int. J. Obes.* 39, 1696–1702.
- Wang, X., Minze, L.J., and Shi, Z.Z. (2012). Functional imaging of brown fat in mice with 18F-FDG micro-PET/CT. *J. Vis. Exp.* 69, 4060.
- Wei, T., and Simko, V. (2017). R package “corrplot”: Visualization of a correlation matrix (Version 0.84). R Found. Stat. Comput., Vienna. <https://github.com/taiyun/corrplot>
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.
- Yuan, K., Jin, X., Park, W.H., Kim, J.H., Park, B.H., and Kim, S.H. (2009). Modification of atrial natriuretic peptide system in cold-induced hypertensive rats. *Regul. Pept.* 154, 112–120.
- Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C.M., Hassan, G., Gupta, R.K., et al. (2018). An adipose tissue atlas: an image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents. *Cell Metab.* 27, 252–262.e3.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit polyclonal anti-UCP1	Abcam	Cat# ab10983; RRID:AB_2241462
Rabbit polyclonal anti-NPRA (GC-A)	Abcam	Cat#ab154266
Goat polyclonal anti-NPRC	Sigma-Aldrich	SAB2501867
Rabbit polyclonal anti-p-p38MAPK	Cell Signaling Technology	Cat# 9211; RRID:AB_331641
Rabbit polyclonal anti-P38MAPK	Cell Signaling Technology	Cat# 9212; RRID:AB_330713
Rabbit polyclonal anti-pS660 HSL	Cell Signaling Technology	Cat#4126; RRID:AB_490997
Rabbit polyclonal anti-pS563 HSL	Cell Signaling Technology	Cat#4139; RRID:AB_2135495
Rabbit polyclonal anti-HSL	Cell Signaling Technology	Cat# 4107; RRID:AB_2296900
Rabbit monoclonal anti-GAPDH	Cell Signaling Technology	Cat# 2118; RRID:AB_561053
DAPI	Sigma-Aldrich	Cat#D9542
Lectin-rhodamine	Vector Laboratories	Cat#B-1105; RRID:AB_2336489
Biological Samples		
Brown adipocytes from humans	N/A	Broeders et al., 2015
White adipocytes from humans	N/A	Broeders et al., 2015
scWAT biopsies from humans	N/A	Barquissau et al., 2018
Plasma samples from humans	N/A	Vosselman et al., 2015
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Albumin	Sigma-Aldrich	Cat#A7030
Isoproterenol	Sigma-Aldrich	Cat#I5627
Atrial Natriuretic Peptide human	Sigma-Aldrich	Cat#A1663
Ripa buffer	Sigma-Aldrich	Cat#R0278
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich	Cat# P8340/P5726/P0044
Collagenase	Sigma-Aldrich	Cat#C-6885
Qiazol	QIAGEN	Cat#79306
Fast SYBR green Master Mix	Life technology	Cat#4385614
Taqman Fast Master Mix	Life technology	Cat#4444558
Rnase inhibitor	Applied Biosystem	Cat# N8080119
Critical Commercial Assays		
Mouse Brain Natriuretic Peptide ELISA Kit	Cusabio	CSB-E07971m
Mouse Atrial Natriuretic Peptide ELISA kit	Cusabio	CSB-E04848m
Human Brain Natriuretic Peptide ELISA Kit	Cusabio	CSB-E07970h
Human Pro Atrial Natriuretic Peptide ELISA kit	Cusabio	CSB-E05149h
Free Glycerol reagent	Sigma	Cat#F6428
NEFA C kit	Wako	Cat#91898/91696
QIAGEN RNeasy kit	QIAGEN	Cat #74106
Kit High capacity cDNA Reverse Transcription kit	Applied Biosystem	Cat#4368814
BCA pierce kit	ThermoScientific	Cat # 23225
[18F]fluorodeoxyglucose (¹⁸ F-FDG) GlucoTep®	Cyclopharma	Cat # FDGTCPRECH
Vetflurane	Virbac	Cat # 200265

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: B6.129P2-Nppa ^{tm1Unc} /J	The Jackson Laboratory	https://www.jax.org/strain/002685
Mouse: C57BL6/J	Janvier Laboratories	https://www.janvier-labs.com/
Oligonucleotides		
See Tables S1 and S2	N/A	N/A
Software and Algorithms		
GraphPad	GraphPad software	https://www.graphpad.com/
ImageLab 4.2 version software	Biorad	http://www.bio-rad.com/
ImageJ	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/
R software	N/A	https://www.R-project.org/
Corrplot Version 0.84	N/A	Wei and Simko, 2017
Nucline	Mediso	http://www.mediso.com
VivoQuant	InviCRO	https://invicro.com/vivoquant-home/
Other		
Rectal thermometer EcoScan Temp4/5/	Eutech Instruments	http://www.eutechinst.com
NanoScan TEP/CT	Mediso	http://www.mediso.com
Vivid7 echograph	GE Healthcare	N/A
14 MHz transducer i13L	GE Healthcare	N/A

RESOURCE AVAILABILITY

Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Cedric Moro (cedric.moro@inserm.fr).

Materials Availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and Code Availability

This study did not generate/analyze new datasets.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Clinical studies and human subjects

Study 1

Ancillary study of the DiOGenes (Diet, Obesity and Genes) European Framework project (NCT00390637). For a thorough description of the overall objective and goals of this multicenter, randomized, controlled dietary intervention study, see [Larsen et al. \(2010\)](#). Briefly, the study examined the effects of dietary macronutrients on weight regain and cardiovascular risk factors. Inclusion and exclusion criteria for study participation were previously outlined ([Larsen et al., 2010](#)). The DiOGenes study included 938 participants aged 27–63 years from eight European countries; however, the present study used only a subgroup of 79 men and women who had high or medium *UCP1* gene expression in subcutaneous white adipose tissue as previously described ([Barquissau et al., 2018](#)) and *GCA* expression data available. Only baseline data were used in the present investigation.

Study 2

To investigate the effect of acute cold on circulating NP levels, each subject underwent a mild cold experiment. This experiment started with one-hour baseline measurements during thermoneutral conditions. Subsequently, subjects were exposed to one hour of mild cold exposure, in which a standardized cooling protocol was used. The mild cold experiment was conducted in a specially equipped air-permeable tent (Colorado altitude training, USA), in which ambient temperature could be tightly controlled. During baseline and the mild cold period, subjects wore standardized clothing (shorts and a t-shirt; 0.19 clo). Energy expenditure was continuously measured while body temperatures, skin perfusion (vasoconstriction) and heart rate were sampled each minute. Blood pressure was measured each 15 minutes as well as thermal comfort and thermal sensation via Visual Analog Scales (VAS).

These data have been reported previously (Vosselman et al., 2015). Muscle shivering was monitored by means of EMG and VAS scales. Venous blood samples were taken during baseline and one hour after the onset of cold exposure.

Mice

Eight weeks old *Nppa*^{-/-} male mice (B6.129P2-*Nppa*^{tm1Unc}/J mice were backcrossed to C57BL/6J mice for at least ten generations) and their littermate control *Nppa*^{+/+} were used. Mice were fed with a normal chow diet (Ssniff) and were housed in a pathogen-free barrier facility (12h light/dark cycle) with *ad libitum* access to water and food in standard animal care facility rooms at 21°C (RT). For cold exposure experiments, at 7 a.m. animals were placed singly and exposed for 5 hours at 4°C with water access but without food. For acclimation to thermoneutrality, mice were transferred to a chamber with controlled ambient temperature at 30°C for four consecutive weeks. Rectal temperature was monitored using an EcoScan Temp4/5/ thermometer (Eutech Instruments) each hour during cold exposure or at indicated time points.

At the end of the protocol, mice were decapitated and blood was collected into EDTA tubes containing protease inhibitors. Organs and tissues were rapidly excised and either snap frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C or processed for histology. All experimental procedures were approved by our institutional animal care and use committee CEEA122 (protocol# 2016122311033178) and performed according to INSERM guidelines for the care and use of laboratory animals.

Human primary adipocytes culture

Adipocytes derived from human BAT and WAT were obtained and differentiated as described previously (Broeders et al., 2015; Nascimento et al., 2018; Wu et al., 2012). The study was reviewed and approved by the ethics committee of Maastricht University Medical Center (METC 10-3-012, NL31367.068.10, NCT03111719). Informed consent was obtained before surgery. In brief, the stromal vascular fraction was obtained from prevertebral BAT and subcutaneous WAT from the same area during thyroid surgery using a collagenase digestion. Differentiation was initiated for 7 days with differentiation medium containing biotin (33 μM), pantothenate (17 μM), insulin (100 nM), dexamethasone (100 nM), IBMX (250 μM), rosiglitazone (5 μM), T3 (2 nM), and transferrin (10 μg/ml). Cells were transferred to maintenance medium consisting of biotin (33 μM), pantothenate (17 μM), insulin (100 nM), dexamethasone (10 nM), T3 (2 nM), and transferrin (10 μg/ml) for another 5 days.

Mouse primary adipocytes culture

SVF from iWAT was obtained from 6-week-old WT mice as previously described (Planat-Benard et al., 2004). iWAT was dissected, mechanically dissociated and digested for 30min at 37°C with collagenase (collagenase NB 4 Standart Grade from Coger, concentration of 0.4 U/ml diluted in proliferative medium (αMEM plus 0.25 U/ml amphotericin, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.016 mM biotin, 100 μM ascorbic acid, 0.018 mM pantothenic acid and 10% new-born calf serum). After filtration, red blood cells lysis and centrifugation, the pellet was resuspended in proliferative medium. SVF cells were then counted, plated at 10000 cells/cm² and rinsed in PBS 3 hours after plating. Cells were maintained at 37°C (5% CO₂) and re-fed every 48h. Adherent cells were grown to 80% confluency in proliferative medium. Cells were then exposed to an adipogenic cocktail (proliferative medium supplemented with 5 μg/ml insulin, 2 ng/ml T3, 33.3 nM dexamethasone, 10 μg/ml transferrin and 1 μM rosiglitazone) and used after 8 days of differentiation.

METHOD DETAILS

Blood analyses

Human and mouse plasma ANP and BNP were measured with Human Atrial Natriuretic Peptide ELISA kit (Cusabio) and Mouse Atrial Natriuretic Peptide ELISA kit (Cusabio), Human Brain Natriuretic Peptide ELISA kit (Cusabio), and Mouse Brain Natriuretic Peptide ELISA kit (Cusabio), respectively following manufactory instructions. Glycerol was measured by enzymatic assay (Free Glycerol reagent, Sigma), NEFA and TG were measured using the NEFA C kit (Wako) and TG reagent (sigma). Glucose and ketone bodies levels were measured using a glucometer (Accucheck; Roche, Meylan, France) and blood β-ketone bodies meter (Freestyle Optium H meter, Abbot) respectively. Plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit (ALPCO Diagnostics, Salem, New Hampshire).

Echocardiography

Echocardiography was carried out with a Vivid7 echograph (GE Healthcare) and a 14 MHz transducer (i13L, GE) on lightly anesthetized (1% isoflurane in air) mice placed on a heating pad. Left ventricular walls and cavity dimensions were obtained from parasternal short axis view at mid-ventricular level during Time Movement mode acquisition. LV mass was estimated by a spherical approximation. LV ejection fraction was measured from parasternal long axis view by delineating LV chamber area in diastole and systole. The operator was blind from mice genotype.

¹⁸F-FDG PET/CT

Positron emission tomography-computed tomography imaging with [¹⁸F]fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG PET/CT) was performed as previously described (Wang et al., 2012). Briefly, mice were placed singly in cages, with water but without food and bedding, for 4h

fasting either at 4°C or RT before transfer to the imaging lab. Then mice were injected intraperitoneally with 10 to 14.5 MBq of ¹⁸F-FDG (GlucoTep® Cyclopharma, S¹-Beauzire, France) and placed back into their respective cage either kept on ice or remaining on a heating pad (RT) for 1h. After anesthesia with 4% isoflurane, mice were placed in 36°C imaging chambers for a 15 min PET acquisition (NanoScan PET/CT *Mediso Ltd, Hungary*) 1h post ¹⁸F-FDG injection and for a 6 min CT scan imaging (720 projections, semi-circular scan method, X-ray energy: 35kVp, exposure time: 450ms, voxel size: 251 × 251 × 251μm). PET acquisitions were performed in list-mode and reconstructed with a three-dimensional iterative algorithm (Tera-Tomo 3D, full detector model and low regularization; *Mediso Ltd, Hungary*) with four iterations and six subsets and a voxel size of 0.4 × 0.4 × 0.4 mm. All images were automatically corrected for radioactive decay during acquisition by the manufacturer software setting (Nucline, *Mediso Ltd, Hungary*). CT images were automatically fused to PET images and were also used for attenuation correction of PET images during their reconstruction. After acquisition, mice were placed back in clean cages with free access to food and water at RT. Processing of reconstructed images has been performed with VivoQuant software (InviCRO). 3D volumes of interest (VOIs) were drawn manually on the CT (part of left quadriceps) giving access to muscle mean ¹⁸F-FDG uptake (kBq.g⁻¹) or, for BAT, by semi-automatic segmentation based on connected pixels threshold to calculate BAT ¹⁸F-FDG uptake (kBq) and metabolic volume (mm³).

Cellular cooling

Fully differentiated inguinal mouse primary adipocytes were kept in a 37°C incubator with 5% CO₂ before experiments. Before cooling treatment, medium was refreshed with prewarmed adipogenic cocktail. For cooling, culture plates were taken out from the home incubator (37°C) and immediately transferred to another incubator set at 31°C for 5 hours.

Adipocyte lipolysis

Fresh eWAT pads were dissected from mice and put into phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C. Adipose tissue depots were cut into small pieces and transferred into Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing 0.5 mM CaCl₂, 238 mg/100ml HEPES, 108 mg/100 mL glucose, 3.5% BSA, and 1 mg/ml collagenase (C-6885, Sigma) at 37°C for 20 min. At the end of digestion, the fat cell suspension was filtered and rinsed three-times. Isolated packed adipocytes were diluted to 1/10th and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate for basal lipolysis determination and 1μM isoproterenol or 1μM ANP for lipolysis determination. Incubations were carried out for 90 min at 37°C and then placed on ice to stop lipolysis. Glycerol was measured by enzymatic assay (Free Glycerol reagent, Sigma,) and NEFA were measured using the NEFA C kit (Wako).

Histology

Adipose tissues and livers were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 7μm sections. Sections were stained with hematoxylin and eosin using standard protocols. For Oil Red O (ORO) staining, livers were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, cryoprotected in 30% sucrose at 4°C and cut into 7μm sections using cryostat. ORO staining was performed as standard procedures.

Immunofluorescence

iBAT sections (300 μm) were incubated in blocking solution (2% normal horse serum and 0.2% Triton X-100 in PBS) for 4 hours at room temperature (RT) and then incubated with the lipid probe BODIPY 558/568 C12 (1:1000) before nuclei being stained with DAPI (Sigma Aldrich). iBAT sections were also incubated with lectin-rhodamine (1/250, Vector Laboratories) overnight at 4°C and nuclei stained with DAPI. Imaging was performed using a confocal Laser Scanning microscope (LSM 780, Carl Zeiss) and image analysis was performed using Fiji software (NIH).

Hepatic glycogen content

Liver samples were weighed and homogenized in acetate buffer (0,2M, pH 4.8). After centrifuging the samples at 12 000 g for 10min, supernatant was transferred into clean tubes and divided in two aliquots. An aliquot of each homogenate was mixed with amyloglucosidase (Sigma) and incubated at 55°C for 15 minutes. The other one was mixed with water and incubated at 4°C for 15 minutes. Glucose content was measured as previously described below. Samples were analyzed in duplicate and the results determined as μg glycogen per mg tissue.

Hepatic triglycerides content

Liver triglycerides were extracted using Folch extraction procedure, as previously described ([Monteillet et al., 2018](#)). This procedure consist in the addition of a chloroform/methanol 2/1 solution to 100 mg of frozen liver (1.7mL for 100mg of tissue), and then a crushing with Fast Prep®. The solution was centrifuged twice (2,000 g; 10 min; 4°C), and 2mL of NaCl was added to the supernatant previously removed. Two phases were created, and the inferior organic phase that contains triglycerides was kept. After chloroform evaporation, triglycerides were diluted in 100μL of propanol and measured with a colorimetric kit (DiaSys, Holzheim, Germany).

Mitochondrial respiration

Freshly isolated tissues were carefully minced and homogenized in homogenization buffer (sucrose 250mM, Trizma-HCl 120mM, EGTA 1mM, 0.3% free fatty acid BSA, pH 7.2) and filtered (100μm) at 4°C. The homogenates (20μl and 100μl of BAT and WAT

homogenate respectively) were placed into a magnetically stirred oxygen electrode chamber set to 37°C (OROBOROS Oxygraph-2k, OROBOROS Instruments Corp, Innsbruck, Austria) in respiration buffer (KCl 125mM, Trizma-HCl 120mM, EGTA 1mM, KH₂PO₄ 10mM, 0.1% free fatty acid BSA, pH 7.2) in the presence of substrates (Glutamate 10mM, Malate 2mM, Succinate 10mM, Pyruvate 5.45mM, ADP 3.4mM and MgCl₂ 2mM). The chamber was closed, and the homogenates were incubated to determine the basal respiratory rate. Antimycin (2.3μM) was added to measure basal mitochondrial-derived oxygen consumption. Oxygen consumption rate was determined from the slope of a plot of O₂ concentration versus time and adjusted to protein content of the homogenate.

SeaHorse

For oxygen consumption measurements, differentiated adipocytes were incubated for 1 h at 37°C in unbuffered XF assay medium supplemented with 2 mM GlutaMAX, 1 mM sodium pyruvate, and 25 mM glucose. To determine mitochondrial uncoupling, oxygen consumption was measured using bio-analyzer from Seahorse Bioscience after addition of 2 μM oligomycin, which inhibited ATPase, followed by indicated concentrations of ANP or 1 μM NE. Maximal respiration was determined following 0.3 μM FCCP. 1 mM antimycin A and rotenone was added to correct for non-mitochondrial respiration (Broeders et al., 2015).

Real-time qPCR

Total RNA from tissue was isolated using QIAGEN RNeasy kit (QIAGEN, GmbH Hilden, Germany) following manufacturer's protocol. The quantity of the RNA was determined on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Reverse-transcriptase PCR was performed using the Multiscribe Reverse Transcriptase method (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed in duplicate using the ViiA 7 Real-time PCR system (Applied biosystems). All expression data were normalized by the 2^(-ΔCt) method using, *18S* in mice and *PUM1* and *GUSB* in human cultures, as internal control. Correlation with thermogenic markers gene expression was assessed using the Biomark HD system with 96.96 Dynamic Array IFC (Fluidigm) and TaqMan assays (Applied Biosystems) as described in Barquissau et al. (2018). Data were normalized using the 2^(-ΔCt) method and *PUM1* as reference gene. The primers used are listed in the Tables S1 and S2.

Western blot

Proteins were extracted from tissues using RIPA buffer and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Tissues homogenates were centrifuged twice for 20 min at 12700 rpm and supernatants were quantified with BCA pierce kit (ThermoScientific). Equal amount of proteins were run on a 4%–20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Biorad), transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies, Rabbit anti-Actin (1:10000, CST, #4970), Rabbit anti-ATGL (1:1000, CST #2138s), Rabbit anti-GAPDH (1:1000, CST, #2118), Mouse anti-GLUT1 (1:1000, Abcam, ab40084), Rabbit anti-G6PC (Rajas et al., 2007) (1:2000), Rabbit anti-pS660 HSL (1:1000, CST, #4126), Rabbit anti-pS563 HSL (1:1000, CST, #4139s), Rabbit anti-HSL (1:1000, CST, #4107), Rabbit anti-NPRA (1:1000, Abcam, ab154266), Goat anti-NPRC (1:1000, Sigma, SAB2501867), Rabbit anti-PEPCK (1:7000, Santa cruz, #32879), Rabbit anti-p-p38MAPK (1:1000, CST, #9211), Rabbit anti-P38MAPK (1:1000, CST, #9212), Rabbit anti-UCP1 (1:1000, Abcam, ab10983). Subsequently, immuno-reactive proteins were blotted with anti-rabbit or goat horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies for 1h at room temperature and revealed by enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific), visualized using ChemiDoc MP Imaging System and data analyzed using the ImageLab 4.2 version software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), except for Figure 4A that was produced using the package corplot of the R software (Wei and Simko, 2017). Normal distribution and homogeneity of variance of the data were tested using Shapiro-Wilk and F tests, respectively. Student's t tests, Mann-Whitney test or one-way ANOVA were performed to determine differences between groups/treatments. Two-way ANOVA followed by Bonferonni's post hoc tests were applied when appropriate. Univariate linear regressions were performed on parametric data. The false discovery rate for multiple testing was controlled by the Benjamini-Hochberg procedure with p_{adj.} values ≤ 0.05 as threshold. All values in Figures are presented as mean ± SEM. Statistical significance was set at p < 0.05.

Supplemental Information

**Atrial Natriuretic Peptide Orchestrates
a Coordinated Physiological Response
to Fuel Non-shivering Thermogenesis**

Deborah Carper, Marine Coué, Emmani B.M. Nascimento, Valentin Barquissau, Damien Lagarde, Carine Pestourie, Claire Laurens, Justine Vily Petit, Maud Soty, Laurent Monbrun, Marie-Adeline Marques, Yannick Jeanson, Yannis Sainte-Marie, Aline Mairal, Sébastien Déjean, Geneviève Tavernier, Nathalie Viguerie, Virginie Bourlier, Frank Lezoualc'h, Audrey Carrière, Wim H.M. Saris, Arne Astrup, Louis Casteilla, Gilles Mithieux, Wouter van Marken Lichtenbelt, Dominique Langin, Patrick Schrauwen, and Cedric Moro

Supplemental Information

Atrial natriuretic peptide orchestrates a coordinated physiological response to fuel non shivering thermogenesis

Deborah Carper, Marine Coue, Emmani Nascimento, Valentin Barquissau, Damien Lagarde, Carine Pestourie, Claire Laurens, Justine Vily Petit, Maud Soty, Laurent Monbrun, Marie-Adeline Marques, Yannick Jeanson, Yannis Sainte-Marie, Aline Mairal, Sébastien Dejean, Geneviève Tavernier, Nathalie Viguerie, Virginie Bourlier, Frank Lezoualc'h, Audrey Carrière, Wim H.M. Saris, Arne Astrup, Louis Casteilla, Gilles Mithieux, Wouter van Marken Lichtenbelt, Dominique Langin, Patrick Schrauwen and Cedric Moro

SUPPLEMENTAL FIGURES

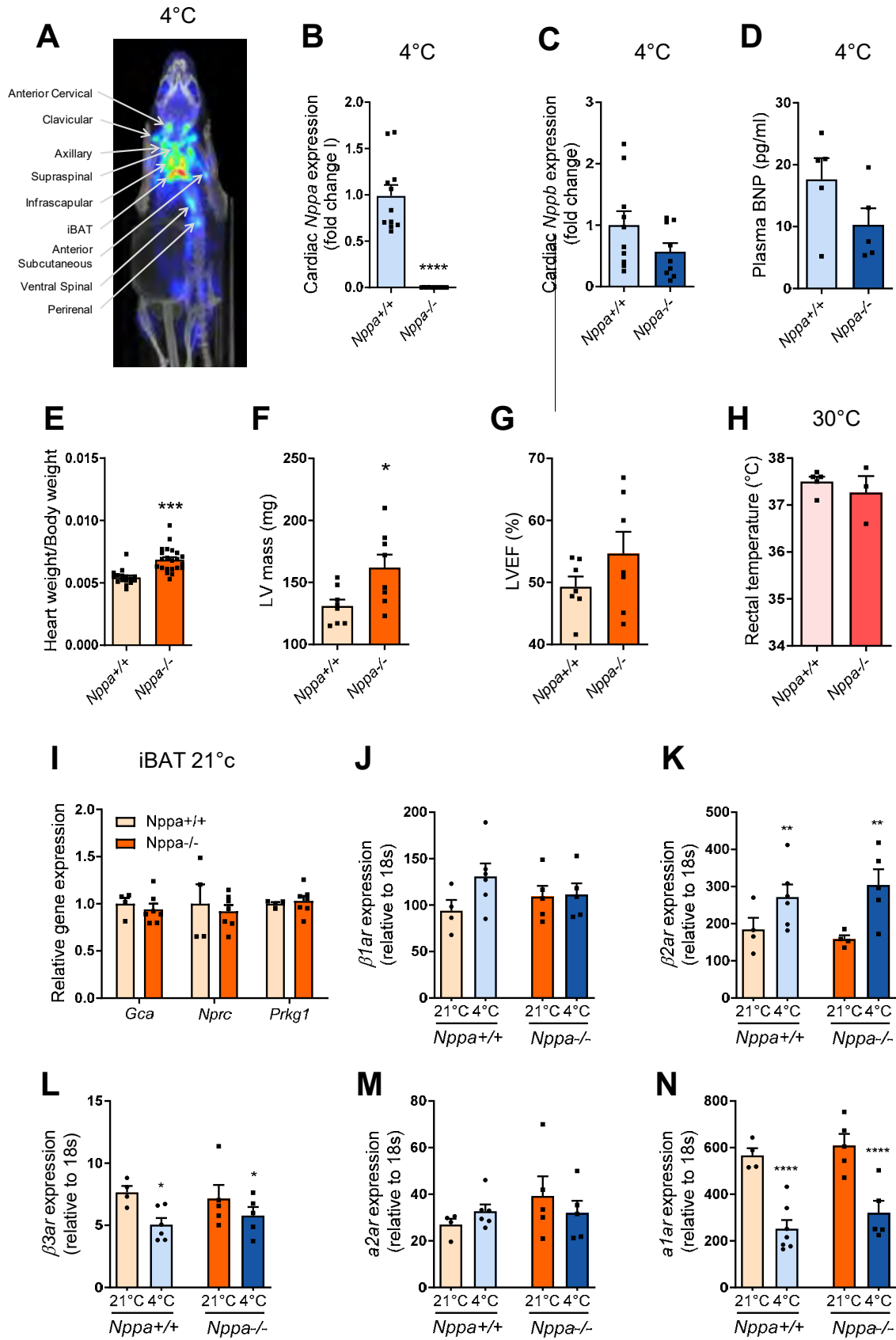


Figure S1. ANP is essential for non-shivering thermogenesis during acute cold exposure. Related to Figure

1

(A) Representative ^{18}F -FDG PET/CT images of BAT recruitment around the neck in mice exposed for 5h to 4°C

(B-C) Cardiac *Nppa* expression (B) and cardiac *Nppb* expression (C) in *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice (n=11)

(D) Plasma BNP in *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after acute cold exposure (n=5-6)

(E) Heart weight to body weight ratio from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice (n=16-22)

(F) Left ventricular (LV) mass from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice (n=8)

(G) Left ventricular ejection fraction (LVEF) from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice (n=7)

(H) Rectal temperature of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at thermoneutrality (30°C) (n=3-5)

(I) Relative mRNA levels of *Gca*, *Nprc* and *Prkg1* in iBAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 21°C (n=4-7)

(J-K-L-M-N) Relative mRNA levels of *β1ar* (J), *β2ar* (K), *β3ar* (L), *α2ar* (M) and *α1ar* (N) in iBAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 21°C or after acute cold exposure (n=4-6)

Results are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

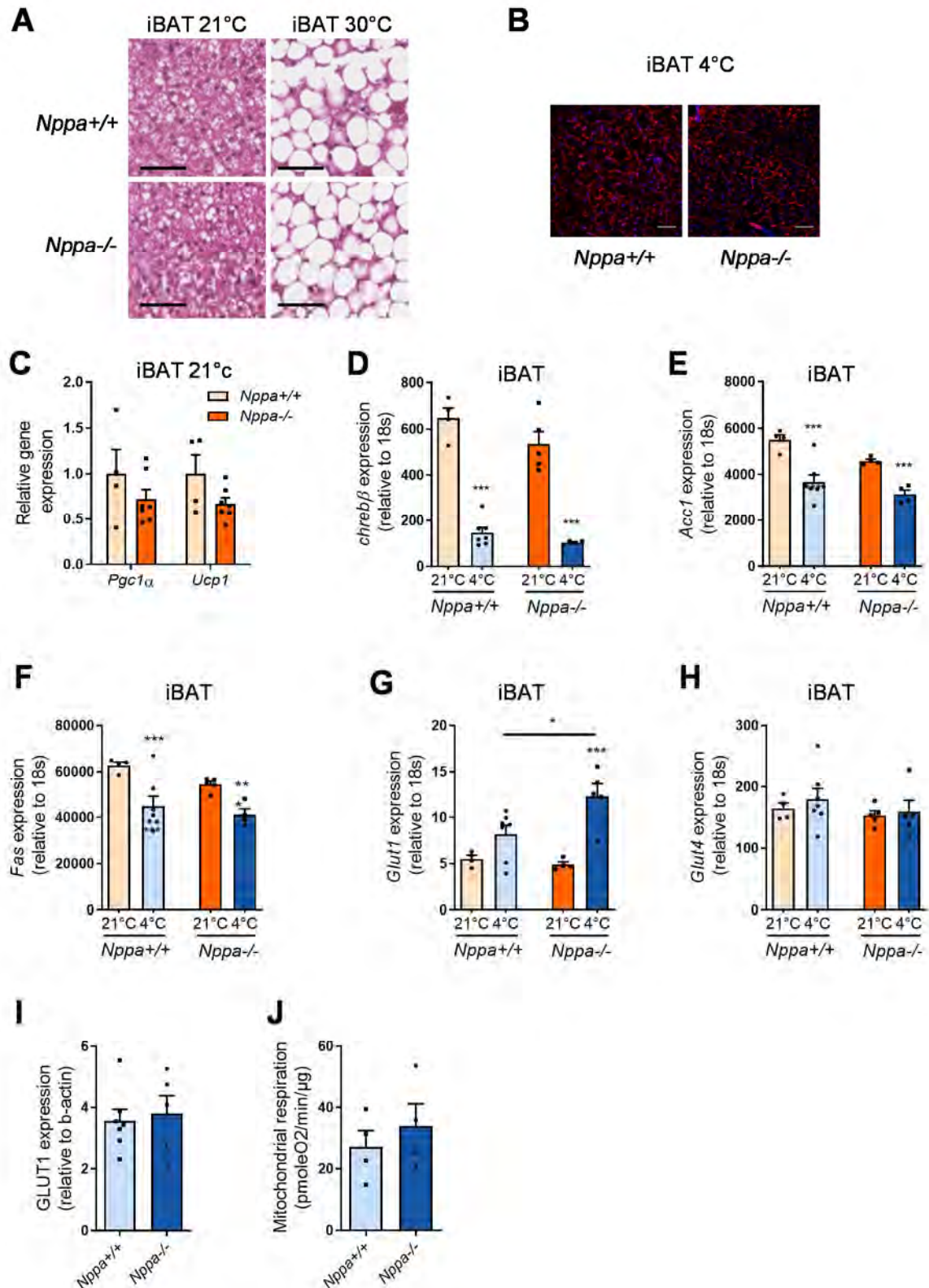


Figure S2. ANP-deficiency induces BAT morphological and molecular changes. Related to Figure 2
 (A) Representative Hematoxylin/Eosin staining of iBAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 21°C or 30°C. Scale bar = 50μm
 (B) Representative Lectin/DAPI staining of iBAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure. Scale bar = 50μm
 (C) Relative mRNA levels of *Pgc1α* and *Ucp1* in iBAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 21°C (n=4-7)
 (D-E-F-G-H) Relative mRNA levels of *Chrebbβ* (D), *Acc1* (E), *Fas* (F), *Glut1* (G) and *Glut4* (H) in iBAT

from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 21°C of after cold exposure (n=4-7)

(I) Relative GLUT1 protein level in iBAT of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure (n=5-7)

(J) Mitochondrial respiration of BAT homogenates from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after cold exposure (n=4)

Results are shown as mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

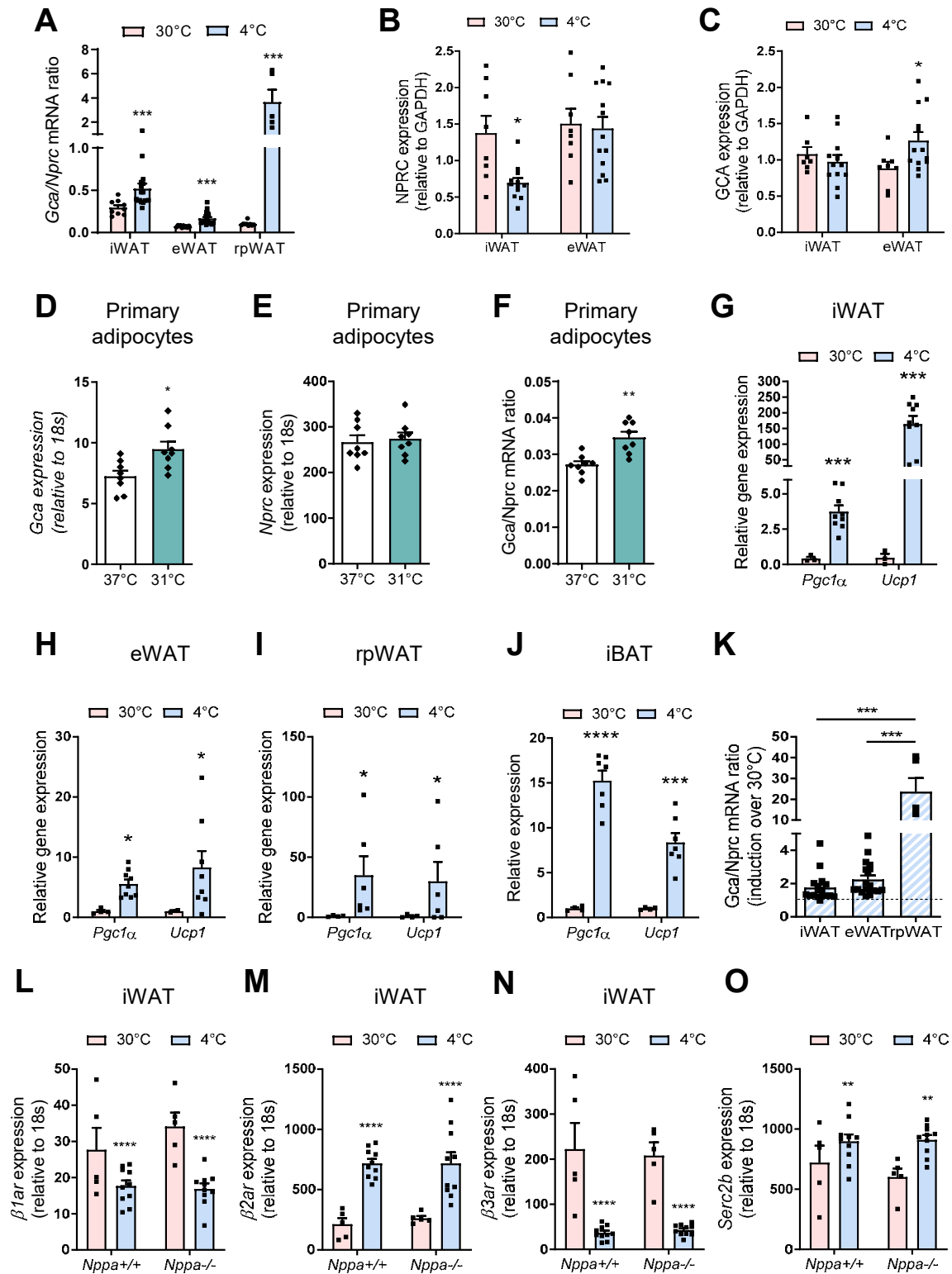


Figure S3. ANP is required for beige adipocyte recruitment during acute cold exposure. Related to Figure 3

(A) *Gca/Nprc* mRNA ratio in iWAT, eWAT and rpWAT of WT mice housed at 30°C (n=9-10) and after acute cold exposure (5h at 4°C) (n=4-19)

(B-C) Relative NPRC (B) and GCA (C) protein level in iWAT and eWAT of WT mice housed at 30°C (n=8) and after acute cold exposure (4°C) (n=13).

(D-E-F) Relative mRNA levels of *Gca* (D) and *Nprc* (E) and *Gca/Nprc* mRNA ratio (F) in mouse primary adipocytes cultured at 37°C or after incubation at 31°C (n=8)

(G-H-I-J) Relative mRNA levels of *Pgc1 α* and *Ucp1* in iWAT (G), eWAT (H), rpWAT (I) and iBAT (J) of WT mice at 30°C and after acute cold exposure (5h at 4°C) (n=4-8)

(K) *Gca/Nprc* mRNA induction in iWAT (n=17), eWAT (n=19) and rpWAT (n=5) of WT mice after acute cold exposure

(L-M-N-O) Relative mRNA levels of *β 1ar* (L), *β 2ar* (M), *β 3ar* (N), *Serca2b* (O) in iWAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C or after acute cold exposure (n=5-10) Results are shown as mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

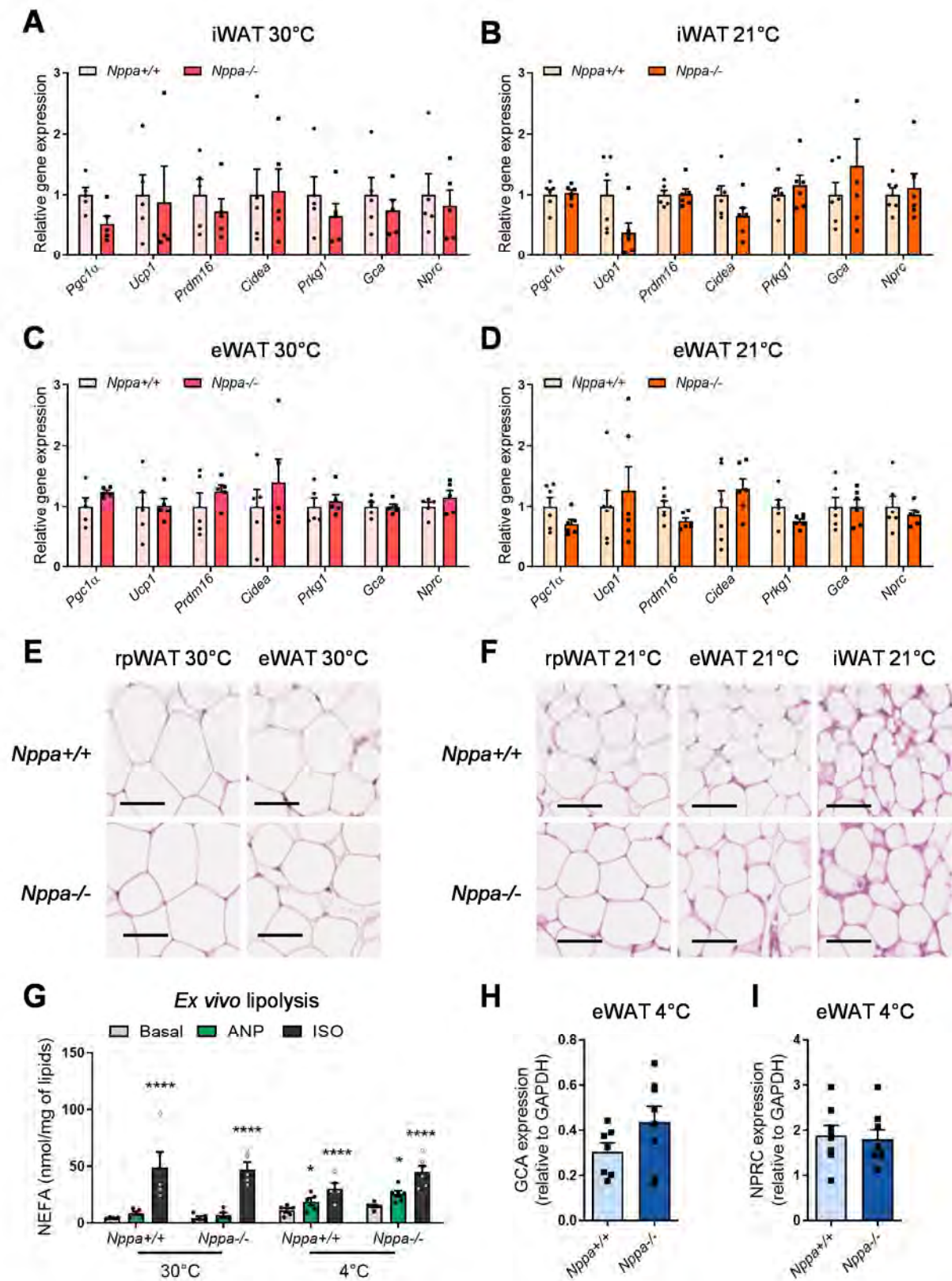


Figure S4. ANP is required for white adipocyte lipolysis during acute cold exposure. Related to Figure 3

(A-B) Relative mRNA levels of thermogenic and NP-signaling genes in iWAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C (n=5) (A) and room temperature (21°C) (n=6) (B)

(C-D) Relative mRNA levels of thermogenic and NP-signaling genes in eWAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C (n=5) (C) and RT (n=6) (D)

- (E) Representative Hematoxylin/Eosin staining of rpWAT and eWAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C. Scale bar = 50µm
- (F) Representative Hematoxylin/Eosin staining of rpWAT, eWAT and iWAT from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at room temperature (21°C). Scale bar = 50µm
- (G) *Ex vivo* adipocyte lipolysis in eWAT under basal, ANP and isoproterenol-stimulated conditions from *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice housed at 30°C and after acute cold exposure (n=5-8)
- (H) Relative GCA protein level in eWAT of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after acute cold exposure (n=8)
- (I) Relative NPRC protein level in eWAT of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice after acute cold exposure (n=8)
- Results are shown as mean ± SEM. *p<0.05

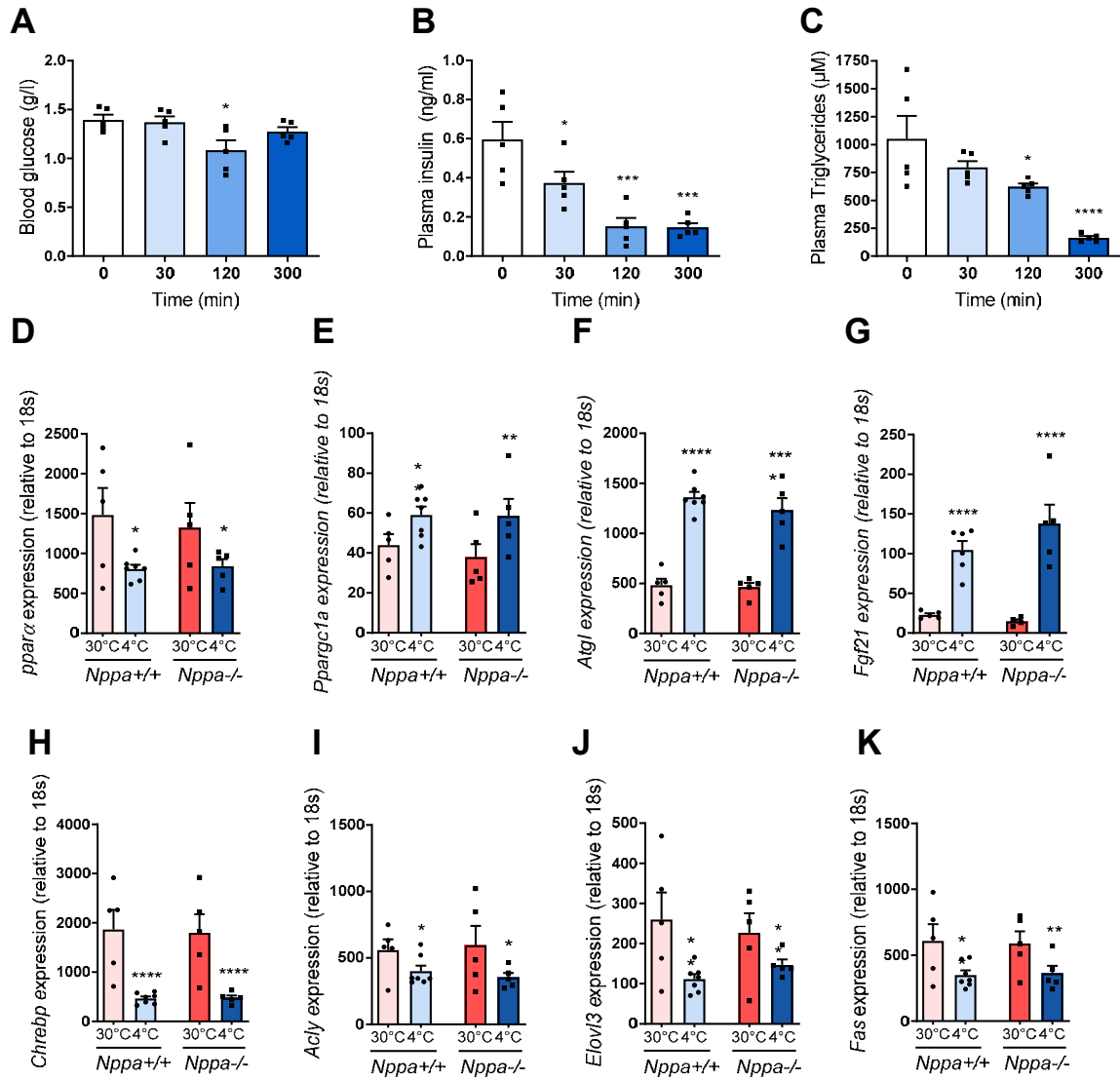


Figure S5. ANP deficiency impairs plasma triglycerides and glucose responses to cold. Related to Figure 4 (A-B-C) Blood glucose (A), plasma insulin (B) and plasma triglycerides (C) levels during acute cold exposure in WT mice (n=5)

(D-E-F-G-H-I-J-K) Relative mRNA levels of *Ppara* (D), *Pgc1a* (E), *Atgl* (F), *Fgf21* (G), *Chrebp* (H), *Acly* (I), *Elovl3* (J), and *Fas* (K) in liver of *Nppa*^{+/+} and *Nppa*^{-/-} mice at 30°C and after acute cold exposure (n=5-7)

Results are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

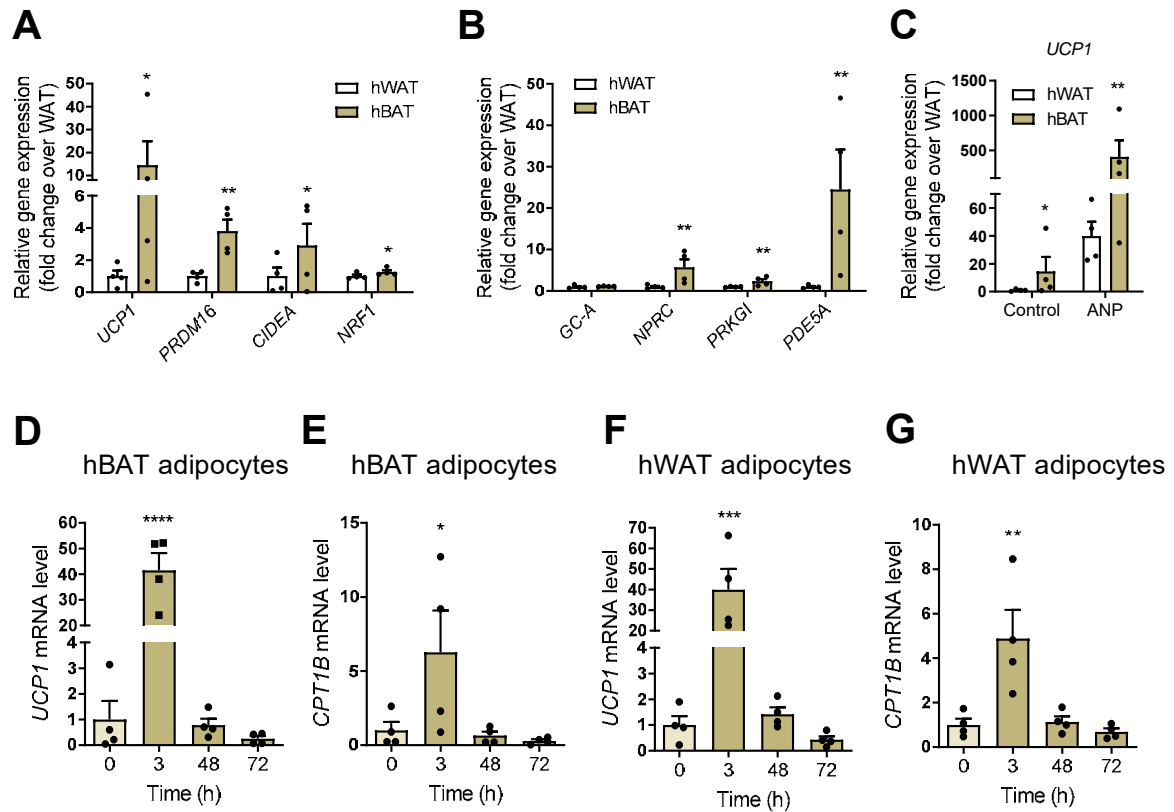


Figure S6. ANP activates mitochondrial uncoupling in BAT and a thermogenic program in human primary brown/beige and white adipocyte. Related to Figure 6

(A) Relative mRNA levels of *UCP1*, *PRDM16*, *CIDEA* and *NRF1* in human primary white adipocytes (hWAT) and human primary brown/beige adipocytes (hBAT) (n=4)

(B) Relative mRNA levels of *GC-A*, *NPRC*, *PRKG1* and *PDE5A* in hWAT and hBAT (n=4)

(C) Relative mRNA levels of *UCP1* in hWAT and hBAT in absence (control) or presence of ANP 100 nM (n=4)

(D-E) Relative mRNA levels of *UCP1* (D) and *CPT1B* (E) in hBAT treated with ANP for 3, or 72h (n=4)

(F-G) Relative mRNA levels of *UCP1* (F) and *CPT1B* (G) in hWAT treated with ANP for 3, or 72h (n=4)

Results are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1. List of primer and probe sequences used for real-time qPCR with Taqman chemistry. Related to Figures 1-6 and Figures S-6.

Gene symbol	Taqman Probe
<i>Cidea</i>	Mm00432554_m1
<i>Cpt1b</i>	Mm00487200_m1
<i>Elovl3</i>	Mm00468164_m1
<i>Npr1</i>	Mm00435324_m1
<i>Npr3</i>	Mm00435329_m1
<i>Pck1</i>	Mm00440636_m1
<i>Pgc1a</i>	Mm01208835_m1
<i>Plin2</i>	Mm00475794_m1
<i>Prkg1</i>	Mm00440954_m1
<i>Ucp1</i>	Mm01244861_m1
<i>18S</i>	Hs99999901_s1
<i>CA4</i>	Hs00426343_m1
<i>CIDEA</i>	Hs00154455_m1
<i>CITED1</i>	Hs00918445_g1
<i>CPT1B</i>	Hs00972284_m1
<i>CYCI</i>	Hs00357717_m1
<i>DIO2</i>	Hs00988260_m1
<i>ELOVL3</i>	Hs00537016_m1
<i>GUSB</i>	Hs99999908_m1
<i>NDUFB6</i>	Hs00159583_m1
<i>NRF1</i>	Hs00602161_m1
<i>PLIN5</i>	Hs00965990_m1
<i>PPARa</i>	Hs00231882_m1
<i>PRDM16</i>	Hs00223161_m1
<i>PUM1</i>	Hs00472881_m1
<i>SIRT3</i>	Hs00202030_m1
<i>TFAM</i>	Hs01082775_m1
<i>UCP1</i>	Hs00222453_m1

Supplemental Table 2. List of primer and probe sequences used for real-time qPCR with Sybr chemistry. Related to Figures 1-4 and Figures S1-5.

Gene symbol	Forward	Reverse
<i>A1ar</i>	TGTGCCCCGAAATGTACTGG	TCTGTGGCCCAATGTTGATAAG
<i>A2ar</i>	AATTGCAGACGGTCCTCTCG	TGGCACCCCTGCCTTTCATAG
<i>Acc1</i>	GCCTCTTCCTGACAAACGAG	TGACTGCCGAAACATCTCTG
<i>Acly</i>	ATGCCCCAAGATTTCAGTCCC	ACGATGGCCTTGGTATGTCTG
<i>Atgl</i>	TCCTTAGGAGGAATGGCCTAC	TCCTCTTCCTGGGGGACAAC
<i>Cd36</i>	CGCTGTGGAAATGGTGTGTT	GAAGGCAGCAACTTCTAGAACAG
<i>Chrebp</i>	TCTGCAGATCGCGTGGAG	CTTGTCCCGGCATAGCAAC
<i>Cpt1a</i>	TTGGAAGTCTCCCTCCTTCA	GCCCATGTTGTACAGCTTCC
<i>Fas</i>	TGGTGAATTGTCTCCGAAAAG	CACGTTTCATCACGAGGTCATG
<i>Fgf21</i>	CGTCTGCCTCAGAAGGACTC	AAGGCTCTACCATGCTCAGG
<i>G6p</i>	ACACCGACTACTACAGCAACAG	CCTCGAAAGATAGCAAGAGTAG
<i>Glut1</i>	TCAACACGGCCTTCACTG	CACGATGCTCAGATAGGACATC
<i>Glut4</i>	ACTCTTGCCACACAGGCTCT	CCTTGCCCTGTCAGGTATGT
<i>Lpl</i>	TTATCCCAATGGAGGCACTTT	CACGTCTCCGAGTCCCTCTCTC
<i>Nppa</i>	CTGCTTCGGGGGTAGGATTG	TTCGGTACCGGAAGCTGT
<i>Nppb</i>	GCTGCTTTGGGCACAAGATA	ACAACAACCTTCAGTGC GTTACAG
<i>Ppara</i>	AGTTCACGCATGTGAAGGCTG	TGTTCCGGTTCTTCTTCTGAATC
<i>Prdm16</i>	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
<i>Serca2b</i>	ACCTTTGCCGCTCATTTTCCAG	AGGCTGCACACACTCTTTACC
<i>β1ar</i>	CTCGTCCGTCGTCCTCTTCTAC	GTCGATCTTCTTACCTGTTTTTGG
<i>β2ar</i>	TTGCAGTGGATCGCTATGTTG	TGACCACTCGGGCCTTATTCT
<i>β3ar</i>	CCTTCAACCCGGTCATCTAC	GAAGATGGGGATCAAGCAAGC

Discussion

Tout d'abord, nous avons observé qu'une exposition au froid induit la sécrétion d'ANP chez la souris et chez l'Homme. Contrairement à l'ANP, le BNP n'est pas sécrété en réponse au froid chez la souris et chez l'Homme. Ceci est en contradiction avec les résultats de l'équipe de Sheila Collins qui montre une forte augmentation des niveaux plasmatiques du BNP en réponse au froid chez la souris (Bordicchia et al. 2012). L'expression cardiaque du BNP étant faible comparée à celle de l'ANP en condition physiologique, une exposition au froid n'est probablement pas suffisante pour augmenter de façon notable la libération de BNP (Kuhn 2016). Au cours d'une exposition au froid, une vasoconstriction des vaisseaux superficiels est induite afin de relocaliser l'afflux sanguin au niveau du tronc contenant tous les organes vitaux et de limiter la dissipation de chaleur. L'augmentation de la volémie au niveau central augmente la pression sanguine au niveau du cœur et induit un étirement de la paroi cardiaque. En plus de l'étirement de la paroi cardiaque induite par le froid, il est possible que ce soit la libération de la noradrénaline qui induise la sécrétion d'ANP. En effet, la noradrénaline stimule la sécrétion d'ANP notamment via les récepteurs β -AR de l'oreillette droite (Schiebinger, Baker, et Linden 1987). En 1991, une étude montrait déjà une augmentation des niveaux plasmatiques d'ANP chez l'Homme en réponse au froid et suggérait que l'ANP sécrété en réponse à la relocalisation de l'afflux sanguin répondait par un effet diurétique (Hassi et al. 1991). Nous démontrons ici que le rôle de l'ANP est beaucoup plus important puisqu'il permet l'activation de la thermogénèse *in vivo* chez la souris. En effet, en absence totale d'ANP, les souris sont intolérantes au froid. Ces résultats démontrent que l'ANP est un activateur endocrine physiologique de la thermogénèse sans frisson chez la souris et l'Homme.

Par la suite, le travail a consisté à étudier par quels mécanismes l'ANP induit la thermogénèse sans frisson chez la souris. Après avoir écarté l'implication d'un éventuel défaut de vascularisation et de fonction cardiaque chez ces souris déficientes pour l'ANP, nous nous sommes intéressés au principal site de production de chaleur : le BAT. La déficience en ANP induit un défaut d'activation et de recrutement du BAT ainsi qu'un blocage du brunissement

dans le WAT. Ces résultats confirment *in vivo*, l'activation du programme thermogénique dans les adipocytes bruns et blancs observée précédemment *in vitro* suite à un traitement à l'ANP (Bordicchia et al. 2012; Kimura et al. 2017).

Récemment, des études ont révélé que l'activation thermogénique du BAT nécessite l'activation de la lipolyse dans le WAT (Schreiber et al. 2017; Shin et al. 2017). Les acides gras libérés par le WAT permettent d'activer la transcription d'UCP1 dans le BAT, de fournir les substrats nécessaires aux adipocytes bruns pour produire de la chaleur et ils favorisent également la production hépatique de glucose et de TG, ces derniers étant des sources majeures d'énergie pour le BAT (Heine et al. 2018; Perry et al. 2015; Samuel et Shulman 2016). Il est maintenant bien établi que l'ANP est un puissant activateur de la lipolyse dans les adipocytes blancs humains. Cependant des études précédentes n'ont pas révélé d'effet lipolytique de l'ANP dans les adipocytes murins (C. Sengenès et al. 2002). De façon intéressante, nous montrons dans ce travail que l'exposition au froid induit, de façon cellule autonome, une augmentation de la signalisation de l'ANP en augmentant le ratio GC-A/NPRC dans les adipocytes blancs de souris, rendant ceux-ci répondeurs à l'ANP. Chez les souris déficientes pour l'ANP, la lipolyse induite par le froid est bloquée. Ces travaux appuient l'importance physiologique du système ANP/GC-A dans l'activation de la lipolyse en condition physiologique. Nous nous sommes alors demandé si les productions hépatiques de TG et glucose étaient altérées chez les souris déficientes pour l'ANP. Les niveaux plasmatiques de TG et la glycémie des souris ANP déficientes chutent drastiquement au cours d'une exposition au froid. Ceci peut être une conséquence de la diminution de leur production et/ou d'une augmentation de leur consommation. Concernant le glucose, nous savons par l'analyse de [¹⁸F]FDG–PET scan qu'il est moins consommé par le BAT, sans différence de consommation dans le muscle squelettique, ce qui sous-entend plutôt un défaut de production. Une précédente étude a montré que l'ANP stimule la néoglucogenèse dans des foies de rats perfusés (Rashed, Nair, et Patel 1992). Néanmoins, ici n'ayant pas observé de modification de l'expression d'enzymes limitantes de la néoglucogenèse chez les souris ANP KO ce défaut de production serait plutôt attribuable à la diminution d'AG disponibles dans la circulation sanguine. Dans le foie des souris ANP KO, l'augmentation de l'expression de CD36, un transporteur d'AG, suggère un mécanisme compensatoire à la diminution d'utilisation des AG par le foie. Cette hypothèse est confortée par la diminution de la concentration plasmatique des corps cétoniques, eux aussi produits dans le foie à partir des AG libérés par le WAT, chez

les souris déficientes pour l'ANP. Pour les TG, une approche *in vivo* permettant d'observer la consommation de TG par le BAT, ou la production de TG hépatique au cours d'une exposition au froid chez des souris ANP KO et WT, pourrait élucider cette question. Nous avons amorcé les mises au point de ces techniques mais des expériences supplémentaires sont nécessaires. Une question qui émane de ces résultats est l'implication de l'activation directe du BAT versus celle de l'activation de la lipolyse du WAT par l'ANP dans la régulation de la thermogénèse, mais cette question sera abordée dans la discussion générale.

Après avoir démontré le rôle de l'ANP dans la thermogénèse sans frisson chez la souris, nous nous sommes demandé ce qu'il en était chez l'Homme. L'équipe de Wouter van Marken Lichtenbelt a réalisé une expérience au cours de laquelle l'activation du BAT d'individus exposés au froid ou non a été observée par [¹⁸F]FDG-PET scan (Vosselman et al. 2015). Nous avons, en collaboration avec eux, pu observer l'augmentation des niveaux plasmatiques d'ANP suite à une exposition au froid, grâce à l'utilisation des plasmas obtenus au cours de cette expérience. Il aurait été intéressant de regarder si une corrélation positive existe entre les niveaux plasmatiques d'ANP et l'activité du BAT chez ces individus mais nous n'avons pas pu avoir accès à ces données. Néanmoins nous montrons dans le WAT d'humains une corrélation positive entre l'expression du récepteur à l'ANP, GC-A, et l'expression de marqueurs d'adipocytes bruns et beiges impliqués dans le métabolisme oxydatif mitochondrial, la biogénèse mitochondriale ainsi que les métabolismes glucidiques et lipidiques. Ces résultats supportent un rôle de la signalisation ANP/GC-A dans les adipocytes thermogéniques humains. En accord avec les travaux de Sheila Collins réalisés sur des adipocytes humains hMADS, notre étude montre que l'ANP a la capacité d'activer le découplage mitochondrial ainsi que le programme thermogénique dans des cultures primaires d'adipocytes bruns et blancs humains. Cet effet équivaut à 50% de l'effet de la noradrénaline. Ces résultats pourraient être complétés par une analyse *in vivo* de l'effet d'une infusion d'ANP dans l'activation thermogénique des adipocytes chez l'Homme.

En résumé, cette étude révèle un nouvel activateur endocrine et physiologique de la thermogénèse sans frisson et de la fonction des adipocytes bruns chez la souris et l'Homme.

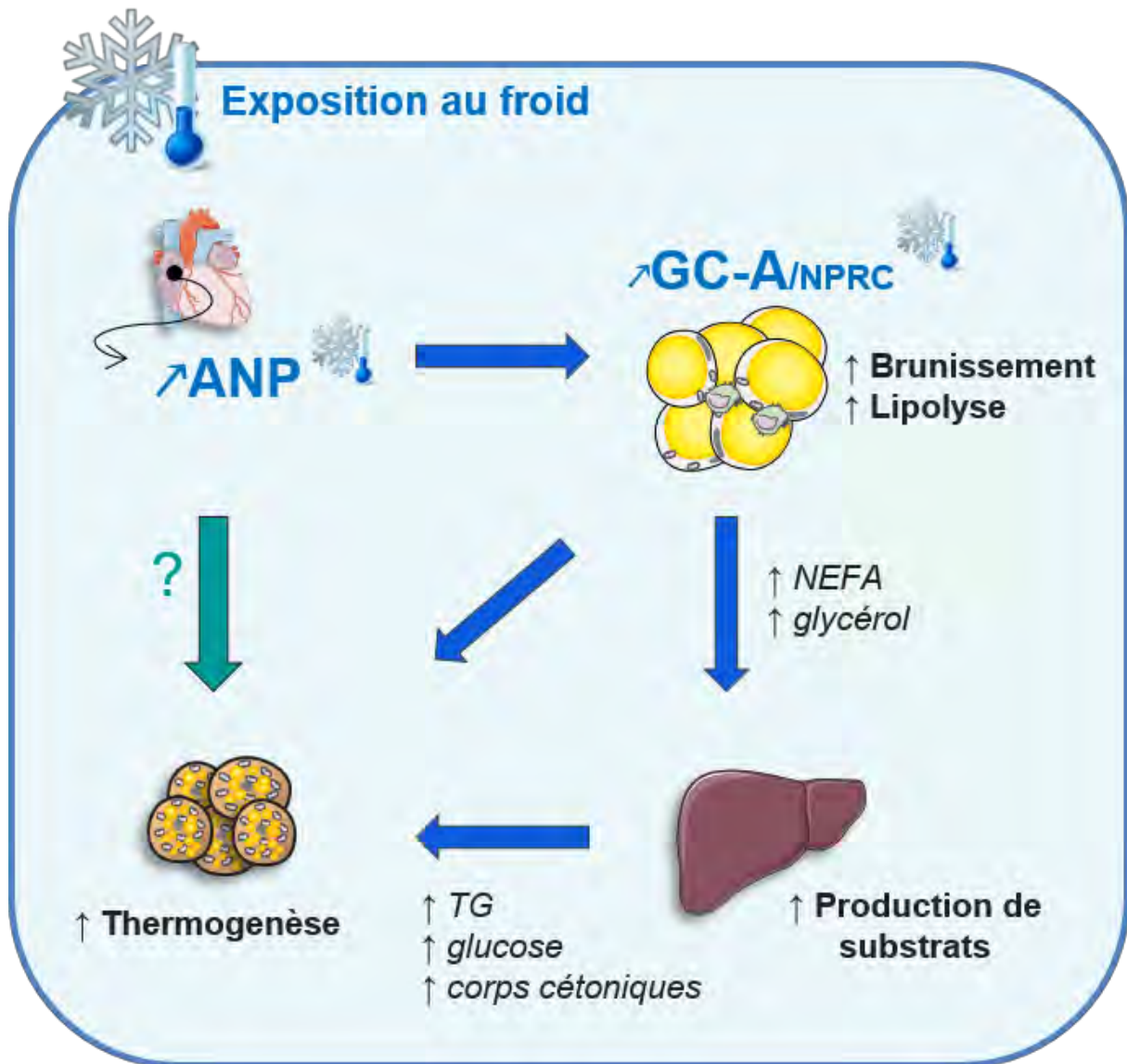


Figure 19 : L'ANP est un activateur endocrine de la thermogénèse sans frisson.

Une exposition au froid induit la sécrétion d'ANP et augmente le ratio de récepteurs GC-A/NPRC dans le WAT. L'ANP induit alors une augmentation du brunissement et de la lipolyse dans le WAT, permettant ainsi la production de substrats hépatiques et l'activation de la thermogénèse dans le BAT. Le rôle direct de l'ANP sur l'activation du BAT chez la souris n'a pas été démontré.

PARTIE II : Rôle du système ANP/GC-A dans le développement du diabète de type 2

I – Temps de jeûne optimal avant la réalisation d'un ITT chez la souris

Introduction

La souris est l'espèce la plus communément utilisée dans le cadre de la recherche préclinique portant sur la physiopathologie des maladies métaboliques. Afin que les études réalisées sur ces animaux apportent des informations pertinentes pour la compréhension de la physiopathologie humaine, les conditions expérimentales mises en œuvre doivent être adéquates. Dans l'étude du DT2, le test de tolérance à l'insuline (ITT) est l'approche expérimentale utilisée en première intention pour analyser la sensibilité systémique à l'insuline ou plutôt déterminer l'insulinorésistance des souris. Afin de diminuer la variabilité des paramètres physiologiques entre les souris avant la réalisation des tests métaboliques, celles-ci sont soumises à un jeûne qui consiste en l'absence de nourriture avec un accès à l'eau (Ayala et al. 2010; Jensen et al. 2013; McGuinness et al. 2009). Habituellement, les souris sont soumises à un jeûne toute la nuit, comme le sont les humains avant un test métabolique, ou bien à un jeûne de 6h, comme recommandé par le centre de phénotypage métabolique chez la souris à l'institut national de la santé (NIH). Cependant des études ont montré que des longues périodes de jeûne chez ces petits mammifères induisaient de profonds changements cataboliques et une perte de poids importante. **Le but de ce travail a été de déterminer le temps de jeûne minimal requis pour diminuer la variabilité des paramètres métaboliques entre les souris avant de réaliser un ITT tout en minimisant la perte de poids corporelle et les stress métaboliques engendrés.**

Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser des souris mâles C57Bl6/J, la souche la plus utilisée pour l'étude du métabolisme énergétique, et d'étudier l'effet d'un jeûne de 2h, 4h, 6h, 12h toute la nuit (12h ON) et 24h sur les paramètres physiologiques plasmatiques ainsi que les possibles altérations cataboliques engendrées dans le muscle squelettique et le foie.

Article 2

Reappraisal of the optimal fasting time for insulin tolerance tests in mice

Deborah Carper, Marine Coué, Claire Laurens, Dominique Langin and Cedric Moro

Molecular Metabolism, 42:101058, 31 Jul. 2020

doi: [10.1016/j.molmet.2020.101058](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101058)

Reappraisal of the optimal fasting time for insulin tolerance tests in mice



Deborah Carper^{1,2}, Marine Coué^{1,2}, Claire Laurens^{1,2}, Dominique Langin^{1,2,3}, Cedric Moro^{1,2,*}

ABSTRACT

Objective: Most studies routinely use overnight or 6 h of fasting before testing metabolic glucose homeostasis in mice. Other studies used empirically shorter fasting times (<6 h). We attempted to determine the shortest fasting time required for optimal insulin responsiveness while minimizing metabolic stress.

Methods: A course of fasting for up to 24 h (0, 2, 4, 6, 12, and 24 h) was conducted in C57Bl/6J male mice. Body weight, metabolic parameters, and insulin tolerance were measured in each experimental group. The organs were collected at the same time on separate occasions and glycogen and metabolic gene expression were measured in the liver and skeletal muscle.

Results: Our data show that blood glucose levels do not significantly change during a 6 h fast, while plasma insulin levels decrease to similar levels between 2 h and 6 h of fasting. During overnight (12 h) and 24 h fasts, a robust decrease in blood glucose and plasma insulin was observed along with a profound depletion in liver glycogen content. Insulin tolerance was comparable between baseline and 6 h fasts while 4 h and 6 h fasts were associated with a greater depletion of liver glycogen than 2 h fasts, impacting the glucose counter-regulatory response. Fasting induced progressive weight loss that was attenuated at thermoneutrality. Fasting longer than 4 h induced major body weight loss (>5%) and significant changes in catabolic gene expression in the liver and skeletal muscle.

Conclusion: Collectively, these data suggest that 2 h of fasting appears optimal for the assessment of insulin tolerance in mice as this duration minimizes major metabolic stress and weight loss.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords Fasting; Blood glucose; Insulin tolerance; Weight loss; Catabolic genes; Muscle atrophy

1. INTRODUCTION

Fasting is a common procedure used to reset metabolism and reduce variability in physiological parameters in experimental studies of mice [1,2]. Fasting refers to a state in which the animal is completely deprived of food but has ad libitum access to water. For instance, a primary screen to evaluate whether a treatment or genetic manipulation alters glucose homeostasis is the measurement of fasting glucose and insulin levels [3,4]. Fasting mice reduces the range of baseline glucose readings and can reveal significant differences between experimental groups that would not reach significance in non-fasted animals [1]. In larger species, animals are typically fasted overnight, as in humans, to obtain a more consistent baseline glucose concentration [5]. In mice, overnight fasting was routinely used prior to glucose tolerance tests and was recommended as a standard operating procedure until recently [6,7]. However, long periods of fasting in small mammals induce profound catabolic states and weight loss, particularly at housing temperatures below thermoneutrality [8]. In addition, although mice may eat up to 60% of their daily food intake at night, they usually nibble

throughout the day and rarely undergo a true fast to maintain a constant body core temperature and avoid torpor. Therefore, daytime fasting likely produces profound changes in mouse physiological parameters and behavior. Shorter fasting times are now considered more physiological to reduce metabolic stress in mice. Consequently, 6-h fasts were recommended by the National Institute of Health Mouse Metabolic Phenotyping Center (MMPC) Consortium in 2010 to conduct metabolic tests of glucose homeostasis in mice [3]. Since then, 6-h fasts have been widely and routinely used by most investigators in the field of metabolism to determine whether fasting glucose levels fall within a normal range. Other investigators used empirically shorter fasting times (2–5 h) [9,10]. To the best of our knowledge, no study has yet determined the shortest optimal fasting time required to conduct insulin tolerance tests while minimizing the impact on metabolic parameters and body weight in mice. The purpose of this study was to more exhaustively describe the metabolic impact of fasting during a 24 h course in young lean mice. Our data indicate that a short fasting duration such as 2 h should be recommended prior to conducting insulin tolerance tests in mice to minimize metabolic stress and weight loss.

¹Inserm, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France ²University of Toulouse, Paul Sabatier University, France ³Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

*Corresponding author. Inserm, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, CHU Rangueil, BP84225, 1 Avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Fax: +33 561 32 5623. E-mail: Cedric.Moro@inserm.fr (C. Moro).

Received June 8, 2020 • Revision received July 23, 2020 • Accepted July 28, 2020 • Available online 31 July 2020

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101058>

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Mice

All of the experimental procedures were approved by our institutional animal care and use committee CEEA122 (protocol# 2016122311033178) and conducted according to Inserm guidelines and the 2010/63/UE European Directive for the care and use of laboratory animals. Three-month-old male C57BL/6J mice were housed at room temperature (21 °C) in a pathogen-free barrier facility (12 h light/dark cycles) and fed a standard chow diet (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany). A first cohort of mice (cohort 1) was randomly assigned to 6 experimental groups ($n = 5$ per group): 0 not fasted, 2 h fast (2), 4 h fast (4), 6 h fast (6), 12 h overnight fast (12N), and 24 h fast (24). The entire protocol started at 7 a.m. on one day and ended at 7 a.m. on the following day except for the 12N group, which was starved overnight from 7 p.m. to 7 a.m. The mice were investigated in two experimental sessions: one session to assess body weight and conduct the ITT, and one week later, another session for blood measurements and organ collection. Two other mice cohorts (cohort 2, $n = 6$, and cohort 3, $n = 5$) were not fasted and used for longitudinal measures of blood glucose and ketones, plasma triglycerides, glycerol, NEFA, insulin, and body weight at the exact same times of the day (7 a.m., 9 a.m., 11 a.m., 1 p.m., and 7 p.m.) as cohort 1 to assess the potential variability and daytime circadian rhythm of the measured parameters (Supplementary Figures 1 and 3). A fourth cohort (cohort 4) of mice was acclimated at thermoneutrality in a chamber with controlled ambient temperature at 30 °C for 1 week and then used for longitudinal measures of body weight, blood glucose, and blood ketones during the same course of fasting as cohort 1.

Following decapitation, blood was collected into EDTA tubes containing protease inhibitors. Tissues were rapidly excised, weighted, and snap frozen in liquid nitrogen before being stored at -80 °C.

2.2. Insulin tolerance test

The mice were injected intraperitoneally with a bolus of 0.5 U/kg insulin (NovoRapid 100 IU/ml) as previously described [11]. Blood glucose levels were monitored from the tip of the tail vein with a glucometer (Accu-Chek; Roche, Meylan, France) 0, 15, 30, 45, and 60 min after injection.

2.3. Blood measurements

Blood glucose was measured using a glucometer (Accu-Chek; Roche, Meylan, France) and the blood ketone level was measured using a blood β -ketone body meter (Freestyle Optium H meter, Abbot) from the tip of the tail vein. Plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA), glycerol was measured by enzymatic assays (Free Glycerol reagent, Sigma), and non-esterified fatty acids (NEFA), and triglycerides (TG) were measured using a NEFA C kit (Wako) and TG reagent (Sigma), respectively.

2.4. Real-time RT-qPCR

Total RNA from tissue was isolated using a Qiagen RNeasy kit (Qiagen, GmbH Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The RNA quantity was determined on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Reverse-transcriptase PCR was conducted using the MultiScribe Reverse Transcriptase method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed in duplicate using a ViiA 7 real-time PCR system (Applied Biosystems). All of the expression data were normalized by

the $2(-\Delta Ct)$ method using 18S as a housekeeping gene. For TaqMan chemistry, the primers used were 18S (TaqMan assay ID: Hs99999901_s1), *Bnip3* (TaqMan assay ID: Mm01275600_g1), *MyoD1* (TaqMan assay ID: Mm00440387_m1), and *Pck1* (TaqMan assay ID: Mm00440636_m1). The SYBR chemistry primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

2.5. Determination of total glycogen

Liver and *tibialis anterior* muscle samples were weighed and homogenized in acetate buffer (0.2 M and pH 4.8). After centrifuging the samples at 12,000 g for 10 min, supernatant was transferred into clean tubes and divided in two aliquots. An aliquot of each homogenate was mixed with amyloglucosidase (Sigma) and incubated at 55 °C for 15 min. The other was mixed with water and incubated at 4 °C for 15 min. The glucose content was determined using a spectrophotometer. The samples were analyzed in duplicate, and the results were determined as μg of glycogen per mg tissue.

2.6. Statistical analyses

All of the statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 8.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Normal distribution and homogeneity of data variance were tested using Shapiro–Wilk and F tests, respectively. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests were conducted to determine differences between groups. Two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc tests were used when appropriate. All of the values in the figures are presented as means \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Influence of fasting on glucose homeostasis

Fasting up to 6 h did not significantly change blood glucose levels (Figure 1A) while reducing plasma insulin levels by $\sim 50\%$ ($p = 0.01$) (Figure 1B). Blood glucose variability decreased during 2, 6, 12N, and 24 h fasts (SD = 12.4 at 0 h, SD = 7.1 at 2 h, SD = 8.9 at 6 h, SD = 9.6 at 12N, and SD = 5.0 at 24 h). The plasma insulin level during 0 h fasting (7 a.m.) was 0.71 ± 0.08 ng/ml and rapidly decreased to $\sim 0.33 \pm 0.09$ ng/ml within 2 h of fasting ($p = 0.007$) (Figure 1B). Long-term fasting for 12 and 24 h markedly lowered blood glucose (Figure 1A) and plasma insulin (-70% compared to baseline levels) (Figure 1B). These changes could not be attributed to circadian rhythm as blood glucose levels measured throughout the day in the non-fasted mice did not significantly change (Supplementary Figure 1A). The ability of insulin to lower blood glucose, that is, insulin responsiveness, assessed during an insulin tolerance test (ITT) was similar between 0, 2, 4, and 6 h fasts, particularly during the first 15 min (Figure 1C). Blood glucose levels decreased by approximately 20–25% during this first phase in the four experimental groups (Figure 1D and E). However, blood glucose levels remained significantly lower at 60 min after insulin injection in the 6 h fast group (Figure 1C and D). In contrast, blood glucose levels during the ITT were dramatically lower in the 12N and 24 h groups (Figure 1C), and insulin responsiveness was impaired in these two groups compared to the 6 h fast (Figure 1E–F).

3.2. Influence of fasting on liver metabolism

We next investigated the impact of the fasting duration on the liver glycogen content. We observed a time-dependent depletion of liver

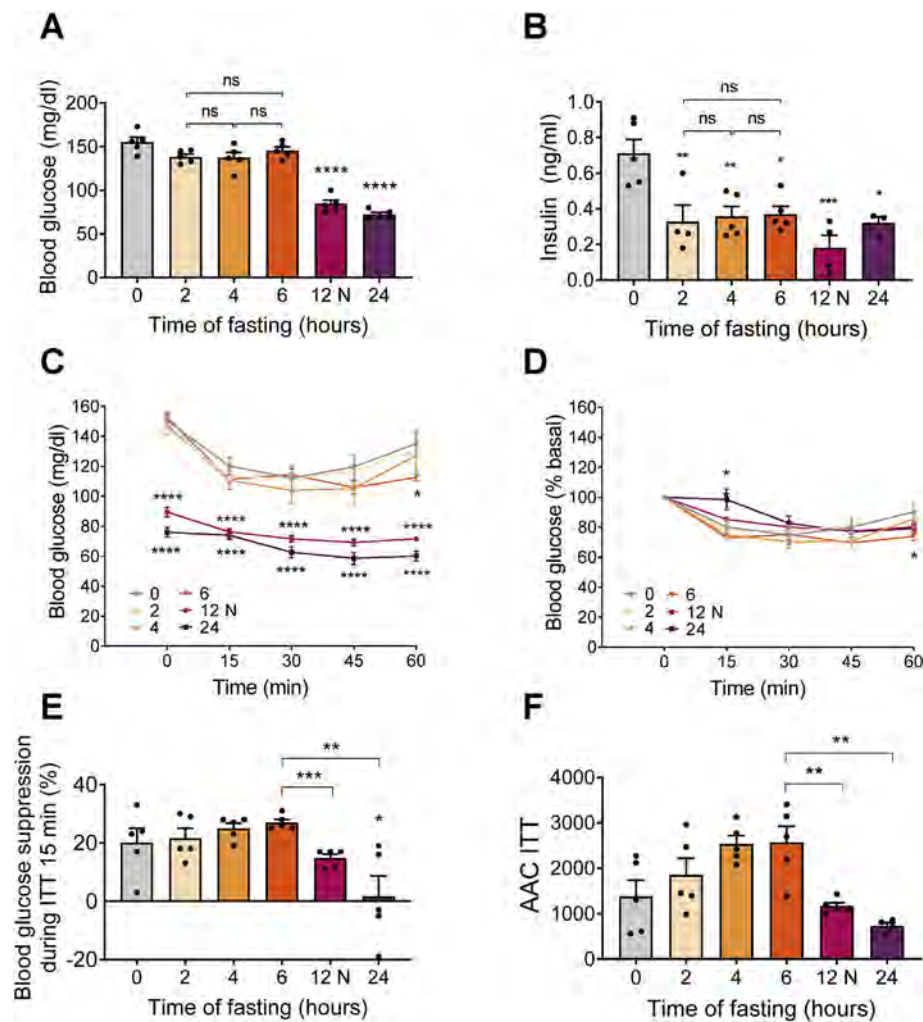


Figure 1: Blood glucose (A) and insulin (B) levels in the mice after 0, 2, 4, 6, 12N, and 24 h of fasting. Blood glucose (C) and changes in the blood glucose (D) levels in the mice fasted for 0, 2, 4, 6, 12N, or 24 h during an ITT. Blood glucose suppression at 15 min of the ITT (E) and the area above the curve (AAC) of the ITT (F) during fasting. ($n = 5/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs time point 0.

glycogen content starting at 4 h fasting and maximal at 12 h (Figure 2A). At 2 h fasting, liver glycogen was not significantly different from baseline. There was a 44% depletion in the liver glycogen content at 6 h fast that reached a steady state at 12 h fast with an 81% depletion of the total glycogen pool in the liver at 12N and 24 h fasts (Figure 2B). Notably, there was a strong positive correlation between the liver glycogen content and blood glucose (Supplementary Figure 1B) and insulin (Supplementary Figure 1C) levels. Interestingly, this considerable liver glycogen depletion was associated with an upregulation of liver *Pck1* gene expression at 12N and 24 h fasts that reached statistical significance at 24 h fast (Figure 2C). No significant change in liver *G6pc* gene expression was noted (Figure 2D). In contrast, we observed a significant upregulation of liver *Ppara* (Figure 2E) and *Cpt1a* (Figure 2F) mRNA levels from 6 h fast onward. This was accompanied by an upregulation of *Bdh1* mRNA levels (Supplementary Figure 2A), the rate-limiting enzyme of β -hydroxybutyrate production, and a time-dependent upregulation of the PPAR α -responsive hepatokine *Fgf21* (Supplementary Figure 2B), both reaching statistical significance at 12N and 24 h fasts. This occurred in light of no significant change in the liver *Cd36* (Supplementary Figure 2C) and *Lpl* (Supplementary Figure 2D) mRNA levels.

Interestingly, liver *Ppara* gene expression was strongly correlated with the total liver glycogen content (Supplementary Figure 2E).

3.3. Fasting induces robust weight loss and metabolic changes at room temperature

Fasting induced a time-dependent weight loss that reached ~10% at 12N and ~14% at 24 h fasts (Figure 3A–B). At 2 h fasting, there was already a significant although moderate (3.5%) body weight loss (Figure 3B). At 6 h fast, body weight loss (5.5%) was significantly higher than at 2 h fast (Figure 3B). In parallel to body weight changes, there were profound changes in systemic lipid metabolism. Increased circulating NEFA levels were observed after 2 h, 12 h, and 24 h fasting (Figure 3C). Interestingly, plasma NEFA levels were strongly inversely correlated to the total liver glycogen content (Supplementary Figure 3). Similarly, fasting augmented circulating glycerol levels from 2 h onward, although it did not reach statistical significance at 6 h fast (Figure 3D). Consistent with the upregulation of *Ppara* (Figure 2E) and other lipid metabolism genes in the liver (Figure 2F and Supplementary Figure 2), we noted a robust 3-fold induction of circulating ketone body levels at 12N and 24 h fasts (Figure 3F), consistent with the observed upregulation of liver *Bdh1* at 12N and 24 h (Supplementary Figure 2A).

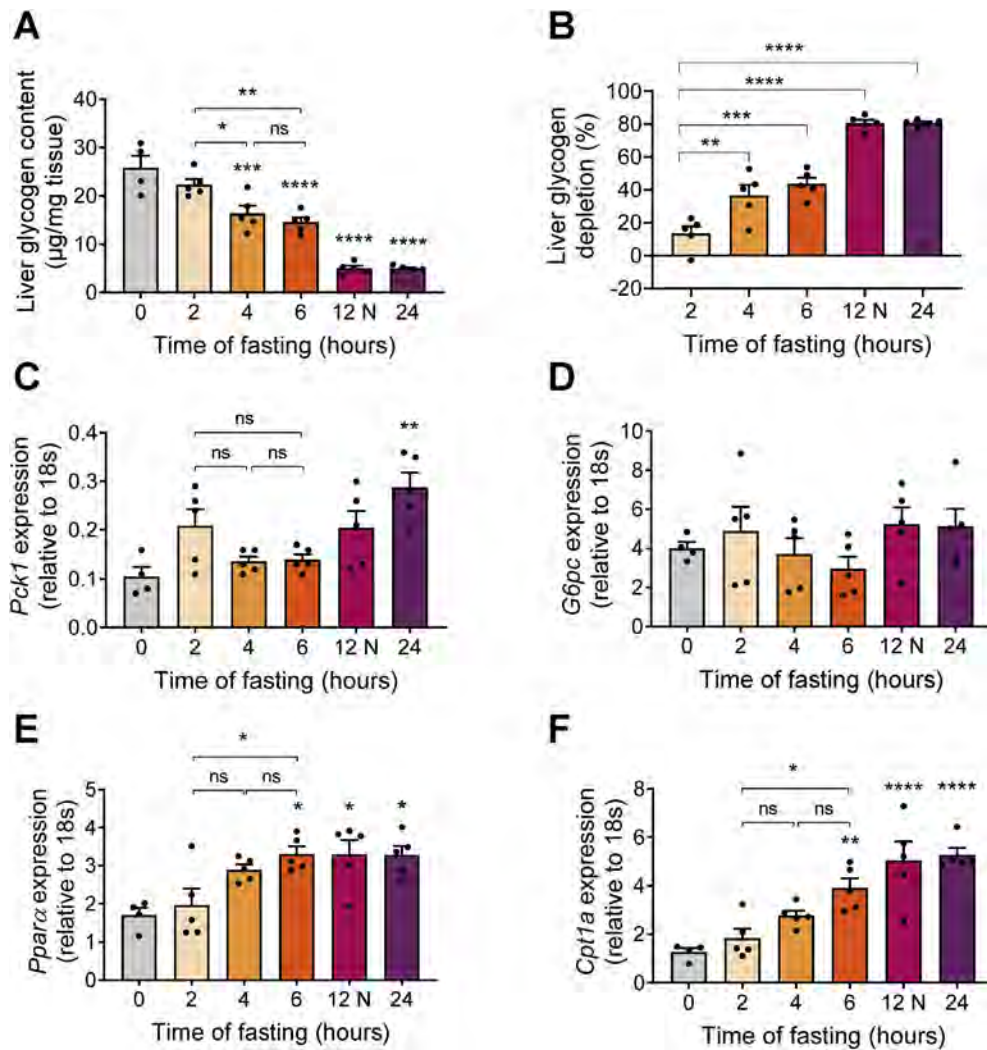


Figure 2: Total liver glycogen content in the mice after 0, 2, 4, 6, 12N, and 24 h of fasting (A) and liver glycogen depletion at 2, 4, 6, 12N, or 24 h relative to 0 (B). Relative *Pck1* (C), *G6pc* (D), *Pparα* (E), and *Cpt1a* mRNA expression the in liver of the mice after 0, 2, 4, 6, 12N, or 24 h of fasting. ($n = 5/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs time point 0.

Importantly, body weight (Supplementary Figure 4A) measured in the non-fasted mice in cohorts 2 and 3 did not significantly change throughout the day. Blood ketone levels were slightly elevated at 1 p.m. but remained within a low physiological range (<0.4 mM) (Supplementary Figure 4B). Similar to body weight, plasma NEFA (Supplementary Figure 4C), glycerol (Supplementary Figure 4D), triglycerides (Supplementary Figure 4E), and insulin (Supplementary Figure 4F) did not change throughout the day. We also noticed that 12 h overnight fasting (12N) induced a greater percentage of weight loss than 12 h of daytime fasting (9.94 ± 0.77 vs $6.12 \pm 0.49\%$, $p = 0.0031$ for 12N and 12D, respectively).

3.4. Fasting-induced weight loss is attenuated at thermoneutrality

Because mice must constantly fight against thermal stress to maintain a constant body core temperature, we hypothesized that fasting-induced weight loss and metabolic stress would be minimized at thermoneutrality. In the mice housed at room temperature, we observed a time-dependent weight loss both in absolute terms (Figure 4A) and percentages (Figure 4B). Blood glucose (Figure 4C) and ketones (Figure 4D) decreased with fasting and followed a similar

pattern as in the mice housed at room temperature. However, blood glucose variability remained greater at each time point compared to room temperature (SD = 17.4 at 0 h, SD = 20.4 at 2 h, SD = 21.7 at 4 h, SD = 15.4 at 6 h, SD = 10.3 at 12N, and SD = 14.7 at 24 h). Importantly, in agreement with our hypothesis, both the absolute (Figure 4D) and percentage of body weight loss (Figure 4E) were significantly lower in the mice housed at thermoneutrality.

3.5. Fasting activates atrophy signaling and promotes muscle atrophy

Since we observed significant muscle atrophy and reduction in the soleus muscle mass at 12N and 24 h fasts (Supplementary Figure 5A), we investigated the impact of the fasting duration on skeletal muscle mass and atrophy. This was related to a marked upregulation of major atrophy genes such as *Murf1* (Figure 5A and Supplementary Figure 5B) and *Atrogin-1* (Figure 5B and Supplementary Figure 5C) after 12N and 24 h fasts. *Actrb2b*, a gene involved in hypertrophy, was down-regulated by fasting from 2 h onward, although it reached statistical significance only at 4 h fast (Figure 5C and Supplementary Figure 5D). In addition, *Bnip3* and *Drp1*, two genes involved in autophagy and

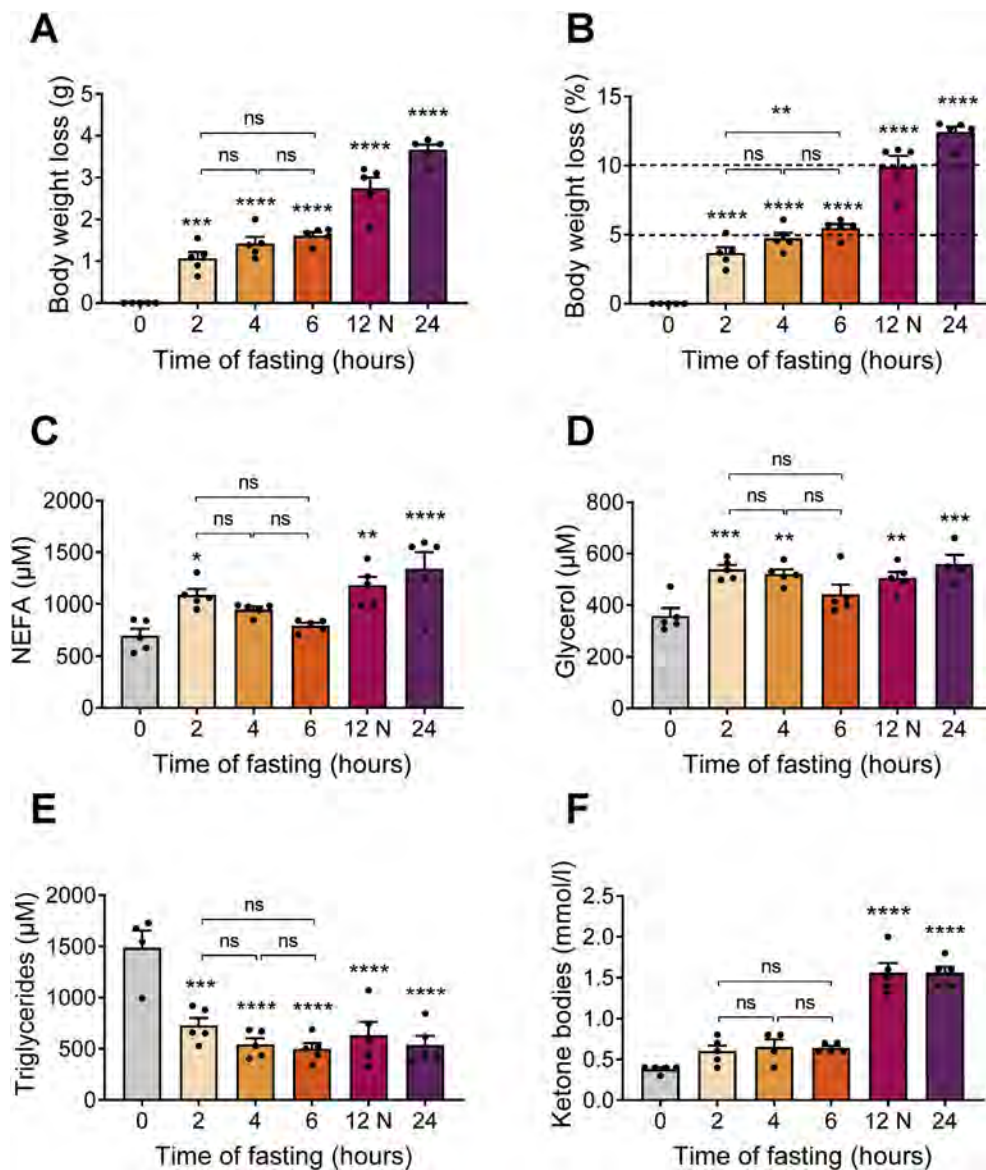


Figure 3: Body weight loss (A) and percentage of body weight loss (B) of the mice after 0, 2, 4, 6, 12N, or 24 h of fasting. Plasma NEFA (C), glycerol (D), triglycerides (E), and ketone (F) levels of the mice during fasting. ($n = 5/\text{group}$). All of the measurements were conducted in the mice housed at normal room temperature (21 °C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs time point 0.

mitochondrial fission, respectively, were upregulated after 12N and 24 h fasts (Figure 5D–E and Supplementary Figure 5E). More strikingly, we observed a rapid and robust suppression of *MyoD1*, a key transcription factor of myogenesis, mRNA levels after 4 h of fasting and onward (Figure 5F and Supplementary Figure 5F). Consistent with the marked metabolic stress and muscle atrophy, we also observed a significant downregulation in the total muscle glycogen content at 12N and 24 h fasts (Supplementary Figure 6).

4. DISCUSSION

Fasting is widely used in metabolic research to reduce variability of various physiological readouts such as blood glucose levels in mice [1,3,12,13]. However, unlike in humans, small mammals such as mice have large body surface area and constantly fight to maintain a constant body core temperature when they are housed below

thermoneutrality [14]. Consequently, mice are very sensitive to food deprivation even during the daytime despite the common belief that mice eat mostly during the night. This study demonstrated that the widely and routinely used 6 h fast model prior to assessing glucose homeostasis in mice induces major metabolic stress and weight loss (>5%) that significantly alters mice physiology and is a major frailty factor [15]. The major difference between humans and mice is that humans reduce their blood glucose levels and variability after an overnight fast of 12 h in the absence of measurable weight loss. Thus, using anthropomorphism, researchers have extrapolated this to mice. However, mice exhibit higher metabolic rates than humans to maintain eutheria. This species difference renders mice highly susceptible to fasting, and as reported in our study, 12 h fasting provokes major weight loss (~10%) and catabolic processes in the liver and skeletal muscles. This metabolic stress is inevitably associated with induction of muscle atrophy and profound changes in systemic lipid metabolism,

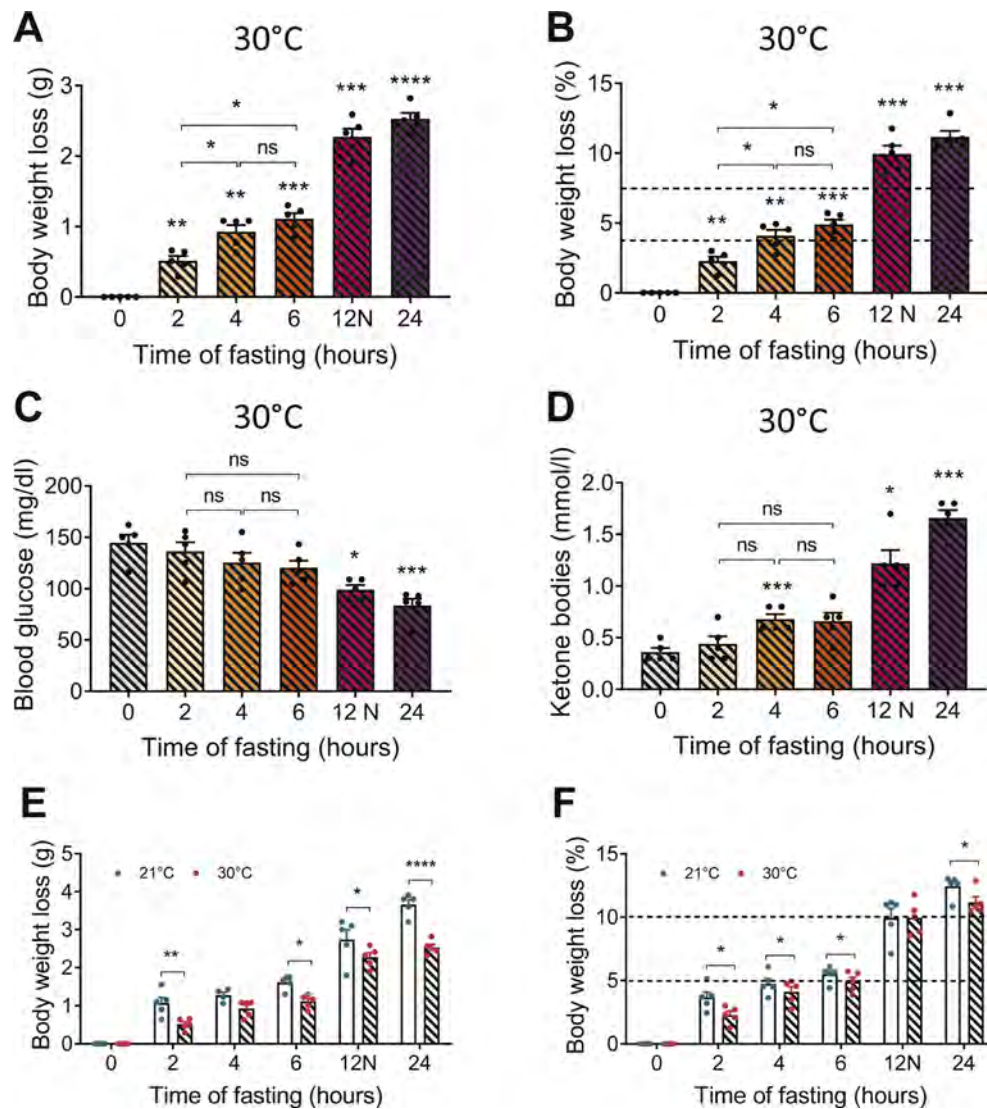


Figure 4: Body weight loss (A), percentage of body weight loss (B), blood glucose (C), and blood ketone bodies (D) were measured in the mice after 0, 2, 4, 6, 12N, or 24 h of fasting ($n = 5/\text{group}$). All of the measurements were conducted in the mice housed at thermoneutrality (30 °C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs time point 0. Body weight loss (E) and percentage of body weight loss (F) were compared in the mice housed at 21 °C vs 30 °C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$ vs 21 °C.

severely hindering insulin tolerance. Therefore, fasting longer than 4 h prior to investigating glucose homeostasis in mice is not physiological and should be proscribed. Thus, a 2 h fast minimizes weight loss and should be used prior to conducting insulin tolerance tests to maximize research results and attenuate the discomfort of mice to ensure greater animal welfare.

Our data show that fasting rapidly downregulated plasma insulin levels by approximately 40% within 2 h of fasting to maintain steady blood glucose levels. The plasma insulin levels at 0 h fast (7 a.m.) were already approximately half of those classically found in the fed mice (>1 ng/ml) [16]. This was paralleled by a time-dependent depletion of liver glycogen reflecting an elevated rate of hepatic glucose output during fasting to maintain steady blood glucose levels [17]. It is reasonable to posit that the observed sustained decrease in blood glucose levels at 12 h overnight and 24 h fasts was directly related to robust liver glycogen depletion (>80%), since mice genetically engineered to maintain high liver glycogen content during 36 h fasts are capable of maintaining their blood glucose levels within a normal

physiological range despite significant weight loss [16]. Since the decrease in circulating insulin during fasting derepresses *Pck1* expression through Foxo1 in the liver [17,18], we observed an increase in liver *Pck1* expression at 12N and 24 h fasts. Although *G6pc* is also considered an insulin-regulating gene in the liver, we did not observe significant changes in liver *G6pc* mRNA levels during fasting. PPAR α , a nuclear hormone receptor activated by FA, is a transcription factor that is central to the metabolic shift from glucose to fat utilization initiated by fasting [19,20]. Upon activation of PPAR α , FA oxidation is stimulated and increased amounts of acetyl-CoA are produced. A large proportion of acetyl-CoA derived from FA β -oxidation is utilized for ketogenesis [21]. Liver *Ppara* and *Cpt1a* mRNA levels were significantly upregulated from 6 h fasting onward, thus reflecting a major metabolic switch occurring in the liver to activate FA β -oxidation and ketogenesis [19]. The metabolic switch was also visible at the systemic level with a rapid induction of whole-body lipolysis reflected by elevated circulating levels of NEFA and glycerol within 2 h of fasting. More strikingly, we noted a rapid and sustained reduction in circulating TG levels after 2 h

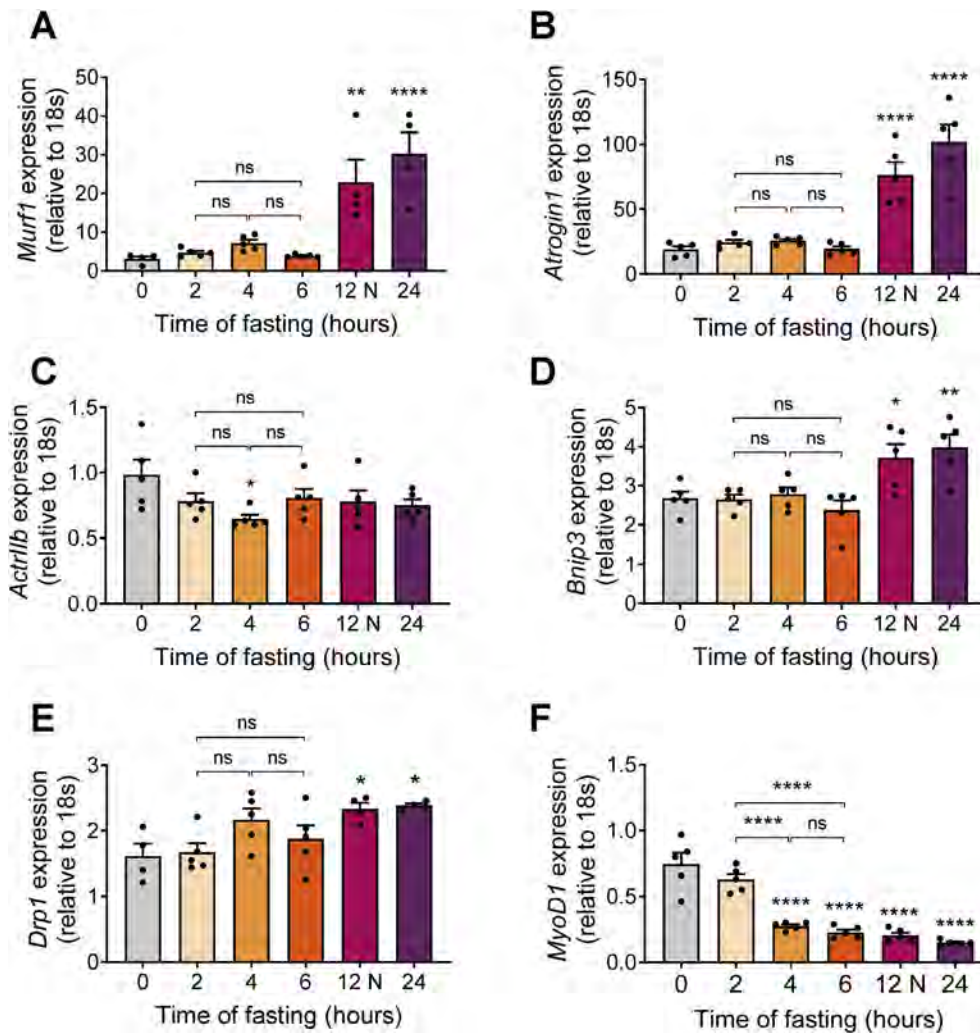


Figure 5: Relative *Murf1* (A), *Atrogin1* (B), *Actr11b* (C), *Bnip3* (D), *Drp1* (E), and *MyoD1* (F) mRNA expression in the *tibialis anterior* muscles of the mice after 0, 2, 4, 6, 12N, or 24 h of fasting. ($n = 5/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$ vs time point 0.

of fasting, possibly due to substantial uptake by peripheral organs through lipoprotein lipase [22]. Consistent with liver activation of *Ppara*, *Cpt1a*, and *Bdh1*, circulating levels of ketone bodies increased by >3-fold after 12 h of fasting. Ketone bodies such as β -hydroxybutyrate can be used as fuel by a number of peripheral organs to spare glucose utilization during fasting [23].

Although fasting expectedly promoted a metabolic switch in the liver and at the systemic level, it inevitably induced substantial weight loss. Thus, mice are very sensitive to food deprivation even during the daytime and particularly at temperatures below thermoneutrality [8]. To maintain a constant body core temperature, mice must nibble throughout the day, even during the daytime. In line with this, our data showed that the mice housed at thermoneutrality lost less weight in response to fasting than the mice housed at room temperature. Indeed, when investigating the mice feeding patterns over 24 h, it was found that mice had an average of 36 food bouts during one day and night, each lasting approximately 3 min. The average interval between food bouts was 34 min [24]. In addition, fed mice maintained at thermoneutrality at 30 °C ate approximately 50% less than mice kept at 23 °C, suggesting that mice exhibit high metabolic rates under standard animal care facility temperatures [8]. Consistent with these studies, our data showed that the non-fasted mice housed at room

temperature in our animal care facility (21 °C), therefore under thermal stress, had very stable body weights across the photophase (daytime) from 7 a.m. to 7 p.m. This finding suggests that mice eat during the daytime to maintain a stable body weight and defend their body core temperature. In contrast, due to their high metabolic rate and need to maintain eutheria under thermal stress, mice experience rapid and profound weight loss during fasting. In line with other studies [3,25], we demonstrated that lean mice experience major weight loss within 6 h of fasting that reached an ethical limit of 10% weight loss after 12 h overnight fasting. In addition to a major metabolic switch observed in the liver and at the systemic level, one detrimental effect of fasting is also the loss of lean body mass and particularly skeletal muscle mass. Skeletal muscle is a key insulin-sensitive tissue that can contribute up to 85% of glucose disposal in response to insulin stimulation [26]. In this study, we found that both 12 h overnight and 24 h fasting were associated with a significant loss of muscle mass and blunted insulin responsiveness. A downregulation in total muscle glycogen content at the same time points likely contributed to water loss and muscle mass loss. In addition, muscle wasting occurs as a physiological response to fasting triggered by low insulin levels in which the loss of muscle proteins primarily results from increased degradation of cell proteins [27]. Two major protein degradation pathways, the ubiquitin-

proteasome and autophagy-lysosome systems, are activated during muscle atrophy and variably contribute to loss of muscle mass [28]. Fasting for 12 h and 24 h promotes robust induction of *Atrogin-1* and *Murf-1*, two key canonical genes encoding E3-ubiquitin ligases involved in muscle atrophy in a variety of pathophysiological states [29,30]. Fasting also induces a weaker transcriptional induction of *Bnip3*, a key player in autophagy, and *Drp1*, a major player in mitochondrial fission, after 12 h and 24 h of fasting. Muscle atrophy primarily involves a loss of intracellular and myofibrillar proteins [30,31]. Among these, myosin-related proteins and myogenic factors such as *MyoD1* have been identified as atrogin-1 targets [29]. Food deprivation was associated with the rapid suppression of myogenic transcription factor *MyoD1*, which plays a major role in muscle differentiation and the transcriptional activation of heavy and light myosin chains [32]. For practical reasons inherent to experimental research, the fasting was conducted during the daytime and the mice were investigated at varying times throughout the day. Although this could influence data outcomes as reported in humans with early vs late time-restricted feeding studies [33–35], our data support the hypothesis that fasting induces greater time-dependent weight loss and metabolic stress if started at night when mice eat the majority of their daily food. In this study, we investigated lean chow diet-fed mice while high fat diet-fed mice are typically used in metabolic research to assess insulin sensitivity and susceptibility to type 2 diabetes. Based on previous reports summarized in [1], body weight loss appears more dependent on fasting time than initial body weight in mice. Thus, our observations could be extrapolated to obese HFD-fed mice.

5. CONCLUSION

Collectively, our data demonstrated that laboratory mice, in contrast with humans, experience rapid and time-dependent weight loss during fasting. We showed that the widely and routinely used 6 h fast model prior to assessing glucose homeostasis is sub-optimal due to major weight loss (>5%) and liver glycogen depletion. Thus, 2 h of fasting during the photophase period should be conducted prior to assessing insulin responsiveness in mice to minimize metabolic stress induced by weight loss. We believe that these findings will maximize the scientific outcomes of experimental studies carried out in mice while ensuring greater animal welfare.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Xavier Sudre and his staff at the animal care facility. D.C. is supported by a PhD fellowship from Inserm/Occitanie Region. This study was supported by grants from the National Research Agency (ANR-12-JSV1-0010-01), Francophone Society of Diabetes, European Federation for the Study of Diabetes/MSD (to C.M.), and Occitanie Region (CLE Obelip and Dialogue programs to D.L.). D.L. is a member of the University Institute of France.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101058>.

REFERENCES

- [1] Jensen, T.L., Kiersgaard, M.K., Sørensen, D.B., Mikkelsen, L.F., 2013. Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals* 47(4):225–240.
- [2] Ellacott, K.L.J., Morton, G.J., Woods, S.C., Tso, P., Schwartz, M.W., 2010. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metabolism* 12(1):10–17.
- [3] Ayala, J.E., Samuel, V.T., Morton, G.J., Obici, S., Croniger, C.M., Shulman, G.I., et al., 2010. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms* 3(9–10):525–534.
- [4] Ayala, J.E., Bracy, D.P., McGuinness, O.P., Wasserman, D.H., 2006. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 55(2):390–397.
- [5] Di Francesco, A., Di Germanio, C., Bernier, M., de Cabo, R., 2018. A time to fast. *Science (New York, N.Y.)* 362(6416):770–775.
- [6] Marsden, P.D., Hagstrom, J.W., 1968. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in beagle puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation on the course of the infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62(6):816–824.
- [7] Yamazaki, K., Yasuda, N., Inoue, T., Yamamoto, E., Sugaya, Y., Nagakura, T., et al., 2007. Effects of the combination of a dipeptidyl peptidase IV inhibitor and an insulin secretagogue on glucose and insulin levels in mice and rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320(2):738–746.
- [8] Fischer, A.W., Cannon, B., Nedergaard, J., 2018. Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: an experimental study. *Molecular Metabolism* 7:161–170.
- [9] Laurens, C., Louche, K., Sengenès, C., Coue, M., Langin, D., Moro, C., et al., 2016. Adipogenic progenitors from obese human skeletal muscle give rise to functional white adipocytes that contribute to insulin resistance. *International Journal of Obesity* 40(3):497–506.
- [10] Benhamed, F., Denechaud, P.-D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., et al., 2012. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* 122(6):2176–2194.
- [11] Laurens, C., Badin, P.-M., Louche, K., Mairal, A., Tavernier, G., Marette, A., et al., 2016. G0/G1 Switch Gene 2 controls adipose triglyceride lipase activity and lipid metabolism in skeletal muscle. *Molecular Metabolism* 5(7):527–537.
- [12] Andrikopoulos, S., Blair, A.R., Deluca, N., Fam, B.C., Proietto, J., 2008. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295(6):E1323–E1332.
- [13] McGuinness, O.P., Ayala, J.E., Laughlin, M.R., Wasserman, D.H., 2009. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297(4):E849–E855.
- [14] Cannon, B., Nedergaard, J., 2011. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology* 214(Pt 2):242–253.
- [15] Martínez de Toda, I., Garrido, A., Vida, C., Gomez-Cabrera, M.C., Viña, J., De la Fuente, M., 2018. Frailty quantified by the “Valencia Score” as a potential predictor of lifespan in mice. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 73(10):1323–1329.
- [16] López-Soldado, I., Bertini, A., Adrover, A., Duran, J., Guinovart, J.J., 2020. Maintenance of liver glycogen during long-term fasting preserves energy state in mice. *FEBS Letters* 594(11):1698–1710.
- [17] Mittelman, S.D., Fu, Y.Y., Rebrin, K., Steil, G., Bergman, R.N., 1997. Indirect effect of insulin to suppress endogenous glucose production is dominant, even with hyperglucagonemia. *Journal of Clinical Investigation* 100(12):3121–3130.
- [18] Bergman, R.N., Iyer, M.S., 2017. Indirect regulation of endogenous glucose production by insulin: the single gateway hypothesis revisited. *Diabetes* 66(7):1742–1747.

- [19] Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *Journal of Clinical Investigation* 103(11):1489–1498.
- [20] Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., et al., 2016. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 65(7):1202–1214.
- [21] Paumelle, R., Haas, J.T., Hennuyer, N., Baugé, E., Deleze, Y., Mesotten, D., et al., 2019. Hepatic PPAR α is critical in the metabolic adaptation to sepsis. *Journal of Hepatology* 70(5):963–973.
- [22] Kersten, S., 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841(7):919–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbailp.2014.03.013>.
- [23] Newman, J.C., Verdin, E., 2014. β -hydroxybutyrate: much more than a metabolite. *Diabetes Research and Clinical Practice* 106(2):173–181.
- [24] Gannon, K.S., Smith, J.C., Henderson, R., Hendrick, P., 1992. A system for studying the microstructure of ingestive behavior in mice. *Physiology & Behavior* 51(3):515–521.
- [25] Sokolović, M., Wehkamp, D., Sokolović, A., Vermeulen, J., Gilhuijs-Pederson, L.A., van Haften, R.I.M., et al., 2007. Fasting induces a biphasic adaptive metabolic response in murine small intestine. *BMC Genomics* 8:361.
- [26] DeFronzo, R.A., Tripathy, D., 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32(Suppl 2):S157–S163. <https://doi.org/10.2337/dc09-S302>.
- [27] Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 1996. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *New England Journal of Medicine* 335(25):1897–1905.
- [28] Sandri, M., 2013. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(10):2121–2129.
- [29] Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., et al., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, N.Y.)* 294(5547):1704–1708.
- [30] Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., Goldberg, A.L., 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(25):14440–14445.
- [31] Jagoe, R.T., Lecker, S.H., Gomes, M., Goldberg, A.L., 2002. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(13):1697–1712.
- [32] Berkes, C.A., Tapscott, S.J., 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16(4–5):585–595.
- [33] Carlson, O., Martin, B., Stote, K.S., Golden, E., Maudsley, S., Najjar, S.S., et al., 2007. Impact of reduced meal frequency without caloric restriction on glucose regulation in healthy, normal-weight middle-aged men and women. *Metabolism: Clinical and Experimental* 56(12):1729–1734.
- [34] Moro, T., Tinsley, G., Bianco, A., Marcolin, G., Pacelli, Q.F., Battaglia, G., et al., 2016. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *Journal of Translational Medicine* 14(1):290.
- [35] Sutton, E.F., Beyl, R., Early, K.S., Cefalu, W.T., Ravussin, E., Peterson, C.M., 2018. Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes. *Cell Metabolism* 27(6):1212–1221 e3.

1 **Supplementary Information**

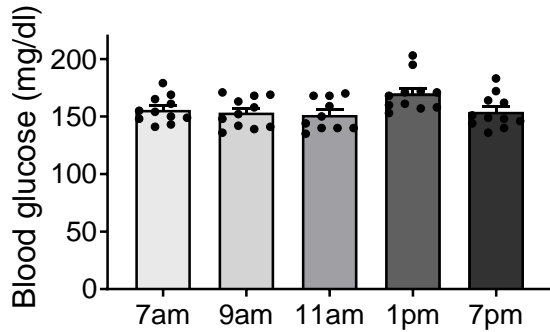
2

3 **Reappraisal of the optimal fasting time for insulin tolerance tests in mice**

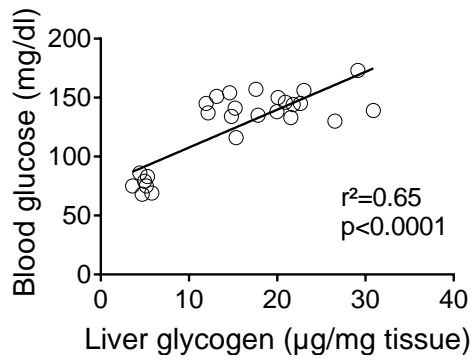
4 Deborah Carper, Marine Coué, Claire Laurens, Dominique Langin and Cedric Moro

5 **Supplementary Figures Legend**

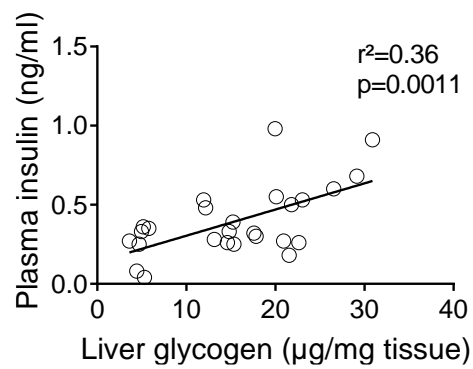
A



B

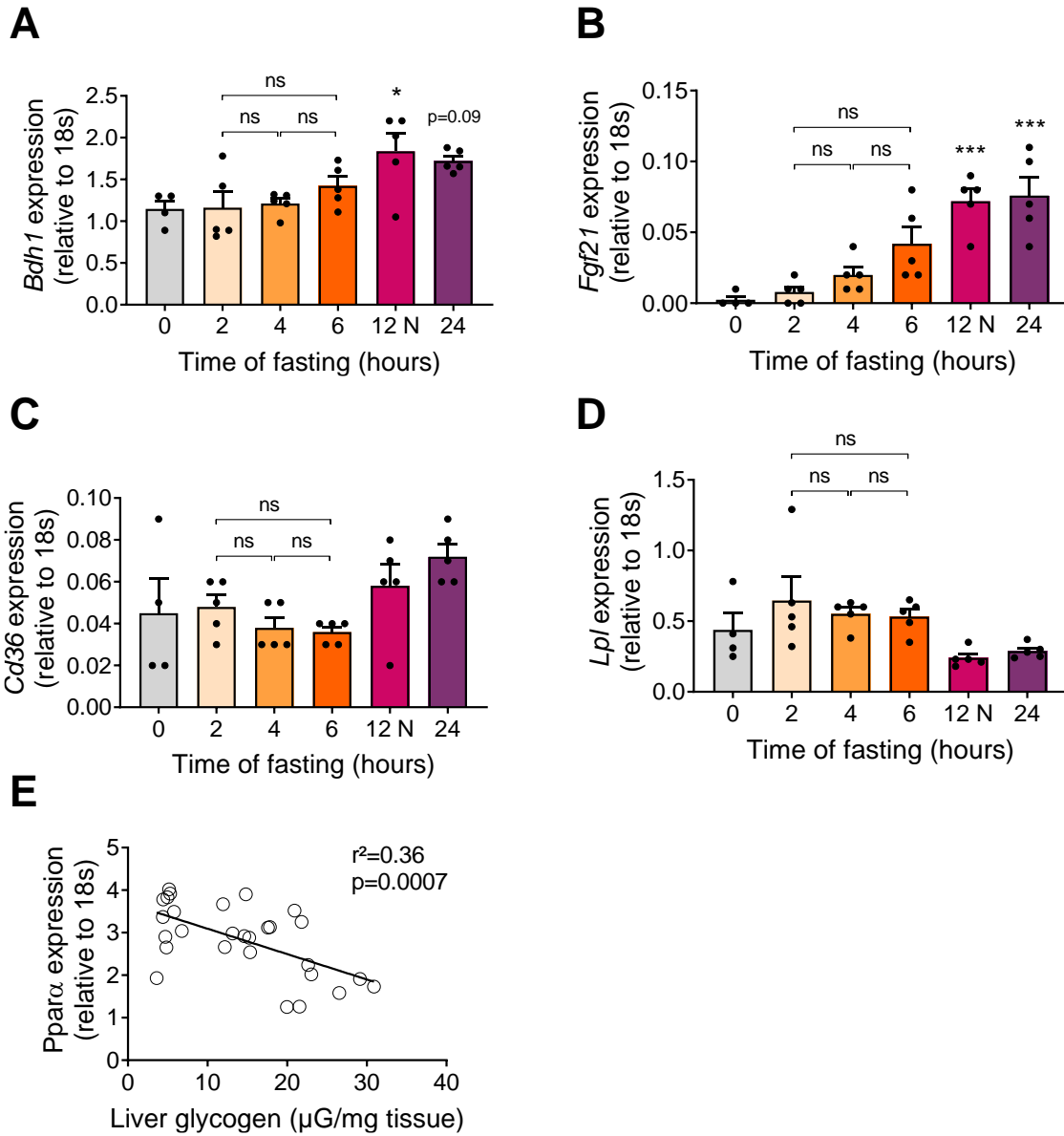


C



6

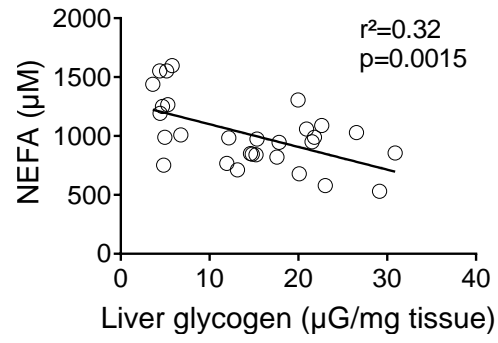
7 **Figure S1:** (A) Blood glucose levels in mice with *ad libitum* access to food at 7am, 9am, 11am,
8 1pm and 7pm. (n=11/time point). Linear regression of total liver glycogen with blood glucose
9 (B) and plasma insulin levels (C) (n=26).



10

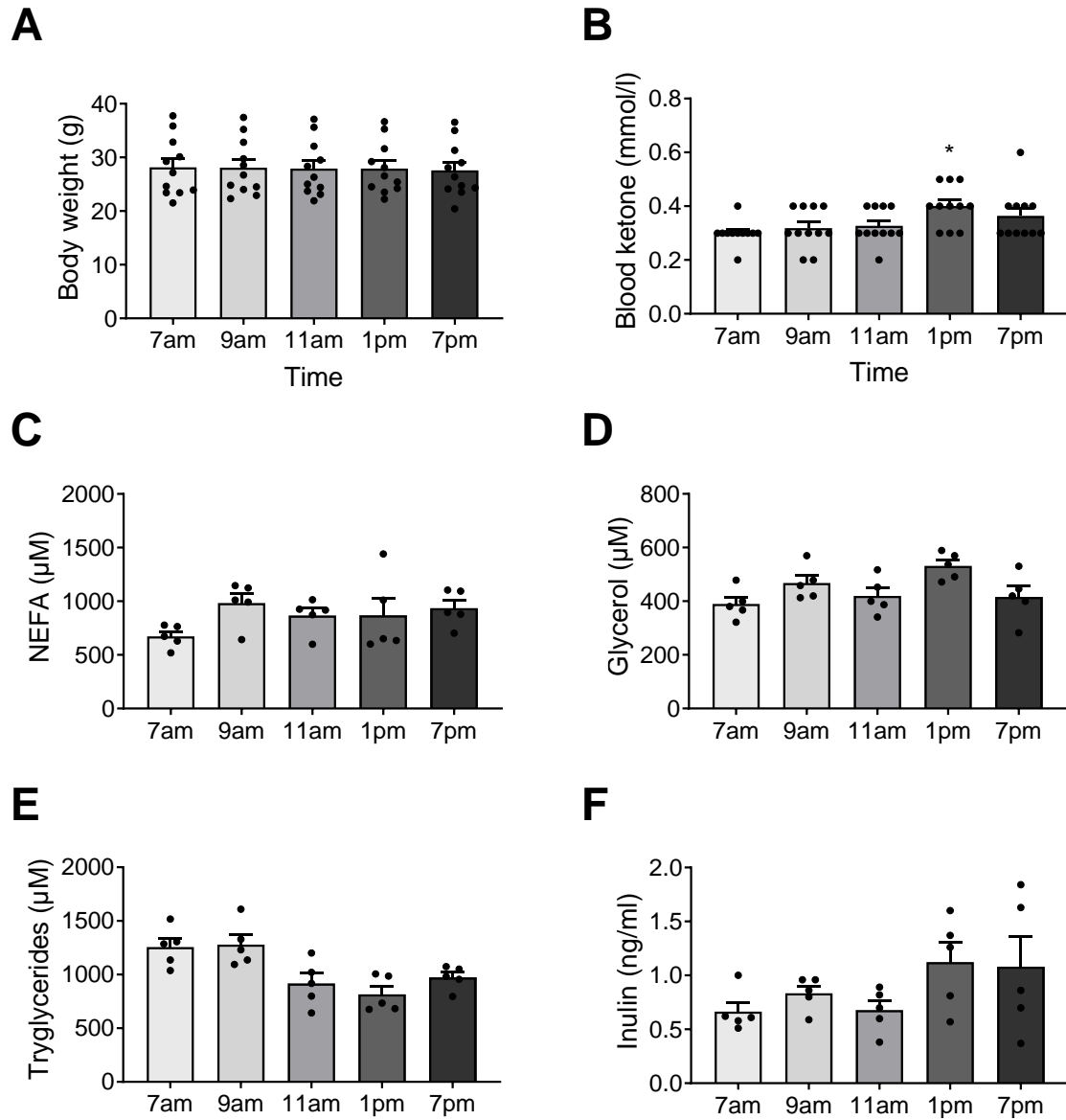
11 **Figure S2:** Relative *Bdh1* (A), *Fgf21* (B), *Cd36* (C), and (D) *Lpl* mRNA expression in liver of
 12 mice after 0, 2, 4, 6, 12N or 24 hours of fasting (n=5/group). * p<0.05, *** p<0.001 vs. time
 13 point 0. (E) Linear regression of total liver glycogen and liver *Ppara* mRNA levels in mice
 14 (n=28).

15



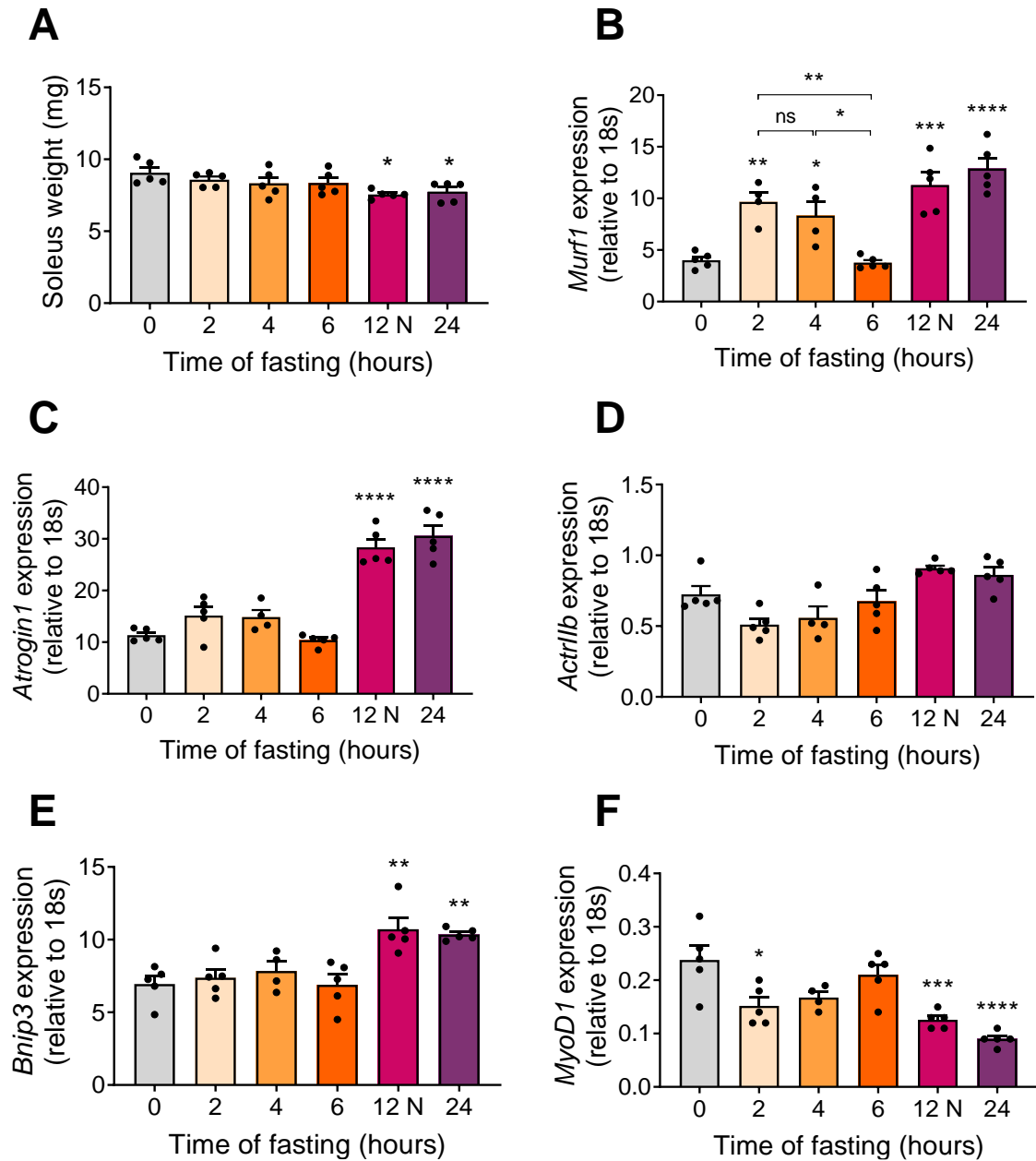
16

17 **Figure S3:** Linear regression of total liver glycogen and plasma NEFA levels in mice housed
18 at room temperature (n=29).



19

20 **Figure S4:** Body weight (A), blood ketone (B) (n=11/time point), plasma NEFA (C), plasma
 21 glycerol (D), plasma triglycerides (E), and plasma insulin levels (F) (n=5/time point) in mice
 22 with *ad libitum* access to food at 7am, 9am, 11am, 1pm and 7pm. * p<0.05 vs. time point 7am.



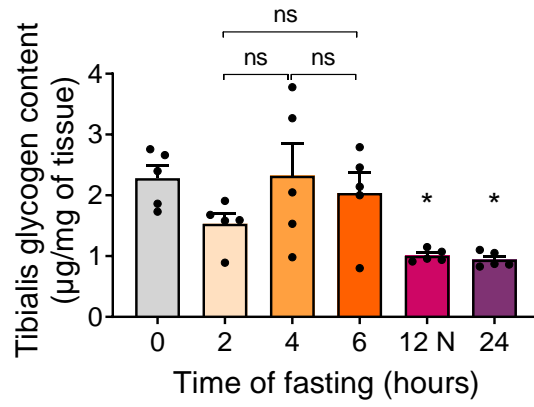
23

24 **Figure S5:** *Soleus* muscle weight of mice after 0, 2, 4, 6, 12N or 24 hours of fasting (A).

25 Relative *Murf1* (B), *Atrogin1* (C), *Actr11b* (D), *Bnip3* (E), *MyoD1* (F) mRNA expression in

26 *Soleus* muscle of mice during the time-course of fasting. (n=5/group). * p<0.05, ** p<0.01, ***

27 p<0.001, **** p<0.0001 vs. time point 0.



28

29 **Figure S6:** *Tibialis anterior* muscle glycogen content of mice after 0, 2, 4, 6, 12N or 24 hours

30 of fasting. (n=5/group) * p<0.05 vs. time point 0.

31 **Supplementary Table 1**

Gene	Reverse	Forward
<i>G6pc</i>	5'-ACACCGACTACTACAGCAACAG-3'	5'-CCTCGAAAGATAGCAAGAGTAG-3'
<i>Ppara</i>	5'-AGTTCACGCATGTGAAGGCTG-3'	5'-TGTTCCGGTTCTTCTTCTGAATC-3'
<i>Murfl</i>	5'-TGCCTGGAGATGTTTACCAAGC-3'	5'-AAACGACCTCCAGACATGGACA-3'
<i>Atrogin1</i>	5'-ACGTAGTAAGGCTGTTGGAGC-3'	5'-GTTCTTTTGGGCGATGCCAC-3'
<i>Actr11b</i>	5'-GAAGGCAACTTCTGCAACGAG-3'	5'-TGGCTCGTACGTGACTTCT-3'
<i>Drp1</i>	5'-TCACCCGGAGACCTCTCATT-3'	5'-TTCCATGTGGCAGGGTCATT-3'
<i>Cpt1a</i>	5'-TTGGAAGTCTCCCTCCTTCA-3'	5'-GCCCATGTTGTACAGCTTCC-3'
<i>Bdh1</i>	5'-CTTGTATTTGCTGGCTGTTTG-3'	5'-CATTGAGCTGGATGGTTCTC-3'
<i>Fgf21</i>	5'-CGTCTGCCTCAGAAGGACTC-3'	5'-AAGGCTCTACCATGCTCAGG-3'
<i>Cd36</i>	5'-CGCTGTGGAAATGGTGTGTT-3'	5'-GAAGGCAGCAACTTCTAGAACAG-3'
<i>Lpl</i>	5'-TTATCCCAATGGAGGCACTTT-3'	5'-CACGTCTCCGAGTCCTCTCTC-3'

32

Discussion

Dans un premier temps, nous montrons qu'après 0, 2, 4 et 6h de jeûne, la glycémie est maintenue à des valeurs physiologiques en parallèle d'une diminution des niveaux plasmatiques d'insuline et d'une diminution du contenu en glycogène hépatique. En effet, en absence d'apport énergétique le pancréas répond par une diminution de la sécrétion d'insuline et une augmentation de la sécrétion de glucagon, une hormone hyperglycémisante. Le glucagon stimule de manière rapide la formation de glucose hépatique à partir de glycogène via la glycogénolyse (Shikama, Yajima, et Ui 1980). Cependant, après des temps de jeûne longs de 12h toute la nuit et 24h, la stabilité de la glycémie n'est plus maintenue, les niveaux plasmatiques de glucose et d'insuline chutent en parallèle d'une déplétion très importante en glycogène (>80%) hépatique. De manière intéressante nous montrons que les niveaux plasmatiques d'AG corrélaient négativement avec le contenu en glycogène hépatique. En effet, lorsque les apports en glucose ne sont plus suffisants, une transition métabolique se met en place et ce sont les lipides qui sont utilisés (D. E. Kelley et al. 1999; Shetty 1990). Dès 2h de jeûne, la lipolyse du WAT est activée en parallèle d'une augmentation de la consommation en TG plasmatiques. Pour pallier à l'absence de glucose, les corps cétoniques peuvent également être utilisés comme source énergétique par plusieurs organes périphériques. La cétogenèse a lieu dans le foie grâce à l'utilisation d'AG. Cependant, une étude récente a montré que des niveaux élevés de corps cétoniques et notamment de β -hydroxybutyrate, induisent une insulino-résistance périphérique (Geisler et al. 2019). Dès 6h de jeûne, une activation des gènes impliqués dans l'oxydation des AG et de la cétogenèse est observée mais ce n'est qu'après 12h de jeûne que les niveaux sanguins de corps cétoniques sont augmentés. Après des jeûnes de 12h toute la nuit et 24h, la sensibilité à l'insuline est fortement diminuée. Bien que la sensibilité des animaux à l'insuline n'est pas différente après 0, 2, 4 et 6h de jeûne, après 4h et 6h de jeûne, la déplétion en glycogène observée impacte la réponse contre-régulatrice du glucose. L'ensemble de ces résultats montre l'impact du temps de jeûne sur les mécanismes énergétiques mis en place par l'organisme des souris pour

maintenir la stabilité de leur glycémie et nous observons qu'après des jeûnes longs l'homéostasie glucidique est altérée.

Par la suite, nous montrons qu'après 6h de jeûne, les souris perdent plus de 5% de leur poids corporel et après 12h de jeûne sur la nuit elles en perdent plus de 10%. Une perte de poids de 10% a été définie comme marqueur de fragilité chez la souris et comme le seuil limite éthique à ne pas dépasser pour le bien-être animal (Martinez de Toda et al. 2018). De plus, cette perte de poids après 12h de jeûne s'accompagne d'une diminution de la masse maigre et notamment de la masse musculaire. Dès 4h de jeûne, le programme atrophique est induit dans le muscle squelettique mais c'est après 12h toute la nuit et 24h de jeûne qu'on observe une diminution significative de la masse musculaire. Le muscle contribuant jusqu'à 85% à la consommation de glucose en réponse à l'insuline (DeFronzo et al. 1981), c'est sans surprise que cette perte de masse musculaire s'accompagne également d'une diminution de la sensibilité à l'insuline systémique.

La perte de poids corporel observée chez la souris, qui n'est pas observée chez l'homme, peut s'expliquer par le fait que comme d'autres petits mammifères, les souris ont une grande surface corporelle pour une faible masse corporelle et luttent constamment pour maintenir leur température corporelle lorsqu'elles sont hébergées à des températures inférieures à leur thermoneutralité (Bastías-Pérez et al. 2020). Lorsque les souris sont hébergées à thermoneutralité, leur prise alimentaire est diminuée de 50% par rapport à des souris hébergées à 23°C. Pour maintenir leur température corporelle, les souris ont besoin d'apports énergétiques. Il a été montré que chez la souris 2/3 de la nourriture est mangée la nuit et 1/3 la journée. Nos résultats montrent qu'au cours de la journée, en condition normale de température d'hébergement qui est déjà un stress thermique (21°C), le poids corporel ainsi que la glycémie des souris est stable. Cela confirme que les souris ont une prise alimentaire majoritairement nocturne mais également diurne leur permettant de maintenir l'eutherme et peut alors expliquer la susceptibilité importante des souris au jeûne. En accord avec cette hypothèse, nous montrons que la perte de poids corporel induite par le jeûne est atténuée quand les souris sont hébergées à thermoneutralité. Pour des raisons pratiques, les différents temps de jeûne ont été réalisés la journée et les souris ont été étudiées à différentes heures de la journée. Au vu de la prise alimentaire majoritairement diurne des souris on pourrait s'attendre à une perte de poids et un stress métabolique plus important si le jeûne avait été

réalisé la nuit. Les ITT sont souvent réalisés sur des souris soumises à un régime hyperlipidique pour stimuler leur métabolisme énergétique et analyser leur susceptibilité au DT2. Il aurait été également intéressant de regarder l'effet du temps de jeûne sur ces souris-là.

En résumé, le jeûne de 6h communément utilisé avant un ITT n'est pas optimal puisqu'il engendre déjà une perte de poids supérieure à 5% et une déplétion en glycogène. Les temps de jeûne plus longs, de 12h toute la nuit ou 24h sont à proscrire au vu de la perte de poids corporel, de l'altération de l'homéostasie glucidique et des stress musculaires et hépatiques induits. Un jeûne de 2h doit être privilégié avant la réalisation d'un ITT afin de minimiser le stress métabolique induit par la perte de poids et permettre une meilleure pertinence et fiabilité des résultats dans les études physiopathologiques du métabolisme chez la souris.

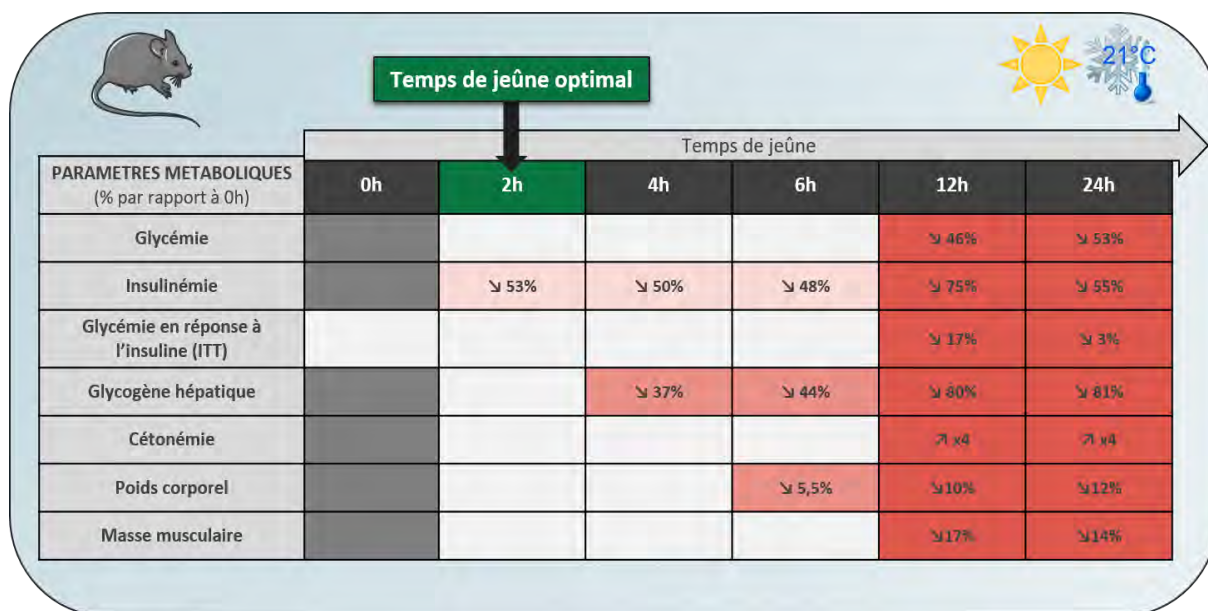


Figure 20 : Le temps de jeûne optimal avant la réalisation d'un test de tolérance à l'insuline chez la souris est de 2h.

II – Conséquence d’une altération du système ANP/GC-A sur le métabolisme énergétique

Introduction

Plusieurs études épidémiologiques ont révélé une altération du système ANP/GC-A chez les patients diabétiques de type 2 et les individus obèses. En effet, ces deux pathologies sont associées à une diminution de la concentration plasmatique de PN ainsi qu’une diminution du ratio GC-A/NPRC dans le tissu adipeux et le muscle squelettique. De façon intéressante, il a également été montré que les niveaux circulants de PN sont prédictifs du développement du DT2. **Le but de ce travail a été de déterminer s’il existe un lien causal entre un déficit du système ANP/GC-A et le développement du DT2.**

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé deux modèles murins : des souris déficientes pour l’ANP et des souris haploinsuffisantes pour le récepteur GC-A. Les souris ont été soumises à un régime hyperlipidique et leur phénotype métabolique a été analysé.

Article 3

Atrial natriuretic peptide deficiency causes mitochondrial dysfunction, insulin resistance and low endurance capacity in mice

Deborah Carper, Marine Coué, Jorge Ayala Banda, Laurène Mazeyrie, Claire Laurens, Justine Vily Petit, Laurent Monbrun, Peggy Del Carmine, Virginie Bourlier, Dominique Langin, Remy Mounier, Gilles Mithieux, Charles Coudray, Christine Feillet-Coudray
and Cedric Moro

In preparation

1 **Atrial natriuretic peptide deficiency causes mitochondrial dysfunction, insulin resistance**
2 **and low endurance capacity in mice**

3

4 Deborah Carper^{1,2}, Marine Coue^{1,2}, Jorge Ayala ^{1,2}, Laurene Mazeyrie^{1,2}, Claire Laurens^{1,2},
5 Justine Vily Petit³, Laurent Monbrun³, Peggy Del Carmine⁴, Virginie Bourlier^{1,2}, Dominique
6 Langin^{1,2,5}, Remy Mounier⁴, Gilles Mithieux³, Charles Coudray⁶, Christine Feillet-Coudray⁶
7 and Cedric Moro^{1,2}

8

9

10

11

12 ¹Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, INSERM, UMR1048, Toulouse, France

13 ²University of Toulouse, Paul Sabatier University, France

14 ³INSERM U1213, Nutrition, Diabète et Cerveau, Lyon, France

15 ⁴Institut NeuroMyoGène, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1217, CNRS UMR
16 5310, Villeurbanne, France

17 ⁵Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

18 ⁶Dynamique Musculaire Et Métabolisme, INRA, UMR866, Université Montpellier,
19 Montpellier, France

20

21 **ABSTRACT**

22 Type 2 diabetes and obesity are strongly associated with low natriuretic peptide (NP) plasma
23 levels and impaired NP signaling with a decrease of GC-A (guanylyl cyclase A)/NPRC
24 (natriuretic peptide receptor C) in skeletal muscle and adipose tissue. However, no study has so
25 far provided evidence for a causal link between ANP/GC-A deficiency and the development of
26 insulin resistance. We show here that ANP/GCA deficiency induces insulin resistance under
27 high fat diet. In GC-A haploinsufficient mice we revealed skeletal muscle insulin resistance
28 associated with altered mitochondria phenotype and metabolism. This is accompanied by an
29 increased GPX activity and PTEN protein level. Moreover, GCA haploinsufficiency induced
30 mitochondria deficiency decreases endurance capacity of mice which is not restored by an
31 endurance training program. Together, these results indicate that the ANP/GCA system play a
32 causal role in the development of insulin resistance

33 INTRODUCTION

34 Obesity is a major risk factor of type 2 diabetes (T2D) and is generally characterized by
35 peripheral insulin resistance and a poor oxidative capacity in skeletal muscles (Roden and
36 Shulman, 2019). Obesity is also associated with neuroendocrine abnormalities.
37 Epidemiological studies demonstrated that obese and T2D patients present low circulating
38 levels of the cardiac hormone atrial natriuretic peptide (ANP) (Wang et al., 2007). ANP binds
39 to a guanylyl cyclase receptor-A (GCA) to regulate blood volume and pressure (Kuhn, 2016).
40 ANP is rapidly cleared from the bloodstream through its binding to a clearance receptor called
41 natriuretic peptide receptor C (NPRC) (Potter et al., 2006). Recently, prospective studies in
42 large clinical cohorts revealed that individuals with low circulating levels of ANP are at high
43 risk of new onset T2D (Lazo et al., 2013; Magnusson et al., 2012). Genetic variants of ANP or
44 its biological receptor GCA are also related to T2D development. We and others further
45 demonstrated a reduced expression of GCA in skeletal muscle and subcutaneous abdominal
46 adipose tissue of obese and/or T2D patients (Coué et al., 2015; Kovacova et al., 2016). Low
47 adipose and skeletal muscle GCA expression was tightly correlated with insulin resistance
48 (Coué et al., 2018). In contrast, high expression of GCA in skeletal muscle associates with high
49 oxidative capacity and exercise training up-regulates GCA together with mitochondrial
50 oxidative capacity in skeletal muscle of middle-aged obese individuals (Engeli et al., 2012).
51 Collectively, this suggests that the ANP/GCA system may play a key role in the pathogenesis
52 of obesity-related metabolic disorders and T2D. Yet, it is still unclear if ANP/GC-A deficiency
53 causes T2D and what are the underlying molecular mechanisms.

54 We here analyzed ANP^{-/-} and GC-A^{+/-} mice to investigate the causal link between
55 ANP/GC-A deficiency and the development of insulin resistance and T2D. Both ANP^{-/-} and
56 GCA^{+/-} mice rapidly developed insulin and glucose intolerance in response to high fat diet
57 (HFD). This was associated with impaired insulin sensitivity, altered mitochondrial function

58 and decreased endurance capacity in skeletal muscle of GCA^{+/-} mice. Collectively, our data
59 indicate that the ANP/GCA system plays a major role in the maintenance of insulin sensitivity
60 and endurance capacity by controlling skeletal muscle oxidative capacity.

61 RESEARCH DESIGN AND METHODS

62 Animals

63 Eight weeks old *Nppa*^{-/-} and *GC-A*^{+/-} male mice (B6.129P2-*Nppa*^{tm1Unc}/J and B6.129-
64 *Npr1*^{tm1Gar}/J mice were backcrossed to C57BL/6J mice for at least ten generations), and their
65 littermate control *Nppa*^{+/+} and *GC-A*^{+/+} respectively were used. Mice were fed with a normal
66 chow diet (Ssniff) or high fat diet (60% kcal lipids) for 12 weeks and were housed in a pathogen-
67 free barrier facility (12h light/dark cycle) with *ad libitum* access to water and food in standard
68 animal care facility rooms at 21°C (RT). Mice were weight weekly and the body composition
69 was assessed by the use of an EchoMRI. At the end of the protocol, mice were decapitated and
70 blood was collected into EDTA tubes containing protease inhibitors. Organs and tissues were
71 rapidly excised and either snap frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C or
72 processed for histology or *ex vivo* testing. All experimental procedures were approved by our
73 institutional animal care and use committee CEEA122 (protocol# 2016122311033178) and
74 performed according to INSERM guidelines for the care and use of laboratory animals.

75

76 Acclimatation to treadmill and maximal running capacity test

77 Mice were acclimated to the treadmill (TSE system) four times by running for 2 min at a speed
78 of 0,10m/s, then 3 min at a speed of 0,10ms/s and finally 7min at a speed of 0.20 m/saat 0°
79 incline during te week prior the maximal running capacity test. The maximal running capacity
80 test was performed at 0.15 m/s and was increased by 0.05 m/s every 2 min until exhaustion.

81

82 Endurance exercise test

83 For the endurance exercise test, after a warm up of 2 min at a speed of 0.10m/s, mice ran 80
84 min at 60% of maximal capacity previously determined for each mice. At exhaustion mice were

85 removed from the test and running time to exhaustion, distance covered and average running
86 speed were measured.

87

88 **Endurance training**

89 Then endurance training group ran 30 min per day, 5 days a week for 4 weeks. The first week
90 of training, running speed was fixed at 60% of maximal capacity for each mice and was
91 increased at 65%, 70% and 75 % for weeks 2, 3 and 4 respectively of training.

92

93 **Blood analyses**

94 Mouse plasma ANP and BNP were measured with Mouse Atrial Natriuretic Peptide ELISA kit
95 (Cusabio) and Mouse Brain Natriuretic Peptide ELISA kit (Cusabio), respectively following
96 manufactory instructions. Plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit
97 (ALPCO Diagnostics, Salem, New Hampshire).

98

99 **Glucose and Insulin Tolerance Tests**

100 After 2h of fasting, mice were injected intraperitoneally with a bolus of insulin or glucose and
101 blood glucose levels were monitored from the tip of the tail vein with a glucometer (Accucheck;
102 Roche, Meylan, France) at 0, 15, 30, 45, and 60 minutes after injection. For insulin tolerance
103 test, mice under standard diet and HFD were injected with 0.5U/kg and 0.75U/Kg of insulin
104 (NovoRapid 100 IU/ml) respectively. For glucose tolerance test, mice under standard diet and
105 HFD were injected with 1.5g/kg of glucose (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

106

107 **Echocardiography**

108 Echocardiography was carried out with a Vivid7 echograph (GE Healthcare) and a 14 MHz
109 transducer (i13L, GE) on lightly anesthetized (1% isoflurane in air) mice placed on a heating

110 pad. Left ventricular walls and cavity dimensions were obtained from parasternal short axis
111 view at mid-ventricular level during Time Movement mode acquisition. LV mass was
112 estimated by a spherical approximation. LV ejection fraction was measured from parasternal
113 long axis view by delineating LV chamber area in diastole and systole. The operator was blind
114 from mice genotype.

115

116 ***Ex vivo* insulin stimulation**

117 Just after removal, EDL muscles were incubated 20min at 37°C in a KRHA buffer (1.18M
118 NaCl, 10mM CaCl₂, 10mM MgSO₄, 10mM KH₂PO₄, 60mM KCl, 0.2% BSA, 20mM Hepes,
119 2mM Sodium Pyruvate) supplemented or not with insulin 100mM. Muscles were then dry and
120 frozen at -80°C.

121

122 **Tissue specific 2-deoxyglucose uptake *in vivo***

123 To determine 2-DG uptake in muscle and adipose tissue, a bolus injection of 2-[^{1,2}-
124 ³H(N)]deoxy-D-glucose (PerkinElmer, Boston, Massachusetts) (0.4 μCi/g body weight) and
125 insulin (3mU/g body weight) was injected intraperitoneal in mice. Then, 30 min after injection,
126 mice were euthanized and tissues were excised and quickly frozen at -80°C until further
127 processing.

128

129 **Catalase, SOD and GPX activity**

130 Anti-oxidative activities including superoxide dismutases, catalase and glutathione peroxidase
131 (GPx) activities were measured in skeletal muscle according to the methods of Beers and Sizer
132 (Beers and Sizer, 1952) and of Flohe and Gunzler (Flohé and Günzler, 1984) respectively.

133

134

135 **Histology**

136 Adipose tissues and liver were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, dehydrated, embedded
137 in paraffin, and cut into 7µm sections. Sections were stained with hematoxylin and eosin using
138 standard protocols.

139

140 **Fiber typing**

141 Skeletal muscles were mounted in OCT freezing medium, snap-frozen in liquid N₂-cooled 2-
142 methylbutane and stored at -80°C for cryo-sectioning. Tissues were cut into 10µm section using
143 eica CM1850 cryostat. For immunostaining, tissue were treated with mouse-on-mouse reagents
144 (M.O.Mkit, Vectr Laboratories) to block endogenous Fc receptor binding sites. Section were
145 then labeled with a mixture of mouse monoclonal antibodies BA-D5 (anti-MYH7, fiber type
146 I), SC-71 (anti-MYH2, fiber type IIa), and BF-F3(anti-MYH4, fiber type IIb) (hybridoma
147 supernates, Developmental Studies Hybridoma Bank) supplemented with rabbit polyclonal
148 anti-laminin antibody (2 µg/ml, Sigma) overnight at 4°C. Sections were then incubated with
149 isotype-specific Alexa Fluor (AF) conjugated secondary antibodies (Jackson immune lab) :
150 anti-mouse Blue-AF 405 IgG2b (#115-475-207), anti-mouse Green-AF 488 IgG1 (115-545-
151 205), anti-mouse Red-AF 546 IgM (#115-295-020), anti-rabbit Far Red-AF 647 (#711-175-
152 153): to mark type I, IIa, IIb fibers and laminin, respectively. Sections were mounted using
153 Fluoromount G medium (Interchim, #FP-483331). All images were obtained using a Nikon
154 Eclipse Ti-E inverted epifluorescent microscope equipped with a motorized stage. Images were
155 acquired in NIS-Elements software (Nikon) with a 10x/0.3NA PlanFluor objective to form a
156 single image of the entire muscle crosssection (approximately 20 - 30 mm²) used for analysis.
157 The analyses were performed on the entire muscle crosssection using Open-CSAM tool in the
158 FIJI/ImageJ software (Desgeorges et al., 2019).

159

160 **G6Pase activity**

161 Frozen tissues were homogenized using Fast Prep[®] in 10 mM HEPES and 0.25 M sucrose, pH
162 7.4 (9 vol./g tissue). G6Pase activity was assayed in homogenates for 10 min at 30°C at pH 7.3
163 in the presence of a saturating glucose-6-phosphate concentration (20 mM) (Mithieux et al.,
164 2004).

165

166 **Liver glycogen content**

167 Liver samples were weighed and homogenized in acetate buffer (0,2M, pH 4.8). After
168 centrifuging the samples at 12 000g for 10min, supernatant was transferred into clean tubes and
169 divided in two aliquots. An aliquot of each homogenate was mixed with amyloglucosidase
170 (Sigma) and incubated at 55°C for 15 minutes. The other one was mixed with water and
171 incubated at 4°C for 15 minutes. Glucose content was measured as previously described below.
172 Samples were analyzed in duplicate and the results determined as µg glycogen per mg tissue.

173

174 **Mitochondria isolation from skeletal muscle**

175 Freshly dissected red part of *gastrocnemus* was placed in ice-cold buffer 1 for mitochondrial
176 isolation (IBM1) containing 67mM of sucrose, 50mM Tris/ HCl, 50mM KCl, 10mM EDTA/
177 Tris, and 0.2% BSA, pH 7.4. The muscle was minced into very small pieces. The tissue was
178 transferred to a cell strainer, rinsed with IBM1, and placed in IBM1/ 0.05% trypsin for digestion
179 for 30 minutes in ice. The sample was then centrifuged at 300g for 3 minutes at 4°C, the
180 supernatant removed and the pellet was resuspended in IBM1. The sample was homogenized
181 using a Potter Ehlvehjem glass/ teflon homogenizer (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ),
182 centrifuged at 700g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was transferred to a polypropylene
183 tube and was centrifuged at 8000g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was carefully
184 removed and the pellet suspended in buffer 2 for mitochondrial isolation (IBM2) containing

185 200mM mannitol, 70mM sucrose, 5mM EGTA/ Tris, 10mMTris HCl, pH 7.4 and then
186 centrifuged again at 8000g for 10 minutes at 4°C. Finally, the supernatant was carefully
187 discarded and the pellet was resuspended in 100µL of IBM2. Protein concentration was
188 determined using the BCA pierce assay.

189

190 **SeaHorse**

191 XF24 instrument was equilibrated at 37 °C overnight. 5 µg of mouse skeletal muscle
192 mitochondria was plated in each well of the XF24 v7 plate in a volume of 50 µl containing 1 ×
193 MAS (70mM sucrose, 220mM mannitol, 10mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 2mM
194 HEPES, 0.2% BSA; pH 7.2) with 10 mM pyruvate and 5 mM malate. The XF plate containing
195 mitochondria with substrate was centrifuged for 20 min at 2000 rpm at 4°C. After
196 centrifugation, 450 µl of substrate containing 1 × MAS with pyruvate and malate was added to
197 each well, and the plate was incubated in a 37 °C non-CO₂ incubator for 10 min. While the
198 plate was centrifuged the XF cartridge was prepared for injections for ports A, B, C and D.
199 ADP (40 mM), oligomycin (25µM), FCCP (40 µM), and rotenone (40µM) were loaded into
200 ports A, B, C and D respectively. The final concentrations were 4 mM ADP, 2.5 µM
201 oligomycin, 4 mM FCCP and 4 µM antimycin A. The cartridge was calibrated by the XF
202 machine, and following calibration the XF plate with mitochondria attached to the bottom was
203 introduced into the machine for the run.

204

205 **RNA Extraction and Real-time qPCR**

206 Total RNA from tissue was isolated using Qiagen RNeasy kit (Qiagen, GmbH Hilden,
207 Germany) following manufacturer's protocol. The quantity of the RNA was determined on a
208 Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Reverse-transcriptase PCR was
209 performed using the Multiscribe Reverse Transcriptase method (Applied Biosystems, Foster

210 City, CA). Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed in duplicate using the ViiA
211 7 Real-time PCR system (Applied biosystems). All expression data were normalized by the $2^{-\Delta C_t}$
212 ΔC_t) method using *18S* in mice Data were Primer sequences are listed in Supplementary Table
213 1.

214

215 **Western blot**

216 Proteins were extracted from tissues using RIPA buffer and protease inhibitor cocktail (Sigma-
217 Aldrich). Tissues homogenates were centrifuged twice for 20 min at 12700 rpm and
218 supernatants were quantified with BCA pierce kit (ThermoScientific). Equal amount of proteins
219 were run on a 4-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Biorad), transferred onto
220 nitrocellulose membrane (Bio-Rad) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies,
221 Rabbit anti-ATLG (1:1000, CST #2138s), Rabbit anti-GAPDH (1:1000, CST, #2118), Rabbit
222 anti-pS660 HSL (1:1000, CST, #4126), Rabbit anti-HSL (1:1000, CST, #4107), Rabbit anti-
223 NPRA (1:1000, Abcam, ab154266), Goat anti-NPRC (1 :1000, Sigma, SAB2501867, Rabbit
224 anti-PEPCK (1:7000, Santa cruz, #32879) anti-ps473 AKT (1:1000, CST, #4060L), anti AKT
225 (1:1000, CST, #4691L), anti-PTEN (1:1000,CST, #9552), anti OXPPOS (1:1000, Abcam,
226 ab110411) and Rabbit anti-Actin (1 :10000, CST, #4970). Subsequently, immuno-reactive
227 proteins were blotted with anti-rabbit or goat horseradish peroxidase-labeled secondary
228 antibodies for 1h at room temperature and revealed by enhanced chemiluminescence reagent
229 (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific), visualized using ChemiDoc MP Imaging
230 System and data analyzed using the ImageLab 4.2 version software (Bio-Rad Laboratories,
231 Hercules, USA).

232

233 **Statistical analyses**

234 All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad
235 Software Inc., San Diego, CA). Normal distribution and homogeneity of variance of the data
236 were tested using Shapiro-Wilk and F tests, respectively. Student's *t*-tests, Mann-Whitney test
237 and Two-way ANOVA followed by Bonferonni's post hoc tests were applied when appropriate.
238 All values in Figures are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

239 **RESULTS**

240 **ANP deficiency promotes insulin resistance in mice**

241 We first examined the influence of ANP deficiency on insulin and glucose tolerance in
242 mice under standard (SD) and high fat diet (HFD) nutritional conditions. Beforehand, *Nppa*^{-/-}
243 mice were backcrossed on a C57Bl6/J background which are susceptible to diet-induced obesity
244 and T2D. Cardiac *Nppa* mRNA levels, the product of the gene coding for ANP, was virtually
245 null in *Nppa*^{-/-} mice compared to WT littermates *Nppa*^{+/+} (Supplementary Fig. 1A), while
246 cardiac *Nppb* mRNA levels remained unaffected (Supplementary Fig. 1B). No change in *Npr1*
247 and *Npr3* mRNA expression, genes coding for NP receptors GC-A and NPRC respectively,
248 were found in skeletal muscle and adipose tissue of *Nppa*^{-/-} versus WT mice (Supplementary
249 Fig. 1C and 1D). As expected, a cardiac hypertrophy reflected by a 31% increase of heart weight
250 to body weight ratio ($p < 0.0001$) was found in *Nppa*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 1E). However
251 this hypertrophy occurred in absence of systolic dysfunction as left ejection fraction remained
252 unchanged in ANP deficient mice (Supplementary Fig. 1F).

253 We here show that ANP deficiency has no major influence of body weight gain (Fig.
254 1A), body composition (Supplementary Fig. 1G and 1H) and obesity development under
255 nutritional stress (HFD). However, glucose tolerance was slightly impaired under SD (Fig. 1B),
256 while insulin tolerance was blunted both under SD and HFD (Fig. 1C & E). Although glucose
257 tolerance was not significantly affected under HFD (Fig. 1D), ANP knockout mice exhibited
258 clear signs of whole-body insulin resistance reflected by elevated concentrations of fasting
259 blood insulin (Fig. 1F) and fasting blood glucose (Fig. 1G).

260 Altogether, these results indicate that ANP deficiency causes insulin resistance in mice.

261

262 **GCA haploinsufficiency exacerbates HFD-induced insulin resistance**

263 Since previous data indicated that GCA protein expression is reduced by about half in
264 adipose tissue and skeletal muscle of obese humans and mice (Coué et al., 2015), we next
265 investigated the influence of *Npr1*^{+/-} haploinsufficiency on metabolic phenotypes and T2D
266 development.

267 *Npr1*^{+/-} mice presented a 45% and 47% decrease of *Npr1* mRNA expression in skeletal muscle
268 and adipose tissue respectively compared to *Npr1*^{+/+} mice (Supplementary Fig. 2A), without
269 any change in *Npr3* expression (Supplementary Fig. 2B). Plasma ANP and BNP levels
270 remained unchanged compared to WT mice (Supplementary Fig. 2C and 2D). As observed in
271 *Nppa*^{-/-} mice, *Npr1*^{+/-} displayed a cardiac hypertrophy (Supplementary Fig. 2E) with a preserved
272 left ventricular ejection fraction (Supplementary Fig. 2F).

273 *Npr1*^{+/-} mice had similar body weight gain under HFD (Fig. 2A) and body composition
274 (Supplementary Fig. 2G and 2H) under SD and HFD. *Npr1*^{+/-} mice developed glucose
275 intolerance (Fig. 2B) in face of unchanged insulin tolerance (Fig. 2C). However, when
276 challenged by HFD for 4, 8 and 12 weeks, *Npr1*^{+/-} mice exhibited a time-dependent decline of
277 insulin tolerance in *Npr1*^{+/-} vs WT mice (Fig. 2D-G). After 12 weeks of HFD, *Npr1*^{+/-} mice also
278 had reduced glucose tolerance (Supplementary Fig. 2I). Blood insulin and glucose
279 concentrations were increased by HFD but remained nearly unchanged in *Npr1*^{+/-} mice (Fig.
280 2H), except a slight decrease of blood glucose levels that was observed in *Npr1*^{+/-} mice (Fig.
281 2I).

282 In summary, our data indicate that GCA haploinsufficiency, which closely recapitulate
283 the neuroendocrine defects observed in obese humans, impairs glucose homeostasis.

284

285 **Impaired glucose homeostasis in GCA haploinsufficient mice is associated with marginal**
286 **changes in adipose tissue and liver metabolism**

287 Adipose tissue weight of various depots (Supplementary Fig. 3A) as well as adipocytes
288 area and number in eWAT (Supplementary Fig. 3B and 3C) were similar between *Npr1^{+/-}* and
289 *Npr1^{+/+}* mice. No significant difference in insulin-stimulated glucose uptake was found in
290 various white adipose tissues depots (i.e. epididymal white adipose tissue (WAT) (eWAT),
291 inguinal WAT (iWAT) and brown adipose tissue (BAT)) (Supplementary Fig. 3D). In parallel,
292 mRNA levels of ATGL and HSL (Supplementary Fig. 3E), the two main rate-limiting enzymes
293 of lipolysis, as well as the mRNA expression of G0S2 and CGI58, two co-enzymatic regulator
294 of ATGL activity (Supplementary Fig. 3F), remained unchanged between *Npr1^{+/-}* and *Npr1^{+/+}*
295 mice. Similarly, the protein content of ATGL and HSL was unaffected in both groups
296 (Supplementary Fig. 3G and 3H). There was also no visible signs of inflammation and
297 macrophage accumulation in eWAT of *Npr1^{+/-}* mice (Supplementary Fig. 3I). Finally, since the
298 ANP/GCA system has been related to brown adipose tissue (BAT) activation and
299 thermogenesis (Bordicchia et al., 2012), we further showed that the expression of PGC1 α and
300 UCP1 was similar in both genotypes under HFD where BAT activation and function is
301 suppressed (Supplementary Fig. 3J).

302 In the same line, insulin resistance in *Npr1^{+/-}* mice appeared independent of major
303 differences in hepatic lipid (Supplementary Fig. 4A) and glycogen content (Supplementary Fig.
304 4B). We next measured the expression of key limiting enzymes of gluconeogenesis in liver.
305 PEPCCK protein content was similar between *Npr1^{+/-}* and *Npr1^{+/+}* mice (Supplementary Fig. 4C)
306 whereas G6Pase activity was significantly increased (Supplementary Fig.4D). This occurred in
307 absence of major changes in the expression of genes involved in lipid oxidation
308 (Supplementary Fig. 4E), glucose metabolism (Supplementary Fig. 4F) and *de novo* lipogenesis
309 (Supplementary Fig. 4G) in liver of *Npr1^{+/-}* and *Npr1^{+/+}* mice.

310 Collectively, our results suggest that GC-A haploinsufficiency does not blunt adipose
311 tissue morphology and glucose uptake, while an elevated activity of a rate-limiting enzyme in
312 gluconeogenesis in liver is observed.

313

314 **GCA haploinsufficiency causes insulin resistance in skeletal muscle**

315 Considering the major contribution of skeletal muscle to total glucose disposal, we next
316 investigated skeletal muscle insulin sensitivity and signaling in HFD-fed *Npr1*^{+/-} mice.

317 We first observed a significantly reduced 2-deoxyglucose uptake in various muscles of *Npr1*^{+/-}
318 mice (Fig 3A). This was associated with a trended reduced insulin-stimulated Akt
319 phosphorylation on the serine 473 residue (Fig. 3B). Importantly, impaired insulin signaling
320 remained when tibialis anterior muscles were incubated *ex vivo* with insulin (Fig. 3C), thus
321 indicating a muscle-autonomous acquired insulin resistance in GCA haploinsufficient mice.

322 We further investigated the potential molecular mechanisms of this muscle insulin resistant
323 phenotype. Muscle insulin resistance was not associated with changes in inflammatory markers
324 *F4/80*, *IL-6*, *TNF-α*, *Mcp1*, *IL1β*, or endoplasmic reticulum (ER) stress *ATF4*, *XBP-1s* and
325 *XBP1-us* in *Npr1*^{+/-} mice skeletal muscles (Supplementary Fig. 5A and Fig. 5B). Previous
326 studies reported that oxidative stress can negatively impact insulin-induced Akt signaling in
327 skeletal muscles (Bonnard et al., 2008). We therefore measured the activity of the three main
328 antioxidant enzymes (*i.e.* superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione
329 peroxidase (GPX)). Both SOD and CAT activities remained unchanged in skeletal muscles of
330 *Npr1*^{+/-} mice compared to WT (Supplementary Fig. 5C and 5D). However, GPX activity was
331 significantly increased in *Npr1*^{+/-} mice (Fig. 3F). This was associated with a significant increase
332 of PTEN protein expression, a negative regulator of the PI3K/Akt pathway, in skeletal muscles
333 of *Npr1*^{+/-} mice (Fig. 3G).

334 Altogether, we here demonstrate that GCA haploinsufficiency induces muscle-
335 autonomous insulin resistance and defects in insulin signaling through the GPx/PTEN axis.

336

337 **GCA haploinsufficiency induces mitochondrial dysfunction in skeletal muscle**

338 Previous reports suggested that GPx activity is tightly coupled to mitochondrial oxidative
339 capacity and oxidative stress. Strikingly, we first observed a consistent down-regulation of
340 various proteins from the OXPHOS pathway encoding mitochondrial respiratory complexes in
341 three different muscle types (i.e. *soleus*, *tibialis anterior* and EDL (*extensor digitorum longus*))
342 of *Npr1*^{+/-} mice (Fig. 4A, 4B and Supplementary Fig. 5E). Paradoxically, mitochondria isolated
343 from muscles of *Npr1*^{+/-} mice presented a significantly higher respiratory capacity (i.e. oxygen
344 consumption rate (OCR)) compared to *Npr1*^{+/+} mice (Fig. 4C). However, this higher respiration
345 rate was mostly driven by a significant increase of proton leak (Fig. 4D). This greater
346 mitochondrial leak in *Npr1*^{+/-} mice also increased maximal respiratory capacity (Fig 4E) and
347 attended to increase basal respiration (Fig. 4F). Elevated proton leak characterizes an
348 incomplete coupling of oxygen consumption to ATP production and is a hallmark of defective
349 mitochondrial function (Cheng et al., 2017; Jastroch et al., 2010). Consistent with OCR data on
350 isolated mitochondria, we found a significantly increased citrate synthase activity per
351 mitochondrial protein unit (Fig. 4G) while it remained unchanged in whole skeletal muscle
352 homogenate (Fig. 4H) of *Npr1*^{+/-} mice compared to WT.

353 Whether mitochondrial dysfunction is a cause or a consequence of insulin resistance
354 remains controversial. Some studies indicated that HFD induces mitochondrial abnormalities
355 that are preceded by insulin resistance (Bonnard et al., 2008). To assess the specific role of
356 GCA haploinsufficiency on mitochondrial function, we analyzed skeletal muscle mitochondria
357 of *Npr1*^{+/-} mice under SD. In agreement with previous observation under HFD, we showed that
358 OXPHOS protein content was decreased in *Npr1*^{+/-} mice under SD (Fig. 5A). As previously,

359 we further noticed a significantly increased OCR in skeletal muscle isolated mitochondria (Fig.
360 5B), and a trend for increased proton leak (Fig. 5C) and basal respiration (Fig. 5D) in *Npr1*^{+/-}
361 mice . Finally, these mitochondrial abnormalities were associated with a significant reduction
362 of fast oxidative IIa fibers in the *tibialis anterior* muscle of *Npr1*^{+/-} mice, while no significant
363 changes in the percentage of type IIb and type IIx fibers were noted (Fig. 5E and 5F).

364 In summary, mitochondrial dysfunction is a primary defect of GCA haploinsufficient
365 mice, thus indicating that mitochondrial defects are concomitant with insulin resistance and
366 caused by GCA deficiency.

367

368 **Impaired endurance capacity and adaptations to training in GCA haploinsufficient mice**

369 Previous results point toward an aberrant mitochondrial function in skeletal muscle of *Npr1*^{+/-}
370 mice in the resting state. Impaired mitochondrial oxidative capacity is associated with poor
371 endurance capacity (Wisløff et al., 2005). We next challenged *Npr1*^{+/-} mice with exercise.

372 Beforehand, we determined individual maximal speed for each mice. No difference in maximal
373 speed (Supplementary Fig. 6A), running time (Supplementary Fig. 6B), and running distance
374 (Supplementary Fig. 6C) were found between genotypes. However, when submitted to
375 endurance test at 60% of their maximal speed, *Npr1*^{+/-} mice exhibited a severely compromised
376 endurance running capacity (Fig. 6A). Consistently, both running time (Fig. 6B) and distance
377 (Fig. 6C) were significantly decreased in *Npr1*^{+/-} mice.

378 Because muscle oxidative capacity and mitochondrial function can be improved by
379 exercise training, we next tested whether the exercise training could partly attenuates the
380 impaired endurance capacity and mitochondrial dysfunction of *Npr1*^{+/-} mice. After 4 weeks of
381 endurance training on a treadmill, *Npr1*^{+/+} mice markedly improved their endurance capacity
382 since 43% of WT mice were still running after 80min while 100% had stopped running by
383 80min prior to training (Fig. 6D). Strikingly, *Npr1*^{+/-} mice conserved a poor endurance capacity

384 even after training since all mice had stopped running at 51min (Fig. 6D). Training compliance
385 was similar between genotypes (Supplementary Fig. 6D) while consistently running time (Fig.
386 6E) and distance (Fig. 6F) were both greatly lower in *Npr1*^{+/-} mice compared to WT mice.
387 While there is a trend towards a decrease of OXPHOS protein content in skeletal muscle of
388 *Npr1*^{+/-} mice, it did not reach statistical significance (Fig. 6G). In addition, respiratory capacity
389 of isolated mitochondria from *Npr1*^{+/-} mice was higher compared to WT (Fig. 6H). In addition,
390 the proton leak was higher in *Npr1*^{+/-} mice, and the basal respiration trended to be increased
391 (Fig. 6I and 6J).

392 Collectively, our data indicate that GCA haploinsufficiency impairs endurance capacity
393 and adaptations to endurance training in mice.

394 **DISCUSSION**

395 In summary, we here show that ANP/GCA deficiency primarily causes insulin
396 resistance and mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. This study provides strong
397 experimental evidences to prospective cohort studies in humans that ANP/GCA deficiency
398 causes insulin resistance and T2D.

399 Previous studies reported a lower body weight in NPRC KO compared to WT mice
400 (Ishikawa et al., 2019; Wu et al., 2017), thus suggesting a role for natriuretic peptide in the
401 control of energy balance. Here, after 12 weeks of HFD, no differences in body weight and
402 body composition were observed neither between *Npr1*^{+/+} and *Npr1*^{+/-} mice nor between *Nppa*^{+/+}
403 and *Nppa*^{-/-} mice. We cannot exclude that ANP or GCA deficient mice exhibit a decreased food
404 intake or an increased energy expenditure compared to WT littermate. However, both ANP and
405 GCA deficiency altered glucose homeostasis. Under standard SD, *Nppa*^{-/-} mice are insulin and
406 glucose intolerant while *Npr1*^{+/-} mice are only glucose intolerant. Under HFD, *Nppa*^{-/-} mice are
407 insulin intolerant and display increased fasting plasma insulin level compared to WT
408 littermates. This phenomenon is similar to the pre-diabetic state in humans. In *Npr1*^{+/-} mice,
409 fasting blood glucose is decreased while insulin is not affected. Moreover, these mice display
410 an increase of G6Pase activity, reflecting liver insulin resistance (Rooney et al., 1993).

411 Contrarily to NPRC knockout mice, which do not display skeletal muscle alterations
412 (Wu et al., 2017), we observed a decrease of insulin signaling in the skeletal muscle of *Npr1*^{+/-}
413 mice. Previous studies identified a role of ANP in mitochondria oxidative capacities. ANP
414 induces mitochondria biogenesis and increases lipid oxidation *in vitro* (Engeli et al., 2012).
415 Moreover, transgenic mice overexpressing cGK, the downstream protein in GCA signaling,
416 showed an improved insulin sensitivity and an increased mitochondria biogenesis associated
417 with the presence of giant mitochondria in skeletal muscles (Miyashita et al., 2009). In
418 agreement with these studies, we show here that *Npr1*^{+/-} mice have dysfunctional mitochondria.

419 Indeed, the increased proton leak is a reflect of defective mitochondria (Cheng et al., 2017;
420 Jastroch et al., 2010). The decrease of proton gradient across the inner mitochondrial membrane
421 by proton leak reduces mitochondrial efficiency and induces energy loss. The increased basal
422 respiration observed in *Npr1*^{+/-} mice could be an adaptive mechanism to counteract this defect.
423 However, it is well-known that the electron transport chain is the primary source of reactive
424 oxygen species (ROS) and that oxidative stress may be induced by defective mitochondria
425 (Cheng et al., 2017; Jastroch et al., 2010). Thus, we investigated anti-oxidant enzyme activities
426 and unexpectedly found an increased GPx activity in *Npr1*^{+/-} mice. However, a study on GPx
427 KO mice revealed that Gpx1 deficiency enhances insulin signaling *in vivo* by the inhibition of
428 PTEN (phosphatase with tensin homology), a negative modulator of the PI3K/Akt pathway, to
429 attenuate the development of insulin resistance (Loh, 2009). In line with these findings, a
430 previous study indicated that GPX1 overexpression induces insulin resistance in mice
431 (McClung et al., 2004). Also, it has been showed that GPx can be induced in response to
432 oxidative stress (Zhou et al., 2001). Consequently, we propose that in *Npr1*^{+/-} mice, defective
433 leaky mitochondria increase GPx activity which in turn increase PTEN protein level and impair
434 insulin signaling in skeletal muscle.

435 As the causal effect of defective oxidative capacities in the development of insulin
436 resistance remains controversial, we aimed to explore mitochondrial function in *Npr1*^{+/-} mice
437 before the apparition of insulin resistance. Under SD, *Npr1*^{+/-} mice already display deficient
438 mitochondria, with a trend towards an increased proton leak and basal respiration associated
439 with a reduction of OXPHOS protein content. In addition, skeletal muscle fiber composition is
440 altered with a decrease of type IIa oxidative fibers content in *Npr1*^{+/-} mice. This is in agreement
441 with a recent study showing an increase of Myh7 expression, the major myosin heavy chain
442 isoform of oxidative fibers (i. e. type I fibers) and a decrease of Myh1 expression, the major
443 isoform of type IIX fibers, in skeletal muscles of NPRC KO mice (Ishikawa et al., 2019). These

444 results reveal that mitochondria deficiency is already present under SD, and induces insulin
445 resistance when *Npr1*^{+/-} mice are challenged by a HFD.

446

447 In conclusion, these results provide compelling evidences for a causal link between
448 ANP/GCA deficiency and the development of insulin resistance and poor endurance capacity
449 in mice. Thus, ANP/GCA deficiency seems to primarily impact on skeletal muscle insulin
450 signaling and oxidative capacity. The precise underlying mechanisms linking ANP/GCA
451 signaling to mitochondrial function and fiber-type determination should be further investigated
452 in future studies.

453

454 **Author contributions**

455 Conceptualization, D.C. and C.M.; Methodology, D.C. and C.M.; Investigation, D.C., M.C.,
456 J.A., L.M., C.L., J.VP., L.M., P.DC., V.B., D.L., R.M., G.M., C.C., C.FC., C.M. ; Resources,
457 R.M., G.M., C.C., C.CF., D.L.; Writing – Original Draft, D.C. and C.M.; Writing – Review &
458 Editing, D.C., C.L. and C.M.; Supervision, D.C. and C.M.; Funding Acquisition, D.L. and C.M.

459

460 **Acknowledgements**

461 This work was supported by grants from Inserm, Société Francophone du Diabète and European
462 Foundation for the Study of Diabetes (C.M.). D.C. is supported by a Ph.D. fellowship from
463 Inserm/Occitanie Region. We also thank Alexandre Lucas (APC core facility), Frédéric Martins
464 (GET-TQ core facility), Lucie Fontaine (Histology core facility). D.L. is a member of Institut
465 Universitaire de France.

466

467 **Competing interests:** The authors declare no competing interests.

468

469 **References**

- 470 Beers, R.F., and Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown
471 of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* *195*, 133–140.
- 472 Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseau, E., Chauvin, M.-A., Morio, B., Vidal, H.,
473 and Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal
474 muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 789–800.
- 475 Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N.,
476 Sarzani, R., and Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce
477 the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of Clinical*
478 *Investigation* *122*, 1022–1036.
- 479 Cheng, J., Nanayakkara, G., Shao, Y., Cueto, R., Wang, L., Yang, W.Y., Tian, Y., Wang, H.,
480 and Yang, X. (2017). Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of
481 Cardiovascular Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* *982*, 359–370.
- 482 Coué, M., Badin, P.-M., Vila, I.K., Laurens, C., Louche, K., Marquès, M.-A., Bourlier, V.,
483 Mouisel, E., Tavernier, G., Rustan, A.C., et al. (2015). Defective Natriuretic Peptide Receptor
484 Signaling in Skeletal Muscle Links Obesity to Type 2 Diabetes. *Diabetes* *64*, 4033–4045.
- 485 Coué, M., Barquissau, V., Morigny, P., Louche, K., Lefort, C., Mairal, A., Carpéné, C.,
486 Viguerie, N., Arner, P., Langin, D., et al. (2018). Natriuretic peptides promote glucose uptake
487 in a cGMP-dependent manner in human adipocytes. *Sci Rep* *8*, 1097.
- 488 Desgeorges, T., Liot, S., Lyon, S., Bouvière, J., Kemmel, A., Trignol, A., Rousseau, D.,
489 Chapuis, B., Gondin, J., Mounier, R., et al. (2019). Open-CSAM, a new tool for semi-automated
490 analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle. *Skelet Muscle*
491 *9*, 2.
- 492 Engeli, S., Birkenfeld, A.L., Badin, P.-M., Bourlier, V., Louche, K., Viguerie, N., Thalamas,
493 C., Montastier, E., Larrouy, D., Harant, I., et al. (2012). Natriuretic peptides enhance the
494 oxidative capacity of human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *122*, 4675–4679.
- 495 Flohé, L., and Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* *105*,
496 114–121.
- 497 Ishikawa, K., Hara, T., Mizukawa, M., Fukano, Y., and Shimomura, T. (2019). Natriuretic
498 peptide signaling is involved in the expression of oxidative metabolism-related and muscle fiber
499 constitutive genes in the gastrocnemius muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* *494*, 110493.
- 500 Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., and Brand, M.D. (2010).
501 Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* *47*, 53–67.
- 502 Kovacova, Z., Tharp, W.G., Liu, D., Wei, W., Xie, H., Collins, S., and Pratley, R.E. (2016).
503 Adipose tissue natriuretic peptide receptor expression is related to insulin sensitivity in obesity
504 and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* *24*, 820–828.
- 505 Kuhn, M. (2016). Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol.*
506 *Rev.* *96*, 751–804.

- 507 Lazo, M., Young, J.H., Brancati, F.L., Coresh, J., Whelton, S., Ndumele, C.E., Hoogeveen, R.,
508 Ballantyne, C.M., and Selvin, E. (2013). NH₂-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of
509 diabetes. *Diabetes* 62, 3189–3193.
- 510 Magnusson, M., Jujic, A., Hedblad, B., Engström, G., Persson, M., Struck, J., Morgenthaler,
511 N.G., Nilsson, P., Newton-Cheh, C., Wang, T.J., et al. (2012). Low plasma level of atrial
512 natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer
513 study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 638–645.
- 514 McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., and Lei, X.G. (2004).
515 Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione
516 peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8852–8857.
- 517 Mithieux, G., Rajas, F., and Gautier-Stein, A. (2004). A novel role for glucose 6-phosphatase
518 in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*
519 279, 44231–44234.
- 520 Miyashita, K., Itoh, H., Tsujimoto, H., Tamura, N., Fukunaga, Y., Sone, M., Yamahara, K.,
521 Taura, D., Inuzuka, M., Sonoyama, T., et al. (2009). Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-
522 dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent
523 obesity. *Diabetes* 58, 2880–2892.
- 524 Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., and Dickey, D.M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors,
525 and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr. Rev.* 27, 47–72.
- 526 Roden, M., and Shulman, G.I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 576,
527 51–60.
- 528 Rooney, D.P., Neely, R.D.G., Beatty, O., Bell, N.P., Sheridan, B., Atkinson, A.B., Trimble,
529 E.R., and Bell, P.M. (1993). Contribution of glucose/glucose 6-phosphate cycle activity to
530 insulin resistance in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 106–
531 112.
- 532 Wang, T.J., Larson, M.G., Keyes, M.J., Levy, D., Benjamin, E.J., and Vasan, R.S. (2007).
533 Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory
534 individuals. *Circulation* 115, 1345–1353.
- 535 Wisløff, U., Najjar, S.M., Ellingsen, O., Haram, P.M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernström, M.,
536 Rezaei, K., Lee, S.J., Koch, L.G., et al. (2005). Cardiovascular risk factors emerge after
537 artificial selection for low aerobic capacity. *Science* 307, 418–420.
- 538 Wu, W., Shi, F., Liu, D., Ceddia, R.P., Gaffin, R., Wei, W., Fang, H., Lewandowski, E.D., and
539 Collins, S. (2017). Enhancing natriuretic peptide signaling in adipose tissue, but not in muscle,
540 protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Sci. Signal.* 10.
- 541 Zhou, L.Z., Johnson, A.P., and Rando, T.A. (2001). NF kappa B and AP-1 mediate
542 transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31,
543 1405–1416.
- 544

545 **Figure legends**

546

547 **Figure 1 – ANP deficiency promotes insulin resistance in mice**

548 Body weight of *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice under standard diet (SD) (n=7-8) or high fat diet
549 (HFD) (n=15-16) (A). Blood glucose in *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice fed a SD during a glucose
550 tolerance test (GTT) (n=8) (B) and an insulin tolerance test (ITT) (n=13) (C). Blood glucose in
551 *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice fed a HFD during a GTT (D) and an ITT (n=6-7) (E). Blood insulin
552 (n=4-11) (F) and blood glucose (n=6-15) (G) in *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice fed a SD or HFD.*
553 p≤0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001.

554

555 **Figure 2 – GCA haploinsufficiency exacerbates HFD-induced insulin resistance**

556 Body weight of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice under HFD (n=8-14) (A). Blood glucose in *Npr1*^{+/-}
557 and *Npr1*^{+/+} mice fed a SD during a GTT (n=7-9) (B) and an ITT (n=17-21) (C). Blood glucose
558 in *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a HFD for 4 (n=17-25) (D), 8 (n=17-25) (E) or 12 (n=9-11) (F)
559 weeks during an ITT and area above the curve of these ITT (G). Fasting blood insulin (n=7-9)
560 (H) and blood glucose (n=24-34) (I) in *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a SD or HFD.* p≤0.05, **
561 p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

562

563 **Figure 3 – GCA haploinsufficiency causes insulin resistance in skeletal muscle**

564 2DG-glucose uptake in the soleus, EDL and tibialis of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice after *in vivo*
565 insulin stimulation (n=6) (A). Akt-ser473/Akt ratio in the EDL from *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice
566 after *in vivo* insulin stimulation (n=6) (B) or *ex vivo* insulin stimulation (n=8-14) (C). GPx
567 activity in the skeletal muscle of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=7) (D). PTEN protein expression
568 in the tibialis and the soleus of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=7-14) (E). * p≤0.05, ** p<0.01, \$
569 p=0.06.

570

571 **Figure 4 – GCA haploinsufficiency induces mitochondrial dysfunction in skeletal muscle**
572 **under HFD**

573 OXPHOS protein expression in the soleus (A) and tibialis (B) of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed
574 a HFD (n=8-14). Oxygen consumption rate (OCR) (C), proton leak (D), maximal respiration
575 capacity (E) and basal respiration (F) of isolated mitochondria from skeletal muscle of *Npr1*^{+/-}
576 and *Npr1*^{+/+} mice under fed a HFD (n=8). Citrate synthase activity of total skeletal muscle (n=7-
577 11) (G) or isolated mitochondria from skeletal muscle (n=8) (H) of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice
578 fed a HFD. * p≤0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

579

580 **Figure 5 – GCA haploinsufficiency induces mitochondria dysfunction in skeletal muscle**
581 **under SD**

582 OXPHOS protein expression in the skeletal muscle of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a SD (n=6-
583 7) (A). Isolated mitochondria OCR (B), proton leak (C) and basal respiration (D) from skeletal
584 muscle of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a SD (n=3). Representative *Tibialis* fiber typing in
585 *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a SD with in green type IIa fibers, in ref type IIb fibers and in
586 black type IIx fibers. (E) Percentage of type IIa, IIb and IIx fiber in the tibialis of *Npr1*^{+/-} and
587 *Npr1*^{+/+} mice fed a SD (n=5-7) (F). ** p<0.01.

588

589 **Figure 6 – Impaired endurance capacity and adaptations to training in GCA**
590 **haploinsufficient mice**

591

592 Percent mice running (A), running time (B) and running distance (C) of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+}
593 mice during an endurance tolerance test (n=14). Percent mice running (D), running time (E)
594 and running distance (F) of *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice during an endurance tolerance test after 4

595 weeks of training (n=20-23). OXPHOS protein expression in the skeletal muscle of *Npr1*^{+/-} and
596 *Npr1*^{+/+} mice after training (n=7-8) (G). OCR (H), proton leak (I) and basal respiration (J) of
597 isolated mitochondria from skeletal muscle of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice after training (n=3). *
598 p≤0.05, ** p<0.01.

599 **Supplementary Table 1**

600 Taqman chemistry:

Gene symbol	Taqman Probe
<i>Cpt1b</i>	Mm00487200_m1
<i>Npr1</i>	Mm00435324_m1
<i>Npr3</i>	Mm00435329_m1
<i>Pgc1α</i>	Mm01208835_m1
<i>Ucp1</i>	Mm01244861_m1
<i>18s</i>	Hs99999901_s1
<i>F4/80</i>	Mm00802530_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1
<i>Tfam</i>	Mm00447485-m1
<i>Tgfb</i>	Mm01178819_m1
<i>G0s2</i>	Mm00484537-g1
<i>Cgi58</i>	Mm00470731_m1
<i>Hsl</i>	Mm00495353_m1
<i>Gys1</i>	Mm_00472712-m1
<i>Glut2</i>	Mm00446229-m1
<i>Pepck</i>	Mm00440636_m1
<i>Srebpl</i>	Mm01138344_m1

601

602 SYBR chemistry :

603

Gene symbol	Forward	Reverse
<i>Acc1</i>	GCCTCTTCCTGACAAACGAG	TGACTGCCGAAACATCTCTG
<i>Atgl</i>	TCCTTAGGAGGAATGGCCTAC	TCCTCTTCCTGGGGGACAAC
<i>Fas</i>	TGGTGAATTGTCTCCGAAAAG	CACGTTTCATCACGAGGTCATG
<i>G6p</i>	ACACCGACTACTACAGCAACAG	CCTCGAAAGATAGCAAGAGTAG
<i>Nppa</i>	CTGCTTCGGGGGTAGGATTG	TTCGGTACCGGAAGCTGT
<i>Nppb</i>	GCTGCTTTGGGCACAAGATA	ACAACAACCTCAGTGCATTACAG
<i>Ppara</i>	AGTTCACGCATGTGAAGGCTG	TGTTCCGGTTCTTCTTCTGAATC
<i>Il-6</i>	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCGCCGACTTG
<i>Il-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>Mcp1</i>	ACTGAAGCCAGCTCTCTTCTCCTC	TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC

<i>Il1β</i>	CAGGCAGGCAGTATCACTCA	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
<i>Atf4</i>	GAGCTTCCTGAACAGCGAAGTG	TGGCCACCTCCAGATAGTCATC
<i>Xbp1-s</i>	TGAGAACCAGGAGTTAAGAACACGC	CCTGCACCTGCTGCGGAC
<i>Xbp1-us</i>	TGAGAACCAGGAGTTAAGAACACGC	CCTGCACCTGCTGCGGAC
<i>Ppara</i>	AGTTCACGCATGTGAAGGCTG	TGTTCCGGTTCTTCTTCTGAATC

604

605 **Supplementary Figure legends**

606

607 **Supplementary Figure 1 – ANP deficiency promotes insulin resistance in mice**

608 Cardiac *Nppa* (A) and *Nppb* (B) expression in *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice (n=6-8). *Npr1* (C) and
609 *Npr3* (D) expression in the skeletal muscle and the adipose tissue of *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice
610 (n=4-8). Heart weight to body weight ratio (n=32-33) (E) and left ventricular ejection fraction
611 (n=7) (F) in *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+} mice. Lean mass (G) and fat mass (H) of *Nppa*^{-/-} and *Nppa*^{+/+}
612 mice fed a SD (n=22-26) or HFD (n=6-7). * p≤0.05, **** p<0.0001.

613

614 **Supplementary Figure 2 – GCA haploinsufficiency exacerbates HFD-induced insulin**
615 **resistance**

616 *Npr1* (A) and *Npr3* (B) expression in the skeletal muscle and the adipose tissue of *Npr1*^{+/-} and
617 *Npr1*^{+/+} mice (n=5-12). Plasma ANP (C) and BNP (D) levels in *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=5-
618 8). Heart weight to body weight ratio (n=16-22) (E) and left ventricular ejection fraction (n=7-
619 14) (F) in *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice. Lean mass (G) and fat mass (H) of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice
620 fed a SD (n=4-6) or HFD (n=8-14). Blood glucose in *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a HFD during
621 a GTT (n=26-32) (I). * p≤0.05, *** p<0.001, **** p<0.0001.

622

623 **Supplementary Figure 3. Impaired glucose homeostasis in GCA haploinsufficient mice is**
624 **associated with marginal changes in adipose tissue**

625 Adipose tissues (eWAT, iWAT, retroperitoneal WAT (rpWAT) and BAT) weight in *Npr1*^{+/-} and
626 *Npr1*^{+/+} mice (n=7-9) (A). Adipocytes area (B) and number (C) in the WAT of *Npr1*^{+/-} and
627 *Npr1*^{+/+} mice (n=3-5). 2DG-glucose uptake induced by insulin in the epididymal white adipose
628 tissue (eWAT), inguinal WAT (iWAT) and brown adipose tissue (BAT) of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+}
629 mice (n=6) (D). *Hsl*, *Atgl* (E) and *Cgi58*, *G0s2* (F) mRNA expression in WAT of *Npr1*^{+/-} and
630 *Npr1*^{+/+} mice (n=7-11). Protein expression of ATGL (G) and LHS-s660 (H) in the WAT of
631 *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=7-9). Inflammation markers mRNA expression in the WAT of
632 *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=7-14) (I). Thermogenic gene and *Npr1* expression in the BAT of
633 *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=6-14) (J). ** p<0.01

634

635 **Supplementary Figure 4. Impaired glucose homeostasis in GCA haploinsufficient mice is**
636 **associated with marginal changes in liver**

637 Representative images of liver H&E staining of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice and quantification of
638 lipid content (n=10-16) (A). Liver glycogen content of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=6-8) (B).
639 PEPCCK protein content (C) and G6Pase activity (D) in the liver of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice
640 (n=4-5). Lipid oxidation (E), glucose metabolism (F) and *de novo* lipogenesis gene expression
641 in the liver of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=5-7). ** p<0.01.

642

643 **Supplementary Figure 5. GCA haploinsufficiency induces mitochondrial dysfunction in**
644 **skeletal muscle**

645 *F4/80*, *IL6*, *TNFα*, *MCP1* and *IL1β* mRNA expression in the skeletal muscle of *Npr1*^{+/-} and
646 *Npr1*^{+/+} mice (n=14-23) (A). *ATF4*, *XBPI-s* and *XBPI-us* mRNA expression in the skeletal
647 muscle of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice (n=14-23) (B). SOD (C) and CAT (D) activity in the skeletal
648 muscle of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice fed a HFD. OXPHOS protein content in EDL of *Npr1*^{+/-} and
649 *Npr1*^{+/+} mice fed a HFD (E). * p≤0.05

650

651 **Supplementary Figure 6. Impaired endurance capacity and adaptations to training in**

652 **GCA haploinsufficient mice**

653

654 Maximal speed (A), running time (B), running distance (C) during a maximal capacity test

655 (n=13-16). Compliance of *Npr1*^{+/-} and *Npr1*^{+/+} mice during training (D).

Figure 1

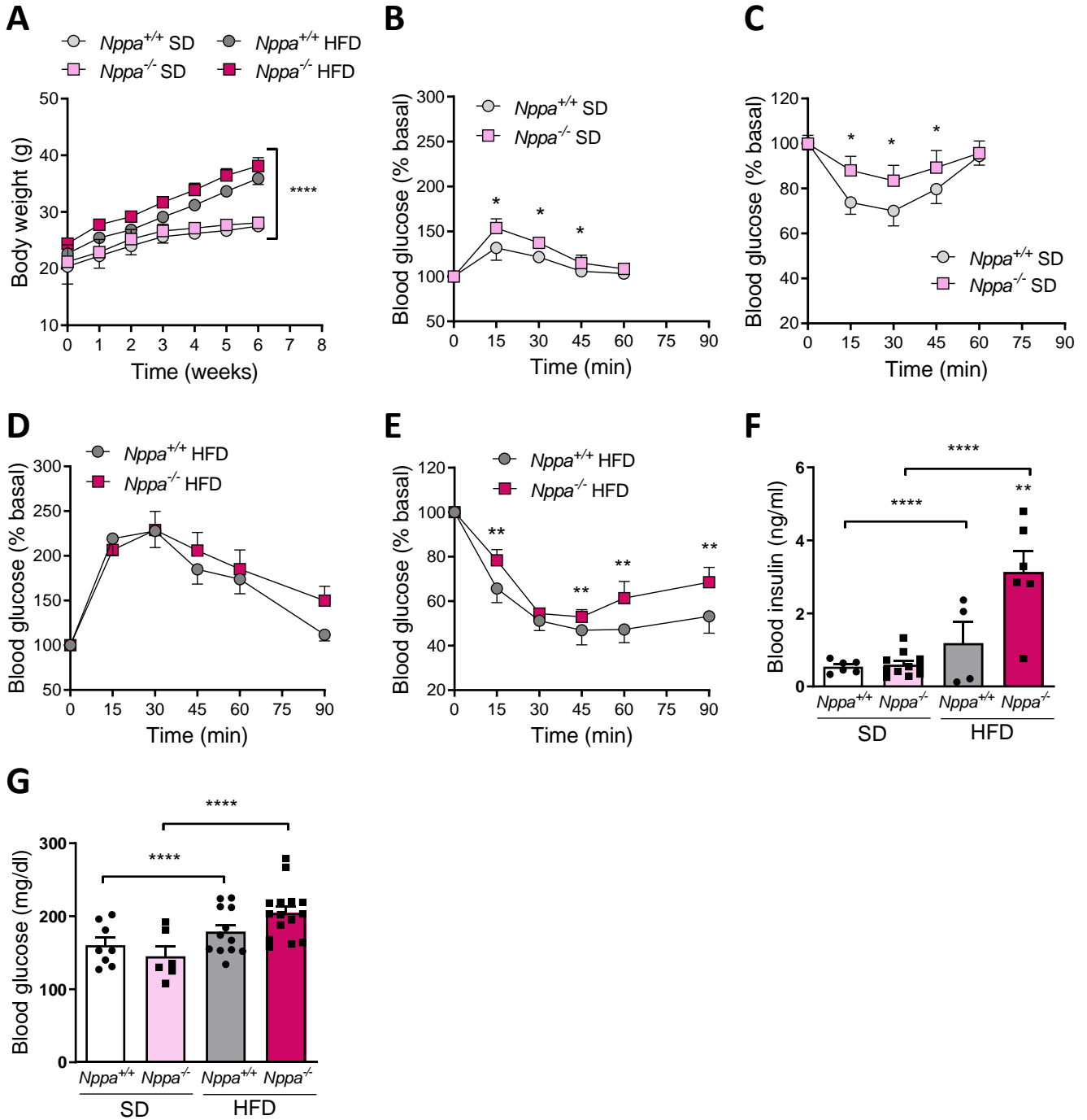


Figure 2

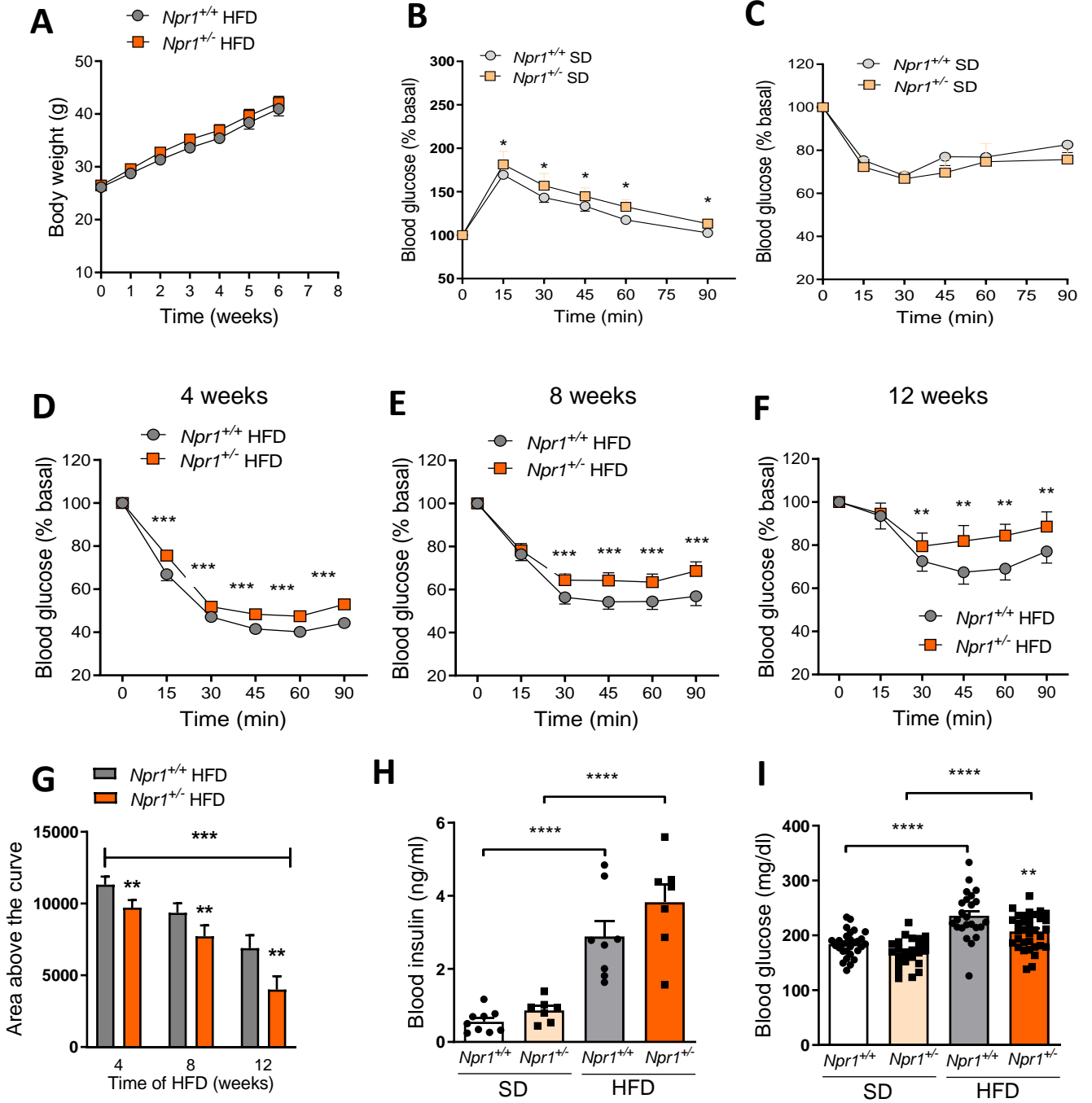


Figure 3

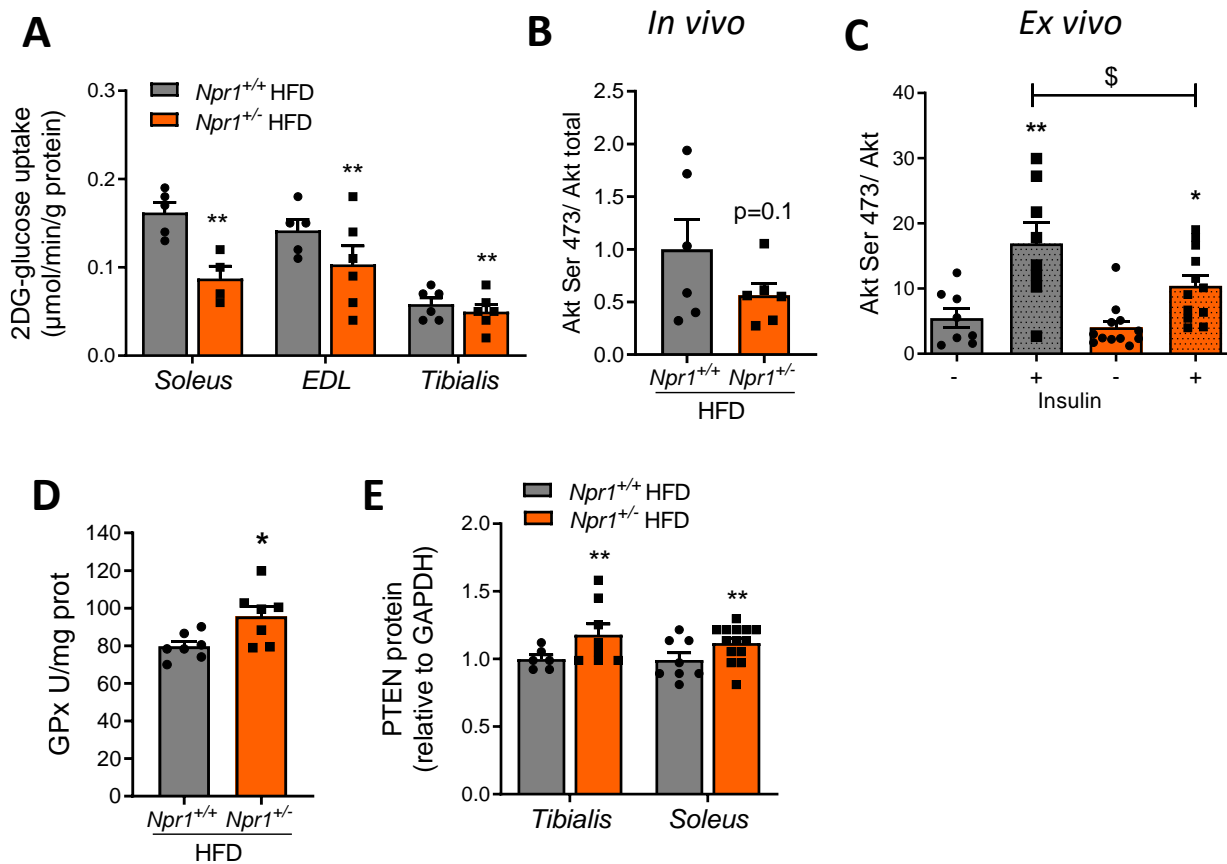


Figure 4

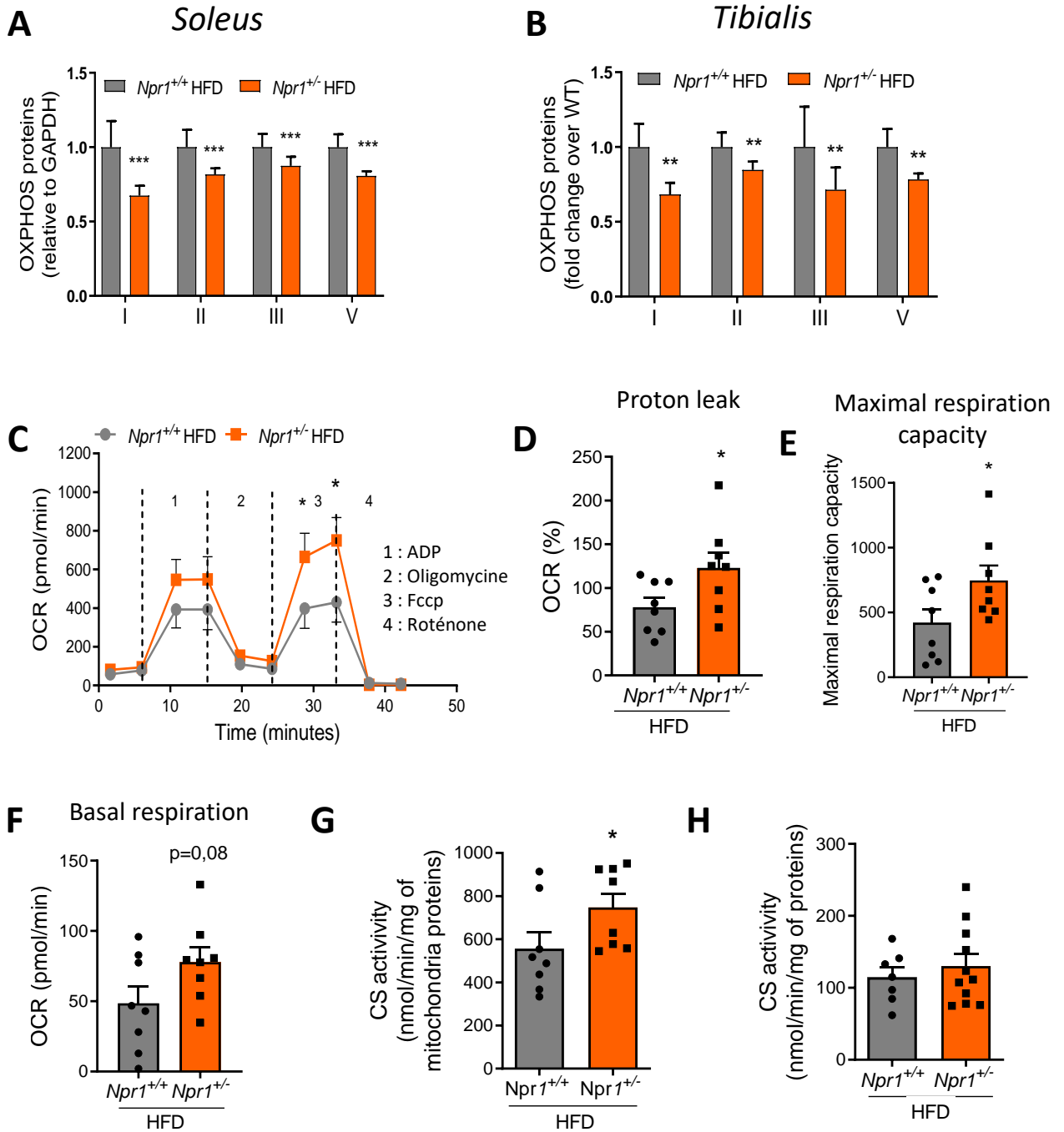


Figure 5

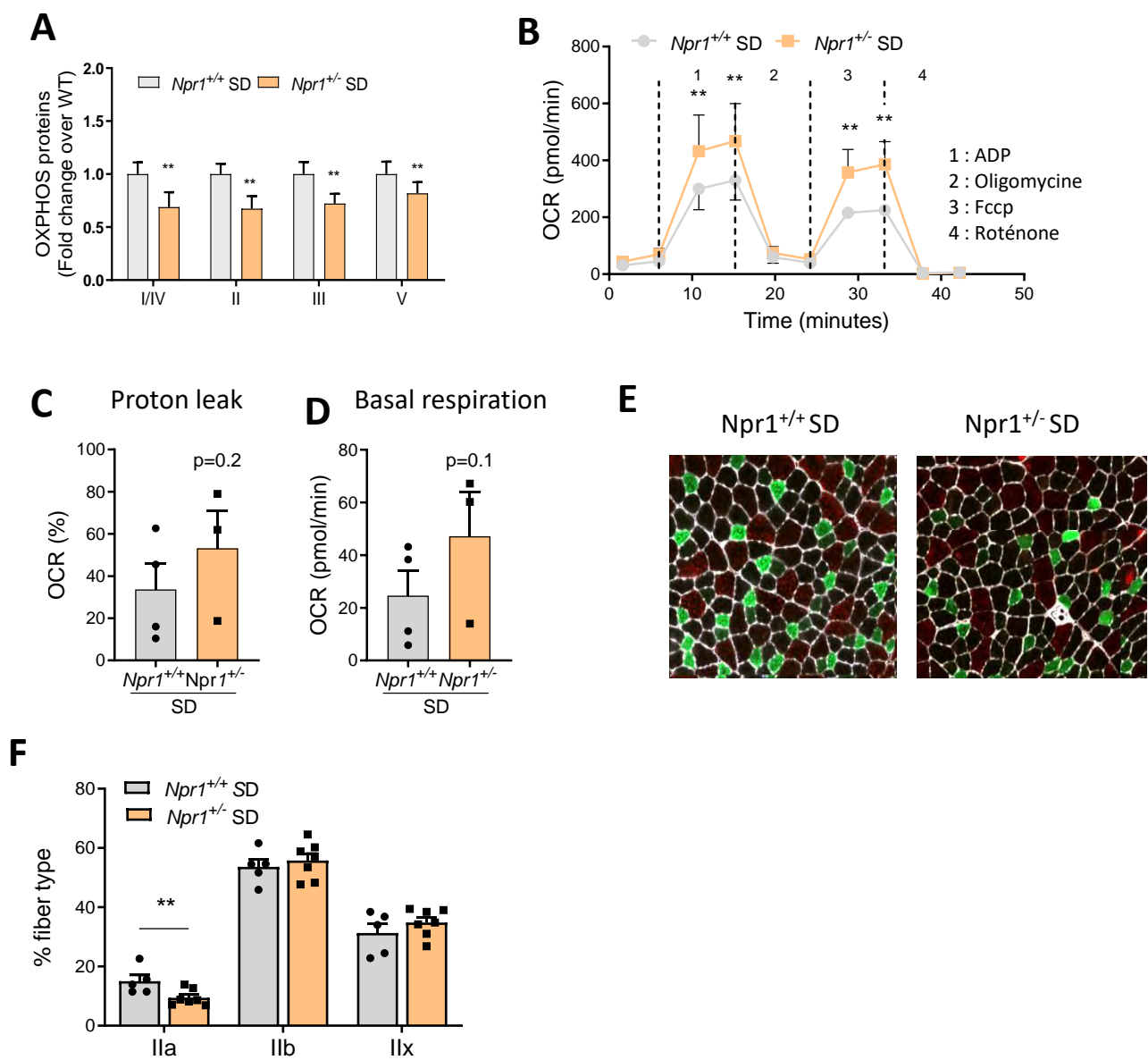
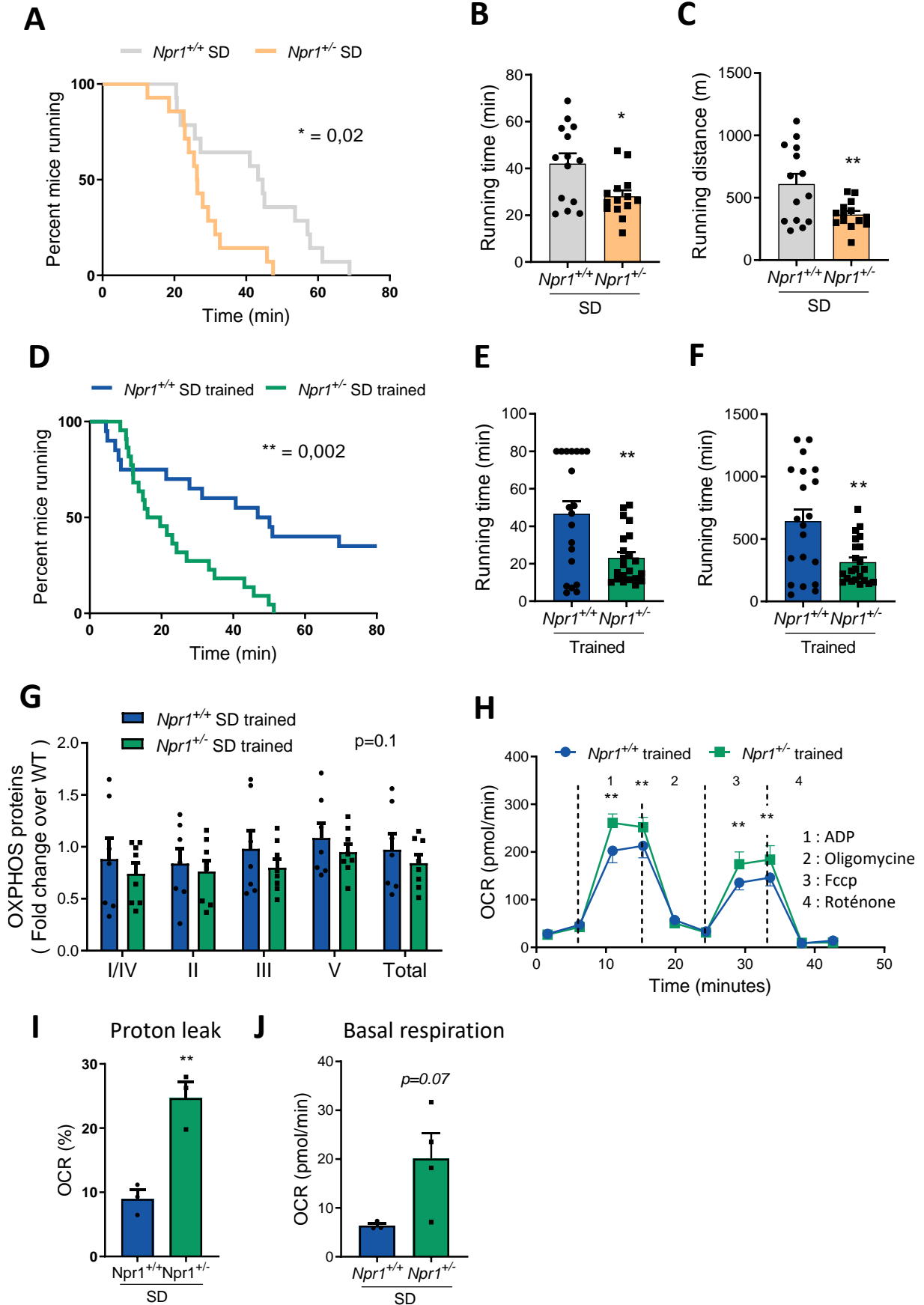
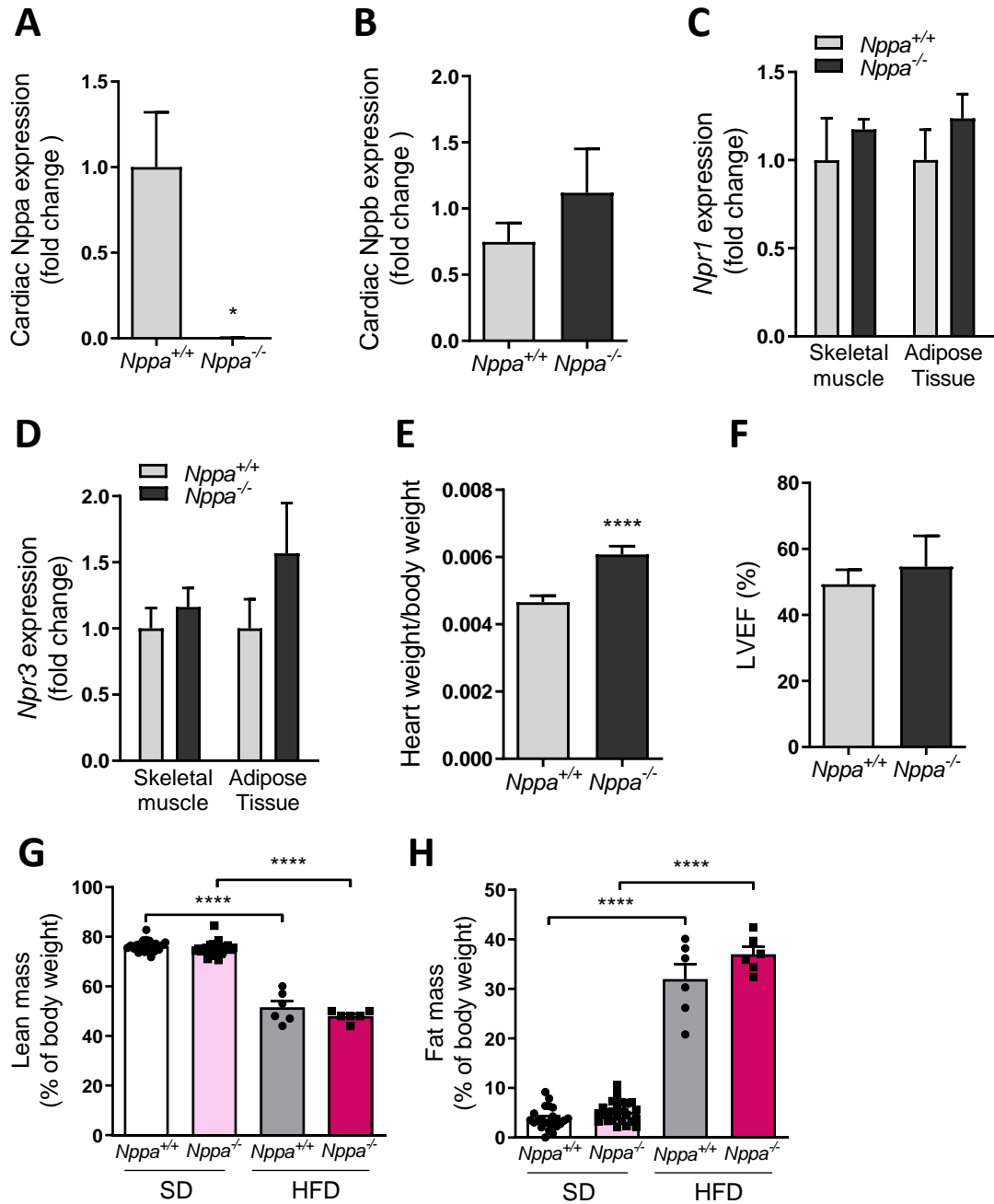


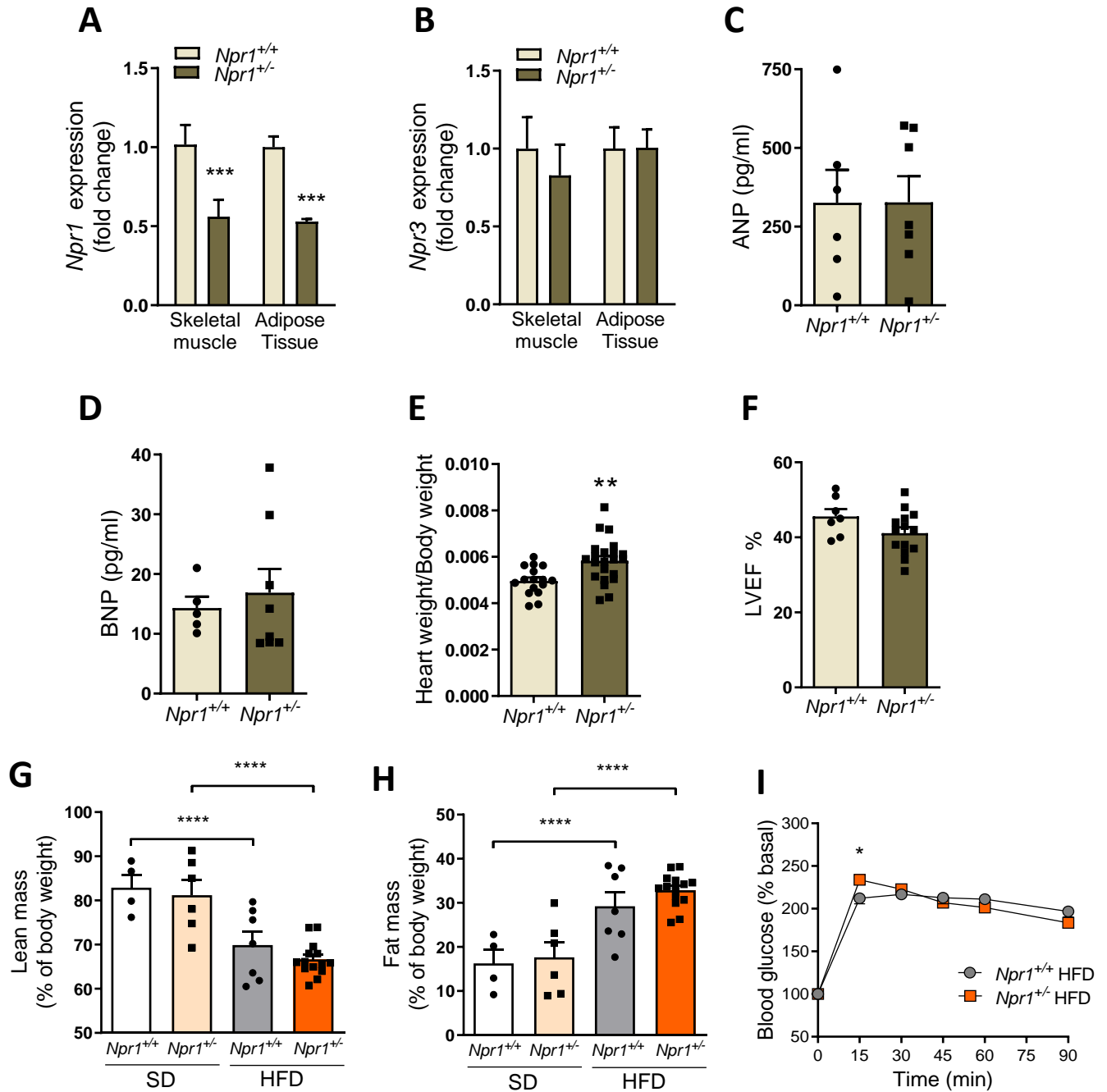
Figure 6



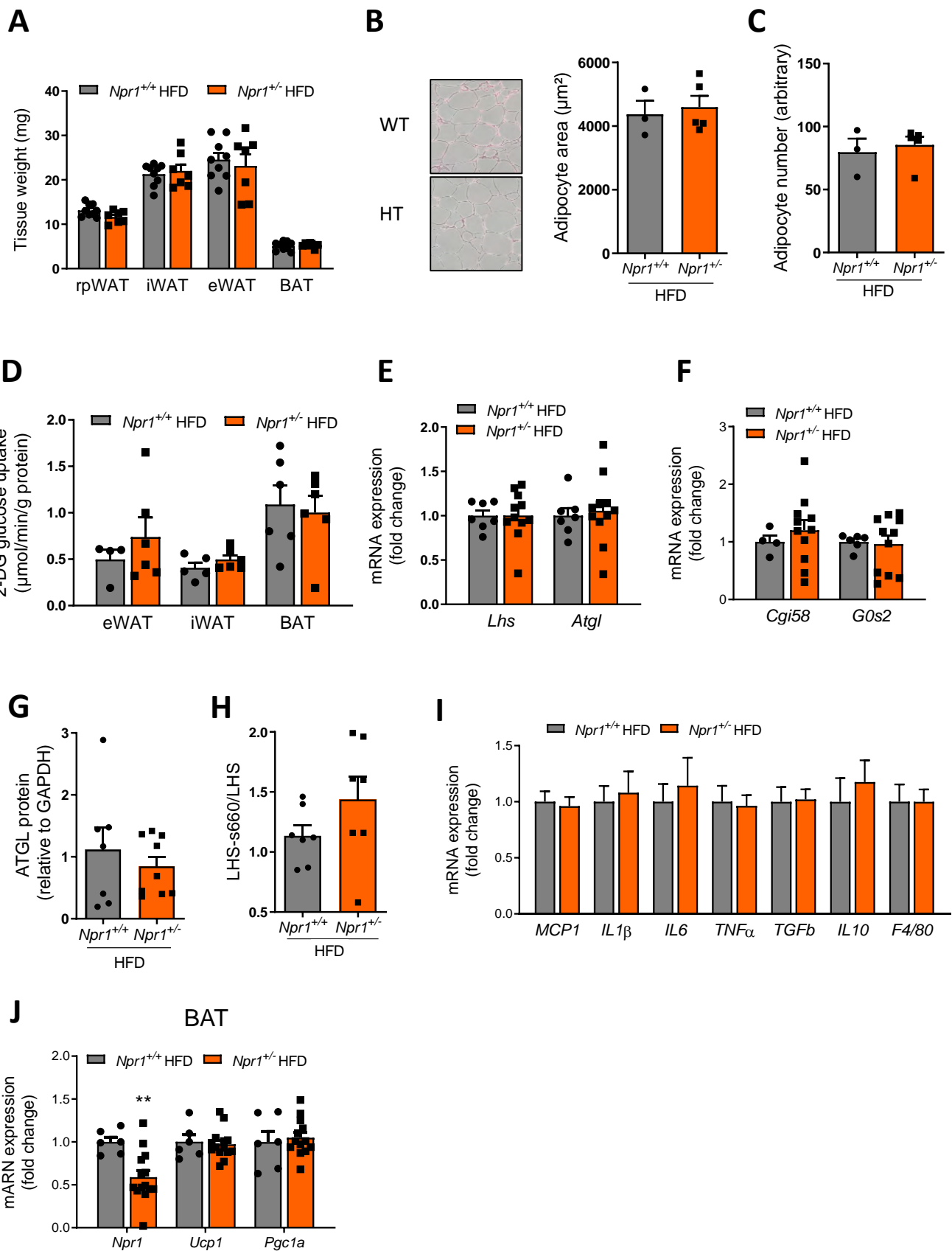
Supplementary Figure 1



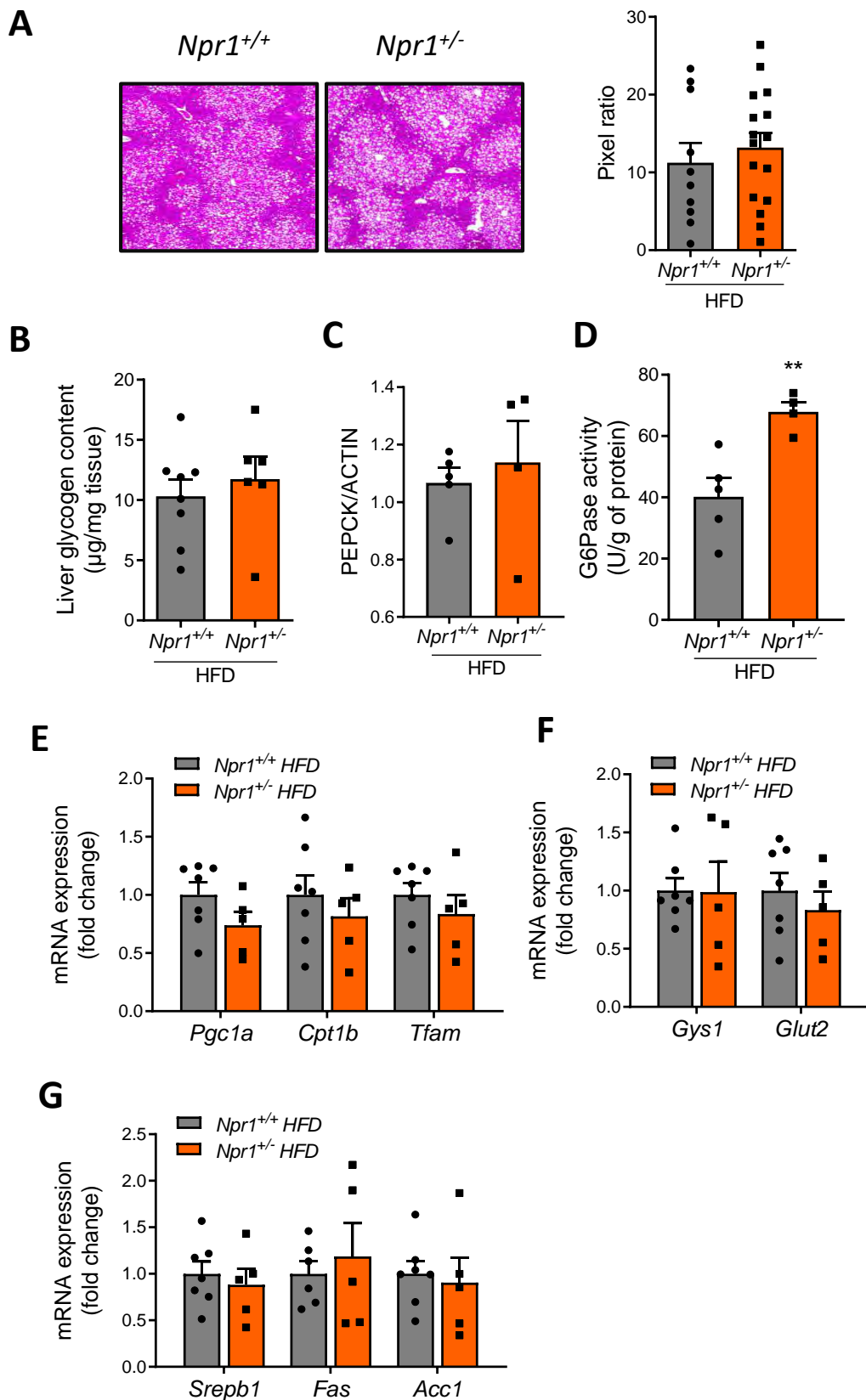
Supplementary Figure 2



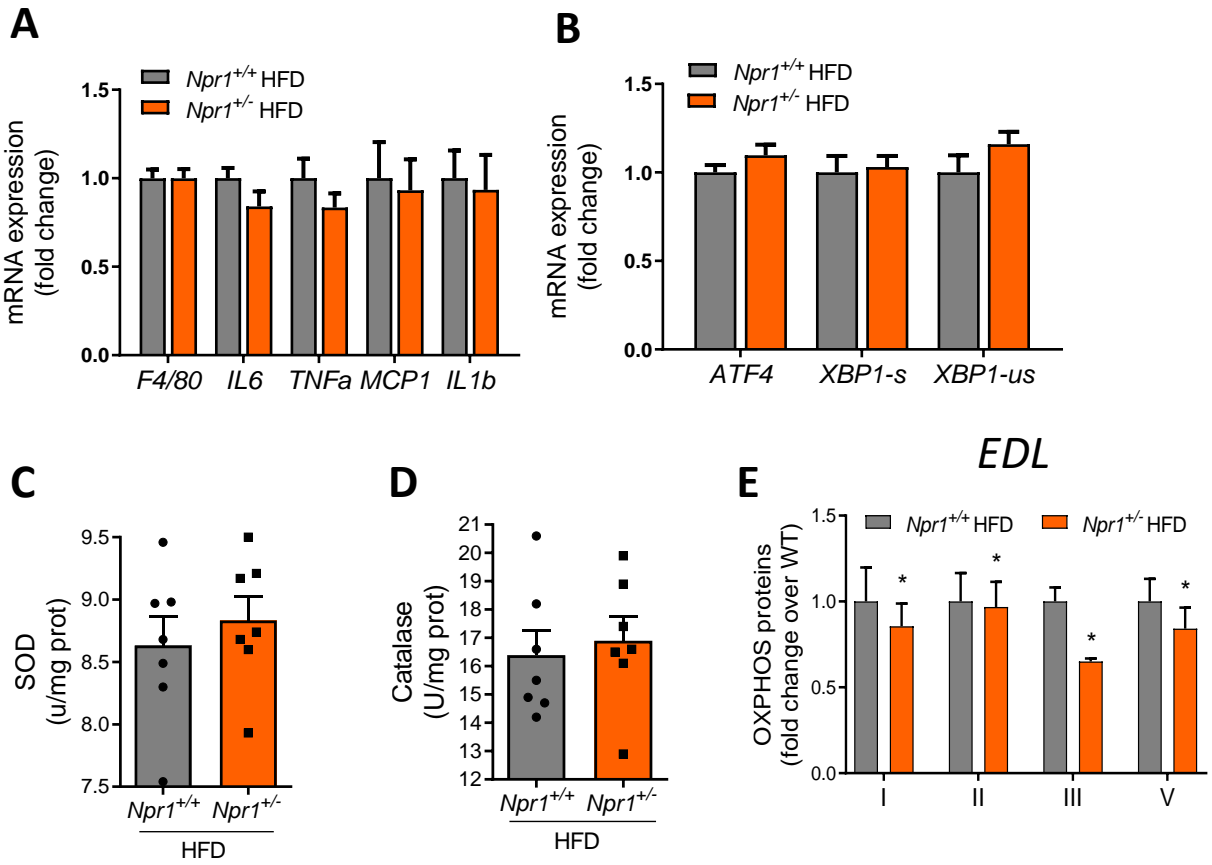
Supplementary Figure 3



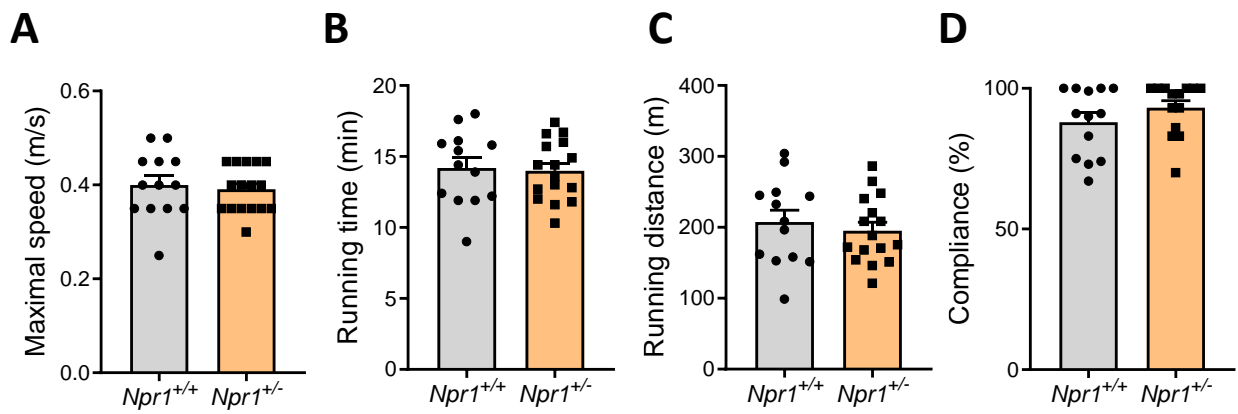
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



Discussion

Premièrement nous avons montré qu'un déficit en ANP ou en GC-A était suffisant pour induire une insulino-résistance. Des études précédentes ont montré qu'une déficience en NPRC, le récepteur de clairance des PN, induit une diminution du poids corporel des souris qui est attribuée à une diminution de la masse grasse (Ishikawa et al. 2019; W. Wu et al. 2017). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé d'altération du poids corporel et de la composition corporelle chez les souris déficientes pour l'ANP ou haploinsuffisantes pour GC-A soumises à un régime HFD. Néanmoins, en accord avec l'amélioration du statut glucidique chez les souris NPRC déficientes (Ishikawa et al. 2019; W. Wu et al. 2017), l'homéostasie glucidique est altérée chez ces deux modèles de souris présentant un déficit du système ANP/GC-A.

Par la suite, le travail a consisté à déterminer par quel(s) mécanisme(s) le déficit en ANP/GC-A induisait une insulino-résistance. Comme il y a une diminution d'environ 50% de l'expression de GC-A dans les tissus métaboliques des patients diabétiques de type 2, nous avons choisi d'utiliser le modèle de souris GC-A haploinsuffisantes qui, pour une perspective physiopathologique, est plus pertinent que les souris déficientes pour l'ANP. Chez les souris GC-A haploinsuffisantes, nous avons étudié les trois tissus cibles de l'insuline et nous avons observé une insulino-résistance musculaire et une augmentation de l'activité G6Pase dans le foie sans altération du tissu adipeux. L'augmentation de l'activité G6Pase hépatique ne pourrait être qu'un reflet, une conséquence, de l'insulino-résistance des souris GC-A haploinsuffisantes (Rooney et al. 1993). Or le muscle squelettique peut capter jusqu'à 85% de glucose en réponse à l'insuline, une insulino-résistance musculaire peut largement altérer la sensibilité à l'insuline systémique. Nous avons voulu comprendre le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'insulino-résistance musculaire.

Plusieurs études ont identifié un rôle de l'ANP dans les capacités oxydatives mitochondriales. En effet, l'équipe a montré *in vitro* que l'ANP peut induire une augmentation des capacités oxydatives et de la biogénèse mitochondriale dans le muscle squelettique, notamment par l'activation de l'expression de PGC1 α (Engeli et al. 2012). De plus, les souris qui surexpriment la PKG I, cible de GMPc, présentent une augmentation de la biogénèse

mitochondriale avec la présence de mitochondries géantes dans leurs muscles squelettiques (Miyashita et al. 2009). Nous nous sommes alors demandé si les capacités oxydatives musculaires des souris haploinsuffisantes pour GC-A étaient altérées. Bien que nous voyions une diminution de la quantité des complexes OXPHOS de la chaîne de transfert des électrons dans différents muscles squelettiques des souris GC-A haploinsuffisantes, de façon contre-intuitive la respiration basale des mitochondries isolées est augmentée. Cependant, ces mitochondries présentent aussi une augmentation de la fuite de protons qui est une caractéristique de mitochondries défectueuses (Cheng et al. 2017; Jastroch et al. 2010). En effet, la diminution du gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale, induite par la fuite de ceux-ci, diminue l'efficacité des mitochondries ce qui induit une perte d'énergie. L'augmentation de la respiration basale observée pourrait être un mécanisme compensatoire de cette perte d'énergie. Nous regarderons prochainement l'expression de protéines impliquées dans la fuite de protons comme les protéines découplantes ANT (*adenine nucleotide translocator*) et UCP (*uncoupling protein*). Aussi, de façon intéressante, l'activité citrate synthase des mitochondries isolées est augmentée chez les souris GC-A haploinsuffisantes alors que celle du muscle entier est inchangée comparée aux souris sauvages. Ceci pourrait être un reflet d'une diminution du nombre de mitochondries dans le muscle squelettique des souris déficientes pour le système ANP/GC-A. Des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser la dysfonction mitochondriale observée chez les souris GC-A haploinsuffisantes:

- La biogenèse mitochondriale est-elle altérée ? Pour cela, nous analyserons la quantité des mitochondries musculaires par des analyses de MET ainsi que des quantifications du ratio d'ADNmt sur l'ADN nucléaire (ADNn) dans les muscles de souris haploinsuffisantes pour GC-A et sauvages. Nous regarderons également l'expression de facteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale et notamment PGC1 α qui a déjà été défini comme une cible de l'ANP (Engeli et al. 2012).

- La dynamique mitochondriale est-elle altérée ? Les mitochondries sont continuellement entrain de fusionner et fissionner. Il a été montré qu'une altération de cette dynamique mitochondriale engendre un dysfonctionnement de celles-ci et peut moduler la signalisation à l'insuline (Holmström et al. 2012; Jheng et al. 2012; Joseph et al. 2012; Leduc-Gaudet et al. 2018). Nous analyserons les niveaux d'expression de protéines clés de la fusion et de la fission comme OPA1 et DRP1 respectivement.

- La mitophagie est-elle altérée ? La mitophagie est importante pour le maintien d'une population mitochondriale « saine ». Si elle est altérée, une accumulation de mitochondries défectueuses a lieu. Nous regarderons les niveaux d'expression de protéines clés de la mitophagie comme PINK1 et LC3.

Nous avons observé une insulino-résistance musculaire associée à une dysfonction mitochondriale. Après avoir écarté l'implication de l'inflammation, du stress du RE, et de la lipotoxicité, nous nous sommes intéressés au stress oxydant. En effet, la chaîne de transfert des électrons est la source majeure de production des ROS et, des mitochondries défectueuses peuvent induire un stress oxydant (Cheng et al. 2017). Aussi, il a été montré que le stress oxydant peut altérer la voie de signalisation de l'insuline (Jastroch et al. 2010). Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre en faveur des ROS par rapport aux antioxydants mais de façon surprenante, l'activité de l'enzyme anti-oxydante GPx est augmentée dans le muscle des souris GC-A haploinsuffisantes. Néanmoins, il a été montré que les souris déficientes pour GPx ne présentent pas une meilleure sensibilité à l'insuline mais au contraire elles y sont plus sensibles. En effet, la GPx active PTEN, un modulateur négatif de la voie de signalisation de l'insuline. Chez les souris GPx déficientes, il y a alors une diminution de l'expression de PTEN associée à une levée d'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline (Loh et al. 2009; McClung et al. 2004). En accord avec ces études, nous observons une augmentation de l'expression de PTEN chez nos souris insulino-résistantes. Nous proposons alors le mécanisme suivant : le déficit du système ANP/GC-A induit un dysfonctionnement mitochondrial attesté par une fuite de proton augmentée. Ces mitochondries, devant augmenter leur activité respiratoire pour compenser la fuite de proton, produisent plus de ROS et ainsi augmentent l'activité de la GPx. L'augmentation de l'activité GPx augmente l'expression de PTEN qui en déphosphorylant PIP3 en PIP2 court-circuite la voie de signalisation de l'insuline et conduit à une insulino-résistance musculaire.

L'effet causal d'une dysfonction mitochondriale dans le développement de l'insulino-résistance est un sujet débattu. Cependant, lorsque les souris GC-A haploinsuffisantes sont en régime standard, avant l'apparition de l'insulino-résistance, on observe déjà les mêmes altérations mitochondriales que lorsqu'elles sont insulino-résistantes (i.e. fuite de proton et respiration basale augmentées). Cela suggère que la dysfonction mitochondriale est une cause plutôt qu'une conséquence de l'insulino-résistance dans notre

modèle murin. Par rapport aux souris WT, en régime standard, on observe également une diminution de la quantité de fibres oxydatives (i.e. types IIa) dans les muscles de souris GC-A haploinsuffisantes. Ces résultats sont en accord avec l'observation d'une augmentation des fibres oxydatives (type I) associée à une diminution de fibres glycolytiques (type IIx) dans le muscle de souris déficientes pour le NPRC (Ishikawa et al. 2019). Les fibres oxydatives présentent une meilleure sensibilité à l'insuline que les fibres glycolytiques, ce qui pourrait aussi expliquer l'altération de la sensibilité à l'insuline chez les souris GC-A haploinsuffisantes. Nous avons réalisé le typage de fibres dans le *tibialis anterior* et avons prévu de compléter ces données avec un typage de fibres dans le *gastrocnémien* qui est un muscle mixte dans lequel des fibres de type I sont présentes et quantifiables.

Dans ce travail, nous avons également montré que ces altérations mitochondriales sont associées à une diminution des capacités oxydatives musculaires *in vivo*, puisque les souris haploinsuffisantes pour GC-A ont une diminution de leur capacité d'endurance comparée aux souris WT. Suite à un entraînement physique, les souris GC-A haploinsuffisantes n'améliorent pas leur capacité d'endurance et ont également des mitochondries défectueuses dans leurs muscles squelettiques. Une précédente étude a montré une augmentation de la sécrétion pulsatile d'ANP suite à un exercice (Ohba et al. 2001). Ces résultats indiquent que l'ANP pourrait être un médiateur des adaptations musculaires à l'entraînement physique. En effet, nous pouvons penser que l'ANP, sécrété au cours d'un exercice, permet la biogenèse mitochondriale ainsi que le « switch » de types de fibres observés dans les muscles squelettiques après un entraînement. Pour étudier ceci, un typage de fibres dans les muscles *tibialis anterior* et gastrocnémiens ainsi qu'une quantification du nombre de mitochondries par MET associée à une mesure du ratio ADNmt/ADNn seront réalisés chez des souris GC-A haploinsuffisantes et sauvages, suite à un entraînement physique. De manière intéressante, nous avons également observé une altération de la capacité d'endurance et des adaptations à l'entraînement physique chez des souris déficientes pour l'ANP (data non montrées), ce qui suggère que c'est l'absence de la signalisation induite par l'ANP et non par le BNP qui est responsable des altérations observées chez les souris GC-A haploinsuffisantes.

Une question qui reste également à élucider est le lien entre le déficit du système ANP/GC-A et la dysfonction mitochondriale. Nous avons réalisé un séquençage d'ARN (RNAseq) sur des muscles de souris GC-A haploinsuffisantes et sauvages soumises à un régime hyperlipidique, ainsi que des expériences de puces à ADN sur des muscles de souris GC-A haploinsuffisantes

et sauvages en condition basale ou après un entrainement physique. Les résultats seront analysés et ils contribueront peut-être à la caractérisation du/des mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans la dysfonction mitochondriale chez les souris GC-A haploinsuffisantes, via l'identification de nouveaux programmes géniques et de nouvelles cibles contrôlés par l'ANP.

En résumé, le système ANP/GC-A joue un rôle important dans le maintien de la fonction mitochondriale musculaire et nous montrons avec ce travail un lien causal entre un déficit du système ANP/GC-A et le développement de l'insulinorésistance, caractéristique du DT2.

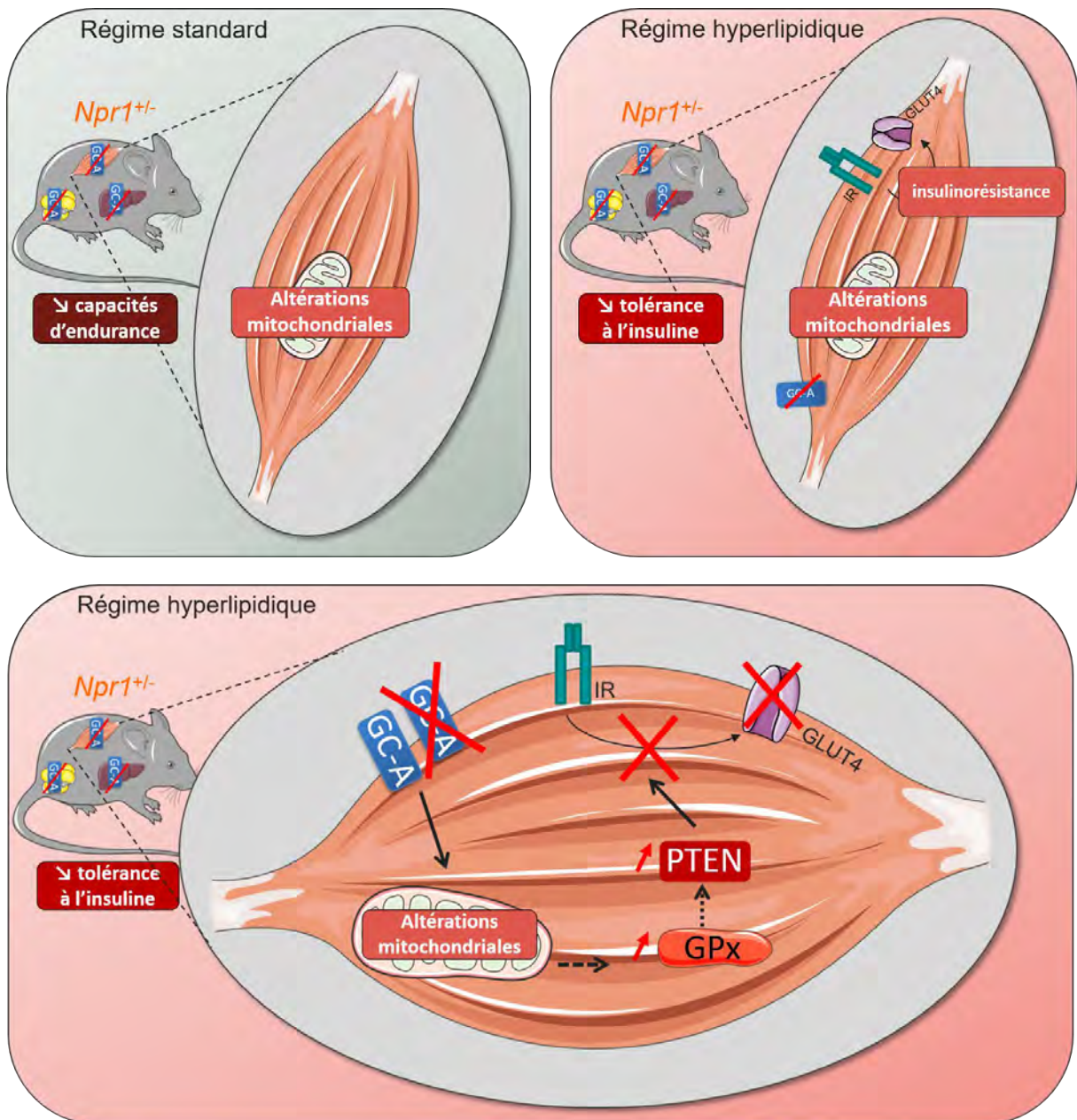


Figure 21 : Le déficit du système ANP/GC-A est causal d'une insulinorésistance, une diminution des capacités d'endurance et une altération des adaptations musculaires à l'entrainement physique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La fonction principale du cœur est de propulser le sang à travers tout le corps pour fournir de l'oxygène et des nutriments à tous les tissus. Néanmoins son rôle ne s'arrête pas là puisqu'il exerce également une fonction endocrine. Largement étudié dans la sphère cardiovasculaire et rénale, les travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent que le cœur assure également une fonction endocrine importante dans le contrôle du métabolisme énergétique. En effet, nous avons montré d'une part que l'hormone cardiaque ANP agit comme un activateur physiologique important de la thermogénèse sans frisson et, d'autre part, qu'un déficit du système ANP/GC-A joue un rôle causal dans le développement du DT2.

La première partie de cette thèse a permis de révéler que l'ANP est important pour la thermogénèse sans frisson. En effet, au cours d'une exposition au froid, l'ANP est sécrété par le cœur. Ceci induit l'activation des adipocytes bruns et beiges ainsi que l'approvisionnement de ces cellules en substrats énergétiques via notamment un effet lipolytique dans le WAT. Cependant, sachant que les lipides peuvent *per se* activer l'expression d'UCP1, nous ne savons pas si l'ANP a un effet direct sur l'activation du BAT et/ou si l'activation thermogénique du BAT est une conséquence de l'effet lipolytique de l'ANP dans le WAT. *In vitro* nous avons montré que l'ANP induit l'activation du programme thermogénique ainsi que de la respiration mitochondriale dans des adipocytes humains ; ces résultats suggèrent un effet direct de l'ANP dans les adipocytes thermogéniques. Néanmoins, *in vivo* chez la souris, nous ne connaissons pas à quelle proportion l'ANP contribue à la thermogénèse de par son effet direct dans le BAT, après liaison sur son récepteur GC-A, versus son action lipolytique dans le WAT. Pour étudier l'effet de l'ANP spécifiquement dans le BAT et sa contribution dans la thermogénèse sans frisson *in vivo* nous avons généré au laboratoire des souris déficientes pour le récepteur GC-A spécifiquement dans les adipocytes bruns/beiges. Grâce à une collaboration avec Michaela Kuhn, qui nous a fourni des souris dont le gène codant pour GC-A est floxé, et Audrey Carrière, qui nous a fourni des souris Ucp1-Cre-ERT2, nous avons obtenu des animaux doubles transgéniques d'intérêt après les croisements suivants : flox-GC-A-flox X Ucp1-Cre-ERT2. Dans ce modèle de contrôle spatio-temporel, il existe donc une délétion du gène codant pour le GC-A spécifiquement dans les cellules exprimant UCP1, après traitement au tamoxifène. La tolérance au froid de ces souris sera testée et l'activité du BAT analysée. Si la délétion de GC-

A dans les cellules positives pour UCP1 diminue l'activité du BAT et la tolérance au froid des souris, alors l'effet thermogénique de l'ANP directement dans le BAT sera démontré *in vivo*.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons montré chez la souris que le déficit en ANP/GC-A induit des altérations mitochondriales associées à une insulino-résistance musculaire. Cependant nous devons encore approfondir nos recherches sur les mécanismes moléculaires impliqués. Nous pouvons nous demander si l'insulino-résistance musculaire observée chez les souris GC-A haploinsuffisantes, provient bien de défauts intrinsèques au muscle ou pas. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons choisi de travailler avec un modèle de souris délétées pour le GC-A spécifiquement dans les muscles squelettiques. Nous avons commencé la mise au point d'injections intramusculaires d'AAV-CRE chez des souris GC-A floxées dans le but de déléter GC-A spécifiquement dans le muscle. Nous analyserons les effets directs d'une délétion de GC-A sur la fonction mitochondriale musculaire et nous regarderons les répercussions possibles sur la sensibilité à l'insuline musculaire.

Dans cette deuxième partie nous avons également montré que le système ANP/GC-A était impliqué dans les capacités d'endurance lors d'un exercice physique ainsi que dans les adaptations musculaires à l'entraînement physique. Lors d'un exercice physique, les muscles ont besoin d'être approvisionnés en substrats pour pouvoir produire de l'ATP et assurer ensuite leur contraction. La capacité d'endurance va dépendre essentiellement de la capacité de production d'énergie par les muscles et de la capacité d'approvisionnement des muscles en substrats énergétiques. Bien que nous ayons vu une dysfonction mitochondriale musculaire chez les souris haploinsuffisantes pour le GC-A, pouvant expliquer leur diminution de capacité d'endurance, nous n'avons pas analysé leur phénotype glucidique et lipidique. En effet, au vu de l'effet lipolytique de l'ANP, il est envisageable que les souris déficientes pour le système ANP/GC-A aient un défaut de lipolyse ne permettant pas aux muscles de fonctionner correctement. Aussi, nous pourrions nous demander quelle est la contribution d'une altération de la lipolyse par rapport à celle du dysfonctionnement mitochondrial dans la diminution des capacités d'endurance des souris haploinsuffisantes pour le GC-A. Pour répondre à cette question, des souris délétées pour GC-A spécifiquement dans le tissu adipeux (par exemple des souris issues du croisement GC-A flox x adiponectine-cre) et des souris délétées pour GC-A spécifiquement dans le muscle (par exemple des souris issues de croisements GC-A flox x MyoD-Cre) pourraient être générées. Leur capacité d'endurance ainsi

que les mécanismes d'adaptations métaboliques mis en place lors d'un exercice physique d'endurance seraient étudiés.

Les niveaux plasmatiques des PN ainsi que leur signalisation dans les tissus métaboliques (i.e. le WAT et le muscle squelettique) sont altérés chez des patients obèses et/ou diabétiques de type 2. Nous montrons avec ce travail de thèse que cette déficience est causale du développement de l'insulinorésistance. Afin de prévenir le développement du DT2, comprendre pourquoi et comment ces altérations du système ANP/GC-A se mettent en place est d'un grand intérêt. Dans le tissu adipeux d'individus obèses, l'expression du GC-A est diminuée et celle du NPRC augmentée (Coué et al. 2015; Kovacova et al. 2016). Aussi, les niveaux plasmatiques de NT-proANP et de BNP sont diminués chez des individus obèses comparés à des individus minces (T. J. Wang et al. 2004). Cependant, dans nos travaux, nous n'avons pas mis en évidence de lien causal entre un déficit du système ANP/GC-A et une augmentation du poids corporel chez les souris. Ces résultats suggèrent que l'altération du ratio GC-A/NPRC et la diminution des niveaux plasmatiques des PN seraient plutôt des conséquences que des causes de l'obésité. La diminution des niveaux plasmatiques des PN peut-être due à un défaut de production de ceux-ci et/ou une augmentation de leur dégradation. L'obésité est caractérisée par une inflammation à bas bruit associée à un recrutement important de macrophages au niveau des adipocytes. La sécrétion d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, est augmentée dans des SVF de WAT d'individus obèses comparés à des individus normopondérés et elle est également positivement corrélée à l'IMC des individus. De façon intéressante, une corrélation négative a été décrite entre les niveaux de sécrétion d'IL-6 et le ratio GC-A/NPRC ainsi qu'entre les niveaux de sécrétion d'IL-6 et les niveaux plasmatiques de BNP. De plus, lorsque des cellules de WAT en culture primaire sont traitées par de l'IL-6, une diminution de l'expression de GC-A et une augmentation de l'expression de NPRC sont observées. Ces résultats suggèrent que l'IL-6 contrôle l'expression des récepteurs aux PN et est impliquée dans la diminution du ratio GC-A/NPRC (Gentili et al. 2017). D'autre part, une étude a montré que le TGF- β , un facteur de croissance à fonction immunomodulatrice, diminue l'expression du GC-A et augmente l'expression du NPRC dans des cellules stromales thymiques (Agui et al. 1995). Il est alors possible que l'inflammation, induite au cours de l'obésité, soit à l'origine de l'altération du système ANP/GC-A observée. Par ailleurs, comme l'insuline possède un effet anti-lipolytique, il est possible qu'elle diminue

la signalisation à l'ANP dans les adipocytes afin d'inhiber les effets lipolytiques de celui-ci. En effet, dans des cultures primaires d'adipocytes de WAT humain, l'insuline stimule l'expression du NPRC sans modifier l'expression du GC-A (Bordicchia et al. 2012; Pivovarova et al. 2012). Aussi, les souris déficientes pour l'insuline présentent des niveaux d'expression de NPRC diminués et de GC-A augmentés (Nakatsuji et al. 2010). Au cours de l'obésité, les pics récurrents de sécrétion d'insuline dus à une hyperphagie et/ou un apport hypercalorique pourraient être à l'origine du déficit du système ANP/GC-A.

L'ensemble de ces données suggère que chez des individus obèses, les sécrétions répétées d'insuline associées à l'inflammation à bas bruit diminueraient le ratio GC-A/NPRC dans le muscle squelettique et le WAT. L'augmentation de l'expression du NPRC engendrerait la diminution de la concentration plasmatique des PN. Cette altération du système ANP/GC-A induirait des altérations musculaires et le développement de l'insulinorésistance conduisant au DT2. Cette hypothèse placerait l'altération du système ANP/GC-A comme un lien possible entre l'obésité et le DT2.

La perte de poids corporel est l'intervention de premier choix pour la prévention du DT2. En effet, une diminution du poids corporel a été montrée comme améliorant la sensibilité à l'insuline (Knowler et al. 2002). Même si un mode de vie plus sain permet de manière irréfutable une perte de poids corporel et une amélioration du profil glucidique et lipidique, la plupart des patients éprouvent des difficultés à maintenir un mode de vie sain sur du long terme. Deux contextes physiologiques ont été montrés comme stimulant les dépenses énergétiques et améliorant le statut glucidique des individus : l'exposition au froid et l'exercice physique (Colberg et al. 2010, 2; Hanssen et al. 2015). En effet, ce sont deux conditions dans lesquelles l'utilisation du glucose et des lipides est augmentée afin d'approvisionner la production d'énergie nécessaire pour, maintenir la température corporelle à une valeur physiologique ou permettre la contraction des muscles squelettiques. L'identification de molécules impliquées dans l'activation des mécanismes mis en place dans ces deux conditions pourrait permettre la découverte de nouvelles cibles pharmacologiques intéressantes dans la prévention du DT2. Au cours de cette thèse, nous avons montré que le système ANP/GC-A était impliqué dans les mécanismes mis en place en réponse à ces deux conditions physiologiques. Augmenter les niveaux circulants d'ANP pourrait alors mimer les effets bénéfiques d'une exposition au froid et/ou d'un exercice physique et par conséquent

améliorer le statut glucidique de patients obèses ou diabétiques de types 2. Une étude réalisée par l'équipe a mis en évidence qu'une infusion chronique au BNP protège les souris de l'obésité et de l'intolérance au glucose induites par un régime hyperlipidique. Ceci s'est traduit par une diminution de la lipotoxicité consécutive à une augmentation des capacités oxydatives lipidiques dans le muscle squelettique (Coué et al. 2015). Cette étude révèle le potentiel préventif d'un traitement aux PN dans le développement du DT2. Le Carperitide est un recombinant de l'ANP humain commercialisé au Japon depuis 25 ans. Il est prescrit lors d'une insuffisance cardiaque aiguë et ses effets potentiellement bénéfiques dans la déficience rénale font l'objet de plusieurs études cliniques récentes (Fujii et al. 2019; H. Yamada et al. 2019). Nous pourrions alors envisager des études cliniques testant les effets bénéfiques que pourraient avoir le Carperitide dans la prévention d'un DT2 chez des individus obèses ou prédiabétiques. Néanmoins, si la diminution des niveaux circulants de PN est principalement due à une diminution du ratio GC-A/NPRC chez les individus obèses, il pourrait être plus pertinent de bloquer la liaison de l'ANP au NPRC. Plusieurs études semblent montrer une augmentation de la signalisation de l'ANP suite à un traitement avec un agoniste du NPRC (Egom et al. 2017; Quinteiro et al. 2011).

Le système ANP/GC-A a des effets plutôt bénéfiques contre le diabète de type 2 et l'obésité. Cependant, nous pouvons également penser que s'il est suractivé, il peut être délétère. L'IC est définie comme l'incapacité du cœur à suffisamment approvisionner en sang les tissus périphériques. Généralement précédée d'une hypertrophie cardiaque due à une surcharge non contrôlée de pression ou de volume, elle peut également s'accompagner de cachexie cardiaque si elle perdure. La cachexie cardiaque correspond à une perte de masse grasse et de masse maigre. Il a récemment été montré chez la souris qu'une IC avec une fraction d'éjection préservée est associée à une diminution de la taille adipocytaire et à l'induction de l'expression d'UCP1 dans le WAT. De façon intéressante, l'induction de l'expression d'UCP1 est associée à une augmentation de l'expression du GC-A dans le WAT (Valero-Muñoz et al. 2016). De plus, lors d'une IC, la sécrétion des PN par le myocarde hypertrophié est élevée. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que l'ANP, sécrété lors de l'IC, se fixe sur son récepteur GC-A dans le tissu adipeux devenu répondeur par l'augmentation du ratio GC-A/NPRC et y induit la lipolyse, le brunissement dans le WAT et l'activité thermogénique dans

le BAT. Aussi, il est envisageable que l'ANP augmente les dépenses énergétiques au cours d'une IC en stimulant les capacités oxydatives musculaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences préliminaires. En collaboration avec une équipe de l'I2MC, des premières souris déficientes pour l'ANP ou haploinsuffisantes pour le GC-A, et des souris « contrôles », ont subi une chirurgie de constriction trans-aortique (TAC) qui induit une IC. Malheureusement, dû au taux élevé de mortalité consécutif à cette chirurgie associée à la forte mortalité « naturelle » prénatale des souris ANP KO nous n'avons pas eu assez d'animaux pour adresser cette question au cours de cette thèse. Néanmoins, si le lien causal de l'ANP dans le développement de la cachexie est vérifié, à l'inverse du DT2/obésité, l'inhibition de la sécrétion d'ANP ou le blocage de sa liaison au récepteur GC-A pourrait prévenir l'apparition de la cachexie chez les patients souffrant d'IC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agui, Takashi et al. 1995. « Opposite Actions of Transforming Growth Factor-B1 on the Gene Expression of Atrial Natriuretic Peptide Biological and Clearance Receptors in a Murine Thymic Stromal Cell Line ». *The Journal of Biochemistry* 118(3): 500-507.
- Akbari, Mohamad, et Vahideh Hassan-Zadeh. 2018. « IL-6 Signalling Pathways and the Development of Type 2 Diabetes ». *Inflammopharmacology* 26(3): 685-98.
- van den Akker, F. 2001. « Structural Insights into the Ligand Binding Domains of Membrane Bound Guanylyl Cyclases and Natriuretic Peptide Receptors ». *Journal of Molecular Biology* 311(5): 923-37.
- Albert, Verena et al. 2016. « MTORC2 Sustains Thermogenesis via Akt-Induced Glucose Uptake and Glycolysis in Brown Adipose Tissue ». *EMBO molecular medicine* 8(3): 232-46.
- Alipourfard, Iraj, Nelly Datukishvili, et Davit Mikeladze. 2019. « TNF- α Downregulation Modifies Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) in Metabolic Signaling of Diabetic Insulin-Resistant Hepatocytes ». *Mediators of Inflammation* 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6378771/> (27 juillet 2020).
- Almeida, F. A. et al. 1989. « Clearance Function of Type C Receptors of Atrial Natriuretic Factor in Rats ». *The American Journal of Physiology* 256(2 Pt 2): R469-475.
- Anand-Srivastava, M. B., P. D. Sehl, et D. G. Lowe. 1996. « Cytoplasmic Domain of Natriuretic Peptide Receptor-C Inhibits Adenylyl Cyclase. Involvement of a Pertussis Toxin-Sensitive G Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 271(32): 19324-29.
- Anderson, Ethan J. et al. 2009. « Mitochondrial H₂O₂ Emission and Cellular Redox State Link Excess Fat Intake to Insulin Resistance in Both Rodents and Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 119(3): 573-81.
- Anderson, Ethan J., et P. Darrell Neuffer. 2006. « Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 290(3): C844-51.
- Archuleta, Tara L. et al. 2009. « Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK ». *Free radical biology & medicine* 47(10): 1486-93.
- Ashman, D. F., R. Lipton, M. M. Melicow, et T. D. Price. 1963. « Isolation of Adenosine 3', 5'-Monophosphate and Guanosine 3', 5'-Monophosphate from Rat Urine ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 11: 330-34.
- Ayala, Julio E. et al. 2010. « Standard Operating Procedures for Describing and Performing Metabolic Tests of Glucose Homeostasis in Mice ». *Disease Models & Mechanisms* 3(9-10): 525-34.
- Bach, Daniel et al. 2005. « Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle : Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-6 ». *Diabetes* 54(9): 2685-93.
- Bachmann, Katherine N. et al. 2019. « Effect of Testosterone on Natriuretic Peptide Levels ». *Journal of the American College of Cardiology* 73(11): 1288-96.

- Barbatelli, G. et al. 2010. « The Emergence of Cold-Induced Brown Adipocytes in Mouse White Fat Depots Is Determined Predominantly by White to Brown Adipocyte Transdifferentiation ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298(6): E1244-1253.
- Barbee, R. W. et al. 1994. « Hemodynamics in Transgenic Mice with Overexpression of Atrial Natriuretic Factor ». *Circulation Research* 74(4): 747-51.
- Barletta, Giuseppe et al. 1998. « Effects of Exercise on Natriuretic Peptides and Cardiac Function in Man ». *International Journal of Cardiology* 65(3): 217-25.
- Bartelt, Alexander et al. 2011. « Brown Adipose Tissue Activity Controls Triglyceride Clearance ». *Nature Medicine* 17(2): 200-205.
- Bartness, T J, et V Ryu. 2015. « Neural control of white, beige and brown adipocytes ». *International Journal of Obesity Supplements* 5(Suppl 1): S35-39.
- Bastías-Pérez, Marianela et al. 2020. « Impact of Adaptive Thermogenesis in Mice on the Treatment of Obesity ». *Cells* 9(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072509/> (15 août 2020).
- Blair, A. S., E. Hajduch, G. J. Litherland, et H. S. Hundal. 1999. « Regulation of Glucose Transport and Glycogen Synthesis in L6 Muscle Cells during Oxidative Stress. Evidence for Cross-Talk between the Insulin and SAPK2/P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(51): 36293-99.
- Blondin, Denis P. et al. 2020. « Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by B2-AR Stimulation ». *Cell Metabolism* 32(2): 287-300.e7.
- Boden, Guenther et al. 2001. « Effects of Acute Changes of Plasma Free Fatty Acids on Intramyocellular Fat Content and Insulin Resistance in Healthy Subjects ». *Diabetes* 50(7): 1612-17.
- de Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress, et H. Sonnenberg. 1981. « A Rapid and Potent Natriuretic Response to Intravenous Injection of Atrial Myocardial Extract in Rats ». *Life Sciences* 28(1): 89-94.
- de Bold, A. J., B. G. Bruneau, et M. L. Kuroski de Bold. 1996. « Mechanical and Neuroendocrine Regulation of the Endocrine Heart ». *Cardiovascular Research* 31(1): 7-18.
- Bonen, A., M. H. Tan, et W. M. Watson-Wright. 1981. « Insulin Binding and Glucose Uptake Differences in Rodent Skeletal Muscles ». *Diabetes* 30(8): 702-4.
- Bonnot, E. 1908. « The Interscapular Gland ». *Journal of Anatomy and Physiology* 43(Pt 1): 43-58.
- Bordicchia, M. et al. 2012. « Cardiac Natriuretic Peptides Act via P38 MAPK to Induce the Brown Fat Thermogenic Program in Mouse and Human Adipocytes ». *J Clin Invest* 122(3): 1022-36.
- Boucher, Jérémie, André Kleinridders, et C. Ronald Kahn. 2014. « Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941218/> (30 juillet 2020).
- Boveris, Alberto, et Britton Chance. 1973. « The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen ». *Biochemical Journal* 134(3): 707-16.

- Bronnikov, G., J. Houstěk, et J. Nedergaard. 1992. « Beta-Adrenergic, CAMP-Mediated Stimulation of Proliferation of Brown Fat Cells in Primary Culture. Mediation via Beta 1 but Not via Beta 3 Adrenoceptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(3): 2006-13.
- Brøns, Charlotte, et Louise Groth Grunnet. 2017. « MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Skeletal Muscle Lipotoxicity in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes: A Causal Mechanism or an Innocent Bystander? » *European Journal of Endocrinology* 176(2): R67-78.
- Burrell, Louise M., J. M. Palmer, et P. H. Baylis. 1992. « Atrial Natriuretic Peptide Inhibits Fluid Intake in Hyperosmolar Subjects ». *Clinical Science* 83(1): 35-39.
- Cai, Dongsheng et al. 2005. « Local and Systemic Insulin Resistance Resulting from Hepatic Activation of IKK-Beta and NF-KappaB ». *Nature Medicine* 11(2): 183-90.
- Cannon, Barbara, et Jan Nedergaard. 2004. « Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance ». *Physiological Reviews* 84(1): 277-359.
- Cannone, Valentina et al. 2013. « The Atrial Natriuretic Peptide Genetic Variant Rs5068 Is Associated With a Favorable Cardiometabolic Phenotype in a Mediterranean Population ». *Diabetes Care* 36(9): 2850-56.
- Cao, L., J. Wu, et D. G. Gardner. 1995. « Atrial Natriuretic Peptide Suppresses the Transcription of Its Guanylyl Cyclase-Linked Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(42): 24891-97.
- Cao, W. et al. 2004. « P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene ». *Mol Cell Biol* 24(7): 3057-67.
- Carvajal, J. A., A. M. Germain, J. P. Huidobro-Toro, et C. P. Weiner. 2000. « Molecular Mechanism of CGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation ». *Journal of Cellular Physiology* 184(3): 409-20.
- Chen, Shenghan et al. 2015. « PCSK6-Mediated Corin Activation Is Essential for Normal Blood Pressure ». *Nature Medicine* 21(9): 1048-53.
- Chen, Yiu-Fai. 2005. « Atrial Natriuretic Peptide in Hypoxia ». *Peptides* 26(6): 1068-77.
- Cheng, Jiali et al. 2017. « Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 982: 359-70.
- Chen-Tournoux, Annabel et al. 2010. « Effect of Weight Loss after Weight Loss Surgery on Plasma N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide Levels ». *The American Journal of Cardiology* 106(10): 1450-55.
- Cinti, Saverio et al. 2002. « CL316,243 and Cold Stress Induce Heterogeneous Expression of UCP1 mRNA and Protein in Rodent Brown Adipocytes ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 50(1): 21-31.
- Colberg, Sheri R. et al. 2010. « Exercise and Type 2 Diabetes ». *Diabetes Care* 33(12): e147-67.
- Collins, S. et al. 1994. « Impaired Expression and Functional Activity of the Beta 3- and Beta 1-Adrenergic Receptors in Adipose Tissue of Congenitally Obese (C57BL/6J Ob/Ob) Mice. » *Molecular Endocrinology* 8(4): 518-27.

- Cooney, G. J., et E. A. Newsholme. 1982. « The Maximum Capacity of Glycolysis in Brown Adipose Tissue and Its Relationship to Control of the Blood Glucose Concentration ». *FEBS letters* 148(2): 198-200.
- Coué, Marine et al. 2015. « Defective Natriuretic Peptide Receptor Signaling in Skeletal Muscle Links Obesity to Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 64(12): 4033-45.
- Cousin, B. et al. 1996. « Cellular Changes during Cold Acclimatation in Adipose Tissues ». *Journal of Cellular Physiology* 167(2): 285-89.
- Cypess, Aaron M. et al. 2009. « Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans ». *New England Journal of Medicine* 360(15): 1509-17.
- Davis, Timothy M. E. et al. 2019. « Temporal changes in the incidence and predictors of severe hypoglycaemia in type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes Study ». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21(3): 648-57.
- De Meyts, Pierre. 2000. « The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network ». In *Endotext*, éd. Kenneth R. Feingold et al. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/> (22 août 2020).
- De Souza, Leanne R. et al. 2018. « Circulating B-Type Natriuretic Peptide in Women with and without Recent Gestational Diabetes: The Impact of Current Glucose Intolerance ». *Clinical Endocrinology* 88(2): 227-33.
- DeFronzo, R. A. et al. 1981. « Synergistic Interaction between Exercise and Insulin on Peripheral Glucose Uptake ». *The Journal of Clinical Investigation* 68(6): 1468-74.
- Dessi-Fulgheri, P., R. Sarzani, et A. Rappelli. 1998. « The Natriuretic Peptide System in Obesity-Related Hypertension: New Pathophysiological Aspects ». *Journal of Nephrology* 11(6): 296-99.
- Dijk, Wieneke et al. 2015. « ANGPTL4 Mediates Shuttling of Lipid Fuel to Brown Adipose Tissue during Sustained Cold Exposure ». *eLife* 4.
- Dinas, Petros C. et al. 2018. « Association of Fat Mass Profile with Natriuretic Peptide Receptor Alpha in Subcutaneous Adipose Tissue of Medication-Free Healthy Men: A Cross-Sectional Study ». *F1000Research* 7: 327.
- Dokken, Betsy B. et al. 2008. « Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance in Rat Skeletal Muscle: Role of Glycogen Synthase Kinase-3 ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 294(3): E615-621.
- Duncan, Robin E. et al. 2007. « Regulation of Lipolysis in Adipocytes ». *Annual review of nutrition* 27: 79-101.
- Egom, Emmanuel Eroume-A. et al. 2017. « A Natriuretic Peptides Clearance Receptor's Agonist Reduces Pulmonary Artery Pressures and Enhances Cardiac Performance in Preclinical Models: New Hope for Patients with Pulmonary Hypertension Due to Left Ventricular Heart Failure ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 93: 1144-50.
- Ek, J. et al. 2001. « Mutation Analysis of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator-1 (PGC-1) and Relationships of Identified Amino Acid Polymorphisms to Type II Diabetes Mellitus ». *Diabetologia* 44(12): 2220-26.

- El Hadi, Hamza, Angelo Di Vincenzo, Roberto Vettor, et Marco Rossato. 2019. « Food Ingredients Involved in White-to-Brown Adipose Tissue Conversion and in Calorie Burning ». *Frontiers in Physiology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01954/full> (2 juillet 2020).
- Elchebly, M. et al. 1999. « Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene ». *Science (New York, N.Y.)* 283(5407): 1544-48.
- Engeli, Stefan et al. 2012. « Natriuretic Peptides Enhance the Oxidative Capacity of Human Skeletal Muscle ». *The Journal of Clinical Investigation* 122(12): 4675-79.
- Epstein, M., P. Norsk, et R. Loutzenhiser. 1989. « Effects of Water Immersion on Atrial Natriuretic Peptide Release in Humans ». *American Journal of Nephrology* 9(1): 1-24.
- Evans, Bronwyn A., Jon Merlin, Tore Bengtsson, et Dana S. Hutchinson. 2019. « Adrenoceptors in White, Brown, and Brite Adipocytes ». *British Journal of Pharmacology* 176(14): 2416-32.
- Flamment, Méliissa, Eric Hajduch, Pascal Ferré, et Fabienne Fougelle. 2012. « New Insights into ER Stress-Induced Insulin Resistance ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23(8): 381-90.
- Forouzanfar, Mohammad H. et al. 2015. « Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks in 188 Countries, 1990–2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 ». *The Lancet* 386(10010): 2287-2323.
- Frajewicki, V. et al. 1997. « Effects of Severe Hemorrhage on Plasma ANP and Glomerular ANP Receptors ». *The American Journal of Physiology* 273(5): R1623-1630.
- Francis, Sharron H., Jennifer L. Busch, Jackie D. Corbin, et David Sibley. 2010. « CGMP-Dependent Protein Kinases and CGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and CGMP Action ». *Pharmacological Reviews* 62(3): 525-63.
- Fujii, Tomoko et al. 2019. « Human Atrial Natriuretic Peptide for Acute Kidney Injury in Adult Critically Ill Patients: A Multicenter Prospective Observational Study ». *Journal of Critical Care* 51: 229-35.
- Fukano, Keigo et al. 2016. « Cold Exposure Induces Proliferation of Mature Brown Adipocyte in a SS3-Adrenergic Receptor-Mediated Pathway ». *PLoS One* 11(11): e0166579.
- Fuller, F. et al. 1988. « Atrial Natriuretic Peptide Clearance Receptor. Complete Sequence and Functional Expression of cDNA Clones ». *The Journal of Biological Chemistry* 263(19): 9395-9401.
- Galitzky, J. et al. 2001. « The Lipid-Mobilizing Effect of Atrial Natriuretic Peptide Is Unrelated to Sympathetic Nervous System Activation or Obesity in Young Men ». *Journal of Lipid Research* 42(4): 536-44.
- Gardner, D. G., B. J. Gertz, C. F. Deschepper, et D. Y. Kim. 1988. « Gene for the Rat Atrial Natriuretic Peptide Is Regulated by Glucocorticoids in Vitro ». *The Journal of Clinical Investigation* 82(4): 1275-81.

- Gaster, M. et al. 2001. « GLUT4 Is Reduced in Slow Muscle Fibers of Type 2 Diabetic Patients: Is Insulin Resistance in Type 2 Diabetes a Slow, Type 1 Fiber Disease? » *Diabetes* 50(6): 1324-29.
- Gauquelin, G. et al. 1996. « Diurnal Rhythms of Plasma Renin Activity, Atrial Natriuretic Peptide and Arterial Pressure during Head-down Bed Rest in Humans ». *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 73(6): 536-43.
- Geisler, Caroline E., Susma Ghimire, Randy L. Bogan, et Benjamin J. Renquist. 2019. « Role of ketone signaling in the hepatic response to fasting ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 316(5): G623-31.
- Gentili, Alessandra et al. 2017. « Modulation of Natriuretic Peptide Receptors in Human Adipose Tissue: Molecular Mechanisms behind the “Natriuretic Handicap” in Morbidly Obese Patients ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 186: 52-61.
- Goetze, Jens Peter. 2010. « Biosynthesis of Cardiac Natriuretic Peptides ». *Results and Problems in Cell Differentiation* 50: 97-120.
- Gutkowska, J. et al. 1986. « The Morphine Effect on Plasma ANF ». *European Journal of Pharmacology* 131(1): 91-94.
- . 1997. « Oxytocin Releases Atrial Natriuretic Peptide by Combining with Oxytocin Receptors in the Heart ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(21): 11704-9.
- Hancock, Chad R. et al. 2008. « High-Fat Diets Cause Insulin Resistance despite an Increase in Muscle Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(22): 7815-20.
- Handschin, Christoph et al. 2007. « Abnormal Glucose Homeostasis in Skeletal Muscle-Specific PGC-1 α Knockout Mice Reveals Skeletal Muscle-Pancreatic Beta Cell Crosstalk ». *The Journal of Clinical Investigation* 117(11): 3463-74.
- Haneda, M. et al. 1991. « Dual Mechanism of Angiotensin II Inhibits ANP-Induced Mesangial CGMP Accumulation ». *Kidney International* 40(2): 188-94.
- Hanssen, Mark J. W. et al. 2015. « Short-Term Cold Acclimation Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus ». *Nature Medicine* 21(8): 863-65.
- Hao, Qin et al. 2015. « Transcriptome Profiling of Brown Adipose Tissue during Cold Exposure Reveals Extensive Regulation of Glucose Metabolism ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 308(5): E380-392.
- Hara, K. et al. 2002. « A Genetic Variation in the PGC-1 Gene Could Confer Insulin Resistance and Susceptibility to Type II Diabetes ». *Diabetologia* 45(5): 740-43.
- Hassi, J. et al. 1991. « Plasma Levels of Endothelin-1 and Atrial Natriuretic Peptide in Men during a 2-Hour Stay in a Cold Room ». *Acta Physiol Scand* 142(4): 481-85.
- Hatting, Maximilian et al. 2018. « Insulin Regulation of Gluconeogenesis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1411(1): 21-35.

- Haufe, Sven et al. 2015. « Differential Response of the Natriuretic Peptide System to Weight Loss and Exercise in Overweight or Obese Patients ». *Journal of Hypertension* 33(7): 1458–1464.
- Hayes, G. R., et D. H. Lockwood. 1987. « Role of Insulin Receptor Phosphorylation in the Insulinomimetic Effects of Hydrogen Peroxide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(22): 8115-19.
- He, Jing, Simon Watkins, et David E. Kelley. 2001. « Skeletal Muscle Lipid Content and Oxidative Enzyme Activity in Relation to Muscle Fiber Type in Type 2 Diabetes and Obesity ». *Diabetes* 50(4): 817-23.
- Heaton, J. M. 1972. « The Distribution of Brown Adipose Tissue in the Human ». *Journal of Anatomy* 112(Pt 1): 35-39.
- Heffetz, D., I. Bushkin, R. Dror, et Y. Zick. 1990. « The Insulinomimetic Agents H₂O₂ and Vanadate Stimulate Protein Tyrosine Phosphorylation in Intact Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 265(5): 2896-2902.
- Heilbronn, Leonie K. et al. 2007. « Markers of Mitochondrial Biogenesis and Metabolism Are Lower in Overweight and Obese Insulin-Resistant Subjects ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92(4): 1467-73.
- Heine, M. et al. 2018. « Lipolysis Triggers a Systemic Insulin Response Essential for Efficient Energy Replenishment of Activated Brown Adipose Tissue in Mice ». *Cell Metab* 28(4): 644-655 e4.
- Hey-Mogensen, M. et al. 2012. « Obesity Augments the Age-Induced Increase in Mitochondrial Capacity for H₂O₂ Release in Zucker Fatty Rats ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 204(3): 354-61.
- Himsworth, H. P. 1936. « MANAGEMENT OF DIABETES MELLITUS ». *British Medical Journal* 2(3942): 188-90.
- Hirosumi, Jiro et al. 2002. « A Central Role for JNK in Obesity and Insulin Resistance ». *Nature* 420(6913): 333-36.
- Hodes, Anastasia, et David Lichtstein. 2014. « Natriuretic Hormones in Brain Function ». *Frontiers in Endocrinology* 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246887/> (12 août 2020).
- Holmström, Maria H., Eduardo Iglesias-Gutierrez, Juleen R. Zierath, et Pablo M. Garcia-Roves. 2012. « Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 302(6): E731-39.
- Holtwick, Rita et al. 2002. « Smooth Muscle-Selective Deletion of Guanylyl Cyclase-A Prevents the Acute but Not Chronic Effects of ANP on Blood Pressure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10): 7142-47.
- . 2003. « Pressure-Independent Cardiac Hypertrophy in Mice with Cardiomyocyte-Restricted Inactivation of the Atrial Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A ». *The Journal of Clinical Investigation* 111(9): 1399-1407.
- Hotamisligil, G. S. et al. 1996. « IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-Alpha- and Obesity-Induced Insulin Resistance ». *Science (New York, N.Y.)* 271(5249): 665-68.

- Hum David et al. 2004. « Characterization of a cGMP-Response Element in the Guanylyl Cyclase/Natriuretic Peptide Receptor A Gene Promoter ». *Hypertension* 43(6): 1270-78.
- Huth, Cornelia et al. 2020. « Biomarker-defined pathways for incident type 2 diabetes and coronary heart disease—a comparison in the MONICA/KORA study ». *Cardiovascular Diabetology* 19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066738/> (18 juillet 2020).
- Iida, H., et Y. Shibata. 1994. « Phasic Secretion of Newly Synthesized Atrial Natriuretic Factor from Unstimulated Atrial Myocytes in Culture ». *Circulation Research* 74(4): 659-68.
- Inagami, T. et al. 1987. « Structure and Physiological Actions of Rat Atrial Natriuretic Factor ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 10(5 Pt 2): 1113-117.
- International Diabetes Federation. IDF. 2015. « International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas — 7th Edition. » <http://www.diabetesatlas.org/>.
- Ishikawa, Kiyoshi et al. 2019. « Natriuretic Peptide Signaling Is Involved in the Expression of Oxidative Metabolism-Related and Muscle Fiber Constitutive Genes in the Gastrocnemius Muscle ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 494: 110493.
- Jaiswal, R. K. 1992. « Endothelin Inhibits the Atrial Natriuretic Factor Stimulated CGMP Production by Activating the Protein Kinase C in Rat Aortic Smooth Muscle Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 182(1): 395-402.
- James, D. E., A. B. Jenkins, et E. W. Kraegen. 1985. « Heterogeneity of Insulin Action in Individual Muscles in Vivo: Euglycemic Clamp Studies in Rats ». *The American Journal of Physiology* 248(5 Pt 1): E567-574.
- Jastroch, Martin et al. 2010. « Mitochondrial Proton and Electron Leaks ». *Essays in Biochemistry* 47: 53-67.
- Jayasinghe, Sisitha U., Aurel T. Tankeu, et Francesca Amati. 2019. « Reassessing the Role of Diacylglycerols in Insulin Resistance ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 30(9): 618-35.
- Jeandel, L. et al. 1989. « Immunocytochemical Localization, Binding, and Effects of Atrial Natriuretic Peptide in Rat Adipocytes ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 62(1): 69-78.
- Jensen, T. L., M. K. Kiersgaard, D. B. Sørensen, et L. F. Mikkelsen. 2013. « Fasting of Mice: A Review ». *Laboratory Animals* 47(4): 225-40.
- Jeong, Jae Hoon, Ji Suk Chang, et Young-Hwan Jo. 2018. « Intracellular Glycolysis in Brown Adipose Tissue Is Essential for Optogenetically Induced Nonshivering Thermogenesis in Mice ». *Scientific Reports* 8(1): 6672.
- Jheng, Huei-Fen et al. 2012. « Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle ». *Molecular and Cellular Biology* 32(2): 309-19.
- Jia, Ru et al. 2019. « [Timeliness of β_3 adrenergic receptor agonist-induced browning of white adipose tissues in mice] ». *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences* 44(10): 1099-1106.
- Jiang, H. et al. 2017. « Dense Intra-Adipose Sympathetic Arborizations Are Essential for Cold-Induced Beiging of Mouse White Adipose Tissue ». *Cell Metab* 26(4): 686-692 e3.

- Jiang, Yuwei, Daniel C Berry, et Jonathan M Graff. 2017. « Distinct cellular and molecular mechanisms for β 3 adrenergic receptor-induced beige adipocyte formation » éd. Peter Tontonoz. *eLife* 6: e30329.
- Jimenez, Maria et al. 2003. « Beta 3-Adrenoceptor Knockout in C57BL/6J Mice Depresses the Occurrence of Brown Adipocytes in White Fat ». *European Journal of Biochemistry* 270(4): 699-705.
- de Jong, J. M. A. et al. 2017. « The Beta3-Adrenergic Receptor Is Dispensable for Browning of Adipose Tissues ». *Am J Physiol Endocrinol Metab* 312(6): E508-18.
- Joseph, Anna-Maria, Denis R. Joannisse, Richard G. Baillot, et David A. Hood. 2012. « Mitochondrial Dysregulation in the Pathogenesis of Diabetes: Potential for Mitochondrial Biogenesis-Mediated Interventions ». *Experimental Diabetes Research* 2012: 642038.
- Joubert, S., J. Labrecque, et A. De Léan. 2001. « Reduced Activity of the NPR-A Kinase Triggers Dephosphorylation and Homologous Desensitization of the Receptor ». *Biochemistry* 40(37): 11096-105.
- Jujić, Amra et al. 2014. « Atrial Natriuretic Peptide and Type 2 Diabetes Development – Biomarker and Genotype Association Study ». *PLoS ONE* 9(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929630/> (18 juillet 2020).
- Kadota, S. et al. 1987. « Stimulation of Insulin-like Growth Factor II Receptor Binding and Insulin Receptor Kinase Activity in Rat Adipocytes. Effects of Vanadate and H₂O₂ ». *The Journal of Biological Chemistry* 262(17): 8252-56.
- Kagawa, Syota et al. 2008. « Impact of Transgenic Overexpression of SH2-Containing Inositol 5'-Phosphatase 2 on Glucose Metabolism and Insulin Signaling in Mice ». *Endocrinology* 149(2): 642-50.
- Kazak, Lawrence et al. 2015. « A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat ». *Cell* 163(3): 643-55.
- Kelley, D. E., B. Goodpaster, R. R. Wing, et J. A. Simoneau. 1999. « Skeletal Muscle Fatty Acid Metabolism in Association with Insulin Resistance, Obesity, and Weight Loss ». *The American Journal of Physiology* 277(6): E1130-1141.
- Kelley, David E., Jing He, Elizabeth V. Menshikova, et Vladimir B. Ritov. 2002. « Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 51(10): 2944-50.
- Kenny, A. J., A. Bourne, et J. Ingram. 1993. « Hydrolysis of Human and Pig Brain Natriuretic Peptides, Urodilatin, C-Type Natriuretic Peptide and Some C-Receptor Ligands by Endopeptidase-24.11 ». *The Biochemical Journal* 291 (Pt 1): 83-88.
- Khedoe, P. Padmini S. J. et al. 2015. « Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis ». *Journal of Lipid Research* 56(1): 51-59.
- Kim, K. W. et al. 2002. « Nociceptin/Orphanin FQ Increases ANP Secretion in Neonatal Cardiac Myocytes ». *Life Sciences* 70(9): 1065-74.
- Kimura, Haruka et al. 2017. « The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe ».

- Scientific Reports* 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5636787/> (14 août 2020).
- Kishimoto, I., S. K. Dubois, et D. L. Garbers. 1996. « The Heart Communicates with the Kidney Exclusively through the Guanylyl Cyclase-A Receptor: Acute Handling of Sodium and Water in Response to Volume Expansion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12): 6215-19.
- Knowler, William C. et al. 2002. « Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin ». *The New England Journal of Medicine* 346(6): 393-403.
- Knowles, J. W. et al. 2001. « Pressure-Independent Enhancement of Cardiac Hypertrophy in Natriuretic Peptide Receptor A-Deficient Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 107(8): 975-84.
- Kohno, M. et al. 1993. « Stimulation of Brain Natriuretic Peptide Release from the Heart by Thyroid Hormone ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 42(8): 1059-64.
- Koo, Seung-Hoi et al. 2004. « PGC-1 Promotes Insulin Resistance in Liver through PPAR-Alpha-Dependent Induction of TRB-3 ». *Nature Medicine* 10(5): 530-34.
- Kovacova, Zuzana et al. 2016. « Adipose Tissue Natriuretic Peptide Receptor Expression Is Related to Insulin Sensitivity in Obesity and Diabetes ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 24(4): 820-28.
- Kraakman, Michael J. et al. 2015. « Blocking IL-6 Trans-Signaling Prevents High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue Macrophage Recruitment but Does Not Improve Insulin Resistance ». *Cell Metabolism* 21(3): 403-16.
- Kuhn, Michaela. 2016. « Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors ». *Physiological Reviews* 96(2): 751-804.
- Kuwahara, K. et al. 2001. « The Neuron-Restrictive Silencer Element-Neuron-Restrictive Silencer Factor System Regulates Basal and Endothelin 1-Inducible Atrial Natriuretic Peptide Gene Expression in Ventricular Myocytes ». *Molecular and Cellular Biology* 21(6): 2085-97.
- Labbé, Sébastien M. et al. 2016. « Metabolic activity of brown, “beige,” and white adipose tissues in response to chronic adrenergic stimulation in male mice ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 311(1): E260-68.
- Lagathu, Claire et al. 2003. « Chronic Interleukin-6 (IL-6) Treatment Increased IL-6 Secretion and Induced Insulin Resistance in Adipocyte: Prevention by Rosiglitazone ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311(2): 372-79.
- LaPointe, Margot C. 2005. « Molecular Regulation of the Brain Natriuretic Peptide Gene ». *Peptides* 26(6): 944-56.
- Larsson, N. G. et al. 1998. « Mitochondrial Transcription Factor A Is Necessary for MtDNA Maintenance and Embryogenesis in Mice ». *Nature Genetics* 18(3): 231-36.
- Lazo, Mariana et al. 2013. « NH2-Terminal Pro–Brain Natriuretic Peptide and Risk of Diabetes ». *Diabetes* 62(9): 3189-93.

- Leduc-Gaudet, Jean-Philippe et al. 2018. « The Impact of a Short-Term High-Fat Diet on Mitochondrial Respiration, Reactive Oxygen Species Production, and Dynamics in Oxidative and Glycolytic Skeletal Muscles of Young Rats ». *Physiological Reports* 6(4).
- Lee, Yun-Hee, Anelia P. Petkova, Anish A. Konkar, et James G. Granneman. 2015. « Cellular Origins of Cold-Induced Brown Adipocytes in Adult Mice ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29(1): 286-99.
- Leone, Teresa C. et al. 2005. « PGC-1alpha Deficiency Causes Multi-System Energy Metabolic Derangements: Muscle Dysfunction, Abnormal Weight Control and Hepatic Steatosis ». *PLoS biology* 3(4): e101.
- Lewis, Matthew T. et al. 2019. « Quantification of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Metabolic Disease: Application to Type 2 Diabetes ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(21). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6862501/> (18 août 2020).
- Li, Peng et al. 2008. « Atrial Natriuretic Peptide Inhibits Transforming Growth Factor Beta-Induced Smad Signaling and Myofibroblast Transformation in Mouse Cardiac Fibroblasts ». *Circulation Research* 102(2): 185-92.
- Liang, F., F. Schaufele, et D. G. Gardner. 2001. « Functional Interaction of NF-Y and Sp1 Is Required for Type a Natriuretic Peptide Receptor Gene Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(2): 1516-22.
- Liang, Faquan et al. 2003. « Triiodothyronine Increases Brain Natriuretic Peptide (BNP) Gene Transcription and Amplifies Endothelin-Dependent BNP Gene Transcription and Hypertrophy in Neonatal Rat Ventricular Myocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(17): 15073-83.
- Lidell, Martin E. et al. 2013. « Evidence for Two Types of Brown Adipose Tissue in Humans ». *Nature Medicine* 19(5): 631-34.
- Lillioja, S. et al. 1987. « Skeletal Muscle Capillary Density and Fiber Type Are Possible Determinants of in Vivo Insulin Resistance in Man ». *The Journal of Clinical Investigation* 80(2): 415-24.
- Lin, C. S., et M. Klingenberg. 1980. « Isolation of the Uncoupling Protein from Brown Adipose Tissue Mitochondria ». *FEBS letters* 113(2): 299-303.
- Lin, Eleanor et al. 2012. « Effects of Transdermal Testosterone on Natriuretic Peptide Levels in Women: A Randomized Placebo-Controlled Pilot Study ». *Fertility and Sterility* 97(2): 489-93.
- Loh, Kim et al. 2009. « Reactive Oxygen Species Enhance Insulin Sensitivity ». *Cell Metabolism* 10(4): 260-72.
- Lowe, D. G. et al. 1989. « Human Atrial Natriuretic Peptide Receptor Defines a New Paradigm for Second Messenger Signal Transduction ». *The EMBO journal* 8(5): 1377-84.
- Luca, Carl de, et Jerrold M. Olefsky. 2008. « Inflammation and Insulin Resistance ». *FEBS Letters* 582(1): 97-105.
- Lucas, K. A. et al. 2000. « Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP ». *Pharmacological Reviews* 52(3): 375-414.

- Lugnier, Claire et al. 2019. « The Endocrine Function of the Heart: Physiology and Involvements of Natriuretic Peptides and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Heart Failure ». *Journal of Clinical Medicine* 8(10). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832599/> (11 août 2020).
- Maack, T. et al. 1987. « Physiological Role of Silent Receptors of Atrial Natriuretic Factor ». *Science (New York, N.Y.)* 238(4827): 675-78.
- Magnusson, Martin et al. 2012. « Low Plasma Level of Atrial Natriuretic Peptide Predicts Development of Diabetes: The Prospective Malmo Diet and Cancer Study ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(2): 638-45.
- Marette, A. et al. 1992. « Abundance, Localization, and Insulin-Induced Translocation of Glucose Transporters in Red and White Muscle ». *The American Journal of Physiology* 263(2 Pt 1): C443-452.
- van Marken Lichtenbelt, W. D. et al. 2009. « Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men ». *N Engl J Med* 360(15): 1500-1508.
- Martel, Guy, Pavel Hamet, et Johanne Tremblay. 2010. « GREBP, a cGMP-Response Element-Binding Protein Repressing the Transcription of Natriuretic Peptide Receptor 1 (NPR1/GCA) ». *Journal of Biological Chemistry* 285(27): 20926-39.
- Martinez de Toda, Irene et al. 2018. « Frailty Quantified by the “Valencia Score” as a Potential Predictor of Lifespan in Mice ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 73(10): 1323-29.
- Mattsson, Charlotte L. et al. 2011. « β_1 -Adrenergic Receptors Increase UCP1 in Human MADS Brown Adipocytes and Rescue Cold-Acclimated β_3 -Adrenergic Receptor-Knockout Mice via Nonshivering Thermogenesis ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 301(6): E1108-1118.
- McClung, James P. et al. 2004. « Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(24): 8852-57.
- McGuinness, Owen P., Julio E. Ayala, Maren R. Laughlin, et David H. Wasserman. 2009. « NIH Experiment in Centralized Mouse Phenotyping: The Vanderbilt Experience and Recommendations for Evaluating Glucose Homeostasis in the Mouse ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297(4): E849-855.
- Mirbolooki, M. Reza et al. 2014. « Adrenergic Pathway Activation Enhances Brown Adipose Tissue Metabolism: A [^{18}F]FDG PET/CT Study in Mice ». *Nuclear Medicine and Biology* 41(1): 10-16.
- Mishra, Prashant, Grigor Varuzhanyan, Anh H. Pham, et David C. Chan. 2015. « Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization ». *Cell Metabolism* 22(6): 1033-44.
- Mitaka, C. et al. 1993. « Endothelin-1 and Atrial Natriuretic Peptide in Septic Shock ». *American Heart Journal* 126(2): 466-68.

- Miyashita, Kazutoshi et al. 2009. « Natriuretic Peptides/CGMP/CGMP-Dependent Protein Kinase Cascades Promote Muscle Mitochondrial Biogenesis and Prevent Obesity ». *Diabetes* 58(12): 2880-92.
- Mogensen, Martin et al. 2007. « Mitochondrial Respiration Is Decreased in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 56(6): 1592-99.
- Mootha, Vamsi K. et al. 2003. « PGC-1alpha-Responsive Genes Involved in Oxidative Phosphorylation Are Coordinately Downregulated in Human Diabetes ». *Nature Genetics* 34(3): 267-73.
- Morin, S., F. Charron, L. Robitaille, et M. Nemer. 2000. « GATA-Dependent Recruitment of MEF2 Proteins to Target Promoters ». *The EMBO journal* 19(9): 2046-55.
- Morino, Katsutaro et al. 2005. « Reduced Mitochondrial Density and Increased IRS-1 Serine Phosphorylation in Muscle of Insulin-Resistant Offspring of Type 2 Diabetic Parents ». *The Journal of Clinical Investigation* 115(12): 3587-93.
- Moro, Cedric et al. 2004. « Atrial Natriuretic Peptide Contributes to Physiological Control of Lipid Mobilization in Humans ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(7): 908-10.
- Moro, Cédric, Sudip Bajpeyi, et Steven R. Smith. 2008. « Determinants of Intramyocellular Triglyceride Turnover: Implications for Insulin Sensitivity ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 294(2): E203-213.
- Mukoyama, M. et al. 1991. « Brain Natriuretic Peptide as a Novel Cardiac Hormone in Humans. Evidence for an Exquisite Dual Natriuretic Peptide System, Atrial Natriuretic Peptide and Brain Natriuretic Peptide ». *The Journal of Clinical Investigation* 87(4): 1402-12.
- Müller, D. et al. 1992. « Rat Insulin-Degrading Enzyme: Cleavage Pattern of the Natriuretic Peptide Hormones ANP, BNP, and CNP Revealed by HPLC and Mass Spectrometry ». *Biochemistry* 31(45): 11138-43.
- Müller, D., H. Baumeister, F. Buck, et D. Richter. 1991. « Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Is a High-Affinity Substrate for Rat Insulin-Degrading Enzyme ». *European Journal of Biochemistry* 202(2): 285-92.
- Muller, Florian L., Yuhong Liu, et Holly Van Remmen. 2004. « Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(47): 49064-73.
- Murthy, K. S. et al. 2000. « G(i-1)/G(i-2)-Dependent Signaling by Single-Transmembrane Natriuretic Peptide Clearance Receptor ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 278(6): G974-980.
- Nahmias, C. et al. 1991. « Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. » *The EMBO Journal* 10(12): 3721-27.
- Nakagawa, Yasuaki, Toshio Nishikimi, et Koichiro Kuwahara. 2019. « Atrial and Brain Natriuretic Peptides: Hormones Secreted from the Heart ». *Peptides* 111: 18-25.
- Nakatsuji, Hideaki et al. 2010. « Reciprocal Regulation of Natriuretic Peptide Receptors by Insulin in Adipose Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392(1): 100-105.

- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). 2017. « Worldwide Trends in Body-Mass Index, Underweight, Overweight, and Obesity from 1975 to 2016: A Pooled Analysis of 2416 Population-Based Measurement Studies in 128.9 Million Children, Adolescents, and Adults ». *Lancet (London, England)* 390(10113): 2627-42.
- Neeland, Ian J. et al. 2013. « Higher Natriuretic Peptide Levels Associate with a Favorable Adipose Tissue Distribution Profile ». *Journal of the American College of Cardiology* 62(8): 752-60.
- Nicholls, D. G. 1976. « The Bioenergetics of Brown Adipose Tissue Mitochondria ». *FEBS letters* 61(2): 103-10.
- Nussenzveig, D. R., J. A. Lewicki, et T. Maack. 1990. « Cellular Mechanisms of the Clearance Function of Type C Receptors of Atrial Natriuretic Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 265(34): 20952-58.
- Oberbach, Andreas et al. 2006. « Altered Fiber Distribution and Fiber-Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes ». *Diabetes Care* 29(4): 895-900.
- Oberkofler, H. et al. 2010. « Aberrant Hepatic TRIB3 Gene Expression in Insulin-Resistant Obese Humans ». *Diabetologia* 53(9): 1971-75.
- Ogawa, Emiko et al. 2002. « Fibronectin Signaling Stimulates BNP Gene Transcription by Inhibiting Neuron-Restrictive Silencer Element-Dependent Repression ». *Cardiovascular Research* 53(2): 451-59.
- Ogawa, Haruo, Yue Qiu, Craig M. Ogata, et Kunio S. Misono. 2004. « Crystal Structure of Hormone-Bound Atrial Natriuretic Peptide Receptor Extracellular Domain: Rotation Mechanism for Transmembrane Signal Transduction ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(27): 28625-31.
- Ogawa, Tsuneo, Marcelo Vatta, Benoit G. Bruneau, et Adolfo J. de Bold. 1999. « Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276(6): H1977-86.
- Oguri, Yasuo, et Shingo Kajimura. 2020. « Cellular Heterogeneity in Brown Adipose Tissue ». *The Journal of Clinical Investigation* 130(1): 65-67.
- Oh, Young-Bin et al. 2011. « Endogenous Angiotensin II Suppresses Stretch-Induced ANP Secretion via AT1 Receptor Pathway ». *Peptides* 32(2): 374-81.
- Ohba, H. et al. 2001. « Effects of Prolonged Strenuous Exercise on Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide and Brain Natriuretic Peptide in Healthy Men ». *American Heart Journal* 141(5): 751-58.
- Ohoka, Nobumichi et al. 2005. « TRB3, a Novel ER Stress-Inducible Gene, Is Induced via ATF4-CHOP Pathway and Is Involved in Cell Death ». *The EMBO journal* 24(6): 1243-55.
- Orava, Janne et al. 2011. « Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin ». *Cell Metabolism* 14(2): 272-79.
- Ørtenblad, Niels et al. 2005. « Reduced Insulin-Mediated Citrate Synthase Activity in Cultured Skeletal Muscle Cells from Patients with Type 2 Diabetes: Evidence for an Intrinsic Oxidative Enzyme Defect ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1741(1): 206-14.

- Özcan, Umut et al. 2004. « Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes ». *Science* 306(5695): 457-61.
- Palaparti, A., Y. Li, et M. B. Anand-Srivastava. 2000. « Inhibition of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) C Receptor Expression by Antisense Oligodeoxynucleotides in A10 Vascular Smooth-Muscle Cells Is Associated with Attenuation of ANP-C-Receptor-Mediated Inhibition of Adenylyl Cyclase ». *The Biochemical Journal* 346 Pt 2: 313-20.
- Patti, Mary Elizabeth et al. 2003. « Coordinated Reduction of Genes of Oxidative Metabolism in Humans with Insulin Resistance and Diabetes: Potential Role of PGC1 and NRF1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8466-71.
- Peirce, Vivian, Vanessa Pellegrinelli, et Antonio Vidal-Puig. 2016. « Adipose Structure (White, Brown, Beige) ». In *Metabolic Syndrome: A Comprehensive Textbook*, éd. Rexford S. Ahima. Cham: Springer International Publishing, 369-96. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11251-0_23 (2 juillet 2020).
- Perry, R. J. et al. 2015. « Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes ». *Cell* 160(4): 745-58.
- Petersen, Kitt Falk et al. 2004. « Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes ». *The New England journal of medicine* 350(7): 664-71.
- Petersen, Max C. et al. 2016. « Insulin Receptor Thr1160 Phosphorylation Mediates Lipid-Induced Hepatic Insulin Resistance ». *The Journal of Clinical Investigation* 126(11): 4361-71.
- Pfeifer, A. et al. 1998. « Defective Smooth Muscle Regulation in CGMP Kinase I-Deficient Mice ». *The EMBO journal* 17(11): 3045-51.
- Pfister, Roman et al. 2011. « Mendelian Randomization Study of B-Type Natriuretic Peptide and Type 2 Diabetes: Evidence of Causal Association from Population Studies ». *PLoS medicine* 8(10): e1001112.
- Pinho, Ricardo A. et al. 2017. « High-Fat Diet Induces Skeletal Muscle Oxidative Stress in a Fiber Type-Dependent Manner in Rats ». *Free Radical Biology and Medicine* 110: 381-89.
- Pivovarova, Olga et al. 2012. « Insulin Up-Regulates Natriuretic Peptide Clearance Receptor Expression in the Subcutaneous Fat Depot in Obese Subjects: A Missing Link between CVD Risk and Obesity? ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(5): E731-739.
- Posner, Barry I. 2017. « Insulin Signalling: The Inside Story ». *Canadian Journal of Diabetes* 41(1): 108-13.
- Potter, L. R., et D. L. Garbers. 1992. « Dephosphorylation of the Guanylyl Cyclase-A Receptor Causes Desensitization ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(21): 14531-34.
- . 1994. « Protein Kinase C-Dependent Desensitization of the Atrial Natriuretic Peptide Receptor Is Mediated by Dephosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 269(20): 14636-42.
- Potter, L. R., et T. Hunter. 1999. « A Constitutively “Phosphorylated” Guanylyl Cyclase-Linked Atrial Natriuretic Peptide Receptor Mutant Is Resistant to Desensitization ». *Molecular Biology of the Cell* 10(6): 1811-20.

- Potter, Lincoln R. et al. 2009. « Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications ». *Handbook of Experimental Pharmacology* (191): 341-66.
- Potter, Lincoln R., Sarah Abbey-Hosch, et Deborah M. Dickey. 2006. « Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions ». *Endocrine Reviews* 27(1): 47-72.
- Preite, Nailliw Z et al. 2016. « Disruption of beta3 adrenergic receptor increases susceptibility to DIO in mouse ». *Journal of Endocrinology* 231(3): 259-69.
- Puigserver, P. et al. 1998. « A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis ». *Cell* 92(6): 829-39.
- Putensen, C. et al. 1992. « Atrial Natriuretic Factor Release during Hypovolemia and after Volume Replacement ». *Critical Care Medicine* 20(7): 984-89.
- Putri, Mirasari et al. 2015. « CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress ». *Biochemical and biophysical research communications* 457(4): 520-25.
- Pw, Ladenson, Bloch Kd, et Seidman Jg. 1988. « Modulation of Atrial Natriuretic Factor by Thyroid Hormone: Messenger Ribonucleic Acid and Peptide Levels in Hypothyroid, Euthyroid, and Hyperthyroid Rat Atria and Ventricles. ». *Endocrinology* 123(1): 652-57.
- Quinteiro, Filipa Mota et al. 2011. « Design and Development of Novel Non-Peptide Agonists at NPR-C ». *BMC Pharmacology* 11(1): P54.
- Rahmutula, Dolkun et al. 2002. « Structure and Polymorphisms of the Human Natriuretic Peptide Receptor C Gene ». *Endocrine* 17(2): 85-90.
- Rahmutula, Dolkun, Hao Zhang, Emily E. Wilson, et Jeffrey E. Olgin. 2019. « Absence of Natriuretic Peptide Clearance Receptor Attenuates TGF-B1-Induced Selective Atrial Fibrosis and Atrial Fibrillation ». *Cardiovascular Research* 115(2): 357-72.
- Rashed, H. M., B. G. Nair, et T. B. Patel. 1992. « Regulation of Hepatic Glycolysis and Gluconeogenesis by Atrial Natriuretic Peptide ». *Arch Biochem Biophys* 298(2): 640-45.
- Rasmussen, A. T. 1922. « THE GLANDULAR STATUS OF BROWN MULTILOCLAR ADIPOSE TISSUE ». *Endocrinology* 6(6): 760-70.
- Razzoli, Maria et al. 2016. « Stress-Induced Activation of Brown Adipose Tissue Prevents Obesity in Conditions of Low Adaptive Thermogenesis ». *Molecular Metabolism* 5(1): 19-33.
- Ren, J. M. et al. 1998. « Transgenic Mice Deficient in the LAR Protein-Tyrosine Phosphatase Exhibit Profound Defects in Glucose Homeostasis ». *Diabetes* 47(3): 493-97.
- Riis-Vestergaard, Mette Ji et al. 2020. « Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 105(4).
- Ritov, Vladimir B. et al. 2005. « Deficiency of Subsarcolemmal Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 54(1): 8-14.

- Roesler, Anna, et Lawrence Kazak. 2020. « UCP1-Independent Thermogenesis ». *The Biochemical Journal* 477(3): 709-25.
- Rooney, D. P. et al. 1993. « Contribution of Glucose/Glucose 6-Phosphate Cycle Activity to Insulin Resistance in Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus ». *Diabetologia* 36(2): 106-12.
- Rosenzweig, A., T. D. Halazonetis, J. G. Seidman, et C. E. Seidman. 1991. « Proximal Regulatory Domains of Rat Atrial Natriuretic Factor Gene ». *Circulation* 84(3): 1256-65.
- Rovira-Llopis, Susana et al. 2017. « Mitochondrial Dynamics in Type 2 Diabetes: Pathophysiological Implications ». *Redox Biology* 11: 637-45.
- Sabrane, Karim et al. 2005. « Vascular Endothelium Is Critically Involved in the Hypotensive and Hypovolemic Actions of Atrial Natriuretic Peptide ». *The Journal of Clinical Investigation* 115(6): 1666-74.
- Samuel, V. T., et G. I. Shulman. 2016. « The Pathogenesis of Insulin Resistance: Integrating Signaling Pathways and Substrate Flux ». *J Clin Invest* 126(1): 12-22.
- Sanders, Francis W. B., et Julian L. Griffin. 2016. « De Novo Lipogenesis in the Liver in Health and Disease: More than Just a Shunting Yard for Glucose ». *Biological Reviews* 91(2): 452-68.
- Santos, Fernando R., Maggie K. Diamond-Stanic, Mujalin Prasannarong, et Erik J. Henriksen. 2012. « Contribution of the Serine Kinase C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) to Oxidant-Induced Insulin Resistance in Isolated Rat Skeletal Muscle ». *Archives of Physiology and Biochemistry* 118(5): 231-36.
- Sarzani, R. et al. 1996. « Expression of Natriuretic Peptide Receptors in Human Adipose and Other Tissues ». *Journal of Endocrinological Investigation* 19(9): 581-85.
- Schellenberger, Ute et al. 2006. « The Precursor to B-Type Natriuretic Peptide Is an O-Linked Glycoprotein ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 451(2): 160-66.
- Schiebinger, R J, M Z Baker, et J Linden. 1987. « Effect of adrenergic and muscarinic cholinergic agonists on atrial natriuretic peptide secretion by isolated rat atria. Potential role of the autonomic nervous system in modulating atrial natriuretic peptide secretion. » *Journal of Clinical Investigation* 80(6): 1687-91.
- Schoettl, Theresa, Ingrid P. Fischer, et Siegfried Ussar. 2018. « Heterogeneity of Adipose Tissue in Development and Metabolic Function ». *The Journal of Experimental Biology* 221(Pt Suppl 1).
- Schrauwen-Hinderling, V. B. et al. 2007. « Impaired in Vivo Mitochondrial Function but Similar Intramyocellular Lipid Content in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and BMI-Matched Control Subjects ». *Diabetologia* 50(1): 113-20.
- Schreiber, Renate et al. 2017. « Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue ». *Cell Metabolism* 26(5): 753-763.e7.
- Seale, Patrick et al. 2011. « Prdm16 Determines the Thermogenic Program of Subcutaneous White Adipose Tissue in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 121(1): 96-105.

- Sengenès, C. et al. 2000. « Natriuretic Peptides: A New Lipolytic Pathway in Human Adipocytes ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14(10): 1345-51.
- Sengenes, C. et al. 2002. « Natriuretic Peptide-Dependent Lipolysis in Fat Cells Is a Primate Specificity ». *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(1): R257-65.
- Sengenès, Coralie et al. 2002. « Natriuretic Peptide-Dependent Lipolysis in Fat Cells Is a Primate Specificity ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283(1): R257-265.
- Sengenes, Coralie et al. 2003. « Involvement of a CGMP-Dependent Pathway in the Natriuretic Peptide-Mediated Hormone-Sensitive Lipase Phosphorylation in Human Adipocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(49): 48617-26.
- Sharp, Louis Z. et al. 2012. « Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells ». *PLOS ONE* 7(11): e49452.
- Shetty, P. S. 1990. « Physiological Mechanisms in the Adaptive Response of Metabolic Rates to Energy Restriction ». *Nutrition Research Reviews* 3(1): 49-74.
- Shikama, H., M. Yajima, et M. Ui. 1980. « Glycogen Metabolism in Rat Liver during Transition from the Fed to Fasted States ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 631(2): 278-88.
- Shin, Hyunsu et al. 2017. « Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice ». *Cell Metabolism* 26(5): 764-777.e5.
- Shiota, M., T. Tanaka, et T. Sugano. 1985. « Effect of Norepinephrine on Gluconeogenesis in Perfused Livers of Cold-Exposed Rats ». *The American Journal of Physiology* 249(3 Pt 1): E281-286.
- Sidossis, Labros, et Shingo Kajimura. 2015. « Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis ». *The Journal of Clinical Investigation* 125(2): 478-86.
- Simcox, J. et al. 2017. « Global Analysis of Plasma Lipids Identifies Liver-Derived Acylcarnitines as a Fuel Source for Brown Fat Thermogenesis ». *Cell Metab* 26(3): 509-522 e6.
- Simoneau, J. A., J. H. Veerkamp, L. P. Turcotte, et D. E. Kelley. 1999. « Markers of Capacity to Utilize Fatty Acids in Human Skeletal Muscle: Relation to Insulin Resistance and Obesity and Effects of Weight Loss ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(14): 2051-60.
- Singh, Abhishek K. et al. 2018. « Brown Adipose Tissue Derived ANGPTL4 Controls Glucose and Lipid Metabolism and Regulates Thermogenesis ». *Molecular Metabolism* 11: 59-69.
- Skvorak, J. P., et J. R. Dietz. 1997. « Endothelin and Nitric Oxide Interact to Regulate Stretch-Induced ANP Secretion ». *The American Journal of Physiology* 273(1 Pt 2): R301-306.
- Skvorak, J. P., S. J. Nazian, et J. R. Dietz. 1995. « Endothelin Acts as a Paracrine Regulator of Stretch-Induced Atrial Natriuretic Peptide Release ». *The American Journal of Physiology* 269(5 Pt 2): R1093-1098.

- Sleeman, Mark W. et al. 2005. « Absence of the Lipid Phosphatase SHIP2 Confers Resistance to Dietary Obesity ». *Nature Medicine* 11(2): 199-205.
- Smith, J. B., et T. M. Lincoln. 1987. « Angiotensin Decreases Cyclic GMP Accumulation Produced by Atrial Natriuretic Factor ». *The American Journal of Physiology* 253(1 Pt 1): C147-150.
- Sokolowska, Emilia, et Agnieszka Blachnio-Zabielska. 2019. « The Role of Ceramides in Insulin Resistance ». *Frontiers in Endocrinology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00577/full> (12 août 2020).
- Solinas, Giovanni, et Barbara Becattini. 2016. « JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response ». *Molecular Metabolism* 6(2): 174-84.
- Somanna, Naveen K., Indra Mani, Satyabha Tripathi, et Kailash N. Pandey. 2018. « Clathrin-Dependent Internalization, Signaling, and Metabolic Processing of Guanylyl Cyclase/Natriuretic Peptide Receptor-A ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 441(1-2): 135-50.
- Song, Anying et al. 2020. « Low- and High-Thermogenic Brown Adipocyte Subpopulations Coexist in Murine Adipose Tissue ». *The Journal of Clinical Investigation* 130(1): 247-57.
- Souto Padron de Figueiredo, Alvaro et al. 2015. « Nox2 Mediates Skeletal Muscle Insulin Resistance Induced by a High Fat Diet ». *The Journal of Biological Chemistry* 290(21): 13427-39.
- Souza, Sandra C. et al. 2011. « Atrial Natriuretic Peptide Regulates Lipid Mobilization and Oxygen Consumption in Human Adipocytes by Activating AMPK ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410(3): 398-403.
- Speake, P. F. et al. 1993. « Dose-Response Effects of Adrenergic and Cholinergic Stimulation on Atrial Natriuretic Peptide Secretion from Beating Isolated Guinea-Pig Atria ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 85(1): 5-12.
- Srivastava, A. K., et S. K. Pandey. 1998. « Potential Mechanism(s) Involved in the Regulation of Glycogen Synthesis by Insulin ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 182(1-2): 135-41.
- Stadeager, C. et al. 1992. « Circulation, kidney function, and volume-regulating hormones during prolonged water immersion in humans ». *Journal of Applied Physiology* 73(2): 530-38.
- Stephenson, S. L., et A. J. Kenny. 1987. « The Hydrolysis of Alpha-Human Atrial Natriuretic Peptide by Pig Kidney Microvillar Membranes Is Initiated by Endopeptidase-24.11 ». *The Biochemical Journal* 243(1): 183-87.
- Stone, James R., et Suping Yang. 2006. « Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger ». *Antioxidants & Redox Signaling* 8(3-4): 243-70.
- Strålfors, P., et R. C. Honnor. 1989. « Insulin-Induced Dephosphorylation of Hormone-Sensitive Lipase. Correlation with Lipolysis and CAMP-Dependent Protein Kinase Activity ». *European Journal of Biochemistry* 182(2): 379-85.
- Stuart, Charles A. et al. 2013. « Slow-Twitch Fiber Proportion in Skeletal Muscle Correlates with Insulin Responsiveness ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(5): 2027-36.

- Subbotina, Ekaterina et al. 2015. « Musclin Is an Activity-Stimulated Myokine That Enhances Physical Endurance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(52): 16042-47.
- Suga, S. et al. 1992. « Receptor Selectivity of Natriuretic Peptide Family, Atrial Natriuretic Peptide, Brain Natriuretic Peptide, and C-Type Natriuretic Peptide ». *Endocrinology* 130(1): 229-39.
- Takahashi, Y. et al. 1998. « Organization of the Human Natriuretic Peptide Receptor A Gene ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246(3): 736-39.
- Talha, Samy et al. 2013. « Pretreatment with Brain Natriuretic Peptide Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress after Ischemia-Reperfusion ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 114(2): 172-79.
- Thomsen, Camilla F. et al. 2019. « Plasma Proatrial Natriuretic Peptide Associates with Lipid Oxidation during Exercise and Cardiorespiratory Fitness in Healthy Young Adults ». *Peptides* 122: 170156.
- Tsuneyoshi, Hiroshi et al. 2004. « Atrial Natriuretic Peptide Helps Prevent Late Remodeling after Left Ventricular Aneurysm Repair ». *Circulation* 110(11 Suppl 1): II174-179.
- Turinsky, J., D. M. O'Sullivan, et B. P. Bayly. 1990. « 1,2-Diacylglycerol and Ceramide Levels in Insulin-Resistant Tissues of the Rat in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 265(28): 16880-85.
- Turner, Nigel et al. 2007. « Excess Lipid Availability Increases Mitochondrial Fatty Acid Oxidative Capacity in Muscle: Evidence Against a Role for Reduced Fatty Acid Oxidation in Lipid-Induced Insulin Resistance in Rodents ». *Diabetes* 56(8): 2085-92.
- Ukropec, Jozef et al. 2006. « UCP1-Independent Thermogenesis in White Adipose Tissue of Cold-Acclimated Ucp1^{-/-} Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(42): 31894-908.
- Urano, F. et al. 2000. « Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1 ». *Science (New York, N.Y.)* 287(5453): 664-66.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, et G. S. Hotamisligil. 1997. « Protection from Obesity-Induced Insulin Resistance in Mice Lacking TNF-Alpha Function ». *Nature* 389(6651): 610-14.
- Valero-Muñoz, María et al. 2016. « Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Induces Beiging in Adipose Tissue ». *Circulation. Heart Failure* 9(1): e002724.
- Vanneste, Y et al. 1988. « Hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide in vitro by human kidney membranes and purified endopeptidase-24.11. Evidence for a novel cleavage site. » *Biochemical Journal* 254(2): 531-37.
- Vesely, David L. 2002. « Atrial Natriuretic Peptide Prohormone Gene Expression: Hormones and Diseases That Upregulate Its Expression ». *IUBMB life* 53(3): 153-59.
- Virtanen, Kirsi A. et al. 2009. « Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults ». *New England Journal of Medicine* 360(15): 1518-25.
- Vosselman, M. J. et al. 2015. « Low Brown Adipose Tissue Activity in Endurance-Trained Compared with Lean Sedentary Men ». *Int J Obes (Lond)* 39(12): 1696-1702.

- Wagner, C. et al. 1998. « Role of CGMP-Kinase II in the Control of Renin Secretion and Renin Expression ». *The Journal of Clinical Investigation* 102(8): 1576-82.
- Wang, Qiong A, Caroline Tao, Rana K Gupta, et Philipp E Scherer. 2013. « Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration ». *Nature medicine* 19(10): 1338-44.
- Wang, Thomas J. et al. 2004. « Impact of Obesity on Plasma Natriuretic Peptide Levels ». *Circulation* 109(5): 594-600.
- . 2007. « Association of Plasma Natriuretic Peptide Levels with Metabolic Risk Factors in Ambulatory Individuals ». *Circulation* 115(11): 1345-53.
- Watanabe, Jun et al. 1987. « Significance of Increase in Glucose 6-Phosphatase Activity in Brown Adipose Cells of Cold-Exposed and Starved Mice ». *The Anatomical Record* 219(1): 39-44.
- Wiedemann, R. et al. 2001. « Atrial Natriuretic Peptide in Severe Primary and Nonprimary Pulmonary Hypertension: Response to Iloprost Inhalation ». *Journal of the American College of Cardiology* 38(4): 1130-36.
- Winther, Sally et al. 2018. « Restricting Glycolysis Impairs Brown Adipocyte Glucose and Oxygen Consumption ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 314(3): E214-23.
- Witthaut, Rochus et al. 2003. « Plasma Atrial Natriuretic Peptide and Brain Natriuretic Peptide Are Increased in Septic Shock: Impact of Interleukin-6 and Sepsis-Associated Left Ventricular Dysfunction ». *Intensive Care Medicine* 29(10): 1696-1702.
- Wong, Philip Ching Yat, Jun Guo, et Aidong Zhang. 2017. « The Renal and Cardiovascular Effects of Natriuretic Peptides ». *Advances in Physiology Education* 41(2): 179-85.
- Woodard, Geoffrey E., et Juan A. Rosado. 2008. « Natriuretic Peptides in Vascular Physiology and Pathology ». *International Review of Cell and Molecular Biology* 268: 59-93.
- Wredenberg, Anna et al. 2006. « Respiratory Chain Dysfunction in Skeletal Muscle Does Not Cause Insulin Resistance ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350(1): 202-7.
- Wu, Jun et al. 2012. « Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human ». *Cell* 150(2): 366-76.
- Wu, Wei et al. 2017. « Enhancing Natriuretic Peptide Signaling in Adipose Tissue, but Not in Muscle, Protects against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance ». *Science Signaling* 10(489). <https://stke.sciencemag-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/10/489/eaam6870> (19 juillet 2020).
- Xu, Chunyan, Beatrice Bailly-Maitre, et John C. Reed. 2005. « Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions ». *Journal of Clinical Investigation* 115(10): 2656-64.
- Xu, L., G. A. Spinaz, et M. Niessen. 2010. « ER Stress in Adipocytes Inhibits Insulin Signaling, Represses Lipolysis, and Alters the Secretion of Adipokines without Inhibiting Glucose Transport ». *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 42(9): 643-51.

- Yamada, Hiroyuki et al. 2019. « Low-dose atrial natriuretic peptide for prevention or treatment of acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis ». *Critical Care* 23(1): 41.
- Yamada, K., S. Yoshida, et Y. Shimada. 1991. « Atrial Natriuretic Polypeptide Secretion via Selective Activation of Kappa-Opioid Receptor: Role of Dynorphin ». *The American Journal of Physiology* 261(3 Pt 1): E293-297.
- Yamada, T. et al. 1975. « Two Distinct Patterns of Glucose Intolerance in Icteric Rats and Rabbits. Relationship to Impaired Liver Mitochondria Function ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 86(1): 38-45.
- Yamaguchi, M., L. J. Rutledge, et D. L. Garbers. 1990. « The Primary Structure of the Rat Guanylyl Cyclase A/Atrial Natriuretic Peptide Receptor Gene. ». *Journal of Biological Chemistry* 265(33): 20414-20.
- Yan, W., F. Wu, J. Morser, et Q. Wu. 2000. « Corin, a Transmembrane Cardiac Serine Protease, Acts as a pro-Atrial Natriuretic Peptide-Converting Enzyme ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(15): 8525-29.
- Yandle, T. G. et al. 1986. « Metabolic Clearance Rate and Plasma Half Life of Alpha-Human Atrial Natriuretic Peptide in Man ». *Life Sciences* 38(20): 1827-33.
- Ye, Li et al. 2013. « Fat Cells Directly Sense Temperature to Activate Thermogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(30): 12480-85.
- Yoshitomi, H., K. Yamazaki, S. Abe, et I. Tanaka. 1998. « Differential Regulation of Mouse Uncoupling Proteins among Brown Adipose Tissue, White Adipose Tissue, and Skeletal Muscle in Chronic Beta 3 Adrenergic Receptor Agonist Treatment ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253(1): 85-91.
- Youle, Richard J., et Derek P. Narendra. 2011. « Mechanisms of Mitophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(1): 9-14.
- Yuan, K. et al. 2009. « Modification of Atrial Natriuretic Peptide System in Cold-Induced Hypertensive Rats ». *Regul Pept* 154(1-3): 112-20.
- Zhang, Fang et al. 2018. « An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents ». *Cell Metabolism* 27(1): 252-262.e3.
- Zhang, L. M., H. Tao, et W. H. Newman. 1993. « Regulation of Atrial Natriuretic Peptide Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of CGMP ». *The American Journal of Physiology* 264(6 Pt 2): H1753-1759.
- Zois, Nora E. et al. 2017. « Effect of Pancreatic Hormones on Pro-Atrial Natriuretic Peptide in Humans ». *EBioMedicine* 17: 88-94.
- Zorzano, Antonio, María Isabel Hernández-Alvarez, Manuel Palacín, et Geltrude Mingrone. 2010. « Alterations in the Mitochondrial Regulatory Pathways Constituted by the Nuclear Co-Factors PGC-1alpha or PGC-1beta and Mitofusin 2 in Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1797(6-7): 1028-33.

ANNEXES

I- Les peptides natriurétiques : nouvelle cible dans le développement du diabète de type 2 ?

Les peptides natriurétiques : nouvelle cible dans le développement du diabète de type 2 ?

Deborah Carper and Cedric Moro

Médecine des Maladies Métaboliques, Vol 13, 4(328-330), June 2019

doi:10.1016/S1957-2557(19)30091-4

Les peptides natriurétiques : une cible potentielle dans le diabète de type 2 ?

Natriuretic peptides: A potential target for type 2 diabetes?

D. Carper, C. Moro

Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, Inserm UMR1048, CHU Rangueil ; Université Paul Sabatier, Toulouse.

Résumé

Les peptides natriurétiques (PN) émergent depuis quelques années comme des régulateurs importants du métabolisme énergétique et sont associés au diabète de type 2. Ces peptides modulent l'activité métabolique des tissus adipeux blancs et bruns, ainsi que la capacité oxydative et la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique. Le système PN apparaît comme une cible potentielle dans la prévention et le traitement du diabète de type 2.

Mots-clés : Métabolisme oxydatif – muscle squelettique – tissu adipeux.

Summary

Natriuretic peptides (NP) have emerged as important regulators of energy metabolism and are associated with type 2 diabetes. These peptides influence white and brown adipose tissue metabolic activity, as well as oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle. These data indicate that the NP system appears as a potential target for the prevention and treatment of type 2 diabetes.

Key-words: Oxidative metabolism – skeletal muscle – adipose tissue.

Correspondance

Cédric Moro

Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires
Inserm UMR1048
CHU Rangueil
1, av. Paul Sabatier
BP 84205
31432 Toulouse cedex 4
cedric.moro@inserm.fr

© 2019 - Elsevier Masson SAS - Tous droits réservés.

Médecine des maladies Métaboliques - XXXXXX 2019 - Vol. 13 - N°X

Introduction

• L'ANP (*atrial natriuretic peptide*) et le BNP (*B-type natriuretic peptide*) sont les membres phares de la famille des peptides natriurétiques (PN). Ils sont synthétisés sous forme de pré-pro-hormones, stockés dans des granules de sécrétion dans l'oreillette cardiaque droite, et sécrétés par les cardiomyocytes en réponse à un étirement de la paroi cardiaque. Ces hormones peptidiques se lient à un récepteur membranaire à activité guanylyl cyclase intrinsèque, appelé GCA (*guanylyl cyclase receptor A*). Le récepteur activé génère du GMPc (guanosine monophosphate cyclique) à partir de GTP (guanosine triphosphate),

un second messager qui active une autre des protéines kinases GMPc-dépendantes (PKG) pour contrôler divers processus biologiques. L'ANP et le BNP lient également, avec une moindre affinité, un récepteur de clairance appelé NPRC (*natriuretic peptide receptor C*), qui internalise et inactive ces peptides.

• L'ANP a été initialement identifié pour son rôle dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée et le contrôle de la volémie. Il induit une augmentation de la diurèse, de la natriurèse, et une vasodilatation conduisant à une diminution de la pression artérielle. Le BNP, quant à lui, semblerait exercer un rôle local dans le cœur *via* un effet anti-hypertrophique et anti-fibrotique [1].

Les peptides natriurétiques : marqueurs prédictifs du diabète de type 2

• Plusieurs études de cohortes ont mis en évidence ces dix dernières années un lien entre un déficit du système des PN et le diabète de type 2 (DT2).

– Les résultats de l'étude *Malmö Diet and Cancer*, dont le suivi prospectif des patients a été de 16 ans, montrent que les concentrations plasmatiques de *mid-regional proANP* (MR-proANP) sont inversement corrélés à la glycémie à jeun et prédisent le développement du DT2 [2].

– Il a également été montré qu'un polymorphisme fonctionnel du gène de l'ANP, associé à des concentrations augmentées d'ANP plasmatiques, s'accompagne d'une diminution du risque de développer un DT2 [3].

– L'étude *Atherosclerosis Risk In Communities* (ARIC) a montré chez 7 822 hommes et femmes sans antécédents de DT2 et de maladies cardiovasculaires, suivis prospectivement pendant 12 ans, que des concentrations plasmatiques faibles de *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (NT-proBNP) étaient associés à un plus haut risque de développer un DT2 [4].

• À côté des concentrations circulantes des PN prédictives du DT2, nous avons montré que l'expression du récepteur de l'ANP (GCA) est diminuée, tandis que celle du récepteur de clairance NPRC est augmentée, dans le tissu adipeux et le muscle squelettique d'individus obèses et DT2 [5] (figure 1).

Mécanismes d'action des peptides natriurétiques dans le contrôle du métabolisme énergétique

Effets sur les tissus adipeux

Des travaux antérieurs du laboratoire ont révélé que le tissu adipeux était une cible privilégiée des PN. L'ANP a un puissant effet lipolytique sur des adipocytes humains isolés. D'un point de vue mécanistique, ceci s'explique par l'activation PKG-dépendante d'une

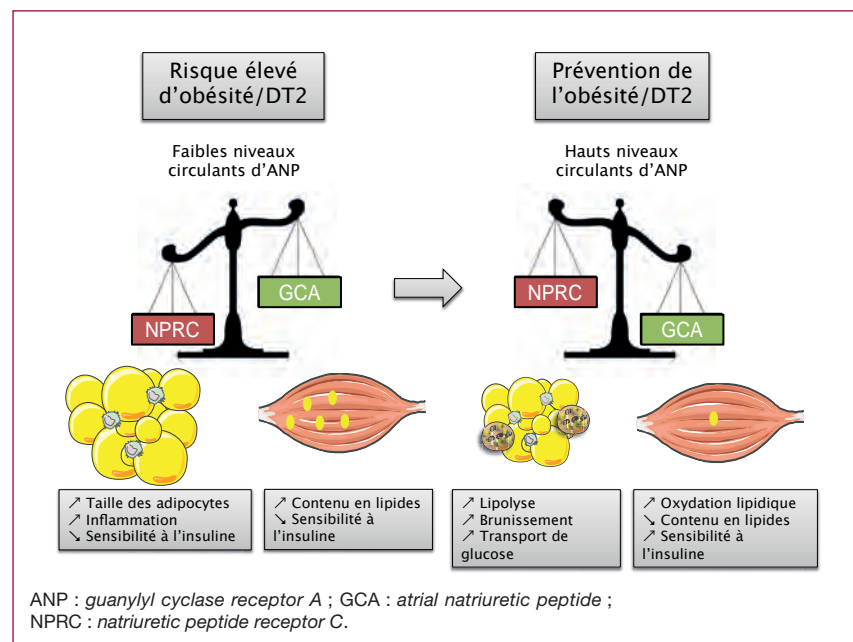


Figure 1. Modèle physiopathologique reliant un déficit des niveaux circulants d'ANP avec un sur-risque d'obésité et de diabète de type 2 (DT2). Nous avons également démontré qu'il existe un défaut de signalisation tissulaire de l'ANP reflété par une diminution de l'expression de son récepteur biologiquement actif GCA et une augmentation de l'expression de son récepteur de clairance NPRC. Restaurer les niveaux circulants d'ANP et/ou sa signalisation tissulaire, notamment dans les tissus adipeux et le muscle squelettique, pourrait améliorer l'insulino-sensibilité et diminuer le risque de développer un DT2.

enzyme limitante de la lipolyse, la lipase hormono-sensible, et d'une protéine de surface des gouttelettes lipidiques, la périlipine 1 [6]. L'effet lipolytique de l'ANP est altéré dans les adipocytes de sujets obèses [7]. Le laboratoire de Sheila Collins a également observé que les PN activaient le tissu adipeux brun et pouvaient induire un programme transcriptionnel thermogénique dans les adipocytes blancs. Ce processus est aujourd'hui appelé brunissement, c'est-à-dire la transformation d'adipocytes blancs en adipocytes beiges qui sont caractérisés par des gouttelettes lipidiques multiloculaires et un enrichissement important

en mitochondries, leur permettant alors de produire de la chaleur en partie *via* l'activation de la protéine découplante UCP1 (*Uncoupling protein 1*). La voie de signalisation implique l'activation d'une protéine clé du stress cellulaire qui est la p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) par la PKG-I, ce qui conduit à l'induction de PGC1 α (*PPAR γ Coactivator 1 α*), un coactivateur transcriptionnel du métabolisme oxydatif, et de ATF2 (*Activating transcription factor 2*), un facteur de transcription, tous deux capables de transactiver la transcription du gène UCP1 [8]. Le brunissement des adipocytes blancs traduit

Les points essentiels

- Une faible concentration plasmatique de peptides natriurétiques prédit le diabète de type 2.
- La signalisation des peptides natriurétiques dans le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique sont un déterminant de la sensibilité à l'insuline.
- Une perfusion chronique de peptides natriurétiques et/ou une inactivation du récepteur de clairance NPRC (*natriuretic peptide receptor C*) améliore la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose de souris obèses diabétiques.

également un état hypermétabolique avec une augmentation de l'utilisation des acides gras, mais aussi du glucose. Les PN stimulent également le transport de glucose *via* un axe Akt-mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [9]. L'effet stimulant de l'ANP sur le transport de glucose est diminué sur des adipocytes isolés issus de patients obèses non diabétiques, en lien avec une diminution de l'expression du récepteur GCA.

Effets sur le muscle squelettique

D'autres travaux indiquent que les PN jouent un rôle clé au niveau des muscles squelettiques en favorisant l'utilisation des lipides comme substrats énergétiques. Par exemple, chez des souris transgéniques surexprimant le BNP et la PKG-I, on observe une augmentation de la taille des mitochondries dans les muscles [10]. Il existe donc une voie de signalisation fonctionnelle aux PN dans le muscle squelettique humain. L'ANP active de façon GMPc-dépendante la transcription du coactivateur transcriptionnel PGC1 α qui, à son tour, stimule l'expression des complexes OXPHOS de la chaîne respiratoire mitochondriale [11].

Cibler les peptides natriurétiques dans la prévention du diabète de type 2

Les études de cohortes prospectives indiquent que des concentrations élevées de PN diminuent significativement le risque de développer un DT2. Nous avons étudié le lien de cause à effet de cette association dans des études précliniques chez des souris rendues obèses et diabétiques par un régime hyperlipidique, et génétiquement obèses diabétiques *via* une mutation du gène codant pour le récepteur de la leptine. Ces souris obèses diabétiques traitées par une perfusion chronique de BNP pendant 4 semaines, présentaient une amélioration de leur contrôle glycémique

et de la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle squelettique. Ceci s'accompagnait d'une réduction de la quantité de céramides, diacylglycérols et sphingomyélines, et d'une augmentation de la capacité oxydative lipidique musculaire [5]. Une autre stratégie thérapeutique possible pour augmenter les concentrations circulantes de PN et/ou la signalisation tissulaire dans les organes cibles serait de bloquer la liaison de ces peptides au récepteur de clairance NPRC. Pour étayer cette hypothèse, des travaux récents suggèrent que des souris déficientes en NPRC présentent une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose [12]. Cet effet semble impliquer une amélioration de la signalisation à l'insuline et du transport de glucose dans les tissus adipeux, en particulier le tissu adipeux brun.

Conclusion

En résumé, le DT2 est associé à une diminution des concentrations circulantes de PN ainsi qu'une altération de leurs voies de signalisation dans les principaux tissus insulino-sensibles que sont le muscle squelettique et les tissus adipeux. Ces hormones peptidiques activent la lipolyse et le brunissement du tissu adipeux, le transport de glucose dans les adipocytes thermogéniques, ainsi que la capacité oxydative musculaire (*figure 1*). Ces mécanismes concourent ensemble à préserver l'insulino-sensibilité et la tolérance au glucose. Une perte de fonction du système PN pourrait ainsi contribuer au développement du DT2 dans un contexte d'obésité. Les données précliniques indiquent que la restauration des concentrations circulantes et/ou la signalisation tissulaire des PN améliorent l'équilibre glycémique. Le récepteur de clairance des PN (NPRC) apparaît comme une cible intéressante dans le traitement et/ou la prévention du DT2. Il reste maintenant à établir les meilleures stratégies thérapeutiques pour cibler ce récepteur NPRC et évaluer le bénéfice/risque.

Remerciements

Les auteurs remercient la Société Francophone du Diabète (SFD) qui a soutenu une partie des travaux de recherches résumés ici.

Déclaration d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt en lien avec ce texte.

Références

- [1] Kuhn M. Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiol Rev* 2016; 96:751-804.
- [2] Magnusson M, Jujic A, Hedblad B, et al. Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmö Diet and Cancer study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:638-45.
- [3] Jujic A, Nilsson P, Engström G, et al. Atrial natriuretic peptide and type 2 diabetes development--biomarker and genotype association study. *PLoS One* 2014; 9:e89201.
- [4] Lazo M, Young JH, Brancati FL, et al. NH2-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes. *Diabetes* 2013; 62:3189-93.
- [5] Coué M, Badin PM, Vila IK, et al. Defective natriuretic peptide receptor signaling in skeletal muscle links obesity to type 2 diabetes. *Diabetes* 2015; 64:4033-45.
- [6] Moro C, Lafontan M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304:H358-68.
- [7] Rydén M, Bäckdahl J, Petrus P, et al. Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity. *Int J Obes (Lond)* 2016; 40:714-20.
- [8] Bordinchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 2012; 122:1022-36 [Erratum in: *J Clin Invest* 2012; 122:1584].
- [9] Coué M, Barquissau V, Morigny P, et al. Natriuretic peptides promote glucose uptake in a cGMP-dependent manner in human adipocytes. *Sci Rep* 2018; 8:1097.
- [10] Miyahista K, Itoh H, Tsujimoto H, et al. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes* 2009; 58:2880-92.
- [11] Engeli S, Birkenfeld AL, Badin PM, et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin Invest* 2012; 122:4675-9.
- [12] Wu W, Shi F, Liu D, et al. Enhancing natriuretic peptide signaling in adipose tissue, but not in muscle, protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Sci Signal* 2017; 10:eaam6870.

II- GDF15 est sécrété par le muscle squelettique pendant un exercice et induit la lipolyse chez l'Homme

Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans

Claire Laurens, Anisha Parmar, Enda Murphy, Deborah Carper, Benjamin Lair, Pauline Maes, Julie Vion, Nathalie Boulet, Coralie Fontaine, Marie Marquès, Dominique Larrouy, Isabelle Harant, Claire Thalamas, Emilie Montastier, Sylvie Caspar-Bauguil, Virginie Bourlier, Geneviève Tavernier, Jean-Louis Grolleau, Anne Bouloumié, Dominique Langin, Nathalie Viguerie, Fabrice Bertile, Stéphane Blanc, Isabelle de Glisezinski, Donal O’Gorman, and Cedric Moro

JCI insight, vol. 5,6 e131870, 26 Mar. 2020

doi:10.1172/jci.insight.131870

Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans

Claire Laurens, ... , Donal O’Gorman, Cedric Moro

JCI Insight. 2020;5(6):e131870. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131870>.

Research Article

Metabolism

We hypothesized that skeletal muscle contraction produces a cellular stress signal, triggering adipose tissue lipolysis to sustain fuel availability during exercise. The present study aimed at identifying exercise-regulated myokines, also known as exerkins, able to promote lipolysis. Human primary myotubes from lean healthy volunteers were submitted to electrical pulse stimulation (EPS) to mimic either acute intense or chronic moderate exercise. Conditioned media (CM) experiments with human adipocytes were performed. CM and human plasma samples were analyzed using unbiased proteomic screening and/or ELISA. Real-time qPCR was performed in cultured myotubes and muscle biopsy samples. CM from both acute intense and chronic moderate exercise increased basal lipolysis in human adipocytes. Growth and differentiation factor 15 (GDF15) gene expression and secretion increased rapidly upon skeletal muscle contraction. GDF15 protein was upregulated in CM from both acute and chronic exercise–stimulated myotubes. We further showed that physiological concentrations of recombinant GDF15 protein increased lipolysis in human adipose tissue, while blocking GDF15 with a neutralizing antibody abrogated EPS CM-mediated lipolysis. We herein provide the first evidence to our knowledge that GDF15 is a potentially novel exerkin produced by skeletal muscle contraction and able to target human adipose tissue to promote lipolysis.

Find the latest version:

<https://jci.me/131870/pdf>



Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans

Claire Laurens,^{1,2,3} Anisha Parmar,^{1,2} Enda Murphy,⁴ Deborah Carper,^{1,2} Benjamin Lair,^{1,2} Pauline Maes,³ Julie Vion,^{1,2} Nathalie Boulet,^{1,2} Coralie Fontaine,^{1,2} Marie Marquès,^{1,2} Dominique Larrouy,^{1,2} Isabelle Harant,^{1,2} Claire Thalamas,^{1,5,6} Emilie Montastier,^{1,2,6} Sylvie Caspar-Bauguil,^{1,2,6} Virginie Bourlier,^{1,2} Geneviève Tavernier,^{1,2} Jean-Louis Grolleau,⁶ Anne Bouloumié,^{1,2} Dominique Langin,^{1,2,6} Nathalie Viguerie,^{1,2} Fabrice Bertile,³ Stéphane Blanc,³ Isabelle de Glisezinski,^{1,2,6} Donal O’Gorman,⁴ and Cedric Moro¹

¹Inserm, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France. ²Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, University of Toulouse, Paul Sabatier University, UMR1048, Toulouse, France. ³CNRS UMR7178, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg University, Strasbourg, France. ⁴School of Health and Human Performance, Dublin City University, Dublin, Ireland. ⁵Inserm, Clinical Investigation Center CIC 1436, Toulouse, France. ⁶Departments of Biochemistry and Nutrition, Physiology, Plastic Surgery and Clinical Investigation Center CIC 1436, Toulouse University Hospitals, Toulouse, France.

We hypothesized that skeletal muscle contraction produces a cellular stress signal, triggering adipose tissue lipolysis to sustain fuel availability during exercise. The present study aimed at identifying exercise-regulated myokines, also known as exerkins, able to promote lipolysis. Human primary myotubes from lean healthy volunteers were submitted to electrical pulse stimulation (EPS) to mimic either acute intense or chronic moderate exercise. Conditioned media (CM) experiments with human adipocytes were performed. CM and human plasma samples were analyzed using unbiased proteomic screening and/or ELISA. Real-time qPCR was performed in cultured myotubes and muscle biopsy samples. CM from both acute intense and chronic moderate exercise increased basal lipolysis in human adipocytes. Growth and differentiation factor 15 (GDF15) gene expression and secretion increased rapidly upon skeletal muscle contraction. GDF15 protein was upregulated in CM from both acute and chronic exercise-stimulated myotubes. We further showed that physiological concentrations of recombinant GDF15 protein increased lipolysis in human adipose tissue, while blocking GDF15 with a neutralizing antibody abrogated EPS CM-mediated lipolysis. We herein provide the first evidence to our knowledge that GDF15 is a potentially novel exerkin produced by skeletal muscle contraction and able to target human adipose tissue to promote lipolysis.

Introduction

Exercise improves metabolic health and prevents the complications of obesity and type 2 diabetes (1, 2). This is partly due to the release of secreted factors by skeletal muscle, i.e., myokines, which can virtually target all organs remotely (3). Over the last decade, hundreds of proteins secreted by skeletal muscle have been identified, as reviewed in detail elsewhere (4–7). However, very few myokines have been shown to target white adipose tissue, particularly in humans. In a previous clinical study, we observed a remarkably enhanced in situ and systemic lipolytic response in lean healthy endurance-trained subjects performing a high-intensity exercise the day after an exhaustive glycogen-depleting exercise compared with participants that rested (8). This greater lipolytic response could not be explained by significant changes in classically known lipolytic stimuli, such as increased catecholamines, atrial natriuretic peptide, growth hormone, cortisol, and IL-6 or a decrease in circulating insulin during exercise. We therefore hypothesized that skeletal muscle contraction in the context of acute high-intensity exercise and chronic moderate exercise may produce a cellular stress signal capable of increasing adipose tissue lipolysis to sustain fuel availability and delay muscle glycogen depletion.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Copyright: © 2020, American Society for Clinical Investigation.

Submitted: July 17, 2019

Accepted: February 20, 2020

Published: March 26, 2020.

Reference information: *JCI Insight*. 2020;5(6):e131870.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.131870>.

Recently, growth and differentiation factor 15 (GDF15) emerged as a biomarker of cellular stress that can be produced by a number of organs, such as lung, kidney, and liver (9–11). GDF15, also known as macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a stress-induced cytokine and an ancient member of the TGF- β superfamily. High levels of circulating GDF15 have been found in various diseases, such as cancer, heart failure, and mitochondrial diseases (12, 13). Very recent studies demonstrate a major role of GDF15 in appetite suppression through noncanonical brain neuronal networks in the brainstem, such as the area postrema and the nucleus tractus solitaries (14–17). Injection of recombinant GDF15 protein in mice fed a high-fat diet (HFD) induces robust weight loss (16). Similarly GDF15-overexpressing mice are resistant to HFD-induced obesity and metabolic disturbances (18). These effects appear largely mediated by food intake suppression through the GDF15 cognate receptor GFRAL (GDNF receptor α -like), which heterodimerizes with a coreceptor called RET (15, 17). RET encodes a tyrosine kinase receptor for members of the glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) family (15). In mice, GFRAL expression appears strictly confined to the area postrema and the nucleus of the tractus solitarius. It is suggested that GDF15 behaves as a metabolic stress signal in response to nutritional stress to trigger conditioned taste aversion (11).

We herein describe GDF15 as a potentially novel exercine for peripheral crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue. We show that conditioned media (CM) from exercised human myotubes activate lipolysis in human adipocytes *in vitro*. Through proteomic screening of the CM, we next identified GDF15 as an exercise-regulated myokine that is rapidly released upon muscle contraction. Neutralization of GDF15 in CM abolishes lipolysis, while treatment of adipose tissue explants with recombinant GDF15 promotes lipolysis. Collectively, we herein provide what we believe to be the first evidence that GDF15 is produced by skeletal muscle upon contraction and that it is able to promote lipolysis in human adipose tissue.

Results

CM from exercised myotubes trigger lipolysis in adipocytes. The physiological and metabolic adaptations of skeletal muscle to exercise are well known (1). Using electrical pulse stimulation (EPS) of human myotubes to induce forced contraction, we modeled two exercise paradigms: an acute high-intensity exercise model (EPS3h) and a chronic moderate exercise training model (EPS24h). EPS activates canonical exercise signaling pathways, such as p38 MAPK and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) for up to 48 hours (Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131870DS1>). As expected, EPS3h, which mimics an acute high-intensity exercise, induced a pronounced glycogen depletion (Figure 1A) and concomitant increase in lactate production (~4-fold, $P < 0.01$) (Figure 1B). Consistent with this type of exercise, no major change in glucose oxidation rate was observed (Figure 1C), while the lipid oxidation rate was reduced by 35% (Figure 1D). EPS3h also induced gene expression of classically known myokines, such as IL-6, IL-15, and FGF21 (Supplemental Figure 1B).

We further found that EPS24h, which mimics chronic moderate exercise training, did not significantly reduce glycogen content (Figure 1E) while increasing basal glycogen storage capacity (~1.5-fold, $P < 0.05$) (Figure 1F), glucose oxidation rate (~2-fold, $P < 0.05$) (Figure 1G), and lipid oxidation rate (~3-fold, $P < 0.05$) (Figure 1H). EPS24h also increased lactate production (2.2-fold, $P < 0.01$), but to a lesser degree than EPS3h (Supplemental Figure 2A). EPS24h increased the IL-6 mRNA level (~3-fold, $P < 0.01$), slightly induced myostatin, and decreased fibronectin type III domain-containing 5 (FNDC5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA levels (Supplemental Figure 1C). To test our hypothesis that skeletal muscle contraction produces a cellular stress signal that triggers lipolysis to sustain fuel availability during exercise, we next incubated human multipotent adipose-derived stem (hMADS) adipocytes with CM of EPS-stimulated myotubes (Figure 1I). Interestingly, CM from EPS3h-stimulated myotubes induced a modest increase of basal lipolysis, as reflected by glycerol production (~1.3-fold, $P < 0.001$) in the absence of any lipolytic stimuli (Figure 1J). Similarly, CM from EPS24h-stimulated myotubes induced a more robust basal lipolysis (~3-fold, $P < 0.001$) (Figure 1K). Similarly, CM from EPS24h induced a significant increase of NEFA release (1.7-fold, $P < 0.05$) (Supplemental Figure 2B).

In summary, exercise-mediated skeletal muscle contraction produces secreted factors able to activate lipolysis in adipocytes *in vitro*.

GDF15 is a potentially novel exercine rapidly induced by skeletal muscle contraction. To identify potential secreted proteins produced by skeletal muscle contraction, we performed a proteomic screen of CM from EPS-stimulated and nonstimulated myotubes (Figure 2, A and D). We quantified 1311 classically

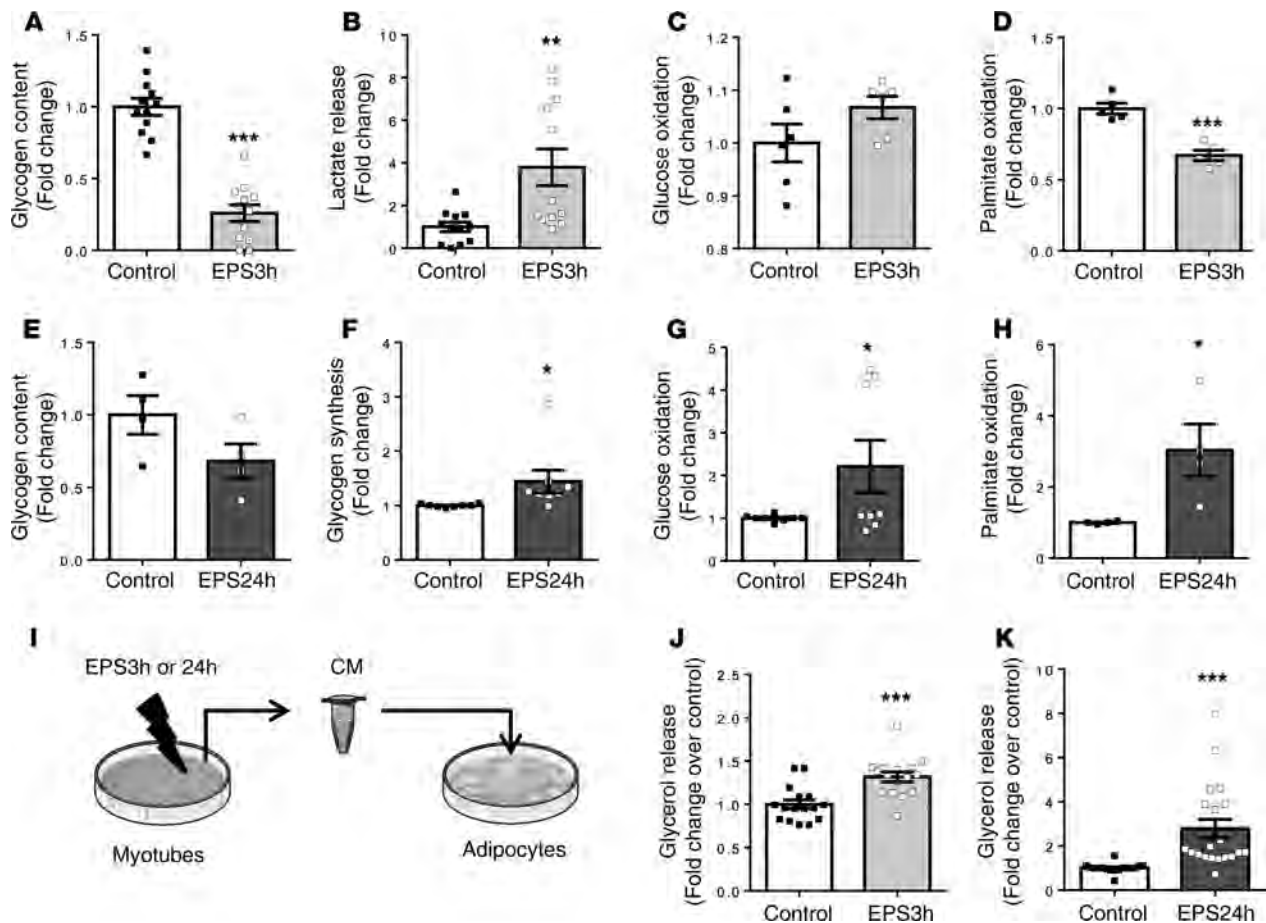


Figure 1. Acute intense and chronic moderate exercise model validation in human myotubes. (A–D) Acute intense exercise model, EPS3h: (A) total glycogen content, (B) lactate secretion, (C) glucose oxidation rate, and (D) palmitate oxidation rate in human myotubes cultured for 5 days submitted to 3 hours of EPS to mimic an acute high-intensity exercise in vitro. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control by 2-tailed unpaired Student's t test. (E–H) Chronic moderate exercise model, EPS24h: (E) total glycogen content, (F) basal glycogen synthesis rate, (G) glucose oxidation rate, and (H) palmitate oxidation rate in human myotubes cultured for 5 days submitted to 24-hour EPS to mimic moderate chronic exercise training in vitro. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$). * $P < 0.05$ compared with control by 2-tailed unpaired Student's t test. (I–K) Conditioned media experiments between human myotubes and human adipocytes: (I) experimental design, (J) conditioned media of EPS3h-stimulated myotubes, and (K) conditioned media of EPS24h-stimulated myotubes were applied on differentiated hMADS adipocytes for 24 hours to measure glycerol output, a surrogate of lipolysis. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 16$ –20). *** $P < 0.01$ compared with control by 2-tailed unpaired Student's t test.

and nonclassically secreted proteins. Among the significantly upregulated proteins, GDF15 caught our attention (Figure 2A), as recent studies described GDF15 as a novel metabolic hormone (14–17). GDF15 protein levels were increased by about 2.5-fold in EPS3h CM (Figure 2B). We confirmed this finding by ELISA: GDF15 increased from 21.7 ± 2.1 pg/ml to 29.6 ± 3.4 pg/ml in EPS3h CM ($P < 0.01$) (Figure 2C). Importantly, we also identified GDF15 as a significantly upregulated protein in EPS24h CM (3-fold, $P < 0.05$) (Figure 2, D–F). The concentration of GDF15 in EPS24h CM ranged from 19.4 to 110.9 pg/ml and was nearly 2-fold higher (41.2 ± 4.0 vs. 21.7 ± 2.1 pg/ml) than that in EPS3h CM. The time course of EPS in human primary myotubes showed that GDF15 was significantly upregulated within 1 hour (Figure 2G). Overall, we here identify GDF15 as a potentially novel exercise-regulated myokine.

GDF15 gene expression is responsive to skeletal muscle contraction and exercise mimetics. Since GDF15 is a stress-responsive hormone, we tested whether acute EPS can modulate GDF15 mRNA levels. We observed a rapid upregulation of GDF15 mRNA levels within 30 minutes of exposure to EPS (Figure 3A). A second peak of mRNA levels was observed at 3 hours of EPS. In agreement with protein secretion data, we observed a significant upregulation of GDF15 mRNA levels for EPS3h-stimulated myotubes (1.7-fold, $P < 0.01$) (Figure 3B). We similarly observed an upregulation of GDF15 mRNA levels in EPS24h-stimulated myotubes (Figure 3C). Since exercise activates a complex integrative response, including neuroendocrine

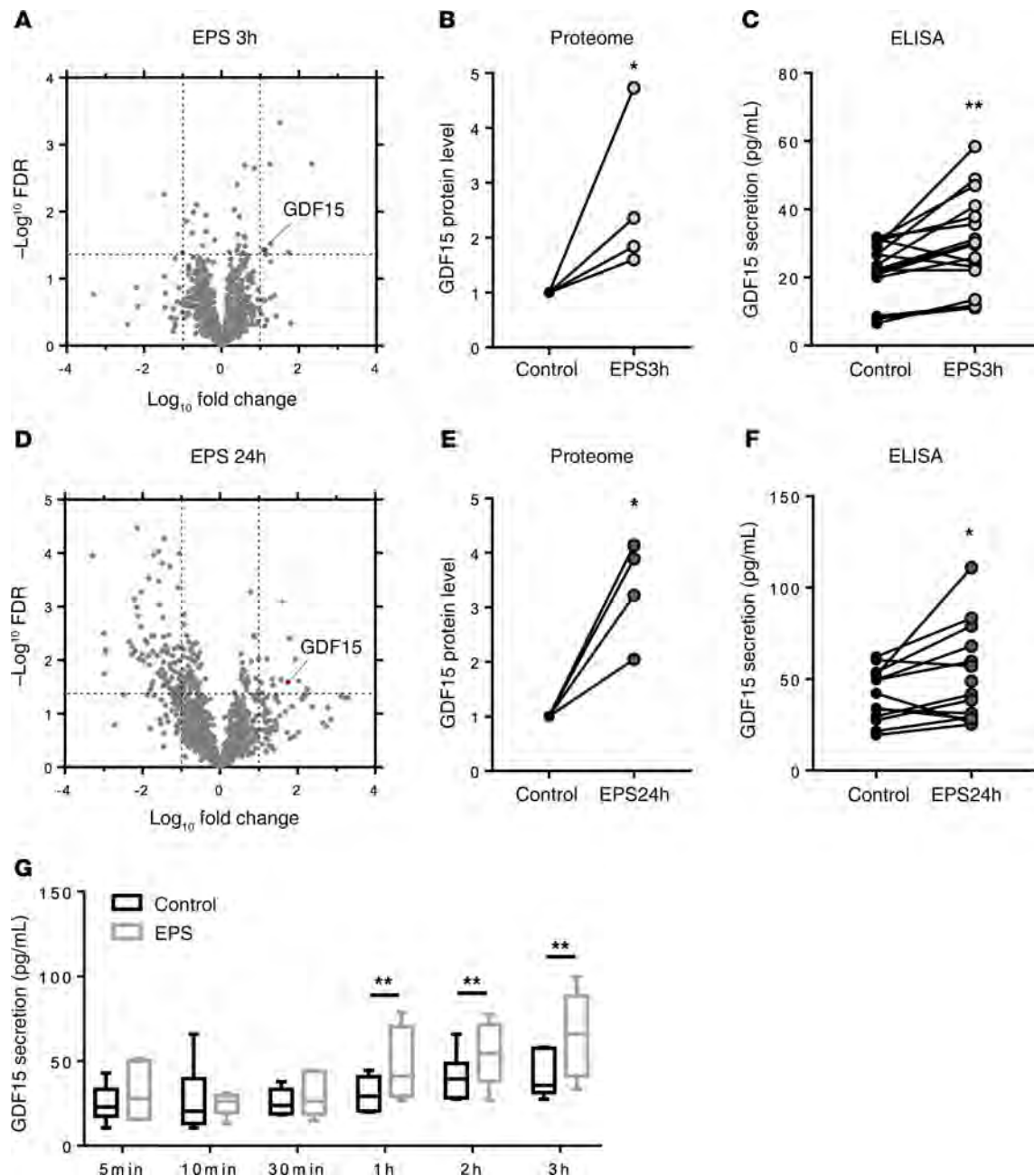


Figure 2. Identification of GDF15 as an exercise-regulated myokine. (A–C) Proteomic screen of conditioned media from EPS3h-stimulated myotubes: (A) Volcano plot of the unbiased proteomic screen reveals GDF15 as a significantly upregulated protein in conditioned media, (B) quantification of GDF15 protein in media from the protein screen, and (C) quantification of GDF15 protein secretion by ELISA in human myotubes cultured for 5 days submitted to 3 hours of EPS to mimic an acute intense exercise in vitro. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 16$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control by 2-tailed paired Student's t test. (D–F) Proteomic screen of conditioned media from EPS24h-stimulated myotubes: (D) Volcano plot of the unbiased proteomic screen reveals GDF15 as a significantly upregulated protein in conditioned media, (E) quantification of GDF15 protein in media from the protein screen, and (F) quantification of GDF15 protein secretion by ELISA in human myotubes cultured for 5 days submitted to 24-hour EPS to mimic a moderate chronic exercise training in vitro. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 16$). * $P < 0.05$ compared with control by 2-tailed paired Student's t test. (G) Time course of GDF15 protein secretion in acutely EPS-stimulated myotubes. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). ** $P < 0.01$ compared with control by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test.

changes beyond muscle contraction, we assessed the influence of exercise mimetics on GDF15 mRNA levels. Forskolin, which increases intracellular levels of the second messenger cAMP, did not change GDF15 gene expression (Figure 3D), while, interestingly, both ionomycin, which facilitates calcium release (Figure 3E), and the peroxisome proliferator-activated receptor β agonist GW0742 (Figure 3F) increased GDF15 mRNA levels (1.5-2-fold, $P < 0.01$). We next investigated GDF15 mRNA levels in muscle biopsy samples

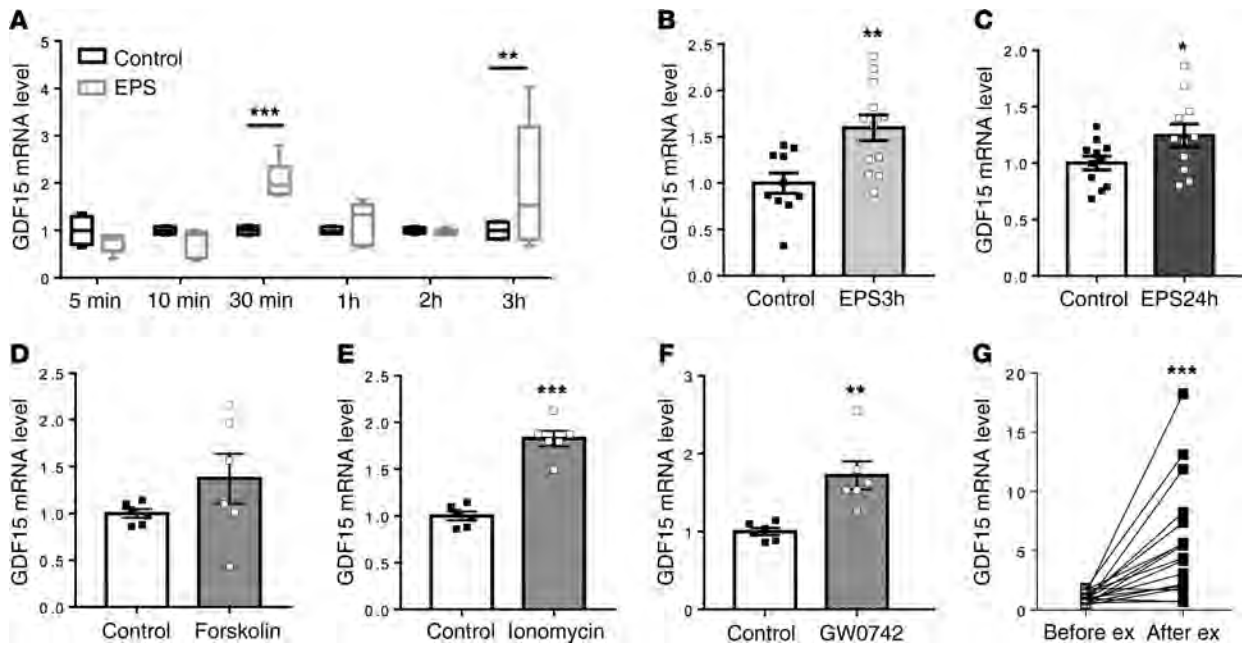


Figure 3. GDF15 gene expression changes in contracting skeletal muscle. (A) Time course of GDF15 mRNA level in acutely EPS-stimulated myotubes. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ compared with control by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test. (B) GDF15 mRNA level in EPS3h-stimulated myotubes and (C) in EPS24h-stimulated myotubes. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 12$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ compared with control by 2-tailed unpaired Student's t test. (D–F) GDF15 mRNA level changes in response to exercise mimetics: human myotubes cultured for 5 days were treated for 3 hours with (D) 10 μ M forskolin, (E) 4 μ M ionomycin, (F) and the PPAR δ agonist GW0742 (100 nM). Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ compared with control by 2-tailed unpaired Student's t test. (G) GDF15 mRNA level changes in the muscle *vastus lateralis* biopsy samples taken before and immediately after a 1-hour acute exercise bout in lean healthy volunteers (human study 1). Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 18$). $***P < 0.001$ compared with control by 2-tailed paired Student's t test.

from lean healthy individuals in response to 1 hour of acute exercise at 55% peak power output on a bicycle ergometer (human study 1). We found that GDF15 mRNA levels increased up to 18-fold in skeletal muscle in response to exercise (Figure 3G).

GDF15 plasma levels in response to exercise, obesity, and lifestyle. Since our in vitro work revealed GDF15 as a exerkine, we measured GDF15 in plasma of lean healthy individuals randomly assigned in a crossover design to either 1 hour of endurance exercise performed at 60% of VO_2 peak or sprint interval exercise consisting of 7 repetitions of 30 seconds at 130% of maximal aerobic power (human study 2) (Figure 4, A–C). In line with a recent report (19), we observed that both types of exercise, endurance (Figure 4A) and sprint interval (Figure 4B), augmented plasma GDF15 circulating levels. Interestingly, the exercise response (exercise minus rest) tended to be lower ($P = 0.07$) for the sprint interval exercise, which produced overall a lower energy expenditure and energetic stress, despite a greater power output during very short periods of time (30 s) (Figure 4C).

We further show that acute endurance exercise (45 min at 50% $\text{VO}_{2\text{max}}$) raised plasma GDF15 levels in both middle-aged and elderly obese subjects (human study 3) (Figure 4, D and E). Plasma GDF15 levels were measured at rest and immediately after exercise at baseline and in response to an 8-week lifestyle intervention program combining moderate calorie restriction and aerobic and resistance exercise. Obese subjects lost in average 5.1 ± 0.5 kg after lifestyle intervention (data not shown). An exercise-induced increase of plasma GDF15 was observed in both groups at baseline and after lifestyle intervention (Figure 4, D and E). When combining all subjects, we observed a slight but significant increase of plasma GDF15 levels in response to lifestyle intervention–induced weight loss (Figure 4F). This increase of plasma GDF15 tended to be positively correlated with lifestyle intervention–induced weight loss in elderly obese subjects ($r = 0.66$; $P = 0.07$). Lean healthy and middle-aged obese subjects had plasma GDF15 levels within the same range (Figure 4G), while BMI-matched elderly obese subjects had higher circulating levels of GDF15 compared with middle-aged obese individuals (Figure 4H). Consistent with this finding, we observed a significant positive correlation between resting plasma GDF15 levels and age in human study 3 ($r = 0.512$, $P = 0.043$). Interestingly, no sex difference in resting plasma GDF15 levels was found in human study 4 (men, 475 ± 56 pg/ml vs. women, 472 ± 46 pg/ml).

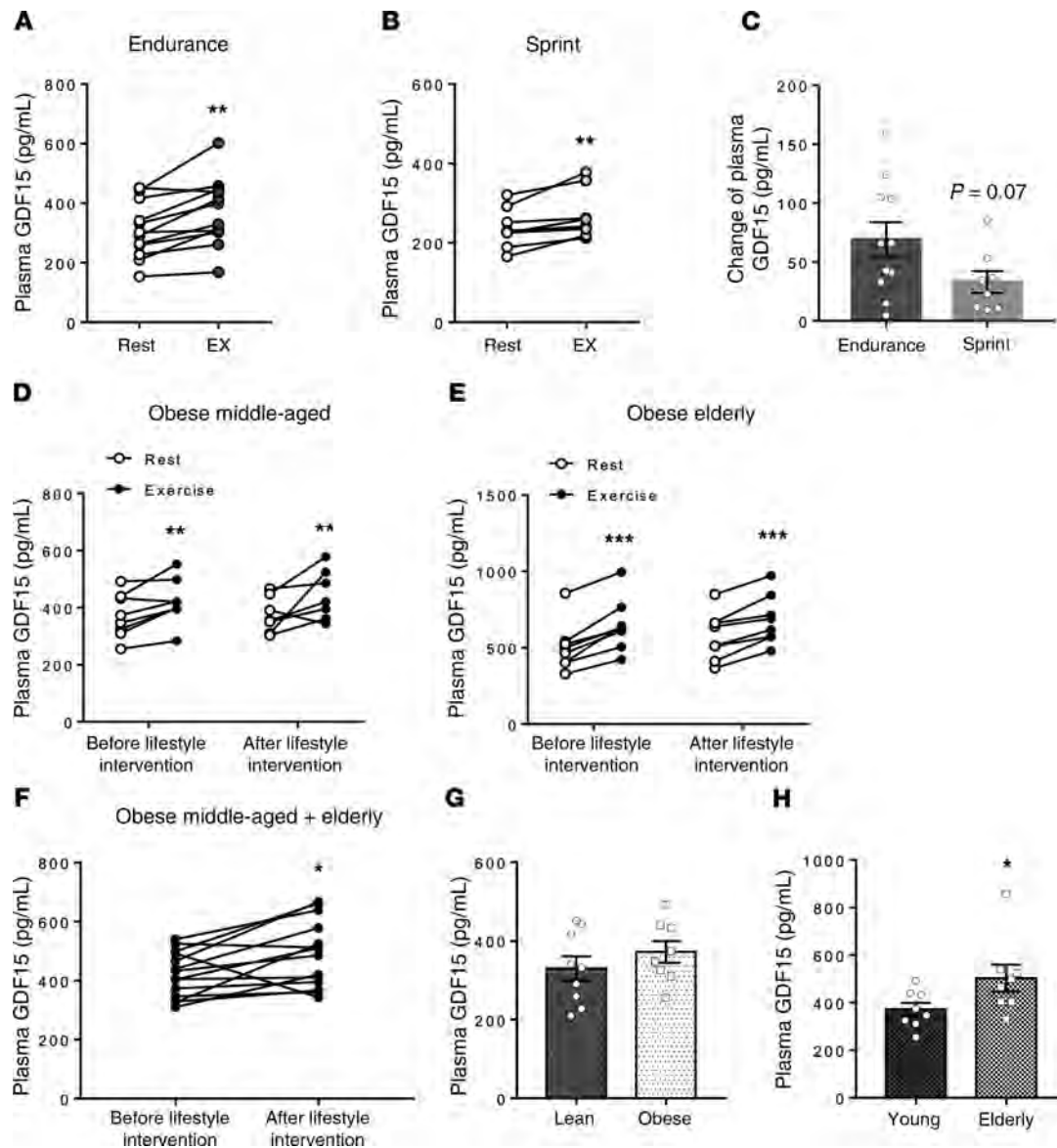


Figure 4. Changes in plasma GDF15 levels with exercise, obesity and lifestyle intervention. (A–C) Human study 2: plasma GDF15 changes in lean healthy volunteers in response to (A) endurance exercise for 1 hour at 60% $\text{VO}_{2\text{max}}$, (B) sprint interval exercise of 7 repetitions at 130% of maximal workload, and (C) delta change from rest to exercise during endurance versus sprint interval exercise. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ –15). ** $P < 0.01$ compared with control by 2-tailed paired Student's t test. (D–F) Human study 3: plasma GDF15 changes in obese middle-aged (D) and elderly (E) subjects at baseline and in response to a 8-week lifestyle intervention-induced weight loss program. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control by 2-tailed paired Student's t test. (F) Plasma GDF15 changes in response to lifestyle intervention-induced weight loss in obese individuals (all subjects). Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 16$). * $P < 0.05$ compared with control by 2-tailed paired Student's t test. (G) Plasma GDF15 levels in lean healthy (study 2) versus middle-aged obese individuals (study 3). (H) Plasma GDF15 levels in middle-aged obese versus elderly obese individuals (study 3). * $P < 0.05$ compared with Young by 2-tailed unpaired Student's t test.

Collectively, we here show that plasma GDF15 responds to various modalities of exercise in lean and obese individuals and increases with age.

GDF15 targets human adipose tissue to promote lipolysis. We noted a positive correlation between plasma glycerol and GDF15 level in all obese subjects investigated at rest and during exercise (human study 3) (Supplemental Figure 3A). We further observed a nearly significant positive relationship ($r = 0.35$, $P = 0.067$) between changes in plasma GDF15 levels and changes in BMI in obese individuals in response to very low calorie diet-induced weight loss (human study 4) (Supplemental Figure 3B). We therefore hypothesized that GDF15 was able to target white adipose tissue to induce lipolysis and weight loss. We first examined mRNA levels of GDF15 receptors GFRAL and RET in human abdominal adipose

Table 1. Relationship between biological and anthropometric variables and subcutaneous abdominal adipose tissue GFRAL and RET mRNA levels

Biological variable	Gene symbol	r	P value	n
Triglycerides	<i>GFRAL</i>	0.126	0.022	329
	<i>RET</i>	0.178	0.001	326
Total cholesterol	<i>GFRAL</i>	0.056	0.308	332
	<i>RET</i>	0.114	0.034	329
Glucose	<i>GFRAL</i>	0.112	0.046	316
	<i>RET</i>	0.085	0.135	313
HOMA-IR	<i>GFRAL</i>	0.137	0.017	306
	<i>RET</i>	0.157	0.006	303
Matsuda index	<i>GFRAL</i>	-0.127	0.027	305
	<i>RET</i>	-0.166	0.004	302
BMI	<i>GFRAL</i>	0.028	0.693	330
	<i>RET</i>	-0.121	0.029	327
Waist circumference	<i>GFRAL</i>	0.106	0.053	329
	<i>RET</i>	0.041	0.460	326

These data were obtained from human study 4. HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; r, Pearson correlation coefficients. The Matsuda index was calculated as 10,000/square root of [(fasting glucose × fasting insulin) × (mean glucose × mean insulin during OGTT)].

tissue biopsy samples (human study 4). We found substantial expression of the GDF15 cognate receptor GFRAL in the whole adipose tissue fraction as well as in isolated adipocytes (Supplemental Figure 4A). Interestingly, GFRAL expression was virtually null in whole human muscle tissue. The coreceptor RET followed a similar pattern of expression as GFRAL in adipose tissue, except for whole skeletal muscle tissue, where its expression was comparable to whole adipose tissue (Supplemental Figure 4B). As both GFRAL and RET were expressed to comparable levels in adipocytes and adipose stroma vascular cells, we further examined expression of both GDF15 receptors in sorted stromal cells. We observed that both GFRAL (Supplemental Figure 4C) and RET (Supplemental Figure 4D) were predominantly expressed in preadipocytes, again confirming a metabolic role of GDF15 in adipocytes. Neither GFRAL (Supplemental Figure 4E) nor RET (Supplemental Figure 4F) adipose gene expression was influenced by obesity grade. However, they were both associated with a number of biological and clinical variables, such as plasma triglycerides, HOMA-IR, and Matsuda index, while adipose RET mRNA levels were inversely related to BMI (Table 1).

We then investigated the effect of recombinant human GDF15 (rhGDF15) protein on lipolysis in human abdominal adipose tissue explants. rhGDF15 significantly modestly increased lipolysis at the physiological concentration of 1 ng/ml (~10%, $P < 0.05$), reflected by both glycerol (Figure 5A) and NEFA release (Figure 5B). This lipolytic response was weak compared with those observed for forskolin and the nonselective β -adrenergic agonist isoprenaline, which increased lipolysis to about 2- to 3-fold. A higher supraphysiological concentration of rhGDF15 at 100 ng/ml did not further raised basal lipolysis (~11%, $P < 0.05$) in adipose explants from 6 independent donors (Figure 5, C and D). Even more remarkable, we demonstrate that blocking GDF15 with a neutralizing IgG antibody of hGDF15 completely abrogates the lipolytic response of EPS24h CM (Figure 5E), thus indicating that GDF15 likely triggers most, if not all, the EPS24h CM lipolytic effect in hMADS adipocytes. To validate this finding, we verified that incubating a nonspecific IgG antibody in control wells did not affect basal lipolysis (data not shown). We finally wondered whether this lipolytic effect of GDF15 was a human specificity. We measured gene expression of both GFRAL and GDF15 in whole brain, perigonadic

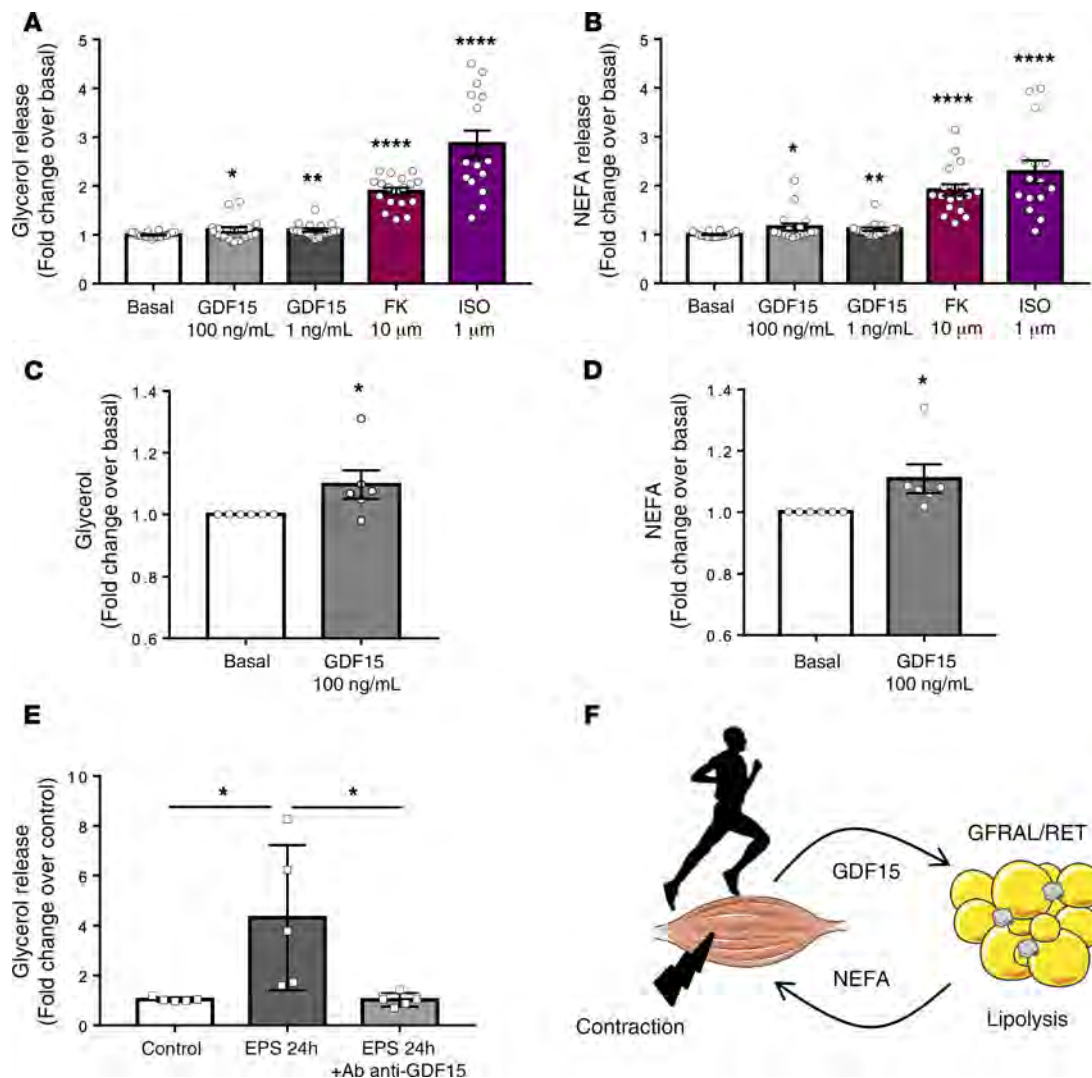


Figure 5. GDF15 promotes lipolysis in human adipose tissue. (A and B) Lipolytic response measured by glycerol release (A) and nonesterified fatty acid release (B) in human abdominal subcutaneous adipose tissue explants in basal condition and in response to 1 and 100 ng/ml recombinant human GDF15, 10 μM forskolin (FK), and 1 μM isoprenaline (ISO). Data are expressed as mean ± SEM ($n = 18$, 3 replicates of 6 independent donors). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared by unpaired Student's t test. (C and D) Lipolytic response measured by glycerol release (C) and nonesterified fatty acid release (D) in human abdominal subcutaneous adipose tissue explants in basal condition and in response to 100 ng/ml recombinant human GDF15. Data are expressed as mean ± SEM ($n = 6$ independent donors). * $P < 0.05$ compared by unpaired Student's t test. (E) Conditioned media of EPS24h-stimulated myotubes were applied on differentiated hMADS adipocytes for 24 hours to measure glycerol output, a surrogate of lipolysis, in absence or presence of a GDF15-neutralizing antibody. Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$). * $P < 0.05$ compared with control by 1-way ANOVA. (F) Integrative model of the skeletal muscle-adipose tissue crosstalk orchestrated by GDF15. Upon muscle contraction, GDF15 is released, reaching its target receptors GFRAL/RET on adipose tissue to activate lipolysis, which releases nonesterified fatty acid, which further serves as fuel to supply muscle contraction.

white adipose tissue, and skeletal muscle of adult female mice. Although GDF15 was expressed in all 3 organs (Supplemental Figure 5A), GFRAL was only detectable in brain (Supplemental Figure 5B), thus confirming recent findings (16).

Altogether, our data provide the first evidence to our knowledge that GDF15 can target human adipose tissue to trigger lipolysis.

Discussion

Investigators have been searching for a link between muscle contraction and metabolic changes in other organs, such as the liver and the adipose tissue, for a few decades. The targets of an “exercise factor” have been humoral proteins released from skeletal muscle during contraction that mediate the adaptations of chronic exercise training (4, 20). This has suggested a novel paradigm in which skeletal muscle is an endocrine organ

producing and releasing hormones, i.e., myokines, which exert endocrine effects on remote organs (4, 21). We here provide compelling evidence that GDF15 behaves as a exerkine involved in a crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue (Figure 5F). We show that the cellular stress mediated by skeletal muscle contraction can be translated into a systemic response through GDF15-mediated lipolysis in white adipocytes.

As we hypothesized that skeletal muscle contraction can release a cellular stress signal able to induce lipolysis, we developed an experimental model of exercise in cultured human myotubes. Human primary culture of skeletal muscle cells has been widely used by several investigators (22–26) and provides a powerful tool for mechanistic studies of skeletal muscle and study muscle autonomous adaptations in the absence of the systemic milieu (27). EPS of human myotubes can be used to induce forced contraction and mimic exercise *in vitro* (28). Although some studies have used EPS to assess individual variability in biological response to exercise *in vitro* (29, 30) and to identify a potentially novel secreted factors by skeletal muscle contraction (31–33), very few have investigated how closely EPS recapitulates the metabolic consequences of exercise. Here, we developed two exercise models: one acute high-intensity exercise model that recapitulates the expected physiological responses with strong glycogen depletion and high lactate production (34) and one chronic moderate exercise model that more closely mimics the biological adaptations of endurance exercise training with increased basal glycogen storage along with an upregulation of substrate oxidation rates (35).

To identify potential muscle contraction–derived lipolytic factors, we analyzed CM from our two exercise models with human adipocytes. Remarkably, CM from both exercise models increased basal lipolysis. This effect was quite modest for the acute intense exercise model but more pronounced for the chronic moderate exercise model. Thus, a muscle contraction–derived factor contained in CM has the potential to promote lipolysis. Among the currently known myokines, only IL-6 has been previously suggested to induce lipolysis in humans (36). After this, the same authors proposed that muscle-derived IL-6 does not promote fat mobilization from subcutaneous adipose tissue, at least at moderate exercise intensity (37), but rather selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle (38). This observation was corroborated by *in vitro* work in adipose tissue explants showing that IL-6 inhibits lipoprotein lipase activity (39). Altogether, most evidence so far indicates that IL-6 does not acutely stimulate lipolysis in human adipose tissue. In order to unravel novel putative lipolytic myokines, we performed a proteomic screen of EPS CM and identified GDF15 as a significantly upregulated protein in our two *in vitro* exercise models. GDF15 mRNA levels rise within 30 minutes in response to muscle contraction, followed by an elevated secretion by 1 hour. GDF15 gene expression was also induced by pharmacological exercise mimetics, such as ionomycin and the PPAR β agonist GW0742, but remained insensitive to activation of cAMP-signaling by forskolin. This indicates that other molecular pathways related to exercise are involved in GDF15 regulation beyond muscle contraction. As GDF15 is a stress-responsive factor, components of the integrated stress response pathway, including the protein kinase R–like (PKR-like) endoplasmic reticulum kinase (PERK), the eukaryotic translation initiation factor 2- α (EIF2 α), the activating transcription factor 4 (ATF4), and the CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) may be involved (11). A few studies have already suggested that this integrated stress response pathway is activated by exercise (40, 41). Thus, several molecular pathways may be involved in the regulation of GDF15 expression/secretion in skeletal muscle.

We consolidated our *in vitro* findings showing that GDF15 mRNA levels rise from 2- to 20-fold in skeletal muscle of lean healthy subjects in response to acute aerobic exercise. This local rise of GDF15 in skeletal muscle was paralleled by an increase of circulating GDF15 levels during endurance and sprint interval exercise in lean healthy volunteers. Although circulating GDF15 can originate from other tissue sources, it is tempting to speculate, based on our data, that contracting skeletal muscle contributes to increase circulating GDF15 levels during exercise. This is in contrast with a recent study suggesting that the rise of circulating GDF15 during exhaustive exercise appears independent of skeletal muscle (19). Alternatively, muscle-derived GDF15 could play a paracrine role within skeletal muscle to target intramuscular adipose tissue. Obesity did not alter exercise-induced circulating GDF15, but, interestingly, lifestyle intervention–induced weight loss in middle-aged and elderly obese individuals significantly increased baseline circulating GDF15 levels. The rise of plasma GDF15 levels was positively related to weight loss in response to the lifestyle program in elderly obese people, again highlighting a link between GDF15 and adipose tissue loss. Emmerson et al. observed that human subcutaneous adipose tissue is a significant site of expression of the GDF15 receptor GFRAL (16). We therefore went on to hypothesize that GDF15 could target adipose tissue to promote lipolysis.

GDF15 is a cellular stress–responsive hormone that has recently gained much interest as antiobesity therapy (42, 43). Recent studies indicate that GDF15 binds to a heterodimeric receptor complex composed

of GFRAL and RET, with expression restricted to the brainstem in mice (14–17). We here provide evidence that GFRAL and RET are substantially expressed in human adipocytes. A comparable expression is also found in the stroma vascular fraction of adipose tissue, and further cell-type specific analyses revealed that both GFRAL and RET are predominantly expressed in preadipocytes compared with macrophages and lymphocytes. In contrast, GFRAL expression in skeletal muscle tissue is virtually null, thus excluding a potential autocrine role of GDF15. Our data are consistent with the Genotype-Tissue Expression public database, indicating that GFRAL is predominantly expressed in human subcutaneous adipose tissue. Of interest, GFRAL and RET gene expression in subcutaneous abdominal adipose tissue is not influenced by adiposity and obesity grade. Adipose GFRAL and RET gene expression correlated positively with plasma triglycerides, HOMA-IR, and the Matsuda index. This is consistent with the recent observation that GDF15 behaves as a nutritional stress signal induced by long-term high-fat feeding and metabolic disturbances in mice (9–11). In line with an effect of GDF15 on adipose tissue, adipose RET gene expression was inversely related to BMI. Consistently, we here show that a physiological concentration of rhGDF15 induces lipolysis in a comparable range as forskolin in human subcutaneous abdominal adipose tissue explants. In our clinical studies and other studies, circulating GDF15 typically ranged between 0.3 and 1 ng/ml (43, 44). Higher supraphysiological concentrations of up to 100 ng/ml, as observed in cancer cachexia (44), did not further increase lipolysis. Most importantly, neutralization of GDF15 in EPS24h CM with a monoclonal antibody completely abrogated lipolysis, implying that GDF15 triggers most if not all the lipolytic response in CM from EPS-stimulated human myotubes. The higher lipolytic response observed in EPS24h CM could be explained by the nearly 2-fold greater concentration of GDF15 accumulated in the medium over 24 hours. Adipocyte lipolysis is a major physiological process of fuel supply in conditions of increased energy needs, such as exercise (45, 46). Our work identifies GDF15 as a potentially novel crosstalk homeostatic hormone between contracting skeletal muscles and adipose tissue in humans.

In summary, GDF15 is an exercise factor involved in a homeostatic regulation loop between contracting skeletal muscles and adipose tissue. Our data suggest that GDF15 is rapidly produced upon skeletal muscle contraction and exercise mimetics. Unlike in mice, GFRAL and RET expression is not highly specific to the caudal brain and displays a nonnegligible expression in human adipose tissue. As GDF15 has emerged as an interesting antiobesity therapy through its central effects on appetite suppression, potential peripheral effects should not be neglected. Hence, future studies of the effects of GDF15 in humans are highly needed.

Methods

GDF15 protein level determination. GDF15 protein levels in cultured CM and plasma samples were determined by ELISA (R&D Systems).

Lipolysis assay. Whole-cell lipolysis in differentiated hMADS adipocytes was assessed in control media and EPS CM supplemented with 2% BSA. The media were changed, and following 3 hours of treatment, glycerol and NEFAs released in the media were measured using commercially available kits (free glycerol reagent, MilliporeSigma; NEFA-C, Wako Chemicals). Data were normalized to total cell protein content.

Thirty g of subcutaneous abdominal adipose tissue were cut with scissors under aseptic conditions into small pieces weighing approximately 10 mg or less. In all experiments, pieces were washed 3 times with sterile PBS to remove blood cells. The pieces of adipose tissue were centrifuged for 1 minute at 300 g at room temperature between each wash. Then, 20 g of the pieces of tissue were resuspended in 50 ml fresh medium containing 10% FCS. The culture medium used was DMEM F12 (Cambrex) containing 33 $\mu\text{mol/l}$ biotin, 17 $\mu\text{mol/l}$ pantothenate, and 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin. The pieces (200 mg/ml) were incubated for 4 hours with rhGDF15 concentrations of 1 and 100 ng/ml and forskolin (10 μM) as positive control. Aliquots of the medium were taken after 4 hours of incubation and stored at -80°C for glycerol and NEFAs measurements as described above. The pieces were washed 3 times with PBS, drained, and weighed for data normalization.

Adipose tissue fractionation. Briefly, after collagenase digestion (250 U/ml in PBS, 2% BSA, pH 7.4, vol/vol) of the adipose tissue for 20 minutes at 37°C , the floating mature adipocytes were separated from the SVF. Then, the different SVF cells were isolated using an immunoselection/depletion approach that used magnetic microbeads coupled to specific CD antibodies (CD31, CD34, CD14), which are membrane cell markers to select the different SVF cell types.

The preadipocytes were CD34⁺ and CD31⁻ cells. The CD34⁻ were immune cells (macrophages that are also CD14⁺ cells and lymphocytes that are CD14⁻ cells) as described in ref. 47.

Skeletal muscle cell primary culture. Satellite cells from *rectus abdominis* of healthy male subjects (age 34.3 ± 2.5 years, BMI 26.0 ± 1.4 kg/m², fasting glucose 5.0 ± 0.2 mM) were provided by Arild C. Rustan (Oslo University, Oslo, Norway). Satellite cells were isolated by trypsin digestion, preplated on an uncoated petri dish for 1 hour to remove fibroblasts, and subsequently transferred to T-25 collagen-coated flasks in DMEM low glucose (1 g/L) supplemented with 16% FBS and various factors (human epidermal growth factor, BSA, dexamethasone, gentamicin, fungizone, fetuin) as previously described (48). Cells from several donors were pooled and grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Differentiation of myoblasts (i.e., activated satellite cells) into myotubes was initiated at approximately 80%–90% confluence, by switching to α -Minimum Essential Medium with 2% penicillin-streptomycin, 2% FBS, and fetuin (0.5 mg/ml). The media were changed every other day, and cells were grown up to 5 days.

EPS. Skeletal muscle cells were fully differentiated for 4 days, and EPS was then applied using a C-Pace EP multichannel culture pacer (IonOptix) for 3 hours (acute intense exercise model) with a protocol consisting of 24-ms pulses at 10 V, with a frequency of 0.5 Hz, or for 24 hours (chronic moderate exercise model) with a protocol consisting of 2-ms pulses at 10 V, with a frequency of 0.1 Hz. Respective control media from unstimulated skeletal muscle cells were obtained at 3 hours and 24 hours in paired cultures. After completion of EPS, CM were collected for proteomic screening and CM experiments with hMADS adipocytes. The EPS protocol did not induce any visible cell detachment, and assessment of the cytotoxic effect of EPS based on the release of adenylate kinase in culture media using a colorimetric cytotoxicity assay (ToxiLight Non-Destructive Cytotoxicity BioAssay Kit) showed that adenylate kinase activity was not significantly changed in medium from stimulated compared with unstimulated myotubes.

Culture of hMADS cells. hMADS cells were cultured and maintained in proliferation medium (1 g/l DMEM low glucose; 10% FBS; 2 mM L-glutamine; 10 mM HEPES buffer; 50 units/ml penicillin; 50 mg/ml streptomycin; supplemented with 2.5 ng/ml human FGF2) as previously described (49). The cells were inoculated in 6-well plates at a density of 44,000 cells/ml and kept at 37°C in 5% CO₂. Six days after seeding, FGF2 was removed from proliferation medium. On the next day (day 0), the cells were incubated in differentiation medium (serum-free proliferation medium/Ham's F-12 medium containing 10 μ g/ml transferrin, 10 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 100 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 100 nM rosiglitazone). At day 3, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine were omitted from differentiation medium, and at day 10, rosiglitazone was also omitted. Lipolysis experiments with EPS CM and the GDF15-neutralizing antibody were carried out at day 14. Human FGF2, insulin, triiodothyronine, transferrin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, and dexamethasone were from MilliporeSigma; L-glutamine, penicillin, and streptomycin were from Invitrogen; HEPES, DMEM low glucose, and Ham's F-12 medium were from Lonza; and rosiglitazone from Alexis Biochemicals.

Determination of glucose metabolism. Total glycogen content was determined spectrophotometrically after complete hydrolysis into glucose by the α -amylglucosidase as previously described (50). For glycogen synthesis experiments, myotubes were preincubated with a glucose- and serum-free medium for 90 minutes and then exposed to DMEM supplemented with D[U-¹⁴C] glucose (1 μ Ci/ml; PerkinElmer) for 3 hours. Following incubation, glucose oxidation was determined by counting of ¹⁴CO₂ released into the culture medium. The cells were then solubilized in KOH 30%, and glycogen synthesis was determined as previously described (26).

Determination of palmitate oxidation. Myotubes were preincubated for 3 hours with [1-¹⁴C]palmitate (1 μ Ci/mL; PerkinElmer) and nonlabeled (cold) palmitate (100 μ M final concentration). Palmitate was coupled to a fatty acid-free BSA in a molar ratio of 5:1. After incubation, ¹⁴CO₂ and ¹⁴C-acid soluble metabolite were measured as previously described (51). All assays were performed in duplicate, and data were normalized to cell protein content.

Mass spectrometry-based quantitative analysis of myotube secretome. Methods are provided in the Supplemental Methods. After protein extraction from culture media ($n = 4$ per group), 1 sample pool, comprising equal amounts of all protein extracts, was generated for quality assessment of LC-MS/MS. Individual samples and the sample pool were electrophoresed using SDS-PAGE gels. Five protein bands (2 mm each) per lane were excised from the gels, and proteins were in-gel reduced and alkylated using an automatic pipetting device (MassPrep, Waters) and then digested at 37°C overnight with trypsin (Promega). A set of reference peptides (Indexed Retention Time [iRT] Kit, Biognosys) was added to the resulting peptides to allow the stability of instrument performances to be measured for QC purposes.

Samples were analyzed on a nano-ultraperformance LC system (nanoAcquity, Waters) coupled to a quadrupole-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Q-Exactive plus, Thermo Fisher Scientific). Mass spectrometry data were processed using MaxQuant software (v.1.5.8.3, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany) (52). Peak lists were created using default parameters and searched using the Andromeda search engine (revert mode) implemented in MaxQuant against a protein database created using the MSDA software suite (53). The database contained human protein sequences (Swiss-Prot; <https://www.uniprot.org/taxonomy/>; taxonomy ID, 9606; 20,195 entries), which were downloaded in October 2017. Sequences of common contaminants, such as keratins and trypsin (247 entries), were added to the database (contaminants.fasta included in MaxQuant). A false discovery rate of 1% for both peptide spectrum matches (minimum length of 7 amino acids) and proteins was accepted during identification. Regarding quantification, data normalization and protein abundance estimation were performed using the label-free quantification (LFQ; ref. 52) option offered in MaxQuant. Proteins identified with only 1 unique peptide were not considered for quantification. Only proteins with at least 3 of 4 valid values per group as well as the ones absent (i.e., 0 valid values) in samples from a given group were kept for further analysis. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the Pride partner repository with the dataset identifier PXD014126.

QC-related measurements showed that HPLC performance remained good and stable throughout the whole experiment, with a median coefficient of variation of 0.5% concerning retention times of all iRT peptides when considering all injections. The reproducibility of quantitative data was also satisfactory, because we recorded low median coefficients of variation for MaxQuant-derived LFQ values of all quantified proteins within each of the 4 experimental groups (31%) and in the sample pool of all samples injected repeatedly during the course of MS-based analyses (21%).

Real-time qPCR. Total RNA from cultured myotubes or *vastus lateralis* muscle was isolated using Qiagen RNeasy mini kit according to manufacturer's instructions (Qiagen). The quantity of RNA was determined on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Reverse-transcriptase PCR was performed on a Techne PCR System TC-412 using the Multiscribe Reverse Transcriptase method (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed to determine cDNA content. All primers were bought from Applied Biosystems and were as follows: *18S* (Taqman assay ID: Hs99999901_s1), *GDF15* (Hs00171132_m1), *GFRAL* (Hs01087628_m1), *RET* (Hs01120030_m1), *IL6* (Hs00985639_m1), *IL15* (Hs01003716_m1), *FGF21* (Hs00173927_m1), *myostatin* (Hs00976237_m1), *FND5* (Hs00401006_m1), *apelin* (Hs00175572_m1), and *BDNF* (Hs03805848_m1). The amplification reaction was performed in duplicate on 20 ng cDNA in 96-well reaction plates on a StepOnePlus system (Applied Biosystems). All expression data were normalized by the $2(-\Delta Ct)$ method using *18S* or *PUM1* as internal controls for cell type or whole adipose tissue data, respectively.

Statistics. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 for Windows. Normal distribution and homogeneity of variance of the data were tested using Shapiro-Wilk and F tests, respectively. Two-tailed Student's unpaired and paired *t* tests were performed to determine differences between treatments. Two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc tests were used when appropriate. All values in figures and tables are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Study approval. All protocols were approved by the appropriate institutional review boards and ethics committees (Toulouse Hospital and Dublin City University), and all subjects gave written informed consent.

Author contributions

CL, AP, EM, DC, BL, PM, JV, NB, CF, MM, DL, IH, CT, EM, SCB, VB, GT, JLG, AB, DL, NV, FB, SB, IDG, DO, and CM researched data and edited the manuscript. CL, DO, FB, and CM contributed to study design and revised the manuscript. CL and CM wrote the manuscript.

Acknowledgments

Authors are very grateful to the study participants and to the plastic surgery department of the Toulouse Hospital for providing adipose tissue samples. We particularly thank Corinne Lefort and Jean-Marc Strub for technical assistance and François Crampes for insightful discussions and critical reading of the manuscript. CL is currently supported by a postdoctoral fellowship from the French National Space Agency. DL is a member of Institut Universitaire de France. This work was supported by grants from the French Nutrition Society, Region Occitanie/FEDER funds DIABKINE (to CM), the Commission of the European Communities (FP6-513946 DiOGenes), Inserm, Occitanie Region (APRTCN 2013 project MONA), CNRS and Strasbourg University (H2E project), and French Proteomic Infrastructure (ProFI, ANR-10-INSB-08-03).

Address correspondence to: Cedric Moro, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Inserm UMR1048, CHU Rangueil, BP84225, 1 avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse cedex 4, France. Phone: 33.561.32.5626; Email: cedric.moro@inserm.fr.

1. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014;159(4):738–749.
2. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25 Suppl 3:1–72.
3. Karstoft K, Pedersen BK. Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016;19(4):270–275.
4. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(8):457–465.
5. Garneau L, Aguer C. Role of myokines in the development of skeletal muscle insulin resistance and related metabolic defects in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2019;45(6):505–516.
6. Görgens SW, Eckardt K, Jensen J, Drevon CA, Eckel J. Exercise and regulation of adipokine and myokine production. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:313–336.
7. Catoire M, Kersten S. The search for exercise factors in humans. *FASEB J*. 2015;29(5):1615–1628.
8. Moro C, et al. Influence of lipolysis and fatty acid availability on fuel selection during exercise. *J Physiol Biochem*. 2014;70(2):583–591.
9. Böttner M, Suter-Crazzolara C, Schober A, Unsicker K. Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res*. 1999;297(1):103–110.
10. Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang HP, Breit SN. MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 1999;65(1):2–5.
11. Patel S, et al. GDF15 provides an endocrine signal of nutritional stress in mice and humans. *Cell Metab*. 2019;29(3):707–718.e8.
12. Fujita Y, Taniguchi Y, Shinkai S, Tanaka M, Ito M. Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatr Gerontol Int*. 2016;16 Suppl 1:17–29.
13. Wollert KC, Kempf T, Wallentin L. Growth differentiation factor 15 as a biomarker in cardiovascular disease. *Clin Chem*. 2017;63(1):140–151.
14. Hsu JY, et al. Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. *Nature*. 2017;550(7675):255–259.
15. Yang L, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nat Med*. 2017;23(10):1158–1166.
16. Emmerson PJ, et al. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat Med*. 2017;23(10):1215–1219.
17. Mullican SE, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat Med*. 2017;23(10):1150–1157.
18. Chrysovergis K, et al. NAG-1/GDF-15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(12):1555–1564.
19. Kleinert M, et al. Exercise increases circulating GDF15 in humans. *Mol Metab*. 2018;9:187–191.
20. Booth FW. Muscle adaptation to exercise: New Saltin's paradigms. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25 Suppl 4:49–52.
21. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 2011;117(2):47–56.
22. Lund J, et al. Higher lipid turnover and oxidation in cultured human myotubes from athletic versus sedentary young male subjects. *Sci Rep*. 2018;8(1):17549.
23. Zou K, et al. Altered tricarboxylic acid cycle flux in primary myotubes from severely obese humans. *Int J Obes (Lond)*. 2019;43(4):895–905.
24. Ciaraldi TP, Ryan AJ, Mudaliar SR, Henry RR. Altered myokine secretion is an intrinsic property of skeletal muscle in type 2 diabetes. *PLoS ONE*. 2016;11(7):e0158209.
25. Jiang LQ, Duque-Guimaraes DE, Machado UF, Zierath JR, Krook A. Altered response of skeletal muscle to IL-6 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2013;62(2):355–361.
26. Laurens C, et al. Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle. *Sci Rep*. 2016;6:38310.
27. Aas V, et al. Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res*. 2013;354(3):671–682.
28. Nikolić N, et al. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33203.
29. Feng YZ, et al. Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an in vitro model of exercise. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2015;308(7):C548–C556.
30. Park S, et al. Electrical pulse stimulation induces differential responses in insulin action in myotubes from severely obese individuals. *J Physiol (Lond)*. 2019;597(2):449–466.
31. Scheler M, et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2013;305(8):C877–C886.
32. Whitham M, et al. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1. *J Biol Chem*. 2012;287(14):10771–10779.
33. Görgens SW, Raschke S, Holven KB, Jensen J, Eckardt K, Eckel J. Regulation of follistatin-like protein 1 expression and secretion in primary human skeletal muscle cells. *Arch Physiol Biochem*. 2013;119(2):75–80.
34. Vandenbergh K, Hespel P, Vanden Eynde B, Lysens R, Richter EA. No effect of glycogen level on glycogen metabolism during high intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(9):1278–1283.

35. Perseghin G, et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1357–1362.
36. van Hall G, et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):3005–3010.
37. Hiscock N, Fischer CP, Sacchetti M, van Hall G, Febbraio MA, Pedersen BK. Recombinant human interleukin-6 infusion during low-intensity exercise does not enhance whole body lipolysis or fat oxidation in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(1):E2–E7.
38. Wolsk E, Mygind H, Grøndahl TS, Pedersen BK, van Hall G. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):E832–E840.
39. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5577–5582.
40. Wu J, et al. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 α /ATF6 α complex. *Cell Metab*. 2011;13(2):160–169.
41. Kim HJ, et al. Endoplasmic reticulum stress markers and ubiquitin–proteasome pathway activity in response to a 200-km run. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(1):18–25.
42. Chung HK, et al. Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis. *J Cell Biol*. 2017;216(1):149–165.
43. Tsai VWW, Husaini Y, Sainsbury A, Brown DA, Breit SN. The MIC-1/GDF15-GFRAL pathway in energy homeostasis: implications for obesity, cachexia, and other associated diseases. *Cell Metab*. 2018;28(3):353–368.
44. Wolfe LS, Pappius HM, Pokrupa R, Hakim A. Involvement of arachidonic acid metabolites in experimental brain injury. Identification of lipoxygenase products in brain. Clinical studies on prostacyclin infusion in acute cerebral ischemia. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1985;15:585–588.
45. Arner P, Langin D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(5):255–262.
46. Lafontan M. Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2012;302(2):C327–C359.
47. Maumus M, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(9):1141–1153.
48. Badin PM, et al. Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58. *J Lipid Res*. 2012;53(5):839–848.
49. Girousse A, et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol*. 2013;11(2):e1001485.
50. Bourlier V, et al. Enhanced glucose metabolism is preserved in cultured primary myotubes from obese donors in response to exercise training. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(9):3739–3747.
51. Engeli S, et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4675–4679.
52. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(9):2513–2526.
53. Carapito C, et al. MSDA, a proteomics software suite for in-depth mass spectrometry data analysis using grid computing. *Proteomics*. 2014;14(9):1014–1019.

1 Supplemental Information for:

2

3 **Growth and Differentiation Factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and**
4 **promotes lipolysis in humans**

5

6 Claire Laurens, Anisha Parmar, Enda Murphy, Deborah Carper, Benjamin Lair, Pauline Maes,
7 Julie Vion, Nathalie Boulet, Coralie Fontaine, Marie Marquès, Dominique Larrouy, Isabelle
8 Harant, Claire Thalamas, Emilie Montastier, Sylvie Caspar-Bauguil, Virginie Bourlier,
9 Geneviève Tavernier, Jean-Louis Grolleau, Anne Bouloumié, Dominique Langin, Nathalie
10 Viguerie, Fabrice Bertile, Stéphane Blanc, de Glisezinski I, Donal O’Gorman, and Cedric
11 Moro

12

13 Inventory of Supplemental Information:

14

15 1. Supplemental Figures 1 to 5 and Legends

16 2. Supplemental Methods

17 3. Supplemental References

18 **Supplementary Figures Legend**

19 **Supplemental Figure 1. Activation of exercise-signaling pathways and myokine gene**
20 **expression by EPS in human myotubes**

21 (A) Representative blot of p38 MAPK and CaMKII phosphorylation in five days cultured
22 human myotubes submitted to a time-course of EPS up to 48h.

23 (B) Canonical myokines mRNA level in EPS3h-stimulated myotubes. Data are expressed as
24 mean \pm SEM (n=12). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to control (CON) by two-
25 way ANOVA.

26 (C) Canonical myokines mRNA level in EPS24h-stimulated myotubes. Data are expressed as
27 mean \pm SEM (n=12). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to control (CON) by two-
28 way ANOVA.

29

30 **Supplemental Figure 2. Metabolic effects of EPS24h**

31 (A) Effect of EPS24h on lactate production in human myotubes (n=12).

32 (B) Influence of conditioned media from EPS24h-stimulated myotubes on NEFA release in
33 human adipocytes (n=5).

34

35

36 **Supplemental Figure 3. Relationship between GDF15, systemic lipolysis and weight loss**

37 (A) Correlation between plasma level of GDF15 and plasma glycerol levels in obese subjects
38 at rest and during exercise (45 min at 50% VO₂max) (Human study 3, n=47).

39 (B) Correlation between changes in plasma GDF15 levels during very low calorie diet
40 (VLCD)-induced weight loss in obese individuals and changes in body mass index (Human
41 study 4, n=28).

42

43 **Supplemental Figure 4. GDF15 receptors expression in subcutaneous abdominal adipose**
44 **tissue as a function of adiposity**

45 (A-B) Relative gene expression of GFRAL (A) and relative gene expression of RET (B) in
46 human whole abdominal subcutaneous adipose tissue, isolated adipocytes and stroma vascular
47 fraction (SVF) preparations from the same samples (Human study 4), and in whole human
48 skeletal muscle tissue. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5-7).

49 (C-D) Relative gene expression of GFRAL (C) and RET (D) in abdominal subcutaneous
50 adipose tissue sorted stromal cells, specifically preadipocytes, lymphocytes and macrophages
51 (n=5).

52 (E-F) Relative gene expression of GFRAL (E) and its co-receptor RET (F) in subcutaneous
53 abdominal adipose tissue samples in a large cohort of Caucasians individuals as a function of
54 adiposity and obesity grade (Human study 4). Data are expressed as mean \pm SEM (n=326).

55

56 **Supplemental Figure 5. GDF15 receptors expression in murine tissues**

57 (A-B) Relative gene expression of GDF15 (A) and GFRAL (B) in whole brain, perigonadic
58 white adipose tissue and skeletal muscle *vastus lateralis* of adult female mice. Data are
59 expressed as mean \pm SEM (n=20).

60

61 **Supplementary Methods**

62 **Human Study 1**

63 Young recreationally active (age 22.1 ± 3.5 years; BMI 24.0 ± 1.6 kg.m⁻²; VO_{2max} 48.5 ± 3.7
64 ml.kg⁻¹.min⁻¹) males recruited to partake in this study. The protocol was approved by the
65 Ethics Committee of Dublin City University and all participants gave written informed.
66 VO_{2peak} was determined on a cycle ergometer starting at 70 watts and increasing in 30-watt
67 increments every 3 minutes until exhaustion. At least 7 days later participants completed a 60
68 min bout of exercise on an electrically braked cycle ergometer at 55% peak power output. A
69 skeletal muscle biopsy of the *vastus lateralis* was performed pre and immediately post the
70 exercise bout. Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen before being stored
71 at -80 °C.

72

73 **Human study 2**

74 This was a cross-sectional study comparing an acute bout of moderate continuous exercise
75 with a high intensity interval bout of exercise in young active men (VO_{2peak} 50-65 ml.kg⁻¹.
76 min⁻¹). The protocol was approved by the Dublin City University Ethics Committee and all
77 subjects gave written informed consent. Participants were instructed to refrain from exercise
78 and to replicate food intake the day before each trial. In the morning, following an overnight
79 fast, participants lay on a bed for 1-hr after arriving at the lab. A blood sample was taken and
80 they then exercised (i) on a bicycle ergometer at 60% VO_{2peak} for 1-hr or (ii) by performing
81 7 high intensity bouts of exercise at 130% peak power output. Each bout lasted 30-sec
82 followed by 4.5-min recovery. A blood sample was taken at the end of each exercise trial.
83 The intensity for both trials was determined using the results of an incremental exercise test to
84 exhaustion.

85

86 **Human Study 3**

87 Middle-aged (age 36.5 ± 0.6 years; BMI 34.2 ± 0.8 kg.m⁻²) and elderly (age 64.2 ± 0.9 years;
88 BMI 33.9 ± 0.4 kg.m⁻²) obese male subjects were enrolled in the MONA (Metabolism, Obesity,
89 Nutrition and Age) clinical trial NCT02161926. The protocol was approved by the Ethics
90 Committee of Toulouse University Hospitals, and all subjects gave written informed consent.
91 They participated in an 8-week lifestyle intervention including a moderate calorie restriction
92 of 20% below their daily energy requirement aerobic combined to two sessions of resistance
93 exercise per week. The participants were asked to refrain from vigorous physical activity 48
94 hours before presenting to the clinical investigation center, and they ate a weight-maintaining
95 diet consisting of 35% fat, 15% protein, and 50% carbohydrates 2 days before the experiment.
96 Maximal oxygen uptake (VO₂max) was investigated on a bicycle ergometer by indirect
97 calorimetry at baseline. Anthropometric and blood parameters were assessed at rest and
98 during a 45 min acute exercise bout performed at 50% VO₂max, at baseline and 48-72h after
99 the end of the lifestyle intervention. Blood was collected on EDTA and immediately
100 processed for plasma storage at -80°C.

101

102 **Human Study 4**

103 The samples investigated in this paper were collected from 2006 to 2007 during the
104 DiOGenes study, a pan-European randomized trial, which was approved by the ethics
105 committees of each of the 8 European centers participating to the program (NCT00390637).
106 The DiOGenes project investigated the effects of diets with different content of protein and
107 glycemic index on weight-loss maintenance and metabolic and cardiovascular risk factors
108 after an 8-week very low calorie diet (VLCD) phase, in obese/overweight individuals. Written
109 informed consent was obtained from each patient according to the local ethics committee of
110 the participating countries as previously described (1).

111 Healthy overweight (body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m²) individuals, aged <65 years were
112 eligible for the study. Exclusion criteria were BMI >45 kg/m², liver or kidney diseases,
113 cardiovascular diseases, diabetes mellitus type 1, special diets/eating disorders, systemic
114 infections/chronic diseases, cancer within the last 10 years, weight change >3 kg within the
115 previous 3 months, and other clinical disorders or use of prescription medication that might
116 interfere with the outcome of the study.

117 A detailed description of inclusion and exclusion criteria has been published previously (1). A
118 detailed description of the DiOGenes intervention trial and main outcomes can be found in the
119 core publication (1). Briefly, among 1209 individuals screened, 932 entered a baseline clinical
120 investigation day including anthropometric measures (height, weight, waist circumference,
121 body composition), blood pressure measurements, fasting blood sampling, and subcutaneous
122 adipose tissue biopsies were performed (at baseline and at the end of each phase). All
123 procedures were standardized between the 8 study centers across Europe. Only baseline and
124 VLCD biological samples and clinical data were used in the present investigation. Paired
125 adipose tissue RNA samples were available at baseline and at the end of the VLCD for 359
126 individuals (age 42.6 ± 6.3 years; BMI 34.1 ± 4.6 kg.m⁻²). Plasma GDF15 was investigated in a
127 subset of 28 individuals (11 men and 17 women) with both clinical and RT-qPCR data
128 available at both baseline and after VLCD.

129

130 **Mass spectrometry-based quantitative analysis of myotube secretome**

131 Culture media (N=4 per group) were first supplemented with 0.1% of sodium lauroyl
132 sarcosinate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 7.5% of trichloroacetic acid (TCA;
133 Sigma-Aldrich), then centrifuged (5400g, 20 minutes, 4°C). Supernatants were discarded and
134 protein pellets were washed twice, using 2ml of cold tetrahydrofuran (THF; VWR
135 International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) followed by centrifugation (5400g, 20

136 minutes, 4°C, then 15000g, 15 minutes, 4°C) and elimination of supernatants. Proteins were
137 then solubilized in a solution composed of 5% of sodium dodecyl sulfate (SDS; Thermo
138 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10mM of Tris pH 6.8 (Sigma-Aldrich), 1mM of
139 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich), and 10% of glycerol (Sigma-
140 Aldrich). Protein concentration was measured using the Bradford protocol (Bio-Rad,
141 Hercules, CA, USA). At this stage, one sample pool, comprising equal amounts of all protein
142 extracts, was generated for quality assessment of LC-MS/MS.

143 Dithiothreitol (DTT; 50mM; Sigma-Aldrich) and bromophenol blue (0.1%; Sigma-Aldrich)
144 were added to aliquots of 10 µg of proteins (individual samples and sample pool). After
145 incubation at 95°C for 5 minutes, proteins were electrophoresed using SDS-polyacrylamide
146 gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels composed of (4% stacking (4% acrylamide; Sigma-
147 Aldrich) and a resolving gel (12% acrylamide). After incubation in a solution composed of
148 ethanol (50%) and phosphoric acid (3%), followed by 4 washing steps in water, staining was
149 performed using colloidal Coomassie blue (Sigma-Aldrich). Five protein bands (2mm each)
150 per lane were excised from the gels. Proteins were in-gel reduced and alkylated using an
151 automatic pipetting device (MassPrep, Waters) and digested at 37°C overnight with trypsin
152 (Promega, Madison, WI, USA) at an enzyme-to-protein-ratio of 1:50. Peptides were extracted
153 twice in 60% acetonitrile (ThermoFisher Scientific)/0.1% formic acid (ThermoFisher
154 Scientific) in water for 1h, then once in 100% acetonitrile at 450rpm on an orbital shaker. At
155 this stage, a set of reference peptides [Indexed Retention Time (iRT) Kit; Biognosys,
156 Schlieren, Switzerland] was added to each sample to allow the stability of instrument
157 performances to be measured for QC purposes. Just before LC-MS/MS analysis, the volume
158 of peptide extracts was reduced in a speed-vac and sample volumes were adjusted to 40 µl
159 with 0.1% formic acid in water.

160 Samples were analyzed on a nano-ultraperformance LC system (nanoAcquity; Waters,
161 Milford, MA, USA) coupled to a quadrupole-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Q-Exactive
162 plus; ThermoFisher Scientific). Six microliters of each sample were concentrated/desalted on
163 a trap column (Symmetry C18, 180 μm x 20 mm, 5 μm ; Waters) using 99% of solvent A
164 (0.1% formic acid in water) and 1% of solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) at a flow
165 rate of 5 μl /minute for 3 minutes. Afterwards, peptides were transferred and eluted from the
166 separation column (BEH 130 C18, 75 μm x 250 mm, 1.7 μm ; Waters) maintained at 60°C
167 using a 80-minute gradient from 1 to 35% of solvent B at a flow rate of 450 nl/minute. All
168 samples were injected using a randomized and blocked injection sequence (1 biologic
169 replicate of each group plus the pool in each block). To minimize carryover, a column wash
170 (50% ACN for 20 min) was included between each block in addition to a solvent blank
171 injection, which was performed after each sample. The Q Exactive Plus instrument was
172 operated in positive ion mode with source temperature set to 250°C and spray voltage set to
173 1.8 kV. Full scan MS spectra [mass-to-charge ratio (m/z) 300–1800] were acquired at a
174 resolution of 140,000 at m/z 200, a maximum injection time of 50 ms, and an automatic gain
175 control target value of 3×10^6 charges with the lock-mass option enabled (m/z 445.12002). The
176 10 most intense precursors per full scan were isolated using a m/z 2 window and fragmented
177 using higher energy collisional dissociation (normalized collision energy of 27 eV). Dynamic
178 exclusion of already-fragmented precursors was set to 60 s. MS/MS spectra were acquired
179 with a resolution of 17,500 at m/z 200, a maximum injection time of 100 ms, and an
180 automatic gain control target value of 1×10^5 . The system was fully controlled by XCalibur
181 software (v. 3.0.63; Thermo Fisher Scientific).

182 Mass spectrometry data were processed using MaxQuant software (v.1.5.8.3; Max Planck
183 Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany) (2). Peak lists were created using default
184 parameters and searched using the Andromeda search engine (revert mode) implemented in

185 MaxQuant against a protein database created using the MSDA software suite (3). The
186 database contained human protein sequences (Swiss-Prot;
187 <https://www.uniprot.org/taxonomy/>; Taxonomy ID: 9606; 20,195 entries), which were
188 downloaded in October 2017. Sequences of common contaminants like keratins and trypsin
189 (247 entries) were added to the database (contaminants.fasta included in MaxQuant). The first
190 search was performed using a precursor mass tolerance of 20 ppm and the main search with a
191 tolerance of 5 ppm after recalibration. Fragment ion mass tolerance was set to 20 ppm.
192 Carbamidomethylation of cysteine residues was considered as fixed and oxidation of
193 methionine residues and acetylation of protein N termini as variable modifications during the
194 search. A maximum number of 1 missed cleavages and a false discovery rate of 1% for both
195 peptide spectrum matches (minimum length of 7 amino acids) and proteins was accepted
196 during identification. Regarding quantification, data normalization and protein abundance
197 estimation was performed using the label-free quantification (LFQ; (2)) option offered in
198 MaxQuant using a minimal ratio count of one. “match between runs” was enabled using a 1.5-
199 min time window after retention time alignment using a 20-min time window. Both
200 unmodified and modified (acetylation of protein N termini and oxidation of methionine
201 residues) peptides were considered for quantification whereas shared peptides were excluded.
202 All other MaxQuant parameters were set as default. Proteins identified with only one unique
203 peptide were not considered for quantification. Only proteins with at least three of four valid
204 values per group as well as the ones absent (i.e., 0 valid values) in samples from a given group
205 were kept for further analysis. The MS proteomics data have been deposited to the
206 ProteomeXchange Consortium via the Pride (24) partner repository with the dataset identifier
207 PXD014126.

208 QC-related measurements showed that HPLC performance remained good and stable
209 throughout the whole experiment, with a median coefficient of variation of 0.5% concerning

210 retention times of all iRT peptides when considering all injections. The reproducibility of
211 quantitative data was also satisfactory because we recorded low median coefficients of
212 variation for MaxQuant-derived LFQ values of all quantified proteins within each of the four
213 experimental groups (31%) and in the sample pool of all samples injected repeatedly during
214 the course of MS-based analyses (21%).

215

216 **Western blot**

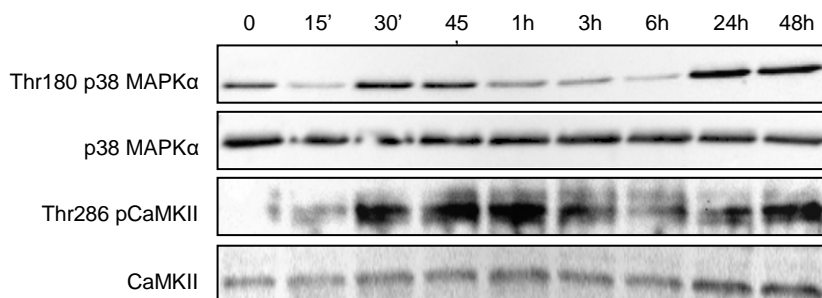
217 Proteins were extracted from tissues using RIPA buffer and protease inhibitor cocktail (Sigma-
218 Aldrich, #R0278 and #P8340/#P5726/#P0044). Tissues homogenates were centrifuged twice
219 for 20 min at 12700 rpm and supernatants were quantified with BCA pierce kit
220 (ThermoScientific, #23225). A total of 30 µg of proteins were run on a 4-20% SDS-
221 polyacrylamide gel electrophoresis (Biorad), transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-
222 Rad) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies, Rabbit anti-P38MAPK (1/1000,
223 CST, #9212), and Rabbit anti-CaMKII (1:1000, CST, #3362). Subsequently, immunoreactive
224 proteins were blotted with anti-rabbit or goat horseradish peroxidase-labeled secondary
225 antibodies for 1h at room temperature and revealed by enhanced chemiluminescence reagent
226 (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific), visualized using ChemiDoc MP Imaging
227 System and data analyzed using the ImageLab 4.2 version software (Bio-Rad Laboratories,
228 Hercules, USA).

229 **Supplementary References**

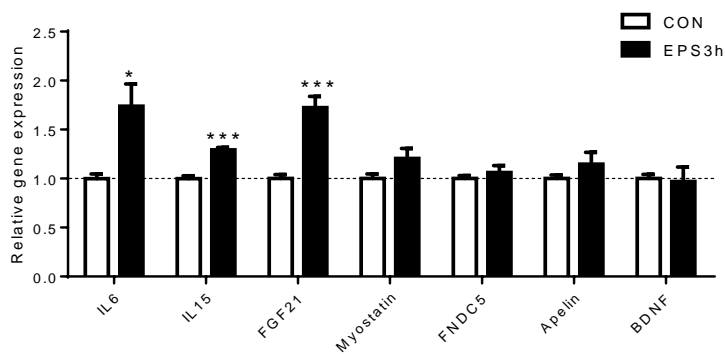
- 230 1. Larsen, T.M., Dalskov, S.M., van Baak, M., Jebb, S.A., Papadaki, A., Pfeiffer, A.F.,
231 Martinez, J.A., Handjieva-Darlenska, T., Kunesova, M., Pihlsgard, M., et al. 2010.
232 Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss
233 maintenance. *N Engl J Med* 363:2102-2113.
- 234 2. Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. 2014. Accurate
235 proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal
236 peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13:2513-2526.
- 237 3. Carapito, C., Burel, A., Guterl, P., Walter, A., Varrier, F., Bertile, F., and Van
238 Dorsselaer, A. 2014. MSDA, a proteomics software suite for in-depth Mass
239 Spectrometry Data Analysis using grid computing. *Proteomics* 14:1014-1019.

Supplemental Figure 1

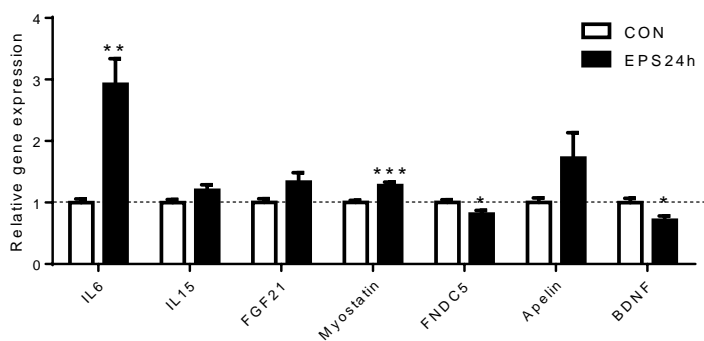
A



B

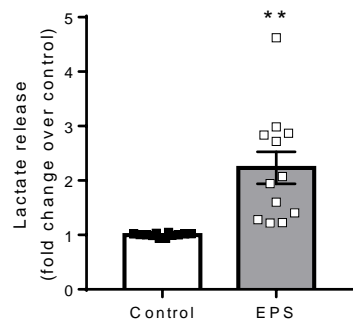


C

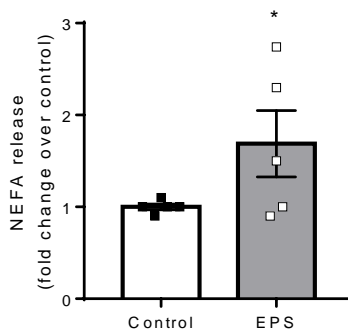


Supplemental Figure 2

A

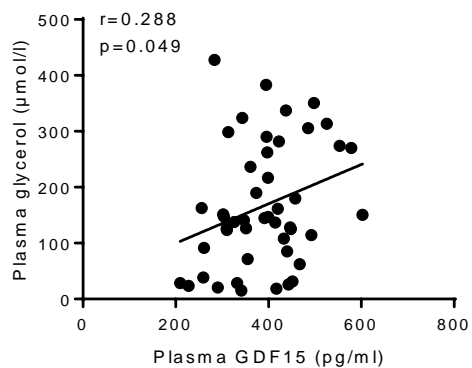


B

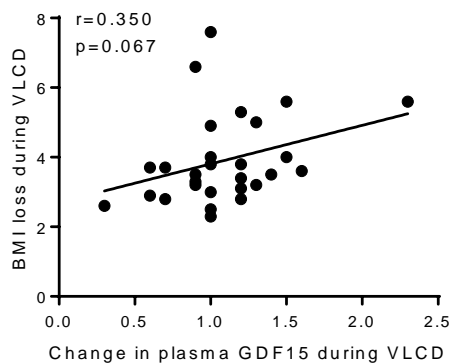


Supplemental Figure 3

A

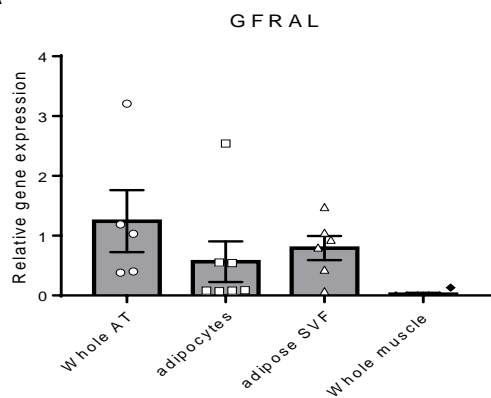


B

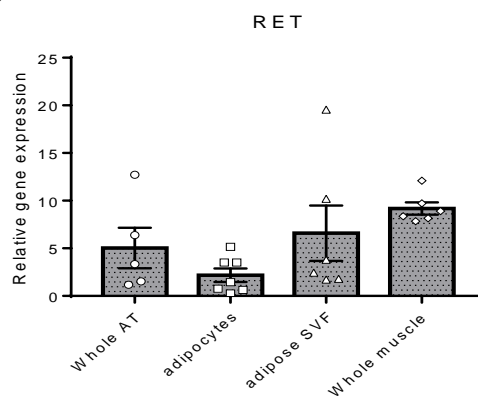


Supplemental Figure 4

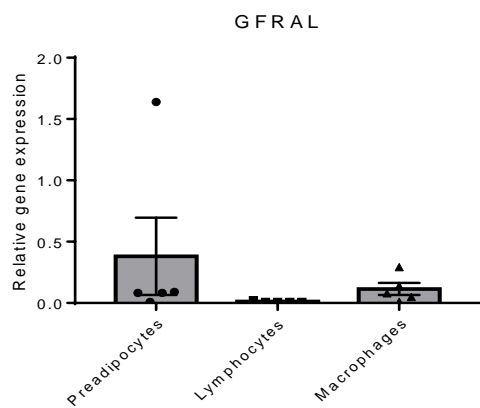
A



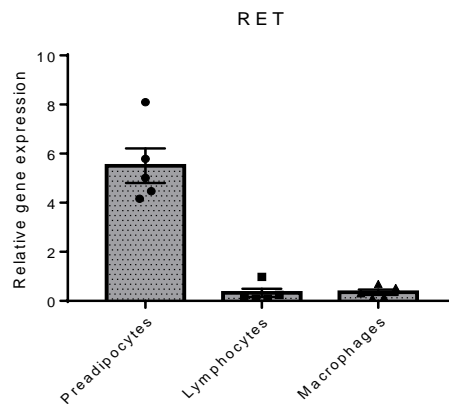
B



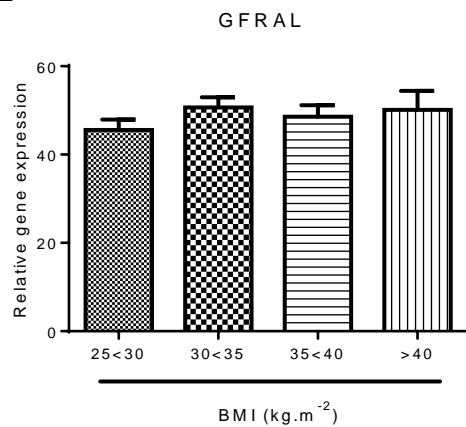
C



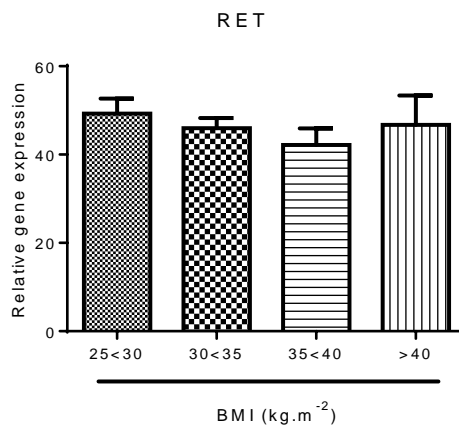
D



E

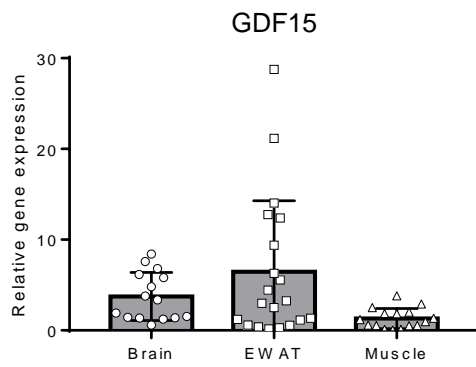


F

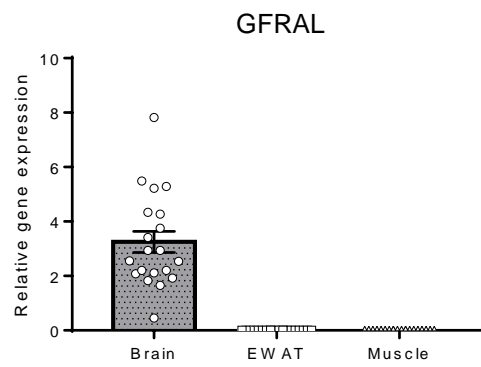


Supplemental Figure 5

A



B



ABSTRACT

The atrial natriuretic peptide (ANP) is a hormone secreted by the heart, which controls fluid homeostasis and cardiac physiology through its receptor guanylyl cyclase A (GC-A). Over the last 20 years, its role outside of the cardiac and renal spheres has been studied. ANP has a lipolytic effect on adipose tissue and increases oxidative capacity in skeletal muscle. Moreover, type 2 diabetic and obese patients display a reduced plasma ANP concentration and a lower GC-A to NPRC (natriuretic peptide receptor C; a clearance receptor) ratio in adipose tissue and skeletal muscle.

In the first part of this thesis, we demonstrated that ANP orchestrates a coordinated physiological response to fuel non shivering thermogenesis. In the second part of this thesis, we first delineated that the optimal fasting time to perform an insulin tolerance test in mice is 2h. Indeed, longer fasting times induce an important weight loss and a metabolic stress. Then, we demonstrated that ANP/GC-A deficiency induces insulin intolerance in high fat diet-fed mice, decreases endurance capacity and reduces the beneficial adaptations to an endurance training program in mice. Thus, ANP/GC-A deficiency plays a causal role in insulin resistance and is required to maintain skeletal muscle function.

In summary, this thesis demonstrated that the heart, via its endocrine function, plays an important role in the control of energy metabolism and that the ANP/GC-A system could be an interesting target in the prevention or treatment of type 2 diabetes.

Key words: natriuretic peptides – thermogenesis – type 2 diabetes – adipose tissues – skeletal muscles – mitochondria

Auteur: Deborah Carper

Titre : Rôle du système ANP/GC-A dans le maintien de l'homéostasie énergétique et le développement du diabète de type 2

Directeur de thèse: Cédric Moro

Lieu et date de soutenance: Toulouse, le 30 octobre 2020

Résumé :

Le peptide atrial natriurétique (ANP) est une hormone sécrétée par le cœur qui, en se liant à son récepteur guanylyl cyclase A (GC-A), régule l'homéostasie des fluides et la fonction cardiaque. Ces 20 dernières années, son rôle en dehors des sphères cardiovasculaires et rénales a été étudié. Il s'est avéré que l'ANP a un effet lipolytique puissant dans le tissu adipeux et qu'il augmente les capacités oxydatives dans le muscle squelettique. De plus, les patients diabétiques de type 2 et les individus obèses présentent une diminution des niveaux plasmatiques d'ANP ainsi qu'une diminution du ratio GC-A/NPRC (*natriuretic peptide receptor C*; un récepteur de clairance de l'ANP) dans leurs tissu adipeux et leurs muscles squelettiques.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons démontré que l'ANP est une hormone endocrine qui orchestre une réponse physiologique à une exposition au froid pour activer la thermogénèse sans frisson. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons d'abord déterminé à 2h le temps de jeûne optimal avant la réalisation d'un test de tolérance à l'insuline chez la souris. En effet, des temps de jeûne plus longs induisent une perte de poids importante ainsi que des stress métaboliques. Par la suite, nous avons démontré que lors d'un déficit du système ANP/GC-A, les souris présentent une dysfonction mitochondriale musculaire qui est associée à une intolérance à l'insuline sous régime hyperlipidique, une diminution des capacités d'endurance ainsi qu'une absence d'adaptation à un entraînement physique. Le déficit du système ANP/GC-A joue alors un rôle causal dans l'insulinorésistance et est nécessaire pour la fonction musculaire.

L'ensemble de ces travaux démontre que le cœur, par sa fonction endocrine, joue un rôle important dans le contrôle du métabolisme énergétique et que le système ANP/GC-A représente un cible intéressante pour la prévention et/ou le traitement du diabète de type 2.

Mots clés : Peptides natriurétiques – thermogénèse – diabète de type 2 – tissus adipeux – muscles squelettiques – mitochondries

Intitulé et adresse du laboratoire : Equipe 4 : Laboratoire de recherche sur les obésités, INSERM UMR 1048 –I2MC, 1 avenue Jean Poulhès, Bâtiment L4 - BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4.