



**HAL**  
open science

# Rôle du système endocannabinoïde périphérique dans l'apparition des désordres métaboliques liés à l'obésité: Implication des endocannabinoïdes produits par le tissu adipeux.

Chloé Buch

## ► To cite this version:

Chloé Buch. Rôle du système endocannabinoïde périphérique dans l'apparition des désordres métaboliques liés à l'obésité: Implication des endocannabinoïdes produits par le tissu adipeux.. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCI020 . tel-03662095

**HAL Id: tel-03662095**

**<https://theses.hal.science/tel-03662095>**

Submitted on 9 May 2022

**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.



**THESE DE DOCTORAT**  
**DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**  
**PREPAREE A L'UFR SCIENCES, VIE, TERRE ET ENVIRONNEMENT**

Ecole doctorale n°554  
Environnements Santé

**Doctorat de Physiologie**

Par  
Mme. BUCH Chloé

**Rôle du système endocannabinoïde périphérique dans l'apparition des  
désordres métaboliques liés à l'obésité :**  
**Implication des endocannabinoïdes produits par le tissu adipeux.**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 17 décembre 2021.

**Composition du Jury :**

Pr. VERGES Bruno	PUPH INSERM U1231, CHU Dijon, UBFC	Président du jury
Dr. COTA Daniela	DR INSERM U1215, Bordeaux	Rapporteur
Dr. MORO Cédric	DR INSERM U1297, Toulouse	Rapporteur
Dr. GANGAROSSA Giuseppe	MCF CNRS U8251, Université de Paris	Examineur
Pr. ROBERT Jean-Michel	PR EA1155, Nantes	Examineur
Pr. DEGRACE Pascal	PR INSERM U1231, UBFC	Directeur de thèse
Dr. DEMIZIEUX Laurent	MCF INSERM U1231, UBFC	Codirecteur de thèse

L'expérimentateur, homme de conquêtes sur la nature, se trouve sans cesse aux prises avec des faits qui ne se sont point encore manifestés et n'existent, pour la plupart, qu'en puissance de devenir dans les lois naturelles. L'inconnu dans le possible et non dans ce qui a été, voilà son domaine, et, pour l'explorer, il a le secours de cette merveilleuse méthode expérimentale, dont on peut dire avec vérité, non qu'elle suffit à tout, mais qu'elle trompe rarement, et ceux-là seulement qui s'en servent mal. Elle élimine certains faits, en provoque d'autres, interroge la nature, la force à répondre et ne s'arrête que quand l'esprit est pleinement satisfait. Le charme de nos études, l'enchantement de la science, si l'on peut ainsi parler, consiste en ce que, partout et toujours, nous pouvons donner la justification de nos principes et la preuve de nos découvertes.

*Discours de M. Louis Pasteur ayant été élu par l'Académie française à la place vacante par la mort de M. Émile Littré. Séance du jeudi 27 avril 1882.*

# Remerciements

---

Je tiens en premier lieu à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux. Je remercie le **Pr. Bruno Vergès** pour avoir accepté de présider ce jury mais aussi en tant que chef d'équipe pour nos échanges au cours de ces trois années. Un grand merci au **Dr. Daniela Cota** et au **Dr. Cédric Moro** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps accordé à la relecture du manuscrit ainsi que pour vos remarques constructives. Enfin, je remercie le **Dr. Giuseppe Gangarossa** pour l'évaluation de ces travaux au même titre que le **Pr. Jean-Michel Robert**, qui a par ailleurs grandement contribué à l'avancée de ces travaux par la synthèse de nouvelles molécules et par sa présence dans le comité de suivi de thèse aux côtés du **Dr. Jacques Grober**.

Merci à tous pour la richesse de nos échanges ainsi que pour toutes les perspectives et l'œil nouveau que vous avez apporté à ce projet.

Dans un second temps, je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude envers le **Pr. Pascal Degrace** ainsi qu'envers le **Dr. Laurent Demizieux** pour leur implication au quotidien lors de ma formation aux différentes techniques expérimentales, pour leur patience lors de ma formation à l'expérimentation animale, pour nos discussions quotidiennes, qu'elles soient professionnelles ou personnelles, et surtout pour le temps que vous m'avez accordé au cours de la rédaction de ce manuscrit. Merci à vous deux, sans qui ces trois années n'auraient pas été aussi riches d'enseignements.

**Tony**, merci à toi pour toutes nos discussions aux pauses café ou autour de l'exceptionnel couscous de Sophia. Tu as été présent tout au long de ces 3 années avec un regard différent sur ce projet. Tu t'es impliqué bien plus que nécessaire dans la relecture du manuscrit et la préparation de la soutenance. Mais surtout merci de nous avoir ouvert, à Alex et moi, les portes de ta maison. Et merci à **Sophia** pour ton sourire, ton humour, ton soutien et ton immense bienveillance. Je vous souhaite le meilleur ainsi qu'à **Tilila** et à **Aaron** qui devrait suivre le même chemin que sa grande sœur.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance envers **Patricia** pour sa bienveillance et sa présence au quotidien notamment pour la culture cellulaire. Merci pour tes conseils, ta pédagogie et surtout la rigueur que tu as su me transmettre.

Je te remercie aussi, **Julia**, pour ton aide au quotidien dans les manip (notamment lors de toutes ces extractions d'endocannabinoïdes, Pascal se souviendra longtemps de ces factures), dans la rédaction du manuscrit et dans la préparation de cette soutenance ainsi que pour ta bonne humeur et pour tous les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces trois belles années.

Mes remerciements vont ensuite à tous les membres de l'équipe PADYS et tout particulièrement au **Pr Bruno Vergès** mais aussi à tous mes collègues du bâtiment Gabriel, notamment **Aziz** et **Charles** pour m'avoir accompagnée dans l'enseignement, mais également **Sandrine, Jérôme, Michel, Mickaël, Jean-Marc, Line, Sabrina, Naïm, Amira, Vi** et **Léa**. Merci pour votre bonne humeur et tous nos moments passés autour du café de 10h.

Je tiens également à remercier tous les collaborateurs qui ont permis la réalisation de ces travaux dont la plateforme de lipidomique avec **Jean-Paul Pais-De-Barros, Hélène Choubley** et **Victoria Bergas** mais aussi l'animalerie centrale avec **Valérie Saint-Giorgio** et les collaborateurs ayant contribué à la mise en place de nos études cliniques avec le CHU de Dijon, notamment **Isabelle Simoneau** ainsi que les attachés de recherche clinique et les chirurgiens ayant participé aux études.

Un grand merci à vous aussi, **Adélie, Quentin, Killian, Marine** et tout particulièrement **Tania** et ton fameux **Thomas**. Tania, tu as su m'accompagner au quotidien afin que la « passation » se déroule au mieux en me donnant toutes les clés pour réussir. Vous avez, tous autant que vous êtes, su m'accueillir comme il se doit dans ce bureau R07, me mettre l'aise et surtout vous vous êtes magistralement occupés de l'animation musicale quotidienne. Votre départ a laissé un grand silence. En tout cas, je suis heureuse d'avoir partagé ces moments avec vous et ce ne seront sûrement pas les derniers.

Je ne pourrais non plus omettre de vous citer, **Amina, Célia** et enfin **Marine** (qui a rejoint Dijon sur la fin). Merci à toutes les trois pour tous ces moments partagés ensemble, que ce soit des moments de doute, de joie, d'appréhension et j'en passe (sans oublier bien sûr nos pauses café/thé et nos kebabs). Votre bienveillance et votre positivité ont marqué ces dernières années, et j'espère que nous continuerons sur cette voie. Merci d'avoir ri par politesse à mes blagues et de m'avoir permis de faire partie de vos vies. Et un petit mot

spécial à Amina et Marine pour vous souhaiter bon courage pour la fin, j'essaierai de vous épauler autant que vous avez su le faire avec moi.

Enfin, merci à ma famille, à mes parents de sang et d'adoption, **Maman, Papa, Stéphanie, Pascale et Jean-Michel**, pour votre écoute, votre soutien et vos nombreux conseils avisés, c'est l'expérience qui parle ! J'espère vous avoir rendu fiers et poursuivre sur cette lancée. Merci aussi à (tous) mes frères et sœurs, en incluant bien sûr mes 3 belles-sœurs et mon beau-frère, ainsi que mes neveux et nièce, l'avantage d'avoir une grande famille ! Vous avez tous contribué de près ou de loin à rendre ces dernières années aussi belles et enrichissantes.

Pour conclure en beauté, « last but not least » comme tu dirais, un grand merci à toi **Alex**, merci pour tout, pour ta présence, pour ton soutien sans faille, pour ton « humour » (oui avec des guillemets), pour ton expertise d'expert et pour le réconfort que tu m'as apporté dans tous mes moments de doute. Je n'y serais jamais arrivée sans toi.

# Résumé

---

L'obésité est une pathologie dont la fréquence est en constante augmentation. Elle correspond à un excès de tissu adipeux (TA) dont les fonctions peuvent être altérées. Parmi les dérégulations métaboliques, il peut exister une hyperactivation du système endocannabinoïde (SEC). Ce système, composé de récepteurs aux cannabinoïdes (CB1R et CB2R), de leurs ligands endogènes (EndoCannabinoïdes – ECs) et des enzymes impliquées dans leur biosynthèse et leur dégradation, est présent dans le système nerveux central ainsi que dans divers tissus périphériques.

Le blocage des CB1R par le Rimonabant, premier antagoniste commercialisé en 2006, s'est révélé être une approche thérapeutique efficace en réduisant la prise alimentaire, la masse corporelle et en améliorant significativement les paramètres métaboliques. Néanmoins, les troubles psychiatriques sévères associés, consécutifs aux effets centraux, ont valu à ce composé d'être retiré du marché 2 ans plus tard.

Depuis, l'utilisation d'antagonistes ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique a permis de démontrer que l'inactivation des CB1R périphériques était suffisante pour diminuer le risque cardio-métabolique chez la souris obèse. Compte tenu du rôle central joué par le TA dans l'étiologie des pathologies associées à l'obésité, il apparaît important de préciser la relation existante entre le SEC et le métabolisme adipocytaire. Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont pour objectifs de préciser le rôle des ECs sur l'activité lipolytique adipocytaire, d'évaluer les capacités sécrétoires des différents dépôts de TA et d'étudier l'impact d'agonistes et d'antagonistes des CB1R sur l'adipogenèse. Une dernière partie, est consacrée à la caractérisation de l'activité biologique de nouveaux antagonistes des CB1R.

Tout d'abord, l'étude des conséquences de la modulation du SEC sur l'activité lipolytique a permis de démontrer que l'activation des CB1R, en stimulant la voie de signalisation PI3K/Akt, conduit à une diminution de la lipolyse. Les résultats suggèrent également que les ECs produits par le TA, pourraient alimenter le pool d'ECs circulants et être à l'origine d'effets exocrines néfastes.

L'étude de la production des ECs *in vitro*, par des explants de TA viscéral et sous-cutané chez la souris et chez l'Homme obèses, a confirmé la modification des capacités sécrétoires en ECs. Ces résultats préliminaires valident une approche méthodologique originale qui nous permet d'envisager une exploration plus poussée des mécanismes de la production des ECs.

Par ailleurs, le rôle des ECs sur la différenciation de cellules souches issues de la fraction stroma-vasculaire de TA sain et pathologique de souris a été étudié. Des essais préliminaires ont permis de suggérer l'existence d'un lien entre différenciation adipocytaire et activité des CB1R.

Enfin, les études de caractérisation de nouveaux antagonistes des CB1R ont démontré des effets intéressants des molécules JM-00266 et HR-0133 sur la masse corporelle et le métabolisme glucido-lipidique. Toutefois, l'optimisation, le développement et la caractérisation de ces nouveaux types d'antagonistes à des fins thérapeutiques apparaît essentiel dans la lutte contre l'obésité et ses complications.

**Mots clés :** *Obésité, Système Endocannabinoïde, Tissu Adipeux, Métabolisme glucido-lipidique*

# Abstract

---

Obesity is a pathology characterized by an excess of adipose tissue (AT) whose functions may be altered. Interestingly, strong evidence suggests that metabolic dysregulations linked to obesity is associated with an hyperactivation of the endocannabinoid system (ECS) in several organs including AT. This system, composed of cannabinoid receptors (CB1R and CB2R), their endogenous ligands (EndoCannabinoids - ECs) and their biosynthetic and degrading enzymes, is expressed both in the central nervous system and in various peripheral tissues.

CB1R blockade with Rimonabant, the first antagonist marketed in 2006, has proven to be an effective therapeutic approach by reducing food intake, body mass and by significantly improving metabolic parameters. However, the associated severe centrally-mediated psychiatric disorders led to its market withdrawal 2 years later.

Since then, the use of antagonists that do not cross the blood-brain barrier has demonstrated that inactivation of peripheral CB1R is sufficient to reduce the cardiometabolic risk in obese mice. Considering the central role played by AT in the etiology of obesity-associated pathologies, it appears important to clarify the existing relationship between ECS and adipocyte metabolism. In this context, these thesis objectives were to clarify the role of ECs on adipocyte lipolytic activity, to evaluate the secretory abilities of the different AT deposits and to study the impact of CB1R agonists and antagonists on adipogenesis. A last part is devoted to the characterization of the biological activity of new CB1R antagonists.

First of all, studying the consequences of the ECS modulation on lipolytic activity allowed us to demonstrate that the activation of CB1R, by stimulating the PI3K/Akt signaling pathway, leads to a decrease in lipolysis. The results also suggest that AT-derived ECs could be the source of circulating ECs and be responsible for harmful exocrine effects.

Studying ECs production *in vitro*, using visceral and subcutaneous AT explants from both obese mice and humans, confirmed the alteration of ECs secretory abilities. These preliminary results validated an original methodological approach that allows us to further explore the mechanisms of ECs production.

In addition, the role of ECs on stem cells differentiation from the stroma-vascular fraction of healthy and pathological mice AT has been studied. Preliminary data are suggesting a link between adipocyte differentiation and CB1R activity.

Finally, characterization studies of new CB1R antagonists have demonstrated interesting effects of the compounds JM-00266 and HR-0133 on body mass as well as on lipid and carbohydrate metabolism. Nonetheless, the optimization, development, and characterization of these new types of antagonists for therapeutic purposes is still incomplete and appears essential in the fight against obesity and obesity-associated disorders.

**Key words:** *Obesity, Endocannabinoid system, Adipose tissue, Lipid and carbohydrate metabolism*



# Table des matières

---

Remerciements.....	1
Résumé.....	4
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des abréviations .....	14
Table des figures.....	18
Table des tableaux .....	23
Table des annexes .....	24
Introduction.....	25
I.  L'obésité.....	26
A.  Épidémiologie .....	27
B.  Origines .....	28
1.  Facteurs environnementaux et comportementaux .....	29
2.  Facteurs génétiques .....	29
3.  Microbiote intestinal .....	30
C.  Conséquences de l'obésité .....	31
II.  Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie .....	35
A.  Les tissus adipeux .....	35
1.  Le tissu adipeux brun .....	35
a.  Origines, caractéristiques et structure .....	35
b.  Rôle métabolique du tissu adipeux brun .....	36
c.  Le tissu adipeux brun, un nouvel acteur dans la lutte contre l'obésité ?..	37
2.  Le tissu adipeux beige .....	38
3.  Le tissu adipeux blanc.....	38
a.  Les différents dépôts .....	38
b.  Composition et structure.....	39
i.  Les adipocytes blancs.....	41
ii.  La fraction stroma-vasculaire.....	41
B.  Le tissu adipeux blanc, un acteur clé du métabolisme énergétique .....	43
1.  Différenciation et renouvellement adipocytaire.....	43
2.  Fonction de stockage .....	45

3.	Lipolyse .....	48
a.	Régulation positive par les catécholamines .....	50
b.	Régulation négative par l'insuline.....	52
c.	Régulation par les peptides natriurétiques .....	53
d.	Autres éléments régulateurs .....	54
e.	Lipolyse dépôt spécifique.....	57
4.	Activité sécrétoire et endocrine .....	58
C.	Dérégulation métabolique du TA au cours de l'obésité .....	60
1.	Remodelage du tissu adipeux.....	60
2.	Altération de la production des adipokines .....	61
3.	Inflammation.....	63
a.	Acides gras, stress du RE et stress oxydant.....	63
b.	Hypoxie et hypertrophie adipocytaires.....	64
c.	Inflammation du TA et microbiote intestinal .....	65
d.	L'infiltration de macrophages .....	66
e.	Remodelage fibro-inflammatoire irréversible.....	68
4.	Résistance à l'insuline du tissu adipeux .....	69
a.	Mécanismes dépendants d'Akt .....	69
b.	Mécanismes indépendants de la voie Akt.....	70
5.	Lipotoxicité.....	71
D.	Traitements de l'obésité et des pathologies associées .....	72
1.	Mode de vie et exercice physique.....	72
2.	Chirurgies bariatriques .....	72
3.	Pharmacothérapies .....	73
III.	Le système endocannabinoïde.....	76
A.	Historique .....	76
B.	Endocannabinoïdes et dérivés endogènes.....	78
1.	Synthèse des ECs .....	79
2.	Dégradation des ECs .....	80
a.	Internalisation des ECs.....	80
b.	Dégradation des ECs .....	81
C.	Récepteurs aux ECs et signalisation .....	83
3.	Les récepteurs aux cannabinoïdes.....	84

a.	Le récepteur CB1 .....	84
b.	Le récepteur CB2 .....	86
4.	Voies de signalisation activées par les CB1R .....	87
a.	Signalisation dépendante des récepteurs couplés aux protéines G .....	88
i.	Adénylate cyclase .....	88
ii.	MAP kinases .....	88
iii.	PI3K/Akt .....	89
iv.	Canaux ioniques .....	89
b.	Signalisation dépendante des $\beta$ -arrestines .....	90
D.	SEC et métabolisme glucido-lipidique : physiologie et physiopathologie .....	92
1.	Système nerveux central et contrôle de la prise alimentaire .....	93
2.	Tissus non-adipeux .....	94
a.	Tractus gastro-intestinal .....	94
b.	Foie .....	95
c.	Pancréas .....	97
d.	Muscle squelettique .....	99
e.	Rein .....	100
3.	Tissu adipeux .....	102
a.	Régulation du tonus endocannabinoïde dans le TA .....	102
i.	Régulation des CB1R .....	103
ii.	Métabolisme des ECs .....	103
b.	Adipogenèse .....	104
c.	Lipolyse et lipogenèse .....	105
d.	Inflammation .....	106
e.	Fonction endocrine .....	107
4.	Polymorphisme CB1R .....	108
E.	Les CB1R, une nouvelle cible thérapeutique .....	108
1.	Le Rimonabant et les antagonistes de 1 <sup>ère</sup> génération .....	110
2.	Les antagonistes de 2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> génération à action périphérique .....	112
	Problématique .....	114
	Résultats et Discussion .....	118
I.	Effets de l'activation des CB1R sur la lipolyse en période interprandiale .....	119
A.	Article de thèse .....	120

B.	Conclusion.....	133
II.	Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse .....	134
A.	Production des ECs par le TA de souris minces.....	135
1.	Production des ECs par le TAV de souris minces .....	135
2.	Production des ECs par le TAV de souris minces en présence d'inhibiteur des enzymes de dégradation (JZL-195) .....	136
3.	Production des ECs par le TA chez la souris mince, comparaison entre le TAV et le TASC.....	137
B.	Production des ECs par le TA de souris obèses .....	138
1.	Cinétique de production des ECs par le TAV de souris obèses .....	138
2.	Production des ECs par le TA chez la souris obèse, comparaison entre le TAV et le TASC.....	139
C.	Effets de l'obésité sur la production d'ECs par le TAV et le TASC.....	141
1.	Effets de l'obésité sur la production des ECs par le TAV.....	141
2.	Effets de l'obésité sur la production des ECs par le TASC .....	142
D.	Effets du blocage des CB1R sur la production des ECs par le TAV et le TASC .	144
1.	Production des ECs par le TAV et le TASC de souris obèses en présence d'antagonistes des CB1R.....	144
2.	Production des ECs par le TAV de souris minces en présence d'antagonistes des CB1R.....	147
E.	Production des ECs par le TA issu de sujets obèses .....	149
1.	Cinétique de production des ECs par le TAV de sujets obèses.....	150
2.	Effets du JZL-195 sur la production du TAV et du TASC .....	150
3.	Production des ECs par le TA chez l'Homme obèse, comparaison entre le TAV et le TASC.....	152
F.	Optimisation de la quantification du 2-AG produit par les explants de TA.....	155
1.	Hypothèse 1 : Production du 2-AG inhibée par TRPV1 .....	156
a.	Test de désensibilisation des TRPV1 avec de l'ACEA .....	156
b.	Test d'inhibition des TRPV1 avec A784168 .....	158
2.	Hypothèse 2 : Dégradation importante du 2-AG.....	159
a.	Evaluation de la dégradation du 2-AG dans le milieu de culture .....	159
b.	L'inhibiteur spécifique de la MAGL MJN110 limite la dégradation du 2-AG dans le milieu de culture.....	161

G.	Conclusion.....	163
III.	Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire.....	164
A.	Mise au point des conditions de culture et de différenciation de cellules de la Fraction Stroma-Vasculaire.....	164
1.	Isolement et mise en culture .....	164
2.	Induction et suivi de la différenciation.....	165
a.	Suivi de la différenciation par marquage à l'Oil Red O.....	166
b.	Suivi de la différenciation par mesure de l'expression génique.....	167
B.	Effet de l'activation des CB1R sur la différenciation de cellules de la FSV de souris minces.....	170
1.	Coloration à l'Oil Red O.....	170
2.	Mesure de l'expression génique.....	171
C.	Effets du blocage des CB1R sur la différenciation de la FSV de souris obèses.....	173
1.	Coloration à l'Oil Red O.....	174
2.	Mesure de l'expression génique.....	176
D.	Conclusion.....	178
IV.	Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1.....	180
A.	JD-5037.....	180
1.	Étude chronique.....	181
a.	Méthodologie.....	181
b.	Évolution de la masse corporelle et des paramètres plasmatiques .....	181
c.	Expression génique dans les tissus adipeux .....	183
d.	Production d'ECs par le TAV et le TASC .....	186
2.	Conclusion .....	187
B.	JM-00266.....	187
1.	Étude chronique.....	189
a.	Méthodologie.....	189
b.	Evolution de la masse corporelle et paramètres plasmatiques .....	189
c.	Tests de tolérance .....	190
d.	Conclusion .....	191
2.	Étude de la phosphorylation de Erk ½ sur le modèle de HEK CB1Rm .....	192
a.	Études préliminaires .....	193

b.	Application à l'étude de JM-00266.....	195
3.	Étude de la fixation au récepteur CB1 : Test de binding.....	195
4.	Conclusion.....	196
C.	Caractérisation de nouvelles molécules antagonistes à action périphérique..	197
1.	HR-0133.....	197
a.	Phosphorylation de Erk ½ - HEK CB1Rm.....	199
b.	Étude de la fixation au récepteur CB1 : Test de binding.....	200
c.	GloSensor.....	200
d.	Étude chronique.....	201
e.	Conclusion.....	204
2.	HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155.....	205
a.	Phosphorylation de Erk - HEK CB1Rm.....	205
b.	Conclusion.....	206
	Conclusion et Perspectives.....	207
	Matériel et Méthodes.....	213
I.	Animaux et régimes.....	214
II.	Réactifs.....	214
III.	Expérimentations <i>in vitro</i> .....	215
A.	Explants de tissu adipeux murin.....	215
1.	Production d'ECs par le TAV et le TASC de souris minces et obèses.....	215
2.	Optimisation de quantification du 2-AG.....	216
a.	Production d'ECs pendant 8h en présence d'ACEA.....	216
b.	Production d'ECs pendant 8h en présence d'A784168.....	216
c.	Dégradation spontanée 2-AG pendant 4h.....	216
d.	Production d'ECs pendant 4h et surcharge en 2-AG de milieu conditionné par des explants de TA.....	216
e.	Production et dégradation des ECs en présence de MJN110.....	217
i.	Inhibition de dégradation pendant 2h.....	217
ii.	Incubation pendant 2h de production.....	217
B.	Explants de tissu adipeux humain.....	218
C.	Cellules HEK 293 CB1Rm.....	218
1.	Culture des HEK CB1Rm.....	218
2.	Traitement des cellules pour étude de la phosphorylation de Erk ½.....	219

3.	Glosensor.....	219
4.	Test de Binding.....	219
D.	Fraction stroma-vasculaire de souris.....	220
1.	Isolement et mise en culture de la FSV.....	220
2.	Induction de la différenciation.....	220
a.	Différenciation de la FSV issue de TAV de souris minces en présence d'ACEA.....	221
b.	Différenciation de la FSV issue de TAV de souris obèses en présence de Rimonabant.....	221
IV.	Expérimentations animales <i>in vivo</i> .....	222
A.	Inhibition de la dégradation des ECs par JZL-195.....	222
B.	Blocage chronique du SEC.....	222
1.	Gavage au Rimonabant et JD-5037.....	222
2.	Gavage au JM-00266.....	223
3.	Gavage au HR-0133.....	223
C.	Tests de tolérance.....	224
1.	oGTT.....	224
2.	ITT.....	224
3.	ipPTT.....	224
V.	Dosages colorimétriques.....	225
A.	Dosages plasmatiques.....	225
B.	Dosages tissulaires.....	225
1.	Extraction et dosage des protéines du tissu adipeux.....	225
2.	Extraction et dosage des triglycérides hépatiques.....	226
VI.	Coloration Oil Red O.....	226
VII.	Extraction et dosage des ECs par spectrométrie de masse.....	227
VIII.	Extraction de protéines et Western-Blotting.....	228
IX.	Analyse de l'expression génique.....	229
1.	Extraction des ARN de TA.....	229
2.	Extraction des ARN de la FSV.....	229
3.	Réverse-transcription et qPCR.....	229
X.	Analyse statistique.....	232
	Bibliographie.....	233

Références Web.....	293
Annexes.....	294
Liste des publications et présentations .....	325



# Liste des abréviations

---

<b>2-AcG</b> : 2-AcylGlycérol	<b>ASAT</b> : Aspartate AminoTransférase
<b>2-AG</b> : 2-ArachidonoylGlycérol	<b>ATGL</b> : Adipose TriGlycérade Lipase
<b>ABHD</b> : Alpha/Beta-Hydrolase Domain containing	<b>ATP</b> : Adénosine TriPhosphate
<b>AC</b> : Adénylate Cyclase	<b>Axe HPA</b> : Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis
<b>ACBP</b> : AcylCoA Binding Protein	<b>BHE</b> : Barrière Hémato-Encéphalique
<b>ACC</b> : AcétylCoA Carboxylase	<b>BMI</b> : Body Mass Index
<b>ACEA</b> : Arachidonyl-2'-ChloroEthylAmide	<b>BMP</b> : Bone Morphogenic Protein
<b>ACL</b> : ATP Citrate Lyase	<b>BNP</b> : Brain Natriuretic Peptide
<b>ACS</b> : AcylCoa Synthétase	<b>BSA</b> : Bovine Serum Albumine
<b>ACSL</b> : AcylCoA Synthétase Long chain	<b>C/EBP</b> : CCAAT/Enhancer Binding Protein
<b>Ad</b> : Adipocyte	<b>CB1R</b> : Récepteur aux Cannabinoïdes de type 1
<b>ADD1</b> : Adipocyte Determination and Differentiation factor 1	<b>CB2R</b> : Récepteur aux Cannabinoïdes de type 2
<b>ADN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>CBR</b> : Récepteur aux Cannabinoïdes
<b>ADSC</b> : Adipose-Derived Stem Cell	<b>CCL2</b> : C-C motif Chemokine Ligand-2 (MCP-1)
<b>AEA</b> : N-ArachidonoylEthanolamide (Anandamide)	<b>ChREBP</b> : Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein
<b>AG</b> : Acide Gras	<b>CM</b> : Chylomicron
<b>AGL</b> : Acide Gras Libres	<b>CREB</b> : cAMP Regulatory Element Binding Protein
<b>AGNE</b> : Acide Gras Non-Estérifié	<b>DAG</b> : DiAcylGlycérol
<b>AGPAT</b> : AcylGlycérolPhosphate Acyl Transférase	<b>DAGL</b> : DiAcylGlycérol Lipase
<b>ALAT</b> : Alanine AminoTransférase	<b>DAMP</b> : Damage Associated Molecular Pattern
<b>AMP</b> : Adénosine MonoPhosphate	<b>DGAT</b> : DiacylGlycérol Acyl Transférase
<b>AMPc</b> : AMP cyclique	<b>DHA</b> : Acide DocosaHexaénoïque
<b>AMPK</b> : AMP-activated protein Kinase	<b>DHEA</b> : N-DocosaHexaénoylEthanolAmide
<b>Angptl4</b> : Angiopoïétine-like 4	<b>DIO</b> : Diet-Induced Obesity
<b>ANP</b> : Atrial Natriuretic Peptide	
<b>apoB</b> : Apolipoprotéine B	
<b>ARN</b> : Acide RiboNucléique	

<b>DIO2</b> : Déionidase de Type 2	<b>GTP</b> : Guanosine TriPhosphate
<b>DIT</b> : Diet-Induced Thermogenesis	<b>HDL</b> : Lipoprotéine de Haute Densité
<b>DPP-4</b> : DiPeptidylPeptidase-4	<b>HF</b> : High Fat
<b>DT2</b> : Diabète de Type II	<b>HGF</b> : Hepatocyte Growth Factor
<b>EBF2</b> : Early B-cell Factor 2	<b>HIF-1<math>\alpha</math></b> : Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$
<b>EC</b> : EndoCannabinoïde	<b>HLH</b> : Helix Loop Helix
<b>EPEA</b> : N-EicosaPentaénoylEthanolAmide	<b>HSL</b> : Homono-Sensitive Lipase
<b>F</b> : Fibrose	<b>IGF-1</b> : Insulin-like Growth Factor 1
<b>FA</b> : Fatty Acid	<b>IL-10</b> : Interleukine-10
<b>FAAH</b> : Fatty Acid Amide Hydrolase	<b>IL-1<math>\beta</math></b> : Interleukine-1 $\beta$
<b>FABP</b> : Fatty Acid Binding Protein	<b>IL-6</b> : Interleukine-6
<b>FABP<sub>pm</sub></b> : Fatty Acid Binding Protein plasma membrane	<b>IL-8</b> : Interleukine-8
<b>FAS</b> : Fatty Acid Synthase	<b>IMC</b> : Indice de Masse Corporelle
<b>FAT/CD36</b> : Fatty Acid Translocase / Cluster of Differentiation 36	<b>iNOS</b> : Nitric Oxide Synthase inductible
<b>FATP</b> : Fatty Acid Transport Protein	<b>IRS</b> : Insulin Receptor Substrate
<b>FSV</b> : Fraction Stroma-Vasculaire	<b>JNK</b> : c-Jun N-terminal Kinase
<b>FTO</b> : fat mass and obesity associated	<b>LEA</b> : N-LinoléoylEthanolAmide
<b>GABA</b> : acide $\gamma$ -aminobutyrique	<b>LF</b> : Low Fat
<b>GC</b> : Guanylate Cyclase	<b>LG</b> : 2-LinoléoylGlycérol
<b>GDE1</b> : GlycérophosphoDiEsterase 1	<b>LHS</b> : Lipase Hormono-Sensible
<b>G<sub>i</sub></b> : protéine inhibitrice de liaison au GTP	<b>LPA phosphatase</b> : Lysophosphatidique Acide phosphatase
<b>GIP</b> : Gastric Inhibitory Polypeptide	<b>LPL</b> : Lipoprotéine Lipase
<b>GIPR</b> : Récepteur au GIP	<b>LPS</b> : LipoPolySaccharide
<b>GLP-1</b> : Glucagon-Like Peptide-1	<b>Lyso-PLC</b> : LysoPhosphoLipase C
<b>GLP-1R</b> : Récepteur au GLP-1	<b>MAG</b> : MonoAcylGlycérol
<b>GMPc</b> : Guanosine MonoPhosphate cyclique	<b>MAGL</b> : MonoAcylGlycérol Lipase
<b>GPAT</b> : Glycérol Phosphate Acyl Transférase	<b>MAP kinase</b> : Mitogen-Activated Protein kinase
<b>GPR</b> : G Protein-coupled Receptor	<b>MC</b> : Milieu Conditionné
<b>G<sub>s</sub></b> : protéine stimulatrice de liaison au GTP	<b>MCC</b> : Milieu de Culture Complet
	<b>MCP-1</b> : Monocyte Chemoattracting Protein-1 (CCL2)

<b>MCV</b> : Maladies CardioVasculaires	<b>PEA</b> : N-PalmitoylEthanolAmide
<b>MGL</b> : MonoGlycérade Lipase	<b>PEPCK</b> : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
<b>MSC</b> : Mesenchymal Stem Cell	<b>PG</b> : PeptidoGlycane
<b>NA</b> : NorAdrénaline	<b>PI3K</b> : PhosphatidylInositol Kinase 3
<b>NAAA</b> : N-Acylethanolamine hydrolysing Acid Amidase	<b>PIB</b> : Produit Intérieur Brut
<b>NAE</b> : N-AcylEthanolamine	<b>PKA</b> : Protéine Kinase A
<b>NAPE</b> : N-Acyl-PhosphatidylEthanolamine	<b>PKB</b> : Protéine Kinase B (Akt)
<b>NAPE-PLD</b> : NAPE-PhosphoLipase D	<b>PKG</b> : Protéine Kinase G
<b>NASH</b> : Non-Alcoholic SteatoHepatitis	<b>PLA1</b> : PhosphoLipase A1
<b>NE</b> : NorEpinephrine	<b>PLC</b> : PhosphoLipase C
<b>NFκB</b> : Nuclear Factor-κB	<b>POEA</b> : N-PalmitOléoylEthanolAmide
<b>NHE</b> : Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchanger	<b>PPAR</b> : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
<b>NKT</b> : cellules T Natural Killer	<b>PREF-1</b> : Preadipocyte Factor-1
<b>NLRP3</b> : NOD-Like Receptor family Pyrin domain-containing 3	<b>PTX</b> : toxine pertussique
<b>NOD1</b> : Domaine d'Oligomérisation de liaison Nucléotidique-1	<b>RCPG</b> : Récepteur Couplé aux Protéines G
<b>NPR</b> : Natriuretic Peptide Receptor	<b>RE</b> : Réticulum Endoplasmique
<b>NPY</b> : NeuroPeptide Y	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen Species
<b>OEA</b> : N-OléoylEthanolAmide	<b>SCD1</b> : Stéaroyl-CoA Désaturase-1
<b>OG</b> : 2-OléoylGlycérol	<b>SEA</b> : N-StéaroylEthanolAmide
<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé	<b>SEC</b> : Système EndoCannabinoïde
<b>ORO</b> : Oil Red O	<b>siRNA</b> : small interfering RNA
<b>P/S</b> : Pénicilline / Streptomycine	<b>SM</b> : Syndrome Métabolique
<b>PAI-1</b> : Plasminogen Activator Inhibitor-1	<b>SNP</b> : Single Nucleotide Polymorphism
<b>PAMP</b> : Pathogen Associated Molecular Pattern	<b>SNS</b> : Système Nerveux Sympathique
<b>PAP</b> : Acide Phosphatidique Phosphatase	<b>Src</b> : Tyrosine kinase Src
<b>PBS</b> : Phosphate Buffer Saline	<b>SREBP-1c</b> : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
<b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction	<b>SVF</b> : Sérum de Veau Foetal
<b>PDE</b> : PhosphoDiEestérase	<b>T3</b> : Triiodothyronine
<b>PDGFR</b> : Platelet-Derived Growth Factor	<b>T4</b> : Hormone thyroxine
	<b>TA</b> : Tissu Adipeux

**TASC** : Tissu Adipeux Sous-Cutané  
**TAV** : Tissu Adipeux Viscéral  
**TG** : TriGlycérine  
**TGF $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**TLR** : Toll-Like Receptor  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**TPSA** : Topological Polar Surface Area  
**TRPV1** : Transient Receptor Potential  
Vanilloïde-1  
**UCP1** : UnCoupling Protein-1  
**UPR** : Unfolded Protein Response  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth  
Factor  
**VLDL** : Very Low Density Lipoprotein  
**VSMC** : Vascular Smooth Muscle Cell  
**WHR** : Waist Hips Ratio  
 **$\alpha$ MSH** :  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating  
Hormone  
 **$\alpha$ SMA** : Smooth Muscle Actin  $\alpha$   
 **$\Delta^9$ -THC** :  $\Delta^9$ -TétraHydroCannabinol

# Table des figures

---

Figure 1. Facteurs impliqués dans le développement de l'obésité (à partir de Faucher & Poitou, 2016).....	28
Figure 2. Obésité et complications métaboliques [6].....	32
Figure 3. Obésité androïde et obésité gynoïde (à partir de [7]). .....	34
Figure 4. Mécanisme de thermogenèse induite par l'alimentation et le froid dans le tissu adipeux brun. (Bonet et al., 2005).....	36
Figure 5. Principaux dépôts de tissu adipeux chez la souris (A) et chez l'Homme (B) (Meiliana & Wijaya, 2014). .....	39
Figure 6. Représentation schématique de la diversité cellulaire du tissu adipeux blanc (Lukaszewski, 2011).....	40
Figure 7. Sécrétion d'adipokines et signalisation paracrine dans le tissu adipeux humain (Fain, 2010).....	42
Figure 8. Mécanismes moléculaires de l'adipogenèse (à partir de Ghaben & Scherer, 2019). .....	44
Figure 9. L'insuline est le régulateur majeur du métabolisme énergétique (Taylor, 1999). .....	46
Figure 10. Représentation schématique de la fonction de stockage adipocytaire (à partir de Alligier et al., 2013).....	47
Figure 11. Synthèse et dégradation des triglycérides dans l'adipocyte (à partir de Alligier et al., 2013).....	48
Figure 12. Lipolyse adipocytaire (à partir de Lafontan & Langin, 2009).....	49
Figure 13. Voies principales de régulation de la lipolyse dans l'adipocyte par les catécholamines (à partir de Lafontan & Langin, 2009). .....	51
Figure 14. Voie principale de régulation de la lipolyse dans l'adipocyte par l'insuline (à partir de Lafontan & Langin, 2009).....	52
Figure 15. Voie principale de régulation de la lipolyse dans l'adipocyte par les peptides natriurétiques (à partir de Lafontan & Langin, 2009). .....	54
Figure 16. Action coordonnée de la périlipine et de la LHS après stimulation de la lipolyse par l'isoprotérénol [8].....	55
Figure 17. Lipolyse par les lipases cytosoliques et par lipophagie (Singh & Cuervo, 2012). .....	56

Figure 18. Mécanismes d'expansion du TA conséquences métaboliques (Ghaben & Scherer, 2019). .....	61
Figure 19. La nature des sécrétions adipocytaires varie en fonction de l'origine du tissu adipeux et du statut pondéral (Laurent et al., 2014). .....	62
Figure 20. Mécanismes majeurs à l'origine de l'inflammation du TA au cours de l'obésité (à partir de Sun et al., 2012). .....	64
Figure 21. Obésité, inflammation et mort cellulaire (à partir de Sun et al., 2012). .....	65
Figure 22. Obésité, inflammation et microbiote intestinal (à partir de Sun et al., 2012). .....	66
Figure 23. Obésité, recrutement et polarisation des macrophages adipeux (Dalmas et al., 2011). .....	67
Figure 24. Aspect microscopique des dépôts de fibrose dans le tissu adipeux humain (Dalmas et al., 2011). .....	68
Figure 25. Schéma récapitulatif des causes majeures de l'insulinorésistance (à partir de Boucher et al., 2014). .....	69
Figure 26. Expansion du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité (à partir de Longo et al., 2019). .....	71
Figure 27. Schéma global du système endocannabinoïde (Cani et al., 2014). .....	77
Figure 28. Voies de synthèse et dégradation de l'AEA (Cascio & Marini, 2015). .....	82
Figure 29. Voies de synthèse et dégradation du 2-AG (Cascio & Marini, 2015). .....	82
Figure 30. Régulation de la transmission synaptique par le SEC (Zlebnik & Cheer, 2016). .....	85
Figure 31. Voies de signalisation dépendantes des CBR (d'après Cayman Chemical et Zou & Kumar, 2018). .....	87
Figure 32. Signalisation des CB1R dépendante des protéines G. .....	90
Figure 33. Signalisation des CB1R par les $\beta$ -arrestines (à partir de Nogueras-Ortiz & Yudowski, 2016). .....	91
Figure 34. Illustration schématique de la localisation et du rôle du système endocannabinoïde dans la régulation des processus métaboliques (Schulz et al., 2021). .....	92
Figure 35. Illustration schématique de la fonction des CBR dans le métabolisme hépatique (Bazwinsky-Wutschke et al., 2019). .....	96
Figure 36. Les différentes générations d'antagonistes des CB1R (Cinar et al., 2020). ....	113

Figure 37. Production des différents endocannabinoïdes (ECs) sur 4h et quantité produite à 1h par le TAV et le TASC de souris minces. ....	135
Figure 38. Production des ECs sur 4h produits par du TAV de souris minces en présence et en absence de JZL-195.....	136
Figure 39. Production des ECs sur 4h par le TAV et le TASC de souris minces en présence de JZL-195.....	138
Figure 40. Production des différents ECs sur 4h et quantité produite à 1h par le TAV de souris obèses. ....	139
Figure 41. Production des ECs sur 4h par le TAV et le TASC de souris obèses en présence de JZL-195.....	140
Figure 42. Production des ECs sur 4h par le TAV de souris minces et obèses en présence de JZL-195.....	141
Figure 43. Production des ECs sur 4h par le TASC de souris minces et obèses en présence de JZL-195.....	143
Figure 44. Production des ECs sur 4h par le TAV de souris obèses en présence de JZL-195 et d'antagonistes des CB1R.....	144
Figure 45. Production des ECs sur 4h par le TASC de souris obèses en présence de JZL-195 et d'antagonistes des CB1R.....	145
Figure 46. Production des ECs sur 4h par le TAV de souris minces en présence de JZL-195 et d'antagonistes des CB1R.....	147
Figure 47. Représentation schématique de l'effet probable du Rimonabant sur la production d'ECs par des explants de tissu adipeux.....	149
Figure 48. Cinétique de production des différents ECs sur 4h et quantité produite à 1h par le TAV de sujets obèses. ....	150
Figure 49. Accumulation des ECs sur 4h à partir de TAV d'humains obèses en présence ou non de JZL-195. ....	151
Figure 50. Accumulation des ECs sur 4h à partir de TASC d'humains obèses en présence ou non de JZL-195.....	152
Figure 51. Dosage des ECs produits à partir de TAV et de TASC de sujets obèses.....	153
Figure 52. Dosage des ECs produits à partir de TAV et de TASC de sujets obèses en présence de JZL-195. ....	154
Figure 53. ECs présents dans le TAV après traitement in vivo au JZL-195.....	156
Figure 54. Production d'ECs sur 8h en présence ou en absence d'ACEA. ....	157

Figure 55. Production d'ECs en présence de l'antagoniste de TRPV1 A784168. ....	158
Figure 56. Dégradation spontanée du 2-AG dans le milieu de culture. ....	159
Figure 57. Milieu conditionné durant 1, 2, 3 ou 4h avec du TAV puis incubé 1, 2, 3 ou 4h respectivement avec du 2-AG. ....	160
Figure 58. Dégradation d'ECs sur 2h en présence de l'inhibiteur de la MAGL MJN110. ....	161
Figure 59. Production d'ECs sur 2h en présence de MJN110 à 100µM. ....	162
Figure 60. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV. ....	165
Figure 61. Marquage à l'Oil Red O à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation et détermination spectrophotométrique de la quantité d'Oil Red O intracellulaire. ....	166
Figure 62. Mesures d'expression génique à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation. ....	168
Figure 63. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées à l'ACEA. ....	170
Figure 64. Marquage à l'Oil Red O à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation en présence ou non d'ACEA. ....	171
Figure 65. Mesures d'expression génique à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 en présence ou non d'un traitement à l'ACEA. ....	172
Figure 66. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées au Rimonabant. ....	174
Figure 67. Marquage Oil Red O à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation à partir de FSV de souris obèse en présence ou non de Rimonabant. ....	175
Figure 68. Mesures d'expression génique à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 à partir de FSV de souris obèses en présence ou non de Rimonabant. ....	177
Figure 69. Mesure d'expression génique à J0 à partir de FSV de souris minces et obèses. ....	178
Figure 70. Structure moléculaire (A) du Rimonabant et (B) de JD-5037. ....	181
Figure 71. Variation de la masse corporelle pendant les 14 jours de traitement. ....	182
Figure 72. Glycémie à jeun et masse des tissus adipeux. ....	182
Figure 73. Paramètres plasmatiques. ....	183
Figure 74. Expression génique dans le TAV. ....	184
Figure 75. Expression génique dans le TASC. ....	185



Figure 76. Production d'ECs sur 1h par le TAV et le TASC prélevés sur des souris traitées 14 jours au JD-5037 et au Rimonabant.....	186
Figure 77. Structure moléculaire de JM-00266. ....	188
Figure 78. Masse corporelle, prise alimentaire, TG hépatiques et masse du TAV. ....	189
Figure 79. Paramètres plasmatiques. ....	190
Figure 80. oGTT, ITT et ipPTT.....	191
Figure 81. Voies de signalisation dépendantes du récepteur CB1. ....	192
Figure 82. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec les agonistes CB1R AEA, ACEA et 2-AG. ....	193
Figure 83. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec JD-5037, (R)-MRI-1867 et (S)-MRI-1867.....	194
Figure 84. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec JM-00266. ....	195
Figure 85. Tests de fixation aux récepteurs CB1 murins du Rimonabant et de JM-00266. ....	196
Figure 86. Superposition de la cristallisation de AM6538 (orange) avec HR-0152 (rose) dans la poche de fixation du récepteur CB1.....	197
Figure 87. Données prédictives issues du logiciel SwissADME concernant HR-0133.....	198
Figure 88. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec HR-0133.....	199
Figure 89. Tests de fixation aux récepteurs CB1 murins du Rimonabant et de HR-0133. ....	200
Figure 90. Analyse par GloSensor de la réponse à HR-0133.....	201
Figure 91. Courbes de poids et prise alimentaire.....	202
Figure 92. oGTT et glycémie à jeun.....	202
Figure 93. Masse du foie et du TAV ramenées à la masse corporelle. ....	203
Figure 94. Paramètres plasmatiques. ....	204
Figure 95. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155.....	206
Figure 96. Résumé schématique de l'antagoniste des CB1R biaisé MRI-1891 (Z. Liu et al., 2021). ....	211
Figure 97. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées à l'ACEA.....	221
Figure 98. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées au Rimonabant.....	222

# Table des tableaux

---

Tableau 1. Tranches standards de l'Indice de Masse Corporelle (OMS). .....	26
Tableau 2. Prévalence de certaines pathologies en fonction de la catégorie d'IMC (ESPS 2012). .....	33
Tableau 3. Différences entre les effets lipolytiques et anti-lipolytiques au niveau du TAV et du TASC (à partir de Lafontan, 2013). .....	57
Tableau 4. Facteurs sécrétés par le tissu adipeux (Badimon et al., 2015; Ronti et al., 2006). .....	59
Tableau 5. Rôles principaux du SEC au niveau rénal (Chua et al., 2019). .....	101
Tableau 6. Le système endocannabinoïde dans l'obésité et le diabète de type II (Di Marzo, 2008). .....	109
Tableau 7. Stades de développement clinique des antagonistes CB1R de première génération (Adapté de Cinar et al., 2020). .....	110
Tableau 8. Transitions énergétiques utilisées dans la quantification des ECs par spectrométrie de masse. ....	227
Tableau 9. Programme de réverse-transcription des ARN. ....	230
Tableau 10. Programme de qPCR sur ADNc murin. ....	230
Tableau 11. Séquences des amorces sens et anti-sens murines.....	231

# Table des annexes

---

Annexe 1. Régime standard.....	295
Annexe 2. Régime contrôle.....	296
Annexe 3. Régime hyperlipidique.....	297
Annexe 4. Synopsis du protocole d'étude humaine « CB1R » (2015-A01619-40).....	298
Annexe 5. Synopsis du protocole d'étude humaine « ENDOCATA » (2020-A02388-31). .....	303
Annexe 6. Muller et al., Chemical Synthesis, Pharmacokinetic Properties and Biological Effects of JM-00266, a Putative Non-Brain Penetrant Cannabinoid Receptor 1 Inverse Agonist.....	307

# Introduction

---

## I. L'obésité

L'obésité est généralement définie comme un excès de masse corporelle pouvant nuire à la santé [1]. Elle peut être estimée via différents marqueurs tels que l'IMC ou Indice de Masse Corporelle (BMI pour Body Mass Index en anglais), correspondant au rapport entre la masse en kilogramme et la taille en mètre élevée au carré, ou encore le rapport taille hanches ou « Waist Hips Ratio » (WHR). Un patient est considéré en surpoids lorsque son IMC est égal ou dépasse 25 kg/m<sup>2</sup>, en obésité avec une valeur supérieure à 30 kg/m<sup>2</sup> et en obésité morbide au-delà de 40 kg/m<sup>2</sup> (**Tableau 1**).

**Tableau 1. Tranches standards de l'Indice de Masse Corporelle (OMS).**

<b>IMC</b>	<b>Interprétation</b>
<b><i>IMC &lt; 18,5</i></b>	Maigreur
<b><i>18,5 ≤ IMC &lt; 25</i></b>	Corpulence normale
<b><i>25 ≤ IMC &lt; 30</i></b>	Surpoids
<b><i>30 ≤ IMC</i></b> <b><i>Obésité</i></b>	Obésité modérée (Classe I) : <b><i>30 ≤ IMC &lt; 35</i></b>
	Obésité sévère (Classe II) : <b><i>35 ≤ IMC &lt; 40</i></b>
	Obésité morbide (Classe III), regroupant les risques les plus lourds : <b><i>40 ≤ IMC</i></b>

L'obésité provient d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Ce dérèglement de la balance énergétique est causé par plusieurs facteurs pouvant être d'origine génétique, environnementale, comportementale et/ou économique, aboutissant à une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique et une accumulation excessive de graisses. Cette pathologie est considérée comme étant le facteur le plus critique dans l'émergence de maladies métaboliques (Engin, 2017). Selon les chiffres de l'OMS, en 2016, 600 millions d'adultes dans le monde souffraient d'obésité. En 2010, 3,4 millions de décès dans le monde seraient dus au surpoids. Au cours de l'année 2000 aux États-Unis, 15% des décès étaient attribués au surpoids et plusieurs études prédisent une surmortalité mondiale d'ici à 2030 en lien avec l'obésité (Hruby & Hu, 2015; F. B. Hu, 2008; Olshansky et al., 2005; Y. Wang et al., 2008). Elle est associée à de nombreuses comorbidités (définies comme des pathologies fréquemment retrouvées associées à une maladie primaire) qui comprennent, entre autres, le diabète de type II (DT2) et les maladies cardio-vasculaires (MCV).

## A. Épidémiologie

L'obésité touche toutes les catégories de la population et peut se déclarer de manière très précoce. En effet, une estimation de l'enquête nationale américaine sur la santé et la nutrition (National Health and Nutrition Examination Survey), menée entre 1999 et 2010 sur les données collectées en 2007-2008, a évalué la proportion d'enfants de 2 à 19 ans en surpoids aux États-Unis. Selon cette étude, le surpoids atteint près d'un tiers de la population de cette tranche d'âge avec environ 17% d'enfants considérés comme obèses avec un IMC supérieur au 95<sup>ème</sup> percentile du diagramme de croissance (Ogden et al., 2012).

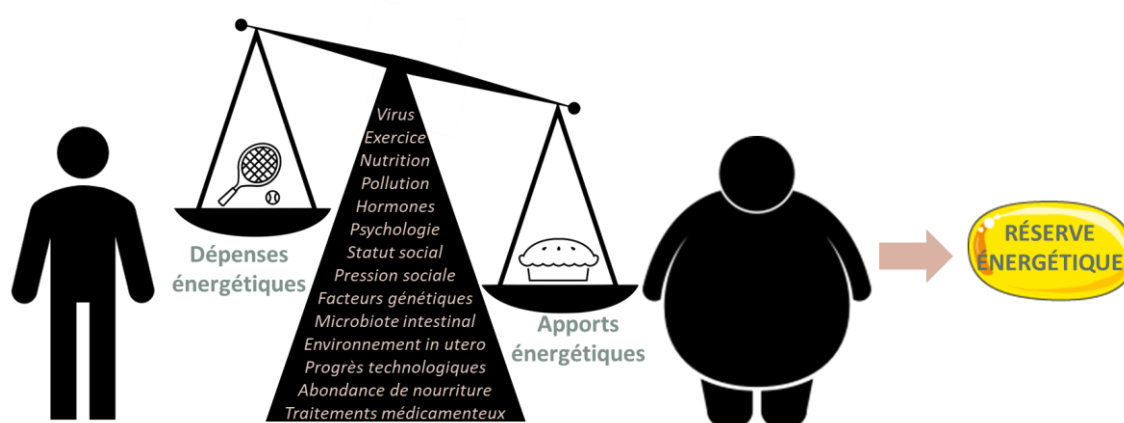
Actuellement, la prévalence de l'obésité au niveau mondial oscille entre 37 et 38% tout sexe confondu avec une disparité importante selon le PIB : la prévalence de l'obésité est plus importante dans les pays « développés » que dans les pays « en voie de développement » (Chooi et al., 2019; Ng et al., 2014). Les 30 dernières années, un accroissement significatif de la prévalence de l'obésité a été observé avec une augmentation chez l'adulte de 27,5% entre 1980 et 2013 (J. M. Lee et al., 2010). Les États-Unis notamment ont vu cette proportion passer de 30,5% en 2000 à 42,4% en 2018 [2]. L'obésité infantile est un facteur important puisqu'elle prédispose la corpulence à l'âge adulte. Dans le monde, près de 40 millions d'enfants de moins de 5 ans sont estimés en surpoids ou en situation d'obésité, ce qui n'est pas sans conséquence aussi bien sur le plan de la santé que d'un point de vue économique [3]. Les États-Unis présentent le taux d'obésité infantile le plus élevé au monde (12,7%) opposé au Bangladesh avec le taux le plus faible (1,2%) (Gregg & Shaw, 2017). Au total, plus de 40 millions d'enfants sont estimés en surpoids ou obèses et 92 millions sont à risque de développer un surpoids (de Onis et al., 2010).

En France, plusieurs études menées entre 1997 et 2013 ont permis d'évaluer la prévalence de l'obésité et ses variations au cours des dernières années. La première étude mise en place a été l'étude ObEpi. Elle a permis la collecte de données sur 25 000 personnes suivies tous les trois ans entre 1997 et 2012 et a démontré une forte augmentation de la prévalence de l'obésité au sein de la population française avec 8,5% de personnes en situation d'obésité au début de l'étude en 1997 contre 15% à la fin de l'étude en 2012 (Eschwege et al., 2015; Moisan et al., 2013). Ce chiffre atteint 17% en 2020

avec 47,3% de la population française estimée en surpoids ou obèse, selon la mise à jour de l'étude ObEpi [4]. Trois autres études lui ont ensuite succédé : l'étude nationale nutrition santé (ENNS) en 2006 (Castetbon et al., 2008), la cohorte Constances en 2013 (Zins, 2019) et l'étude Esteban entre 2014 et 2016 (Szego et al., 2016). Ces dernières ont confirmé les résultats de l'étude ObEpi, à savoir que l'obésité concerne majoritairement les hommes en France et que sa prévalence est inversement proportionnelle au niveau d'étude et de revenus. L'âge est aussi un facteur important puisqu'il entraîne une augmentation de sa prévalence pour atteindre, chez les hommes et les femmes, respectivement 20,8 et 18,8% pour la tranche d'âge 60-69 ans. Concernant l'obésité infantile en France, sa prévalence est plus faible que dans la plupart des pays européens avec 17% d'enfants en surpoids et 3,9% d'enfants obèses en 2015 chez les 6-17 ans, d'après l'étude Esteban (Szego et al., 2016).

## B. Origines

Les causes de l'obésité sont multiples. Cet ensemble de facteurs engendre un déséquilibre de la balance énergétique favorisant l'accumulation excessive de graisses à l'origine de l'obésité (**Figure 1**).



**Figure 1. Facteurs impliqués dans le développement de l'obésité (à partir de Faucher & Poitou, 2016).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art.

## 1. Facteurs environnementaux et comportementaux

Les causes considérées par l'OMS comme majoritaires dans le développement de l'épidémie de l'obésité sont les facteurs environnementaux et comportementaux. En effet, au cours des dernières décennies, les modes de vie ont évolué vers une alimentation plus riche en énergie mais aussi plus grasse et plus sucrée. En parallèle, un manque d'activité physique spontanée quotidienne ainsi qu'une augmentation globale de la sédentarité, accentuent le déséquilibre de la balance énergétique. Cette sédentarité provient majoritairement de l'évolution technologique, à la fois sur le lieu de travail avec l'automatisation des procédés trop contraignants physiquement pour les employés, mais aussi avec la diversification des moyens de transport, diminuant ainsi la distance parcourue quotidiennement.

## 2. Facteurs génétiques

De nombreuses recherches ont aussi étudié l'influence de facteurs génétiques sur le développement de l'obésité. De manière générale, 40 à 70% de la variation de l'IMC entre individus résulte de différences génétiques. En pratique, l'influence de la génétique sur l'obésité est classée en deux groupes : on distingue alors **obésité monogénique** et **obésité commune**.

L'obésité monogénique correspond à des formes globalement rares d'obésité pour lesquelles la modification d'un gène est déterminante dans le développement de la maladie. L'une des premières mutations à avoir été identifiée concerne le gène codant pour la leptine (gène *ob*) ou pour son récepteur (*ob-R*). La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux (TA), fortement impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique permettant ainsi le contrôle de la masse grasse. Des mutations du gène codant pour la leptine ou son récepteur ont été identifiées comme responsables d'obésités sévères et précoces, caractérisées par une hyperphagie due à une diminution de la sensation de satiété, accompagnée d'une réduction de la dépense énergétique (Montague et al., 1997). D'autres mutations ont ensuite été identifiées comme celles intervenant dans la voie des mélanocortines. Le récepteur de la mélanocortine-4 (MC4R) est le récepteur neuronal prédominant de la mélanocortine



situé dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Son activation par l'hormone de stimulation  $\alpha$ -mélanocytaire ( $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone -  $\alpha$ MSH) induit une hypophagie. Chez l'Homme, les mutations du gène *MC4R* sont une forme commune d'obésité monogénique (Dubern et al., 2001). En effet, des études chez des adultes atteints d'obésité morbide ont impliqué des mutations du gène *MC4R* dans près de 4% des cas. A l'heure actuelle, près de 90 mutations différentes ont été répertoriées chez les patients obèses, adultes et enfants confondus, avec une incidence de 0,5 à 2% dans le cadre de l'obésité modérée et jusqu'à 4% dans le cadre de l'obésité sévère.

L'obésité commune est considérée comme une maladie polygénique qui résulte de la mutation de plusieurs gènes de prédisposition, associée à des facteurs environnementaux (sédentarité, suralimentation, facteurs psychologiques). Des études pangénomiques menées depuis 2005 ont permis de répertorier différents variants géniques associés à une augmentation de l'IMC et à un risque accru d'obésité. Une modification du gène *FTO* (fat mass and obesity associated) entraîne une masse corporelle plus élevée que la moyenne et une obésité plus fréquente (Frayling et al., 2007). Néanmoins, lorsque des sujets présentant ce variant sont soumis à une activité physique régulière, l'impact sur la masse corporelle est fortement réduit, démontrant ainsi l'importance du mode de vie sur les différents facteurs de prédisposition génétique.

### 3. Microbiote intestinal

De recherches récentes ont aussi démontré l'impact de la diversité du microbiote intestinal sur le comportement alimentaire, l'assimilation des lipides et nutriments et sur le développement de l'obésité. De nombreuses données suggèrent que le microbiote intestinal peut être impliqué dans le développement de l'obésité ainsi que dans le développement des comorbidités qui y sont associées (Burcelin et al., 2011; Cani et al., 2007; Cuevas-Sierra et al., 2019; Muñoz-Garach et al., 2016). Il a déjà été observé que sa composition variait entre des sujets sains et obèses, suggérant ainsi qu'une dysbiose pourrait contribuer à des modifications de la masse corporelle. Des interactions complexes entre facteurs génétiques, microbiote intestinal et alimentation ont été identifiées dans le cas de développement de l'obésité et du syndrome métabolique (SM) (Cuevas-Sierra et al., 2019). Le microbiote peut influencer sur le métabolisme de l'hôte par

l'action notamment de métabolites induisant des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et l'expression de micro-ARNs. Le microbiote peut aussi sécréter des acides gras (AG) à courtes chaînes ou protéines membranaires modulant, entre autres, l'appétit de l'hôte, la lipogenèse, la néoglucogenèse et l'inflammation (J.-L. Liu et al., 2020; Puddu et al., 2014).

La flore intestinale est également impliquée dans l'installation de la résistance à l'insuline et du diabète, la modification de la perméabilité intestinale, le phénomène d'endotoxémie, l'interaction avec les acides biliaires et la variation de la proportion de TA brun. La grande variété de ces effets démontre l'importance de cette diversité de micro-organismes dans le développement de l'obésité mais aussi du diabète (Muñoz-Garach et al., 2016). Un lien a aussi été établi entre psychologie, obésité et microbiote intestinal. En effet, des désordres psychologiques peuvent modifier fortement le comportement alimentaire et ainsi induire une prise de poids importante ainsi qu'un dérèglement de la flore intestinale (Faucher & Poitou, 2016).

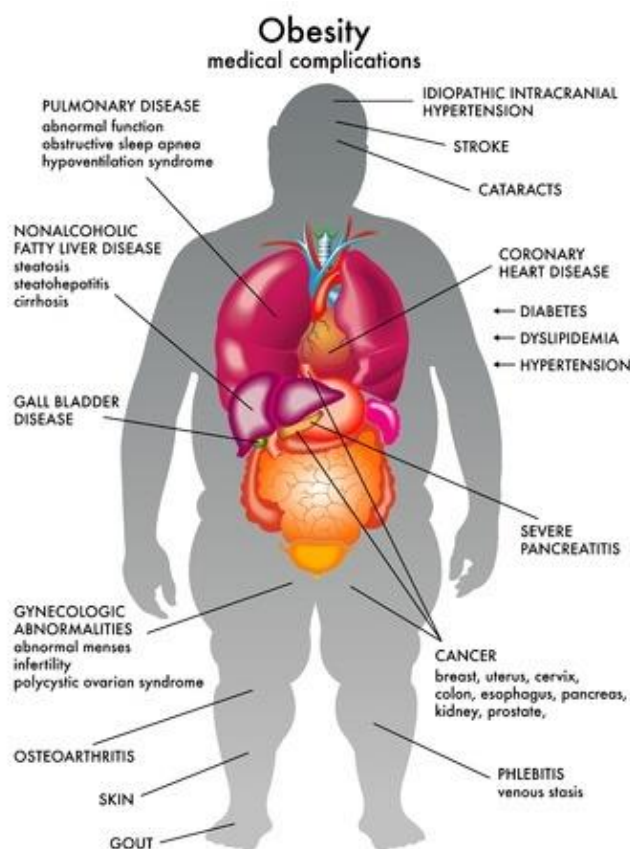
Ainsi de nouvelles approches, utilisant des prébiotiques, probiotiques, post-biotiques ou encore des techniques de transplantations de microbiote fécal, émergent pour traiter la dysbiose intestinale (Cuevas-Sierra et al., 2019).

### C. Conséquences de l'obésité

L'obésité constitue le facteur le plus critique dans l'émergence de maladies métaboliques. Des individus présentant une forte adiposité intra-abdominale sont statistiquement plus à risque de développer une résistance à l'insuline et un SM (**Figure 2**). Le SM est un trouble complexe qui est considéré comme une épidémie mondiale et étroitement lié à l'obésité. Le SM est défini par un ensemble de facteurs interconnectés qui augmente directement le risque de MCV et de DT2 (Galassi et al., 2006). Ses principaux composants sont la dyslipidémie (caractérisée par des taux élevés de triglycérides (TG) et de lipoprotéines riches en TG contenant de l'apolipoprotéine B (apoB) et un faible taux de lipoprotéines de haute densité (HDL), l'élévation de la pression artérielle et une dérégulation de l'homéostasie du glucose (glycémie à jeun élevée). L'obésité abdominale

et/ou la résistance à l'insuline ont attiré une attention croissante en tant que manifestations principales du syndrome [5].

La forte prévalence de l'obésité, du diabète, des dyslipidémies et de l'hypertension est étroitement liée à l'épidémie mondiale des MCV (Mendis et al., 2015). Les MCV sont la cause majeure de mortalité au monde avec approximativement 17,3 millions de décès par an (Laslett et al., 2012). Le diabète est désigné comme un facteur de risque majeur de MCV chez l'Homme avec 65% des patients diabétiques qui décèdent d'une maladie cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral.



**Figure 2. Obésité et complications métaboliques [6].**

De nombreuses comorbidités sont communément associées à l'obésité comme l'insulinorésistance, l'hypertension artérielle, les apnées du sommeil, l'asthme et la stéatohépatite non-alcoolique (Non-Alcoholic SteatoHepatitis - NASH). Ces comorbidités incluent également des facteurs de risque pour le DT2 telles que l'augmentation du taux de cholestérol, l'hypertension artérielle et la diminution de la tolérance au glucose (Sinha et al., 2002; Weiss et al., 2004). L'obésité est également associée à une augmentation

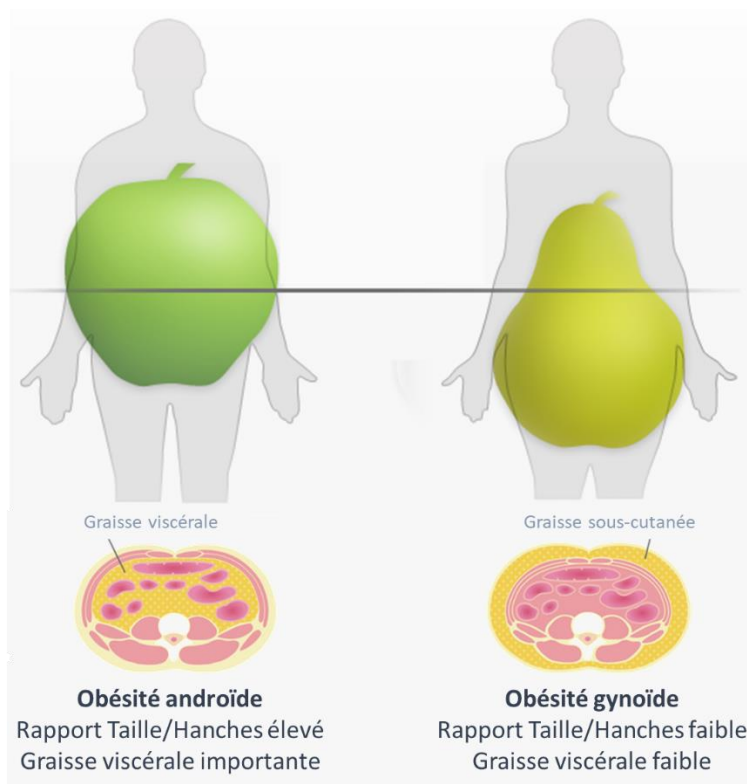
significative du risque de développer des problèmes psychologiques (Pulgarón, 2013) (**Tableau 2**).

**Tableau 2. Prévalence de certaines pathologies en fonction de la catégorie d'IMC (ESPS 2012).**

<i>Population</i>	<b>Diabète</b>	<b>Infarctus</b>	<b>Hypertension artérielle</b>	<b>Dépression</b>	<b>Lombalgie</b>
<i>IMC &lt; 18,5</i>	2,1 %	0,3 %	3,9 %	6,0 %	13,9 %
<i>18,5 ≤ IMC &lt; 25</i>	3,2 %	0,3 %	6,8 %	3,6 %	16,2 %
<i>25 ≤ IMC &lt; 30</i>	9,6 %	0,9 %	15,6 %	5,6 %	22,0 %
<i>30 ≤ IMC</i>	19,3 %	0,9 %	26,7 %	7,7 %	24,6 %
<b><i>Population générale</i></b>	<b>6,7 %</b>	<b>0,6 %</b>	<b>12,9 %</b>	<b>4,5 %</b>	<b>19,0 %</b>

L'obésité est corrélée à des problèmes liés à l'estime de soi, l'image du corps, une diminution de la qualité de vie, un isolement social et de la discrimination (Delamater et al., 2017; Pulgarón, 2013; Schwimmer et al., 2003). En parallèle, un état dépressif est associé à une augmentation du risque de développement de l'obésité et à une augmentation de l'IMC (Goodman & Whitaker, 2002). A plus long terme, les conséquences médicales et psychologiques de l'obésité, notamment chez l'enfant, induisent une mortalité précoce accrue à l'âge adulte (Reilly & Kelly, 2011).

Cependant, tout le monde n'est pas égal face à l'obésité. En effet, les facteurs de risques et la morbidité qui lui sont associés varient fortement d'un individu à l'autre, notamment en fonction de la répartition de la masse grasse. En effet, l'intégralité des patients obèses n'est pas insulino-résistant ou à fort risque pour le diabète et les MCV (Hall et al., 2002). Les sujets atteints d'une obésité **gynoïde**, c'est-à-dire une accumulation de graisses sous-cutanée majoritairement dans la partie basse du corps (au niveau des cuisses et dans la région glutéale), ont un faible risque de développer un SM et un DT2 (**Figure 3**). A contrario, les sujets atteints d'obésité **androïde**, c'est-à-dire présentant une accumulation de graisse dans la partie haute du corps (dépôts de graisse sous-cutanée et viscérale au niveau central-abdominal), ont un fort risque de développer un SM et un DT2. Ainsi, à adiposité égale, les sujets présentant une plus forte proportion de graisse viscérale présentent des complications métaboliques plus importantes (J. P. Després et al., 1990; J.-P. Després et al., 2008).



**Figure 3. Obésité androïde et obésité gynoïde (à partir de [7]).**

L'obésité est donc une maladie du TA et dans le but de mieux comprendre comment son expansion peut conduire à des complications métaboliques, il est important de connaître sa physiologie.

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

### A. Les tissus adipeux

Le TA est dérivé du latin *adeps, adipis* qui signifie graisse. Il est défini comme un tissu conjonctif dont les cellules se chargent de graisse et joue ainsi un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie métabolique (Encyclopédie Larousse). Il existe plusieurs sortes de TA chez les mammifères qui présentent des caractéristiques et des localisations anatomiques distinctes : le TA brun, le TA beige et le TA blanc.

#### 1. Le tissu adipeux brun

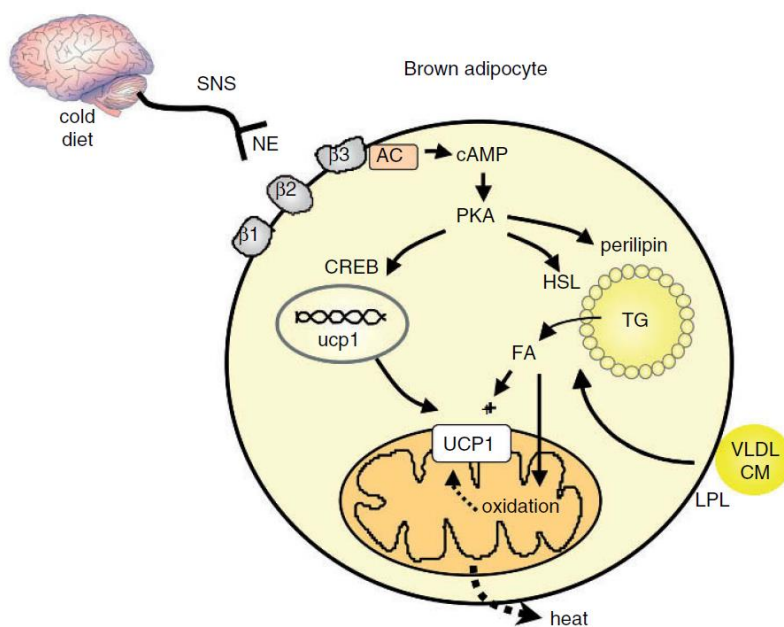
Le TA brun a pour fonction principale la thermogénèse. Ce procédé consiste en la dissipation, sous forme de chaleur, de l'énergie stockée au sein des gouttelettes lipidiques multiloculaires des adipocytes bruns (W. Wang & Seale, 2016).

##### *a. Origines, caractéristiques et structure*

Chez la souris, les dépôts de TA brun se forment pendant l'embryogenèse avant les autres dépôts adipeux, permettant ainsi aux nouveau-nés d'effectuer une thermogénèse « sans frisson » afin de s'acclimater au froid (Billon & Dani, 2009). Des clusters d'adipocytes bruns exprimant le facteur de différenciation majeur des adipocytes : PPAR- $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ), ainsi que la protéine thermogénique UCP1 (Uncoupling Protein-1), sont détectables dans la région interscapulaire au cours du développement embryonnaire (Kajimura et al., 2015). Chez la souris adulte, les principaux dépôts de TA brun sont situés dans la région dorsale antérieure (TA brun interscapulaire, cervical et axillaire). Les nourrissons humains ont également un TA brun interscapulaire avec un profil moléculaire similaire aux rongeurs. Des dépôts supplémentaires chez l'Homme sont situés dans la région périrénale et du cou profond.

**b. Rôle métabolique du tissu adipeux brun**

Contrairement au TA blanc, le TA brun stocke les TG dans des adipocytes multiloculaires en tant que combustible à accès rapide pour la production de chaleur *in situ* par découplage mitochondrial de la phosphorylation oxydative des acides gras libres (AGL). Les AGL issus de la lipolyse adipocytaire alimentent la voie de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale qui produit des substrats pour la chaîne respiratoire. Le gradient électrochimique de protons généré par la chaîne respiratoire va conduire, après dissipation via la protéine découplante UCP1, à un dégagement d'énergie sous forme de chaleur au détriment de la synthèse d'ATP (Bonet et al., 2005). Ce processus thermogénique est vital chez les nouveau-nés exposés au froid et semble être beaucoup moins actif chez les adultes qui ont développé des stratégies supplémentaires (Kajimura et al., 2015). Le mécanisme de régulation est décrit dans la **Figure 4**.



**Figure 4. Mécanisme de thermogénèse induite par l'alimentation et le froid dans le tissu adipeux brun. (Bonet et al., 2005).**

La noradrénaline (NE - Norepinephrine) libérée par le système nerveux sympathique activé (SNS) agit sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, principalement  $\beta_3$ , qui sont couplés par des protéines  $G_s$  à l'adénylate cyclase (AC), et stimule ainsi la génération d'AMPc, qui à son tour active la protéine kinase A (PKA). La PKA phosphoryle la protéine de liaison à l'élément régulateur de l'AMPc (CREB - cAMP Regulatory Element Binding protein) qui entraîne une augmentation de l'expression du gène *ucp1*. La PKA phosphoryle également la lipase hormono-sensible (HSL) et la périlipine (la protéine qui recouvre les gouttelettes lipidiques) déclenchant l'activation de la lipase et la dissociation de la périlipine des gouttelettes lipidiques, activant ainsi la lipolyse des réserves de triglycérides (TG). Les acides gras libérés (FA - Fatty Acid) sont acheminés vers les mitochondries où ils entrent dans la voie de la  $\beta$ -oxydation, qui alimente la thermogénèse. Les acides gras libres agissent également comme des activateurs de l'activité d'UCP1. UCP1 va dissiper le gradient de protons généré par la chaîne respiratoire, conduisant à un dégagement d'énergie sous forme de chaleur. CM : chylomicrons ; VLDL : lipoprotéines de très basse densité ; LPL : lipoprotéine lipase.

L'exposition au froid stimule également l'expansion hyperplasique des dépôts de TA brun via un processus impliquant la prolifération et la différenciation *de novo* de cellules progénitrices. La fraction stroma-vasculaire du TA brun chez l'adulte contient des cellules progénitrices exprimant EBF2 (Early B-cell Factor 2) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGFR $\alpha$  (Platelet-Derived Growth Factor) (W. Wang & Seale, 2016). La signalisation  $\beta$ -adrénergique induit directement la prolifération de ces précurseurs. Des études de lignées démontrent que l'exposition au froid active les précurseurs d'adipocytes bruns induisant une différenciation *de novo* en adipocytes bruns matures. La réponse hyperplasique dépend de l'innervation sympathique et de la fonction des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (W. Wang & Seale, 2016). Les signaux moléculaires contrôlant l'équilibre entre la prolifération et la différenciation de ces précurseurs sont encore indéterminés.

### *c. Le tissu adipeux brun, un nouvel acteur dans la lutte contre l'obésité ?*

Les TA brun tout comme le TA beige (présenté dans la partie suivante) sont les principaux tissus réalisant la thermogénèse. L'exposition au froid ou aux catécholamines active le TA brun, entraînant une augmentation de la dépense énergétique et une diminution de la graisse corporelle (Saito et al., 2020). Par ailleurs, la thermogénèse induite par l'alimentation (DIT – Diet-Induced Thermogenesis), comprend une composante dite « non-obligatoire » liée à l'activation du système nerveux sympathique conduisant à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur dans le TA brun (Habek et al., 2020). La relation inverse entre l'activité du TA brun et la masse grasse corporelle suggère que la dissipation d'énergie par thermogénèse protège contre l'accumulation de graisse corporelle (Kuryłowicz & Puzianowska-Kuźnicka, 2020). Cependant, une question reste encore sans réponse : l'activité réduite du TA brun dans l'obésité est-elle une cause ou une conséquence de cette pathologie ? Au regard de l'influence des niveaux d'activité de la graisse brune sur la masse corporelle et le métabolisme, l'augmentation de la quantité d'adipocytes bruns et/ou de leur activité est considérée comme une stratégie prometteuse dans la lutte contre les maladies métaboliques (Kuryłowicz & Puzianowska-Kuźnicka, 2020).



## 2. Le tissu adipeux beige

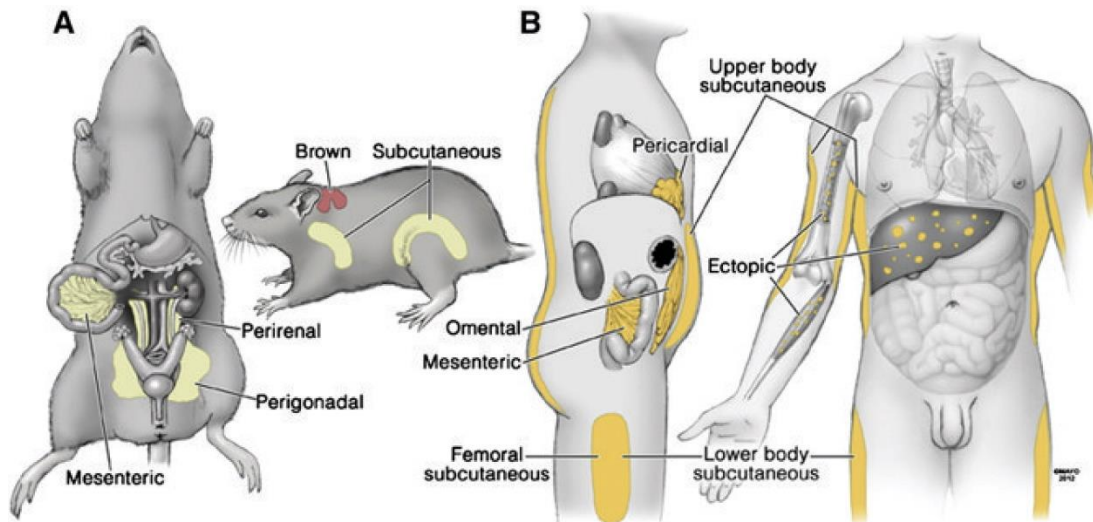
Le TA beige ou « bright » correspond au développement d'adipocytes, exprimant la protéine UCP-1 et présentant un grand nombre de mitochondries, à partir de précurseurs adipogéniques similaires aux adipocytes blancs (W. Wang & Seale, 2016). Ce processus de brunissement n'est observable que sous l'influence de certains stimuli (exposition prolongée au froid ou aux catécholamines) (Hansen & Kristiansen, 2006). En effet, une exposition prolongée au froid conduit à l'apparition d'adipocytes UCP1-positifs dans la plupart des dépôts de TA blanc de souris (Wu et al., 2012).

Les dépôts de TA blanc traditionnels chez l'Homme, y compris le dépôt viscéral et sous-cutané abdominal, abritent des cellules souches mésenchymateuses ou cellules souches adipeuses (ADSCs – Adipose-Derived Stem Cells) qui ont la capacité d'activer un programme de différenciation de la graisse brune (Wu et al., 2012). Les adipocytes beiges, dérivés des ADSCs, sont compétents pour la thermogenèse dépendante d'UCP1 en culture. Cependant, le développement des adipocytes beiges dans le TA blanc humain soulève encore de nombreuses questions. En effet, certains dépôts, comme le TA blanc inguinal (sous-cutané), sont sensibles, tandis que d'autres dépôts comme le dépôt de TA blanc péri-épididymaire (viscéral) semblent plus résistants au processus de brunissement (H. Wang et al., 2019).

## 3. Le tissu adipeux blanc

### *a. Les différents dépôts*

Il existe différents dépôts de TA blanc qui possèdent des caractéristiques et des fonctions qui leur sont propres : le TA **sous-cutané** (TASC), le TA **viscéral** (TAV) et le TA de la moelle osseuse. Les deux principaux dépôts jouant un rôle prépondérant dans le contrôle de l'homéostasie énergétique sont les dépôts de TASC et de TAV (**Figure 5**).



**Figure 5. Principaux dépôts de tissu adipeux chez la souris (A) et chez l'Homme (B) (Meiliana & Wijaya, 2014).**

Le TASC est présent, comme son nom l'indique, sous l'épiderme et contribue en conditions normales à 80% du stockage des graisses au sein de l'organisme, chez l'Homme, soit la majeure partie. Le TASC, considéré comme le réservoir « sain » de graisses dans l'organisme, a démontré des effets protecteurs liés à son activité sécrétoire et à une faible activité lipolytique (Snijder et al., 2004; Van Pelt et al., 2005).

Le TAV est situé au niveau abdominal et plus en profondeur que le TASC. Chez l'Homme différentes localisations de TAV ont été identifiées, parmi eux les dépôts péricardique, gonadique, périrénal, mésentérique et épiploïque (**Figure 5**).

Il représente 10 à 20% du stockage des graisses dans l'organisme chez les sujets sains et, comme son nom l'indique, entoure les viscères. L'augmentation de la taille du TAV est généralement associée aux dérégulations métaboliques liées à l'obésité (Hirsch & Batchelor, 1976). En effet, la présence d'adipocytes de grande taille (hypertrophiques) dans ce tissu est corrélée à la dyslipidémie indépendamment de la masse et de la répartition graisseuse (Veilleux et al., 2011).

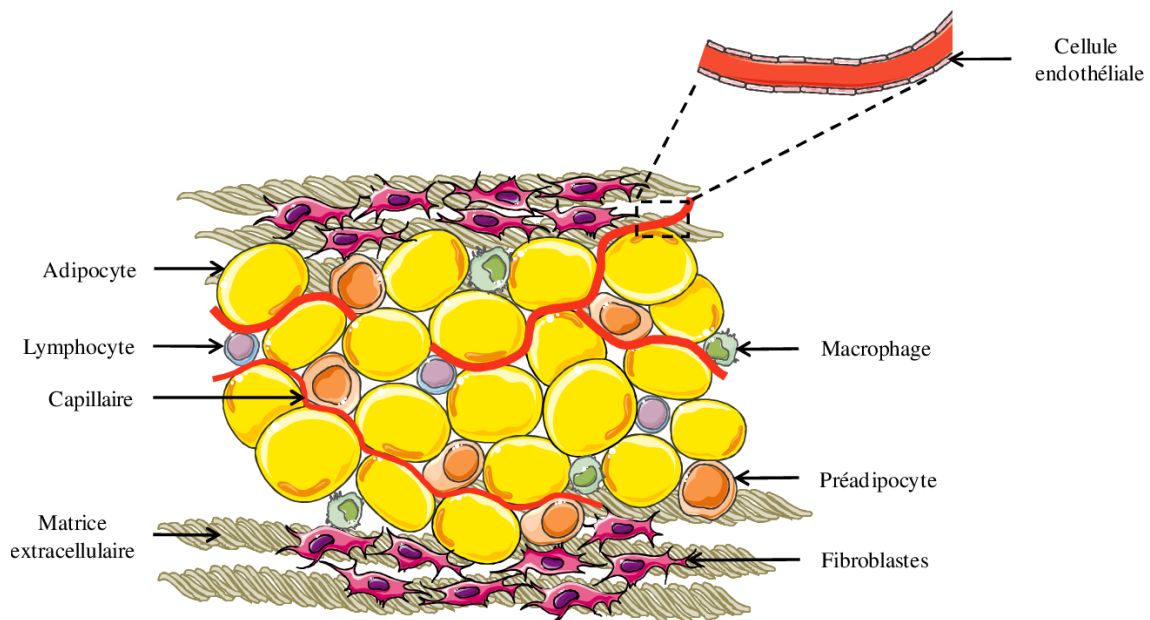
### ***b. Composition et structure***

Le TA blanc possède une vascularisation et une innervation plus faible que le TA brun et il est composé, entre autres, de larges adipocytes uniloculaires c'est-à-dire présentant une

## II. Tissu adipeux : physiologie et physiopathologie

unique et large gouttelette lipidique ainsi qu'un nombre faible de mitochondries (Cinti, 2005). Il est le principal organe de stockage énergétique de l'organisme sous forme de TG. Il permet, en situation de jeûne ou au cours d'un exercice physique intense, de fournir de l'énergie aux organes périphériques par le processus de lipolyse qui induit la libération d'AGL et de glycérol à partir des TG de stockage (Lafontan & Langin, 2009). Le TA blanc a longtemps été décrit comme un tissu inerte avec un rôle limité au stockage de l'énergie. Il est maintenant bien démontré qu'il possède une activité sécrétrice importante. Il produit des adipokines dont l'adiponectine, la leptine et la résistine, ainsi que des facteurs inflammatoires qui rentrent en jeu dans des mécanismes de régulation endocrines et paracrines (Lafontan, 2003; Stepan et al., 2001; Yamauchi et al., 2001).

Chez un individu sain, le TA blanc représente en moyenne 10 à 25 % de la masse corporelle. Il est structuré en lobules regroupant les adipocytes entourés de tissu conjonctif dense dans lequel sont enchevêtrés les terminaisons nerveuses, les vaisseaux lymphatiques et sanguins (Lafontan, 2003) (**Figure 6**).



**Figure 6. Représentation schématique de la diversité cellulaire du tissu adipeux blanc (Lukaszewski, 2011).**

Les mécanismes majeurs impliqués dans la physiologie et la physiopathologie du TA blanc seront détaillés dans la **Partie B**.

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

### i. Les adipocytes blancs

Les premiers adipocytes blancs, chez l'Homme, se forment au niveau de la tête, vers la 14<sup>ème</sup> semaine de gestation puis ces derniers apparaissent de manière progressive dans le tronc et les membres (Poissonnet et al., 1983). A 28 semaines, la répartition de ces adipocytes blancs correspondrait aux principaux dépôts adipeux de l'organisme. Ces localisations possèdent une forte variabilité inter-espèces, cependant, chez les mammifères, ces dépôts graisseux sont principalement situés au niveau intra-abdominal et sous-cutané mais ils peuvent aussi être retrouvés, entre autres, dans les extrémités, le visage et la moelle osseuse (Billon & Dani, 2009).

Les adipocytes sont des cellules issues de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en préadipocytes puis en adipocytes matures. Ils possèdent un rôle de stockage, de synthèse et d'hydrolyse de lipides, auquel s'ajoute une importante activité sécrétoire (Billon & Dani, 2009). Ils se caractérisent par une grande et unique vacuole lipidique située dans le cytoplasme, repoussant le noyau contre la membrane plasmique. Ces cellules et leurs gouttelettes lipidiques peuvent atteindre respectivement des tailles de 100 à 200µm et de 30 à 150µm. La vacuole lipidique possède une couche externe composée de cholestérol et de phospholipides entre lesquels sont enchâssées de nombreuses protéines qui, outre leur rôle de maintien de la structure, participent à la régulation du stockage et de la mobilisation des lipides (Tansey et al., 2004). Sur la totalité des lipides stockés dans cette vacuole lipidique, 90 à 99% sont des TG. Il est estimé que la totalité des TG stockés dans l'organisme contient suffisamment d'énergie pour répondre aux besoins énergétiques d'un adulte en bonne santé pendant une période de deux mois (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020).

### ii. La fraction stroma-vasculaire

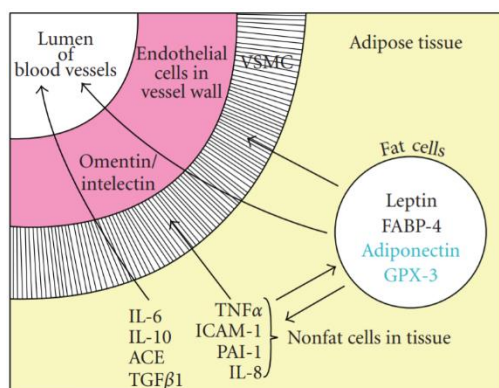
La fraction stroma-vasculaire (FSV) est constituée par un ensemble hétérogène de cellules, excluant les adipocytes, et traditionnellement obtenu par digestion du TA à la collagénase. Elle regroupe principalement les types cellulaires suivants : fibroblastes, préadipocytes, cellules immunitaires, cellules endothéliales et cellules progénitrices (Curat et al., 2004; Miranville et al., 2004; Sengenès et al., 2005). Ainsi, la FSV joue un rôle clé dans l'homéostasie du TA, en particulier en régulant l'adipogenèse et la sécrétion d'adipokines. En effet, le TA génère un grand nombre d'adipokines et de lipokines. Les

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

adipokines sont des peptides qui agissent à la manière d'hormones ou de messagers régulant le métabolisme. Environ 40% des gènes exprimés par le TA sont estimés comme nouveaux dans leur fonction et 20 à 30% d'entre eux devraient correspondre à des protéines de sécrétion, démontrant alors le rôle sécrétoire important de ce tissu et plus particulièrement des cellules composant la FSV (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020) **(Figure 7)**.

La FSV est essentielle à la régénération du TA. Les mécanismes mis en jeu dans les processus de prolifération et de différenciation adipocytaire, impliquant les cellules progénitrices de la FSV, seront détaillés dans la **Partie II.B.1**. La régulation de ces processus est altérée au cours de l'obésité. On assiste à une évolution des différentes populations cellulaires de la FSV avec, en particulier, une modification de la prolifération et différenciation des cellules souches mésenchymateuses et des préadipocytes en

adipocytes matures ainsi qu'un recrutement de cellules au profil pro-inflammatoire (Faucher & Poitou, 2016). Ces modifications contribuent à l'apparition de l'inflammation chronique liée au surpoids. L'étude de ces différentes populations au sein des différents dépôts adipeux et leur caractérisation présentent donc un intérêt majeur dans le suivi et le traitement de l'obésité.



**Figure 7. Sécrétion d'adipokines et signalisation paracrine dans le tissu adipeux humain (Fain, 2010).**

Les adipokines sont divisées en deux groupes : celles libérées par les cellules grasses (leptine, FABP-4, adiponectine et GPX-3) et celles libérées par les cellules non grasses du tissu adipeux (IL-6, IL-8, IL10, ACE, PAI-1, ICAM-1, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, omentine et interlectine). Les adipokines représentées en noir sont celles dont les taux circulants sont élevés en cas d'obésité ainsi que leur libération par des explants de tissus adipeux humains. Les taux circulants d'adiponectine et de GPX3 sont indiqués en bleu car ils ne sont pas élevés en cas d'obésité. L'omentine/intelectine est montrée comme étant sécrétée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de la graisse omentale mais pas sous-cutanée. Les flèches représentent les cibles possibles des adipokines comme les autres cellules du tissu adipeux, les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) et les cellules endothéliales dans les parois des vaisseaux sanguins.

## **B. Le tissu adipeux blanc, un acteur clé du métabolisme énergétique**

Le TA est principalement défini comme le principal site de stockage de l'énergie excédentaire. Il est soumis à une très fine régulation nutritionnelle et hormonale. En effet, pendant les périodes d'apport alimentaire accru et/ou de dépense énergétique réduite, le surplus d'énergie est déposé dans le TA sous forme de TG neutres. Ce processus est réalisé par des enzymes lipogéniques clés (Foufelle & Ferré, 2013). A l'inverse, en période de jeûne ou d'activité physique, les réserves lipidiques sont libérées pour produire de l'énergie. Pour cela, les adipocytes contiennent des lipases qui hydrolysent les TG en glycérol et AG, par le processus de lipolyse (Mouisel & Langin, 2013). Ces composés peuvent ensuite être transportés, via la circulation sanguine, vers le foie et les muscles où ils sont utilisés dans la  $\beta$ -oxydation des AG. Le glycérol et les AGL ainsi générés peuvent également être réestérifiés dans les adipocytes permettant ainsi une régulation du flux d'AGL (Mouisel & Langin, 2013).

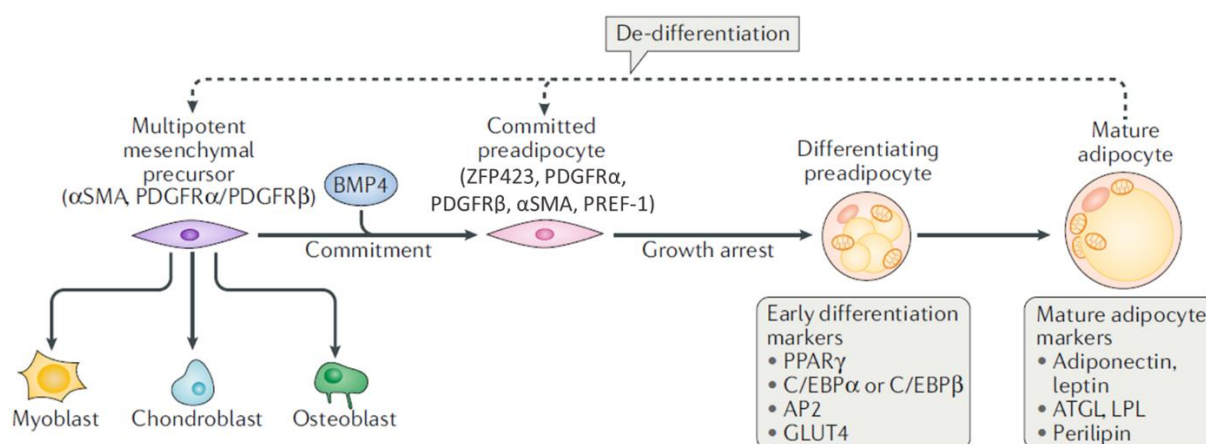
Les deux principales fonctions du TA blanc sont donc d'une part de stocker l'excès d'énergie sous forme de gouttelettes lipidiques et d'autre part de libérer du glycérol et des AGL pour fournir de l'énergie à l'organisme (Dugail & Le Lay, 2013). L'homéostasie énergétique repose donc sur une régulation fine des voies métaboliques impliquées dans les processus de stockage et de mobilisation des graisses. Néanmoins, le TA est maintenant reconnu comme un organe endocrine à part entière remplissant d'importantes fonctions régulatrices.

### **1. Différenciation et renouvellement adipocytaire**

Le TA peut augmenter de taille principalement de deux manières : 1) en augmentant la taille des adipocytes existants (hypertrophie) ou 2) en formant de nouveaux adipocytes par différenciation de précurseurs résidents appelés préadipocytes (hyperplasie). Les adipocytes différenciés ont un potentiel hypertrophique remarquable, pouvant atteindre jusqu'à plusieurs centaines de micromètres de diamètre. Le nombre d'adipocytes dans un dépôt donné est principalement déterminé au début de la vie et est généralement stable à l'âge adulte (Hirsch & Batchelor, 1976; Spalding et al., 2008). En effet, il existe un très

faible renouvellement adipocytaire chez l'Homme estimé à 10% des adipocytes du TASC remplacés chaque année (Spalding et al., 2008).

L'engagement adipogénique est le processus selon lequel un précurseur multipotent, également nommé cellules souches mésenchymateuses (MSC – Mesenchymal Stem Cells), devient restreint à la lignée adipocytaire et incapable de former d'autres types de cellules mésenchymateuses, tels que les myoblastes, les chondroblastes ou les ostéoblastes (Cawthorn et al., 2012; Farmer, 2006) (**Figure 8**). L'un des marqueurs les plus caractéristiques de la lignée adipocytaire est PDGFR $\alpha$  et la grande majorité des adipocytes adultes dérivent de cette lignée (Berry & Rodeheffer, 2013). Cependant, PDGFR $\alpha$  n'est pas exprimé dans les adipocytes matures, reflétant une expression limitée aux précurseurs adipocytaires.



**Figure 8. Mécanismes moléculaires de l'adipogenèse (à partir de Ghaben & Scherer, 2019).**

Des précurseurs mésenchymateux multipotents de type fibroblaste (marqués par l'actine des muscles lisses ( $\alpha$ SMA) et les récepteurs du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR $\alpha$  et/ou PDGFR $\beta$ )) servent de précurseurs adipocytaires mais sont également capables de former des myoblastes, des ostéoblastes et des chondroblastes. La signalisation de la protéine morphogénétique osseuse (BMP Bone Morphogénétique Protéine) restreint ces précurseurs mésenchymateux à la lignée adipocytaire dans le cadre d'un processus connu sous le nom d'« engagement ». Au moment de l'engagement, les précurseurs sont encore morphologiquement semblables à des fibroblastes et expriment le facteur de transcription ZFP423 et le facteur préadipocytaire PREF-1 (Preadipocyte Factor-1). Lorsque le préadipocyte engagé arrête sa croissance, il active le régulateur maître de l'adipogenèse PPAR $\gamma$  et les co-activateurs de transcription CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$  et  $\beta$  (C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ ). L'accumulation de lipides entraîne l'expression de la protéine de liaison aux acides gras des adipocytes (AP2 – FABP4) et du transporteur sensible à l'insuline GLUT4, marquant les adipocytes aux premiers stades de la différenciation. A la fin de la différenciation, les adipocytes matures expriment tous les marqueurs de la différenciation adipocytaire précoce ainsi que les hormones peptidiques adiponectine et leptine ; les lipases adipeuses (ATGL – Adipose Triglyceride Lipase) et lipoprotéine lipase (LPL) ; et des niveaux élevés de la protéine périlipine 1 associée aux gouttelettes lipidiques. Il existe maintenant des preuves que les adipocytes peuvent subir une dédifférenciation en préadipocytes de type fibroblaste sans savoir si ces préadipocytes sont engagés dans la lignée adipocytaire ou s'ils peuvent générer d'autres types de cellules mésenchymateuses.

Les premières cellules impliquées dans la différenciation adipocytaire sont les adipoblastes issus de lignées cellulaires fibroblastiques multipotentes. En culture et après

avoir atteint la confluence, ces précurseurs s'engagent dans une première étape de différenciation adipocytaire vers le stade de préadipocyte puis s'ensuivent des processus dits précoces et tardifs (Ghaben & Scherer, 2019). Les premières étapes, induites sous l'action de l'hormone de croissance, incluent des remaniements du cytosquelette et l'expression de marqueurs adipocytaires précoces tels que PPAR $\gamma$ .

Après une phase d'expansion clonale des préadipocytes contrôlée par IGF-1, la dernière phase dite de différenciation terminale prend place, caractérisée par des modifications morphologiques majeures (apparition de la gouttelette lipidique) associées à l'acquisition de nouvelles fonctions permettant la synthèse de TG, la lipolyse et l'activité sécrétoire (Fève et al., 1998). La différenciation adipocytaire et l'émergence du phénotype terminal sont induites par plusieurs facteurs de transcription notamment : des PPARs, des C/EBP (CCAAT / Enhancer Binding Protein) et des protéines à motifs HLH (Hélice-Boucle-Hélice) telles que SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) et ADD1 (Adipocyte Determination and Differentiation factor 1). Ce dernier est spécifiquement retrouvé chez les rongeurs (Mohsen-Kanson et al., 2013). Les adipocytes matures expriment différents marqueurs spécifiques tels que la LPL (Lipoprotéine Lipase) ou la leptine (**Figure 8**).

### 2. Fonction de stockage

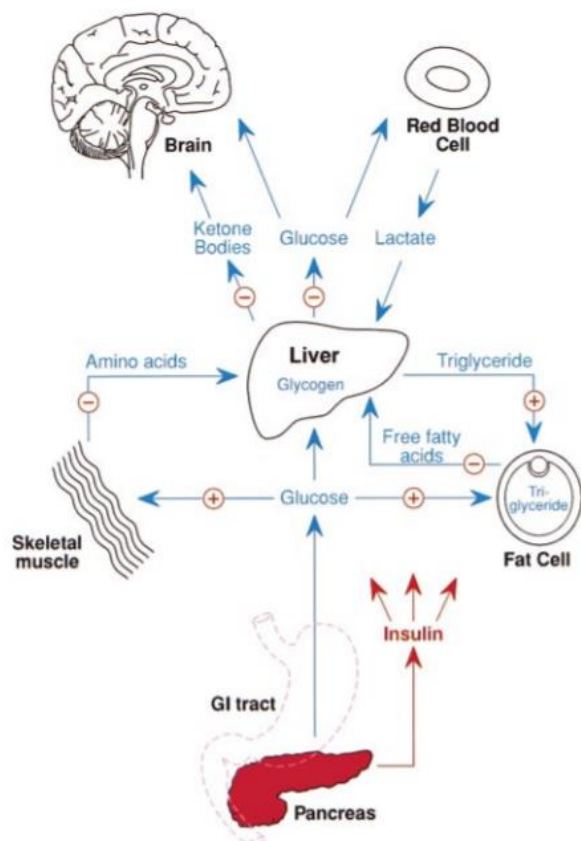
Au cours de l'évolution, les organismes ont développé des mécanismes complexes pour réguler le métabolisme énergétique en réponse à la disponibilité en nourriture (**Figure 9**). L'insuline est la principale hormone qui coordonne ces processus.

En ce qui concerne le métabolisme glucidique, lorsque la nourriture est consommée, le glucose qu'elle contient stimule la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques, qui oriente alors le métabolisme vers un stockage énergétique (Kahn, 1985). L'insuline favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie et les muscles et sous forme de TG dans le TA (Petersen & Shulman, 2018). En période de jeûne, les niveaux d'insuline sont faibles, incitant les cellules sensibles à l'insuline (notamment au niveau des muscles, du TA et du foie) à mobiliser l'énergie stockée (Petersen & Shulman, 2018). Le muscle ne possède pas de glucose 6-phosphatase, la glycogénolyse dans le muscle ne libère donc pas de glucose dans le sang. Cependant, lorsque les niveaux d'insuline sont



## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

bas, le muscle exporte des acides aminés et d'autres substrats vers le foie pour la néoglucogenèse (Taylor, 1999).

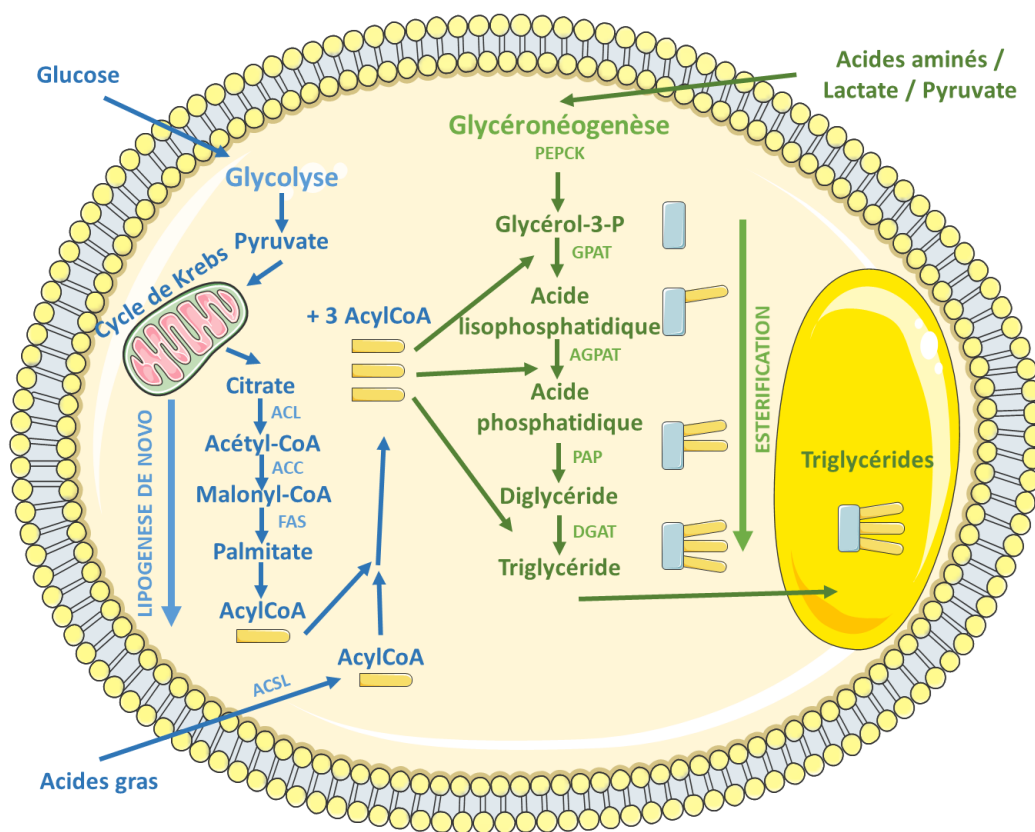


**Figure 9. L'insuline est le régulateur majeur du métabolisme énergétique (Taylor, 1999).**

Le glucose et d'autres nutriments absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal induisent la sécrétion d'insuline. L'insuline régule le métabolisme de plusieurs molécules énergétiques (en bleu). Les actions de l'insuline sont indiquées en rouge (+ : activation / - : inhibition). L'insuline active le transport de glucose dans les muscles et le tissu adipeux, et favorise également la synthèse du glycogène et des triglycérides. L'insuline inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux, la cétogenèse dans le foie et la protéolyse dans le muscle. L'insuline inhibe également la production hépatique de glucose en inhibant à la fois la glycogénolyse et la néoglucogenèse. L'insuline ne régule pas directement le métabolisme des hématies qui utilisent la glycolyse pour se fournir de l'énergie. Bien que le cerveau utilise du glucose comme source d'énergie à l'état nourri, il peut également utiliser les corps cétoniques (acétoacétate et 3-hydroxybutyrate) lorsque les niveaux augmentent suffisamment (comme au cours du jeûne).

Pour ce qui est du métabolisme lipidique, l'alimentation fournit la grande majorité des AG stockés dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes sous forme de TG. Ces lipides alimentaires sont tout d'abord hydrolysés au niveau intestinal et resynthétisés au niveau entérocytaire où ils sont alors relargués dans la lymphe, inclus dans les chylomicrons, pour ensuite regagner la circulation sanguine (Marcelin & Chua, 2010). Les AG des TG contenus dans les chylomicrons ou les VLDL (qui contiennent les TG exportés du foie) sont hydrolysés par la LPL puis captés par les adipocytes soit par diffusion passive à travers la bicouche lipidique soit grâce à un transfert facilité par des protéines telles que la FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase / Cluster of Differentiation 36), la FATP (Fatty Acid Transport Protein) et la FABPpm (Fatty Acid Binding Protein, plasma membrane). Une fois dans la cellule, les AG sont pris en charge par des FABP (notamment FABP4 codé par le gène *aP2*) (Large et al., 2004). Il est à noter que les AG peuvent également être synthétisés dans l'adipocyte à partir de glucose. Cette voie métabolique, la lipogenèse *de novo*, dont l'activité se manifeste principalement à l'état nourri, est sous l'influence d'insuline qui déclenche notamment le transport du glucose et des acides aminés dans les

adipocytes, où ils sont métabolisés en acétyl-CoA. Cette voie est représentée en bleu dans le TA dans la **Figure 10**.



**Figure 10. Représentation schématique de la fonction de stockage adipocytaire (à partir de Alligier et al., 2013).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. L'augmentation postprandiale de l'insuline conduit à l'induction de la lipogenèse. Après absorption au sein des adipocytes, les AG sont activés en acyl-CoA. 3 acyl-CoA sont estérifiés avec du glycérol pour former des triglycérides stockés dans la gouttelette lipidique. L'ACC (AcétylCoA carboxylase) qui convertit l'acétyl-CoA en malonyl-CoA est l'étape d'engagement de la voie de synthèse des AG. ACC : Acétyl-CoA carboxylase, ACL : ATP citrate lyase, ACSL : AcylCoA Synthétase long chain, AGPAT : AcylGlycérolPhosphate Acyl Transférase, DGAT : Diacylglycérol acyl transférase, FAS : Fatty Acid Synthase, PAP : acide phosphatidique phosphatase, PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase.

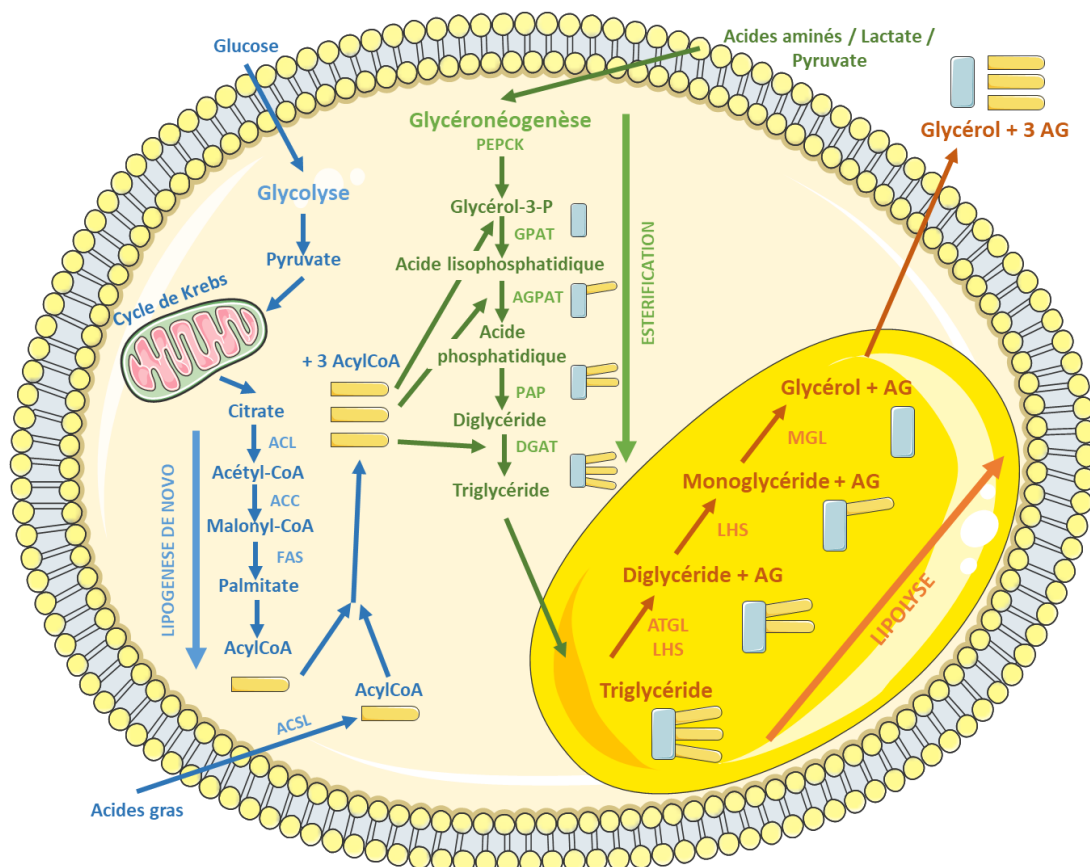
A l'inverse, cette voie est inhibée par la leptine qui favorise l'activité lipolytique adipocytaire (Minehira et al., 2003).

Que les AG proviennent de la circulation ou qu'ils aient été synthétisés *de novo* dans les adipocytes, ils sont ensuite activés en Acyl-CoA par l'ACS (AcylCoA Synthétase) avant leur transport par une ACBP (AcylCoA Binding Protein) et leur estérification en TG pour leur stockage dans des gouttelettes lipidiques, représenté en vert dans la **Figure 10**. La condensation de ces acyl-CoA en TG se fait par 3 estérifications séquentielles sur un glycérol-3-phosphate sous l'action des GPAT (Glycérol Phosphate Acyl Transférase),

AGPAT (AcylGlycérolPhosphate Acyl Transférase) et DGAT (DiAcylGlycérolPhosphate Acyl Transférase) (Takeuchi & Reue, 2009).

### 3. Lipolyse

La lipolyse est un processus selon lequel les adipocytes fournissent de l'énergie à l'organisme en hydrolysant les TG contenus dans leurs gouttelettes lipidiques. Ce processus est représenté en orange dans la **Figure 11**.



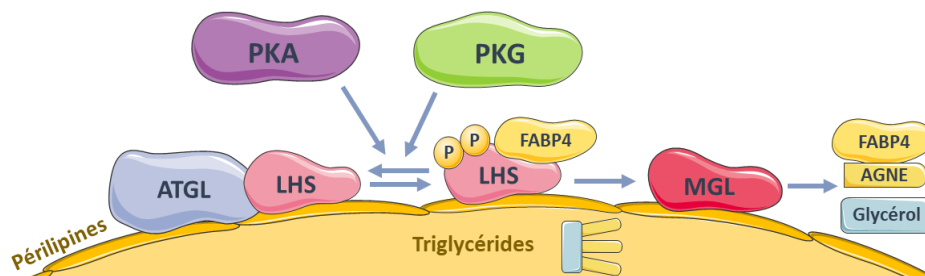
**Figure 11. Synthèse et dégradation des triglycérides dans l'adipocyte (à partir de Alligier et al., 2013).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. La décomposition séquentielle des TG intracellulaires (lipolyse) fournit des AG et du glycérol. La formation de diglycérides est catalysée par la LHS (Lipase hormono-sensible) et l'ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), les diglycérides sont hydrolysés par la LHS et le catabolisme des monoglycérides implique la MGL (Monoglycéride Lipase). Les AG et le glycérol peuvent être libérés dans la circulation ou les AG peuvent être oxydés dans les mitochondries. L'oxydation des acides gras forme des substrats pour la chaîne respiratoire. ACC : Acétyl-CoA carboxylase, ACL : ATP citrate lyase, ACSL : AcylCoA Synthétase long chain, AGPAT : AcylGlycérolPhosphate Acyl Transférase, ATGL : Adipose Triglyceride Lipase, DGAT : Diacylglycérol acyl transférase, FAS : Fatty Acid Synthase, LHS : Lipase Hormono-Sensible, MGL : Monoglycéride Lipase, PAP : Acide Phosphatidique Phosphatase, PEPCK : Phosphoénolpyruvate Carboxykinase.

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

Ces TG sont hydrolysés en diglycérides puis en monoglycérides pour finir par libérer du glycérol et des AG sous l'action de 3 enzymes principales : la Lipase Hormono-Sensible (LHS), la TriGlycéride Lipase Adipeuse (ATGL) et la MonoGlycéride Lipase (MGL). En conditions normales, ces trois enzymes agissent de concert bien que la LHS *in vitro* soit capable d'hydrolyser complètement les TG.

Lorsque la voie de la lipolyse est activée, la LHS est phosphorylée par la PKA favorisant alors sa translocation avec l'ATGL du cytosol vers la surface de la gouttelette lipidique où elles vont pouvoir hydrolyser des TG en diglycérides + AG (Lafontan & Langin, 2009). La LHS dégrade ensuite les diglycérides en monoglycérides + AG avant de passer le relais à la MGL qui se charge de la dernière étape, l'hydrolyse des monoglycérides en glycérol + AG. Seules les deux premières enzymes (LHS et ATGL) sont sous contrôle hormonal. Les hormones et composés agissant sur l'adénylate cyclase et les taux d'AMPc intracellulaire sont en général des régulateurs directs de la lipolyse (Londos et al., 1985; C. J. Smith & Manganiello, 1989) (**Figure 12**).



**Figure 12. Lipolyse adipocytaire (à partir de Lafontan & Langin, 2009).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. Les protéines kinases (PKA et PKG) sont impliquées dans la phosphorylation de protéines cibles. La phosphorylation de la LHS favorise sa translocation du cytosol à la surface de la gouttelette lipidique. La phosphorylation de la périlipine induit une altération physique importante de la surface des gouttelettes qui facilite l'action de la LHS et l'initiation de la lipolyse. L'amarrage de la protéine de liaison aux lipides adipocytaire (FABP4) à la LHS favorise la sortie de la cellule des AG libérés par l'hydrolyse des TG. ATGL : tri-glycéride lipase adipeuse, FABP4 : protéine de liaison aux acides gras des adipocytes 4, Gi : protéine inhibitrice de liaison au GTP, Gs : protéine stimulatrice de liaison au GTP, LHS : lipase hormono-sensible, MGL : mono-glycéride lipase, AGNE : acide gras non estérifié.

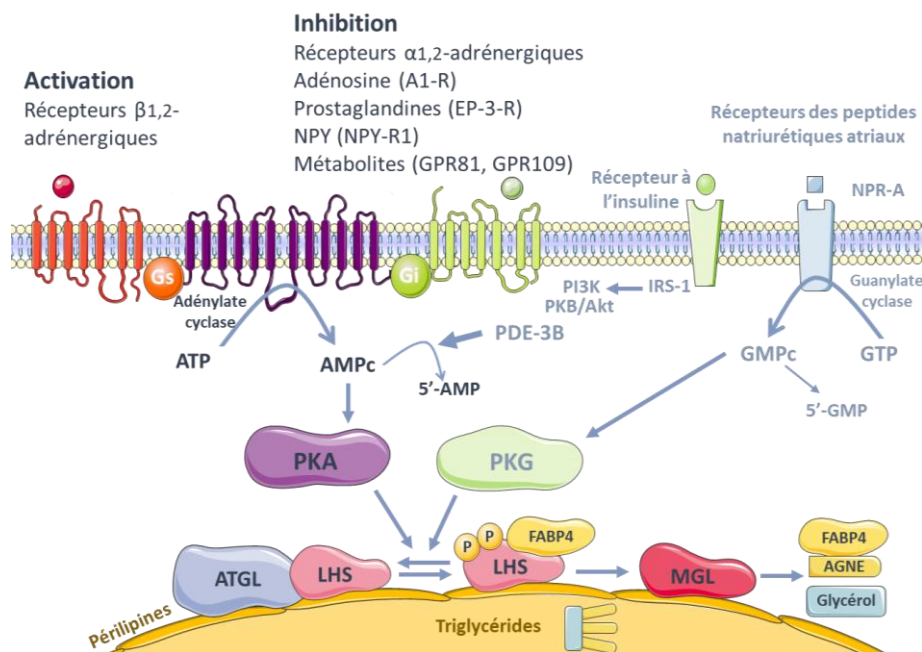
Une augmentation de l'AMPc intracellulaire induit la lipolyse et inversement. Des études *in vitro* sur des cellules adipeuses humaines ont établi que la régulation des niveaux d'AMPc et de la lipolyse, par les hormones et les agents paracrines, dépend de l'interaction équilibrée entre les voies stimulatrices et inhibitrices contrôlant l'adénylate cyclase d'une part et les phosphodiésterases (PDE) d'autre part (Lafontan & Langin, 2009). Les PDE, en hydrolysant l'AMPc, font partie de la voie inhibitrice de la lipolyse puisqu'elles sont à l'origine d'une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc (C. J. Smith &

Manganiello, 1989). L'activation ou l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, via les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), contrôle la formation d'AMPc à partir de l'ATP. Des récepteurs stimulants sont couplés à la protéine  $G_s$ , impliquée dans la transduction du signal et l'activation de l'adénylate cyclase favorisant ainsi la formation d'AMPc, tandis que l'activation de récepteurs inhibiteurs couplés à la protéine  $G_i$  inhibe l'activité de l'enzyme réduisant les taux d'AMPc (Laurencikiene et al., 2011). C'est le cas, entre autres, des récepteurs aux catécholamines qui, selon leur nature, peuvent être couplés à des protéines  $G_s$  ou  $G_i$ .

### *a. Régulation positive par les catécholamines*

L'adrénaline et la noradrénaline circulantes (sécrétées par la médullosurrénale), ainsi que la noradrénaline libérée par les nerfs sympathiques innervant le TA, sont collectivement appelées catécholamines (Wirsen, 1964). L'origine de ces catécholamines est déterminante pour l'activation de la lipolyse. En effet, de nombreux articles de recherche avaient affirmé que les catécholamines produites par les médullosurrénales étaient le principal stimulateur de la lipolyse dans le TA blanc. Or, il a été montré par la suite que l'élimination de la seule source d'adrénaline circulante par démédullation surrénale bilatérale ne suffisait pas à bloquer la lipolyse (Nishizawa & Bray, 1978; Takahashi & Shimazu, 1981). En revanche, l'innervation du TA blanc par le système nerveux sympathique est suffisante et nécessaire pour initier la lipolyse et rempli une fonction déterminante dans l'ajustement des réserves énergétiques lipidiques (Bartness et al., 2014).

De manière générale, l'action des catécholamines est un facteur régulateur majeur du métabolisme des graisses pendant les périodes de stress pour l'organisme, comme le jeûne et l'exercice ou encore l'exposition au froid, de sorte que ces hormones sont en grande partie responsables de l'augmentation du métabolisme des graisses en augmentant l'apport d'AGL aux autres tissus pour la  $\beta$ -oxydation (Coppack et al., 1994; Saltin & Astrand, 1993) (**Figure 13**). La sécrétion des catécholamines augmente au début du jeûne ou de l'exercice physique et stimule la mobilisation des AG du TA (Arner, 1995).



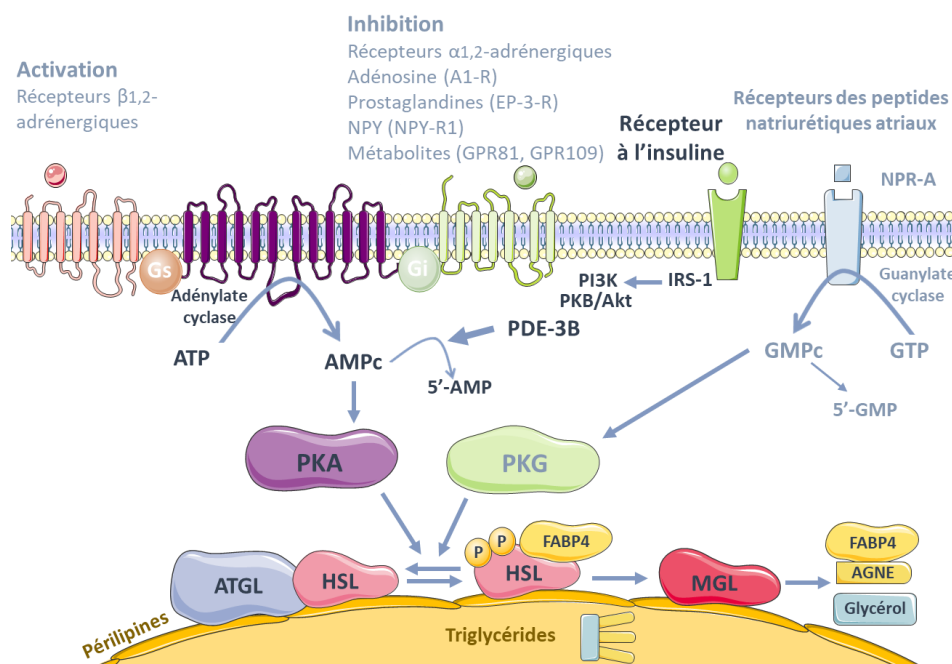
**Figure 13. Voies principales de régulation de la lipolyse dans l'adipocyte par les catécholamines (à partir de Lafontan & Langin, 2009).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. ATGL : triglycéride lipase adipeuse, FABP4 : protéine de liaison aux acides gras des adipocytes 4, Gi : protéine inhibitrice de liaison au GTP, Gs : protéine stimulatrice de liaison au GTP, LHS : lipase hormono-sensible, MGL : monoacylglycérol lipase, AGNE : acide gras non estérifié, NPR-A : récepteur du peptide natriurétique de type A.

Les cellules du TA répondent à l'action des catécholamines par l'intermédiaire de différents récepteurs adrénergiques : les récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques, couplés à des protéines de type G<sub>i</sub>, inhibent la lipolyse à l'état nourri et les récepteurs β<sub>1/2</sub>-adrénergiques, couplés à des protéines de type G<sub>s</sub>, stimulent la lipolyse pendant le jeûne (Arner et al., 1990). Les récepteurs β<sub>3</sub>-adrénergiques, fortement présents chez la souris contrairement à l'Homme, sont couplés à des protéines de type G<sub>s</sub> et activent quant à eux la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase), dont Erk 1/2, et la PKA à l'origine d'une hausse des taux d'AMPc intracellulaire et donc d'une stimulation de la lipolyse (Soeder et al., 1999). Une sensibilité accrue des adipocytes à la stimulation β-adrénergique, ainsi qu'une augmentation des concentrations d'adrénaline, peuvent expliquer une mobilisation accrue des AG pendant le jeûne (M. D. Jensen et al., 1987). Par conséquent, il semble que les mécanismes adrénergiques assurent un contrôle assez étroit de la mobilisation des AG entre les conditions post-prandiales et de jeûne (Portillo et al., 2000).

**b. Régulation négative par l'insuline**

Dans les adipocytes, en plus de contrôler la lipogenèse, l'insuline et les facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF – Insulin-like Growth Factor) régulent la lipolyse en inhibant notamment la libération de glycérol (Lafontan & Langin, 2009; Langin, 2006). Parallèlement à leur contrôle de la captation du glucose par les cellules graisseuses, l'insuline et l'IGF-1 contrôlent les taux d'AMPc. La liaison de l'insuline sur son récepteur provoque son activation, par phosphorylation sur des résidus tyrosine, induisant de manière consécutive la phosphorylation de la tyrosine, sur des substrats intracellulaires (notamment IRS 1 et 2 – Insulin Receptor Substrate 1 et 2), ainsi que la liaison de la sous-unité p85 $\alpha$  de la phosphatidylinositol kinase 3 (PI3K) (Choi et al., 2006) (**Figure 14**).



**Figure 14. Voie principale de régulation de la lipolyse dans l'adipocyte par l'insuline (à partir de Lafontan & Langin, 2009).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. ATGL : triglycéride lipase adipeuse, FABP4 : protéine de liaison aux acides gras des adipocytes 4, Gi : protéine inhibitrice de liaison au GTP, Gs : protéine stimulatrice de liaison au GTP, LHS : lipase hormono-sensible, MGL : monoacylglycérol lipase, AGNE : acide gras non estérifié, NPR-A : récepteur du peptide natriurétique de type A.

La PI3K est un hétérodimère qui possède à la fois des activités lipide-kinase et sérine-kinase et est composé de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  ainsi qu'une sous-unité catalytique p110. L'activation de PI3K est suivie d'une phosphorylation/activation de PKB/Akt et d'une activation de la PDE3B qui va alors catalyser la dégradation de l'AMPc en 5'AMP. Il en résulte une réduction de la

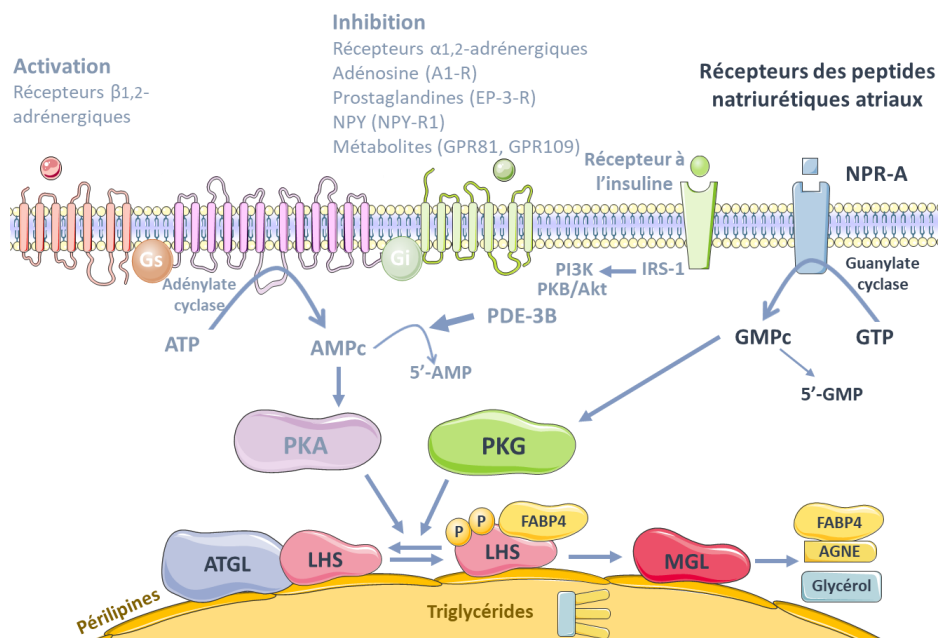
concentration intracellulaire d'AMPc qui, par conséquent, va induire l'inactivation de la PKA et une réduction de la phosphorylation de la LHS et des périlipines, inhibant ainsi la lipolyse (Saltiel & Pessin, 2002).

Durant le jeûne, les niveaux d'insuline diminuent tandis que les niveaux d'adrénaline augmentent, et ainsi la lipolyse est stimulée (R. R. Wolfe et al., 1987). Un effet similaire est observé pendant l'exercice, avec une moindre inhibition par la noradrénaline de la libération d'insuline pancréatique (Jeukendrup et al., 1998). Cette interaction réciproque entre ces deux hormones est primordiale pour réguler à la hausse le métabolisme des graisses, en particulier pendant les périodes de stress telles que l'exercice et le jeûne (vs l'ingestion de nourriture) qui favorisent une augmentation de la mobilisation des graisses.

### *c. Régulation par les peptides natriurétiques*

Outre la voie majeure de régulation de la lipolyse par les taux d'AMPc intracellulaires, une autre voie, mise en évidence plus récemment, implique les peptides natriurétiques (Sengenès et al., 2000). Ces derniers sont d'origine cardiaque et comprennent le BNP (Brain Natriuretic Peptide) et l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide). Les peptides natriurétiques font partie d'une famille d'hormones exerçant des effets sur le système vasculaire ainsi que le rein et capables de moduler la pression artérielle. Leurs effets s'exercent via leur liaison à trois récepteurs membranaires NPR-A, NPR-B et NPR-C (Natriuretic Peptide Receptor) (Sengenès et al., 2005) qui activent la guanylate cyclase catalysant la formation de GMPc (**Figure 15**). L'augmentation de la concentration cytoplasmique de GMPc induit l'activation de la Protéine Kinase G (PKG) qui phosphoryle la LHS. Cette voie est majoritairement stimulée lors de l'activité physique durant laquelle une augmentation de la concentration plasmatique de peptide natriurétique est observée (Sengenès et al., 2000).





**Figure 15. Voie principale de régulation de la lipolyse dans l'adipocyte par les peptides natriurétiques (à partir de Lafontan & Langin, 2009).**

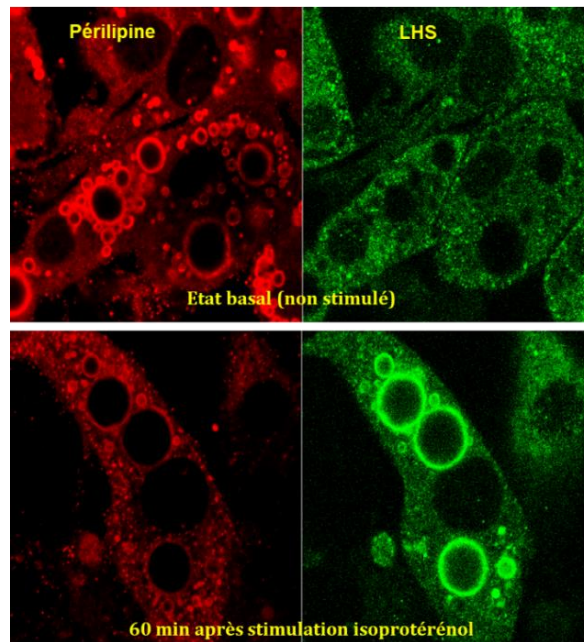
Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. ATGL : triglycéride lipase adipeuse, FABP4 : protéine de liaison aux acides gras des adipocytes 4, Gi : protéine inhibitrice de liaison au GTP, Gs : protéine stimulatrice de liaison au GTP, LHS : lipase hormono-sensible, MGL : monoacylglycéril lipase, AGNE : acide gras non estérifié, NPR-A : récepteur du peptide natriurétique de type A.

### d. Autres éléments régulateurs

D'autres facteurs entrent en jeu dans la régulation de la lipolyse en agissant de façon indirecte sur la dégradation des TG. C'est le cas de la périlipine. Cette protéine constitutive de l'adipocyte, située à la surface des gouttelettes lipidiques, subit des changements conformationnels lorsqu'elle est phosphorylée par la Protéine Kinase A (PKA) (Lafontan & Langin, 2009). Ceci permet la translocation de la LHS à la surface de la gouttelette lipidique (comme élégamment illustré dans la **Figure 16**) qui peut ainsi exercer son activité lipolytique (Lafontan & Langin, 2009).

La cavéoline-1, autre protéine constitutive des adipocytes, joue aussi un rôle dans la régulation de la lipolyse du fait de sa capacité à interagir directement avec la PKA, réduisant ainsi son activité de phosphorylation et, par conséquent, la lipolyse (Cohen et al., 2004). L'importance de cette protéine dans la régulation des fonctions de stockage du TA a été illustrée par l'étude de souris invalidées pour le gène de la cavéoline-1 ( $Cav^{-/-}$ )

qui présentent une forte lipoatrophie associée à une insulino-résistance et une hypertriglycéridémie sévères (Cohen et al., 2003, 2004; Razani et al., 2002).



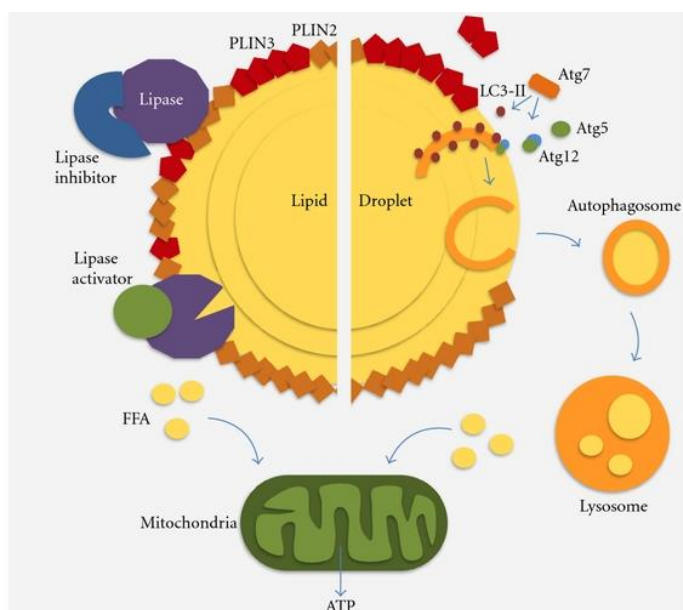
**Figure 16. Action coordonnée de la périlipine et de la LHS après stimulation de la lipolyse par l'isoprotérénol [8].**

*Résultats obtenus après 60min de stimulation de la lipolyse à l'isoprotérénol d'adipocytes permettant de visualiser la périlipine (en rouge) et la translocation de la LHS (Lipase Hormono-Sensible - en vert) à la surface de la vacuole lipidique.*

L'activité lipolytique peut également être régulée par FABP4, protéine cytosolique très exprimée dans les adipocytes liant les AG. Elle agit comme une protéine chaperonne facilitant le transport intracellulaire des AG et la lipolyse en fixant un AG puis en se liant à la LHS phosphorylée. Suite à la phosphorylation de la LHS et des périlipines par la PKA, ce complexe est ensuite transloqué au niveau de la gouttelette lipidique, permettant ainsi l'hydrolyse des DAG en MAG (A. J. Smith et al., 2007).

L'autophagie, ou processus de dégradation des composants intracellulaires dans les lysosomes, a été traditionnellement liée à l'équilibre énergétique cellulaire et à l'état nutritionnel cellulaire (Mizushima et al., 2004; Singh & Cuervo, 2011). Des études récentes soutiennent que l'autophagie peut également fournir des composants essentiels énergétiquement plus efficaces, tels que les AGL. Bien que, traditionnellement, la mobilisation des gouttelettes lipidiques par lipolyse ait été uniquement attribuée aux lipases associées aux gouttelettes lipidiques, des études récentes ont révélé un rôle de l'autophagie dans la dégradation des TG adipocytaires (**Figure 17**). Chacun des

événements du processus autophagique est coordonné par un réseau complexe de plus de 32 gènes et protéines (gènes liés à l'autophagie (ATG) et protéines liées à l'autophagie (Atgs)). Les Atgs participent à plusieurs niveaux : 1) l'activation, 2) la nucléation de la



membrane de l'autophagosome qui se forme *de novo* par conjugaison de protéines et de lipides de différents compartiments cellulaires, 3) l'allongement de la membrane et le scellement pour former l'autophagosome, 4) le déplacement vers les lysosomes, et 5) la fusion des deux membranes (Singh & Cuervo, 2012).

**Figure 17. Lipolyse par les lipases**

**cytosoliques et par lipophagie (Singh & Cuervo, 2012).**

(a) Représentation schématique des principaux composants lipidiques et protéiques des gouttelettes lipidiques (LD – Lipid Droplet) et des mécanismes de mobilisation des lipides (lipolyse) par les lipases cytosoliques. (b) Lipolyse par lipophagie. Représentation schématique de la formation de vacuoles autophagiques à la surface d'un LD. PLIN : périlipine ; Atg : protéine liée à l'autophagie ; FFA : acides gras libres.

Enfin, les cytokines peuvent influencer sur la lipolyse, particulièrement au cours de l'obésité. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (Interkine-6), le TNF $\alpha$  (Facteur de Nécrose Tumorale  $\alpha$ ) et l'IL-1 $\beta$  (Interleukine-1 $\beta$ ), dont les taux augmentent au cours de l'obésité (Hotamisligil et al., 1995), contribueraient à l'augmentation de la lipolyse basale (Bastard et al., 2006; Rydén et al., 2004). En effet, TNF $\alpha$  a la capacité de stimuler la voie des MAP kinases (Erk 1/2) et ainsi induire une augmentation des taux intracellulaires d'AMPc, à l'origine d'une stimulation de la lipolyse (Ryden et al., 2002). Par ailleurs, il a été démontré que des adipocytes traités par de l'IL-6 ne parviennent pas à maintenir un phénotype normal (baisse de l'expression de marqueurs adipocytaires). Ils présentent alors une réduction de la lipogenèse stimulée par l'insuline associée à une réduction du transport du glucose (Lagathu et al., 2003).

**e. Lipolyse dépôt spécifique**

Il est aussi important de considérer l'hétérogénéité des différents dépôts de TA vis-à-vis de leur sensibilité à la stimulation par les catécholamines. Cette sensibilité est fonction de la distribution des récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$  (à l'activité anti-lipolytique) et  $\beta$  (à l'activité lipolytique). Ainsi, la proportion des récepteurs  $\alpha_2$  est plus importante que celle des  $\beta$  dans le TASC et inversement dans le TAV (Mauriege et al., 1987; Rodrigues et al., 2021). Par ailleurs, les effets de l'insuline sur la captation des AGL, le stockage en TG et la lipolyse sont moindres dans les adipocytes du TAV (Zierath et al., 1998). Dans ce dépôt, la signalisation insulinique est limitée, ce qui le rend donc plus résistant aux effets anti-lipolytiques de l'insuline (Laviola et al., 2006). La notion de lipolyse dépôt spécifique, illustrée dans la **Tableau 3**, est importante dans l'étude du rôle du TAV et du TASC au cours de l'obésité. Ces observations permettent aussi de mieux comprendre le lien entre le développement disproportionné du TAV et la physiopathologie de l'obésité.

**Tableau 3. Différences entre les effets lipolytiques et anti-lipolytiques au niveau du TAV et du TASC (à partir de Lafontan, 2013).**

<i>Effets et facteurs divers</i>	<b>Différences régionales</b>
<b>Voies lipolytiques</b>	
<i>Lipases hormono-sensible (protéine et activité)</i>	TASC > TAV
<i>Lipolyse basale (libération spontanée de glycérol)</i>	TASC > TAV
<i>Réponse lipolytique induite par les catécholamines</i>	TAV > TASC
<i>Activité adénylate cyclase stimulée par l'isoprénaline</i>	TAV > TASC
<i>Lipolyse induite par la stimulation des récepteurs <math>\beta</math>-adrénergiques</i>	TAV > TASC
<i>Nombre de récepteurs <math>\beta_{1,2}</math>-adrénergiques</i>	TAV > TASC
<i>Anti-lipolyse induite par la stimulation des récepteurs <math>\alpha_2</math>-adrénergiques</i>	TASC > TAV
<i>Nombre de récepteurs <math>\alpha_2</math>-adrénergiques</i>	TASC > TAV
<i>Protéine de liaison des acides gras-4 (FABP4)</i>	TASC > TAV
<b>Voies anti-lipolytiques</b>	
<i>Action anti-lipolytique de l'insuline</i>	TASC > TAV
<i>Substrat du récepteur à l'insuline-1 (IRS-1) (protéine et expression)</i>	TASC > TAV
<i>Tyrosine phosphorylation du récepteur insuline induite par l'insuline</i>	TASC > TAV
<i>Tyrosine phosphorylation d'IRS-1 induite par l'insuline</i>	TASC > TAV
<i>Activation de la voie PI3-kinase induite par l'insuline</i>	TASC > TAV
<i>Activité de la protéine tyrosine phosphatase 1B</i>	TAV > TASC
<i>Récepteur insuline (délétion exon 1)</i>	TAV > TASC

### 4. Activité sécrétoire et endocrine

En 1994, la découverte de la leptine, un facteur de satiété principalement produit par le TA et majoritairement par le TASC (Van Harmelen et al., 1998), a ajouté une dimension supplémentaire à la compréhension de la fonction du TA (Y. Zhang et al., 1994). Elle a démontré que ce tissu était capable d'émettre des signaux de différentes natures, hormonale, lipidique et protéique, contribuant à la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique afin d'orchestrer des changements de l'équilibre énergétique en fonction de l'état nutritionnel du corps. Les progrès ultérieurs ont identifié de nombreux autres dérivés adipeux sécrétés qui ont conduit à la reclassification du TA en tant qu'organe endocrinien.

Les adipocytes sont à l'origine de la sécrétion de nombreux facteurs, dont les principaux ainsi que leur fonction connue sont reportés dans le **Tableau 4**. Il est à noter que les types cellulaires présents dans le TA ou sa FSV, tels que les péricytes, les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages et les cellules souches pluripotentes, sont également à l'origine de la sécrétion de certains facteurs (Fain et al., 2006). L'adiponectine est l'une des adipokines sécrétées la plus étudiée (E. Hu et al., 1996; Scherer et al., 1995). C'est à la fois une importante molécule anti-inflammatoire et un important régulateur de la sensibilité à l'insuline. C'est une véritable adipokine, uniquement produite par les cellules adipeuses, et également un marqueur de la différenciation adipocytaire (Scherer et al., 1995). Sa sécrétion est réduite dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le DT2 (Arita et al., 1999; Pajvani et al., 2004; Yamauchi et al., 2001). Il a été démontré que l'adiponectine améliore la signalisation de l'insuline et l'absorption du glucose par le muscle squelettique en activant la signalisation associée à l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) (Gustafson et al., 2007; Yamauchi et al., 2002).

**Tableau 4. Facteurs sécrétés par le tissu adipeux (Badimon et al., 2015; Ronti et al., 2006).**

Adipokines	Fonction	Cellule sécrétrice	Régulation
<i>11β</i> -hydrostéroïde déshydrogénase 1	Métabolisme des stéroïdes	Adipocytes, préadipocytes	↑ obésité
Acides gras libres	Métabolisme lipidique	Adipocytes	↑ obésité
Adiponectine	Augmente la sensibilité à l'insuline, l'inflammation et l'artériosclérose	Adipocytes	↓ obésité
ASP	Stress et réponse immunitaire	Adipocytes, macrophages M2	↑ obésité
Angiotensinogène	Homéostasie vasculaire	Adipocytes, FSV	↑ obésité
Apéline	IR	Adipocytes, FSV, macrophages	↑ obésité
Aromatase	Métabolisme lipidique	Adipocytes, ADSCs, macrophages	↑ obésité
IGF-1	Métabolisme lipidique et IR	Adipocytes, préadipocytes, ADSCs	
TNFα	Inflammation, artériosclérose et IR	Adipocytes, macrophages M1	↑ obésité
MIF	Inflammation	Adipocytes, ADSCs, cellules du système immunitaire	↑ obésité
TGFβ	Adhésion, migration, croissance et différenciation cellulaire	Adipocytes, FSV, ADSCs	↑ obésité
Hormones stéroïdes	Métabolisme lipidique et IR	Adipocytes, préadipocytes	↑ obésité
PAI-1	Homéostasie vasculaire	Adipocytes, FSV	↑ obésité
IL-1	Inflammation et IR	Macrophages M1	↑ obésité
IL-6	Inflammation, artériosclérose et IR	Adipocytes, FSV	↑ obésité
IL-8	Pro-athérogenèse	Adipocytes, FSV	↑ obésité
IL-10	Inflammation et IR	Adipocytes, macrophages M2	↑ obésité ↓ SM
Leptin	Prise alimentaire, reproduction, angiogenèse et système immunitaire	Adipocytes	↑ obésité
LHS	Métabolisme lipidique	Adipocytes	↓ obésité
LPL	Métabolisme lipidique	Adipocytes	↑ obésité
Métallothionéine	Stress et réponse immunitaire	Adipocytes, FSV	↑ obésité
Monobutyryne	Angiogenèse	Adipocytes	↑ obésité
Omentine	IR	FSV, macrophages	↓ obésité
Péripiline	Métabolisme lipidique	Adipocytes	↑ obésité
Prostaglandines	Flux sanguin, lipolyse et différenciation cellulaire	Adipocytes, ADSCs	↑ obésité
Protéine C réactive	Inflammation, artériosclérose et IR	FSV	↑ obésité
FABP4	Métabolisme lipidique	Adipocytes, macrophages	↑ obésité
MCP-1	Pro-athérogenèse et IR	Adipocytes, macrophages M1	↑ obésité
CETP	Métabolisme lipidique	Préadipocytes, adipocytes	↑ obésité
RBP	Métabolisme lipidique	Adipocytes	Variable
Résistine	Inflammation et IR	Adipocytes, macrophages M2	Variable
Thrombospondine	Angiogenèse	Adipocytes	↑ obésité
Visfatine	IR	Adipocytes, préadipocytes, neutrophiles	Variable
Zinc-α2-glycoprotéine	Métabolisme lipidique, cancer et cachexie	Adipocytes, FSV	↓ obésité

SM : Syndrome Métabolique, ADSCs : Adipose-Derived Stem Cells, FSV : Fraction Stroma-Vasculaire, IR : Insulinorésistance, ASP : Adipsin and Acylation Stimulating Protein, IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1, TNFα : Tumor Necrosis Factor α, MIF : Macrophage migration Inhibitory Factor, TGFβ : Transforming Growth Factor β, PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1, IL : Interleukine, LHS : Lipase Hormono-Sensible, LPL : Lipoprotéine Lipase, FABP4 : Fatty Acid-Binding Protein 4 (AP2), MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1, CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein, RBP : Retinol-Binding Protein.

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

Les facteurs sécrétés dérivés du TA peuvent agir de façon locale ou systémique (action autocrine ou endocrine) et avoir des effets sur des systèmes biologiques multiples y compris sur l'homéostasie énergétique (métabolisme des glucides et des lipides, appétit, thermogénèse), le système immunitaire, la fonction reproductrice, la tension artérielle et l'angiogénèse. Certains effets de ces adipokines soulignent les liens entre obésité et pathologies associées comme la résistance à l'insuline, l'hypertension, l'hyperlipidémie et le DT2. En effet, au cours de l'obésité l'hypertrophie des adipocytes et l'infiltration de cellules immunitaires dans le TA entraînent une modification de son activité sécrétoire contribuant à l'instauration de l'inflammation à « bas bruit » (Lafontan & Berlan, 2003; Skurk et al., 2007).

### C. Dérégulation métabolique du TA au cours de l'obésité

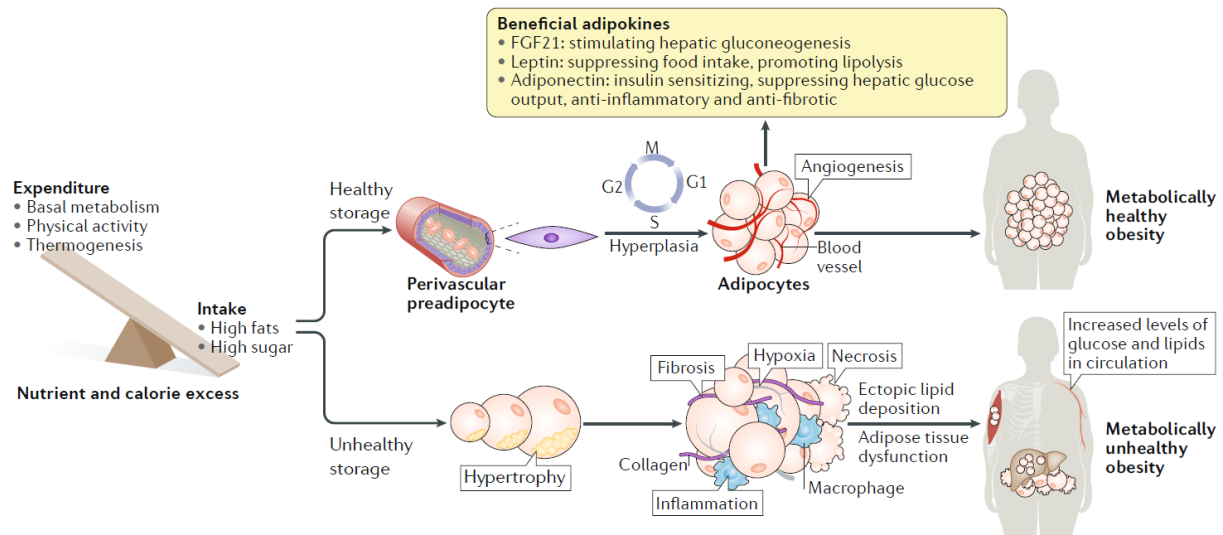
L'expansion de la masse grasse, telle qu'elle intervient au cours de l'obésité, conduit à de profondes modifications morphologiques et fonctionnelles du TA associées à une hyperplasie (augmentation du nombre) et hypertrophie (augmentation de la taille) des adipocytes qui affectent leur métabolisme et celui d'autres organes (Boden, 1997; Boden et al., 2002; DeFronzo et al., 1981; Engeli et al., 2005; Hirsch & Batchelor, 1976; Shulman, 2000; Warram et al., 1990; Weisberg et al., 2003).

#### 1. Remodelage du tissu adipeux

Au cours de la prise de poids, le TA n'est plus capable, au-delà d'un certain stade, de stocker les lipides de manière efficace ni de recruter des adipocytes supplémentaires, entraînant ainsi un remodelage global. La conséquence directe est l'apparition d'une grande quantité d'adipocytes hypertrophiques et hyperplasiques aux capacités altérées (Ghaben & Scherer, 2019) (**Figure 18**). L'apparition de ces cellules hypertrophiques provient d'une dégradation du renouvellement adipocytaire. En effet, la multiplication des préadipocytes est réduite ainsi que leur différenciation en adipocytes matures. A cela s'ajoute une sénescence prématurée des préadipocytes et une diminution de l'adipogénèse. Par conséquent, il existe un nombre trop faible d'adipocytes matures par

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

rapport à la quantité d'AG à stocker. De nombreuses observations expérimentales suggèrent que les adipocytes hypertrophiques plus gros peuvent présenter des propriétés biochimiques différentes de celles des adipocytes plus petits. Ces différences incluent une lipolyse élevée (Laurencikiene et al., 2011), une sécrétion accrue de cytokines inflammatoires (Skurk et al., 2007) et une sécrétion réduite d'adipokines anti-inflammatoires telles que la leptine (Skurk et al., 2007) et l'adiponectine (Bambace et al., 2011; Meyer et al., 2013).



**Figure 18. Mécanismes d'expansion du TA conséquences métaboliques (Ghaben & Scherer, 2019).**

*FGF21 : Fibroblast Growth factor 21.*

Les adipocytes hypertrophiés ont une fonction altérée caractérisée par un défaut de stockage des graisses entraînant un relargage de lipides dans la circulation. L'augmentation des AGL plasmatiques est en partie à l'origine de dépôts ectopiques au niveau des organes périphériques comme le foie par exemple (Virtue & Vidal-Puig, 2010). Ces dépôts sont à l'origine d'un effet délétère de ces lipides appelé lipotoxicité contribuant à la mise en place de l'insulinorésistance et du DT2.

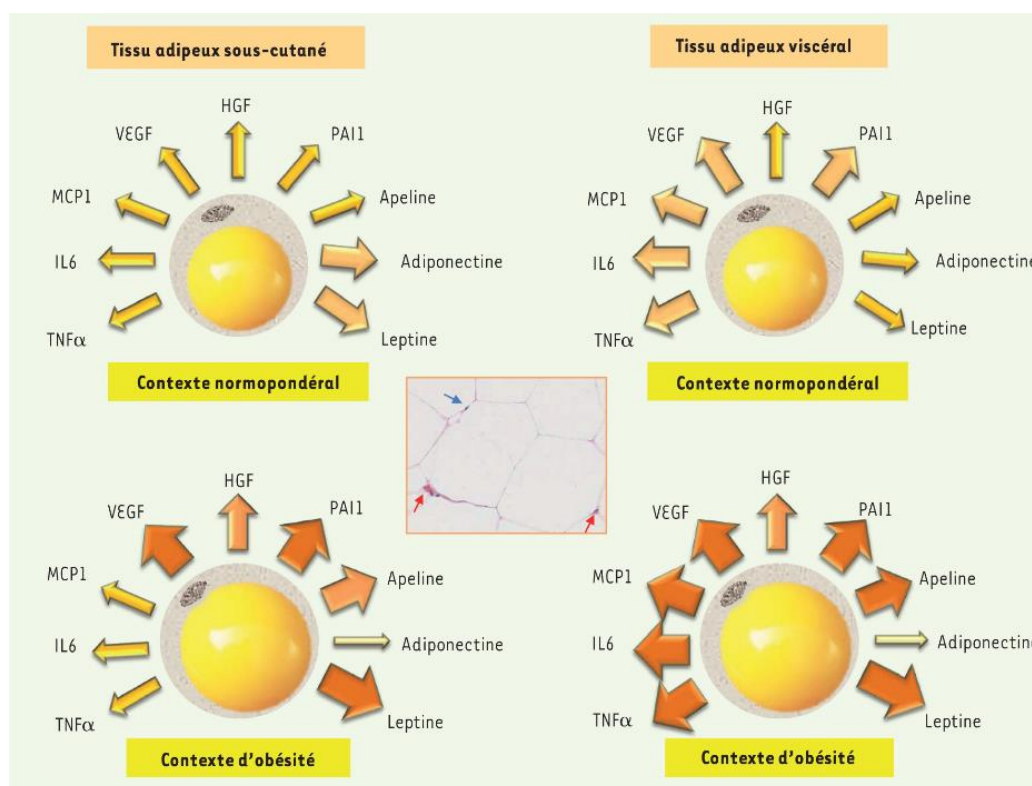
### 2. Altération de la production des adipokines

L'adipocyte possède un fort potentiel sécrétoire avec comme composés majoritaires les AGL mais il sécrète également, dans une moindre mesure, une grande variété de protéines



## II. Tissu adipeux : physiologie et physiopathologie

(Trayhurn et al., 2006). Le profil des adipokines sécrétées varie en fonction du dépôt adipeux (viscéral ou sous-cutané) et en fonction du contexte métabolique (normopondéral ou obésité). Les modifications structurelles et fonctionnelles du TA, observées au cours de l'obésité, se traduisent notamment par une production altérée des adipokines avec une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires issues du TAV (**Figure 19**).



**Figure 19. La nature des sécrétions adipocytaires varie en fonction de l'origine du tissu adipeux et du statut pondéral (Laurent et al., 2014).**

Les adipocytes sécrètent un grand nombre de protéines, appelées adipokines. Certaines d'entre elles sont représentées ici ; parmi celles-ci on trouve des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), ou certaines interleukines comme l'IL-6 (Interleukine-6), des chimiokines comme MCP1 (Monocyte-Chemoattracting Protein 1), des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), des facteurs de croissance tels que l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), mais également des adipokines spécifiques aux adipocytes comme la leptine, l'adiponectine et l'apeline. Le type des sécrétions varie en fonction du type de TA (sous-cutané ou viscéral) à partir desquels les adipocytes sont isolés, mais aussi du contexte (normopondéral ou obèse). La taille des flèches, ainsi que l'intensité de la coloration dans l'orange indiquent les variations positives des concentrations en adipokines. Une coupe de tissu adipeux humain est présentée dans l'encadré au centre de la figure (coloration à l'hématoxyline-éosine). La flèche bleue pointe le noyau d'un adipocyte, repoussé en périphérie de la cellule par la vésicule lipidique. Les flèches rouges indiquent les cellules du stroma du tissu adipeux. PAI1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1.

Skurk et collaborateurs en 2007 ont démontré que la taille des adipocytes était un facteur déterminant dans la sécrétion adipocytaires. Ils ont observé une expression différentielle des facteurs pro et anti-inflammatoires corrélée à l'augmentation de la taille des adipocytes. La résultante de la dérégulation des cellules hypertrophiques, observée au

cours de l'obésité, est un basculement de la dominance des adipokines anti-inflammatoires vers une dominance des adipokines pro-inflammatoires. Les facteurs majoritairement sécrétés par les adipocytes hypertrophiques sont la leptine, l'IL-6, TNF $\alpha$ , PAI-1 et MCP-1 (Trayhurn et al., 2006).

### 3. Inflammation

L'obésité et l'altération de la fonction adipocytaire sont associées à l'installation d'un état inflammatoire chronique du TA sans signes cliniques, appelé inflammation « à bas bruit » ou de bas grade. Cette inflammation est caractérisée par une infiltration massive de cellules immunitaires, contrairement à l'inflammation aiguë caractérisée par une réaction immunitaire rapide associée aux 4 symptômes : rougeur, chaleur, douleur et gonflement.

La chronicité de cette inflammation est due à la persistance de la lésion tissulaire initiale, et donc de l'infiltrat immunitaire qui en résulte, associée à des phénomènes de destruction tissulaire (nécrose) puis à l'installation d'un processus de cicatrisation pathologique nommé fibrose. La fibrose du TA est une augmentation des fibrilles de la matrice extracellulaire et des collagènes pouvant être à l'origine de l'altération partielle ou globale de la fonction de l'organe ou du tissu.

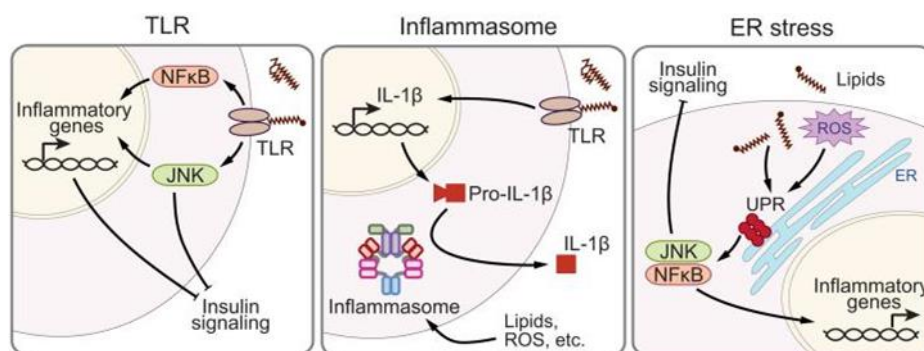
Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le développement et l'installation de l'inflammation du TA. Ces mécanismes comprennent la présence excessive d'AG, le stress du réticulum endoplasmique (RE) et le stress oxydant, les phénomènes d'hypoxie et d'hypertrophie adipocytaire et une inflammation liée au microbiote intestinal. L'activation de ces voies inflammatoires entraîne une infiltration de macrophages au niveau du TA contribuant à un remodelage fibro-inflammatoire irréversible du tissu.

#### *a. Acides gras, stress du RE et stress oxydant*

L'un des premiers facteurs à l'origine de l'inflammation chronique du TA est l'apport excessif et répété de nutriments qui induit un flux important de lipides au niveau adipocytaire. L'apport excessif d'AGL est notamment à l'origine de l'activation directe de la voie des TLR-4 (Toll-Like Receptor 4) conduisant à une stimulation de l'inflammation

(Shi et al., 2006). L'activation des TLR, via les voies NFκB (Nuclear Factor-κB) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase), augmente l'expression de gènes pro-inflammatoires et diminue la signalisation insulinaire (S. Sun et al., 2012) (**Figure 20**).

D'autre part, le flux lipidique associé à la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), causée par l'activation de NADPH oxydases en réponse à la présence d'AGL (Furukawa et al., 2004), induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-Like Receptor family Pyrin domain-containing 3) qui stimule alors la Caspase-1 à l'origine du clivage de la pro-IL-1β en IL-1β mature (Wen et al., 2011) (**Figure 20**). Cet environnement est aussi à l'origine de l'induction du stress du RE qui, lui-même, peut être la source de stress oxydatif (S. Sun et al., 2012). Ce stress peut alors engendrer toute une cascade de signalisation inflammatoire incluant NFκB et JNK réduisant alors la signalisation insulinaire (Hotamisligil, 2010; Tanti et al., 2012) (**Figure 20**).



**Figure 20. Mécanismes majeurs à l'origine de l'inflammation du TA au cours de l'obésité (à partir de Sun et al., 2012).**

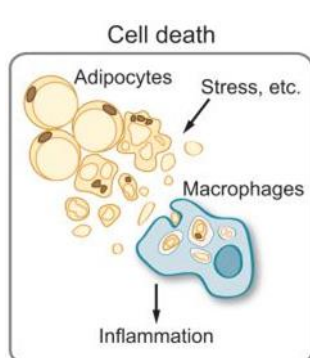
*Des signaux de stress tels que les AGL peuvent stimuler les voies inflammatoires dans les adipocytes en activant les TLR ou le stress du RE via JNK et NF-κB avec comme conséquence une inhibition de la signalisation de l'insuline. Par ailleurs, les lipides peuvent également stimuler la voie des inflammasomes. RE : Réticulum Endoplasmique, JNK : c-Jun N-terminal kinase, NF-κB : Nuclear Factor-κB, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TLR : récepteur de type Toll, UPR : Unfolded Protein Response.*

### **b. Hypoxie et hypertrophie adipocytaires**

L'équilibre entre l'expansion hypertrophique des adipocytes existants et l'adipogenèse chez un individu a un impact profond sur la santé métabolique. Au cours de leur expansion, les adipocytes subissent un stress mécanique accru à mesure que leur contact avec les cellules voisines et les composants de la matrice extracellulaire augmentent. Les adipocytes subissent notamment un phénomène d'hypoxie lorsqu'ils se développent à des tailles approchant les limites de la diffusion de l'oxygène. Les stress mécaniques et

hypoxiques accrus des adipocytes hypertrophiques contribuent à l'inflammation du TA (Halberg et al., 2009; Khan et al., 2009).

Au-delà d'une certaine taille, les adipocytes atteignent un seuil de diffusion de l'oxygène au sein de la cellule créant alors des zones de micro-hypoxie (Trayhurn & Wood, 2004). L'hypoxie observée au niveau du TA au cours de l'obésité est à l'origine de la production de la protéine MCP-1. Cette protéine active alors le stress du RE et les facteurs de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor 1  $\alpha$ ) et NF $\kappa$ B conduisant à la sécrétion notamment de CCL2 (C-C motif Chemokine Ligand-2, MCP-1) et IL-6 (Cusi, 2010; Ye et al.,



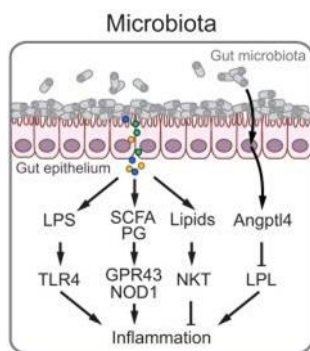
2007). L'hypoxie liée à l'hypertrophie adipocytaire peut également conduire à la nécrose de certaines cellules qui s'accompagne du relargage de DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) entraînant le recrutement de macrophages et l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui *in fine* conduisent à l'augmentation de l'inflammation (Skurk et al., 2007) (**Figure 21**).

**Figure 21. Obésité, inflammation et mort cellulaire (à partir de Sun et al., 2012).**

*Les signaux de stress induisent la mort des adipocytes, à partir de laquelle les débris cellulaires peuvent être phagocytés par les macrophages et influencer l'inflammation.*

### **c. Inflammation du TA et microbiote intestinal**

Par ailleurs, au cours de l'obésité, l'apport excessif de nutriments impacte de façon importante le tube digestif et son microbiote, ce qui pourrait favoriser l'inflammation chronique et de ce fait l'inflammation du TA. L'intestin et ses micro-organismes sont des acteurs majeurs dans l'obésité et ses dérégulations métaboliques. L'altération de la flore intestinale peut être la source d'inflammation, de prise de poids ou encore d'insulinorésistance (**Figure 22**). Au cours de l'obésité, la paroi intestinale peut se retrouver altérée et ainsi permettre le passage de la barrière intestinale à une partie de cette flore. En effet, des niveaux plasmatiques plus élevés de LPS ont été retrouvés chez la souris obèse, indiquant une endotoxémie métabolique (Cani et al., 2007). Les PAMPs (Pathogen Associated Molecular patterns) issus du microbiote intestinal peuvent donc contribuer à l'inflammation du TA (Burcelin et al., 2011).



**Figure 22. Obésité, inflammation et microbiote intestinal (à partir de Sun et al., 2012).**

Le microbiote intestinal peut influencer les réponses inflammatoires chez l'hôte par la libération de LPS (LipoPolySaccharide) et de PG (PeptidoGlycane), qui activent ensuite les récepteurs TLR4, GPR43 et NOD1, respectivement. Les antigènes lipidiques dérivés du microbiote peuvent également modifier le statut d'activation des cellules NKT. Le microbiote intestinal peut influencer la sécrétion d'Angptl4 par les entérocytes, ce qui inhibe l'activité de la LPL et l'absorption des lipides dans les macrophages. Angptl4 : Angiopoïétine-like 4, GPR43 : récepteur 43 couplé à la protéine G, LPL : lipoprotéine lipase, NKT : cellules T Natural Killer, NOD1 : domaine d'oligomérisation de liaison nucléotidique 1, TLR : récepteur de type Toll.

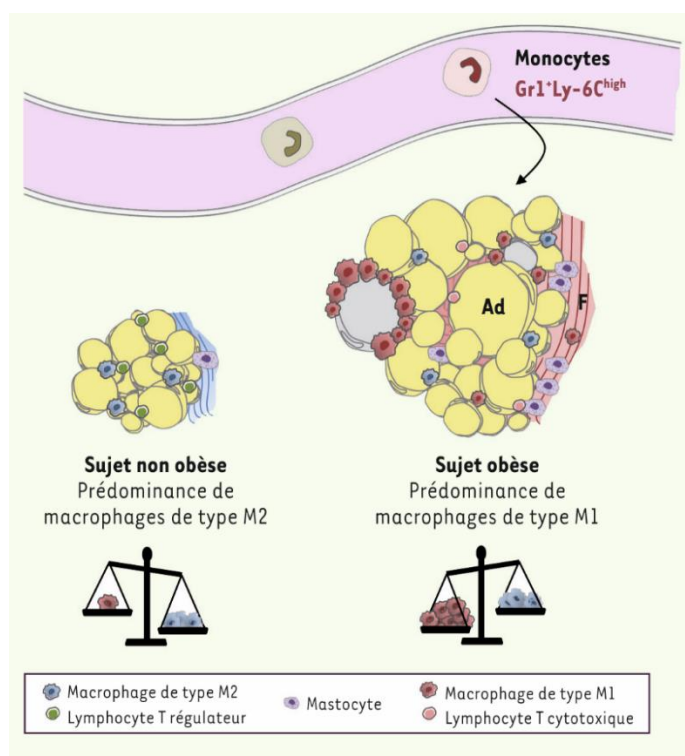
### d. L'infiltration de macrophages

L'activation de ces voies inflammatoires consécutive à l'installation de l'obésité a pour conséquence le recrutement et l'accumulation de nombreuses cellules immunitaires principalement composées de macrophages comme le dénote l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de MCP-1 (Bruun et al., 2005; Fain & Madan, 2005; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Cette infiltration est majoritairement observée dans le TAV (Bruun et al., 2005).

Plusieurs processus rentrent en jeu dans l'inflammation du TA obèse liée aux macrophages : le recrutement de monocytes circulants, la multiplication des macrophages *in situ* et l'activation métabolique des macrophages vers un phénotype M1.

Les différentes cellules composants le TA pathologique (adipocytes hypertrophiés, préadipocytes, autres cellules de la FSV et cellules immunitaires) produisent un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines attirant les macrophages (MCP-1) et de composés permettant une activation des cellules endothéliales. L'infiltration monocytaire qui en résulte aboutit à une forte accumulation de macrophages (**Figure 23**). La teneur de la FSV en macrophages passe de 4% chez l'Homme mince à environ 12% chez l'Homme obèse (Harman-Boehm et al., 2007). Il en est de même chez la souris avec entre 5 à 15% de macrophages dans la FSV du TAV chez la souris mince et jusqu'à 40 à 50% chez la souris obèse (McNelis & Olefsky, 2014).

Cependant, plusieurs équipes ont mis en évidence que ce recrutement de monocytes est



aussi associé à une prolifération *in situ* des macrophages résidents (Amano et al., 2014; Zheng et al., 2016). A cette prolifération s'ajoute une rétention de ces cellules dans le TA consécutive à une augmentation de l'expression du gène *NTN1* (codants pour la nétrine 1) dans les macrophages du TA obèse (Ramkhelawon et al., 2014). La nétrine-1 est importante dans la persistance des macrophages au sein du TA pathologique (Sharma et al., 2019).

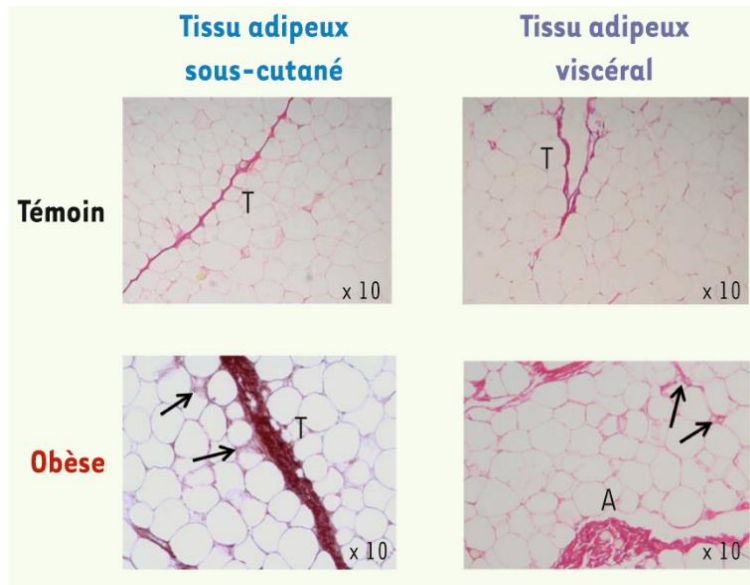
**Figure 23. Obésité, recrutement et polarisation des macrophages adipeux (Dalmas et al., 2011).**

*Chez les souris non obèses, les macrophages résidents ont un phénotype de type M2. Des lymphocytes Treg sont présents, particulièrement dans les tissus profonds. Dans le modèle DIO (Diet-Induced Obesity), l'obésité induit le recrutement de monocytes inflammatoires de phénotype Gr1<sup>+</sup>Ly-6C<sup>high</sup>, qui seraient les précurseurs de macrophages de type M1. Ces macrophages recrutés sont disposés en couronne autour d'adipocytes présentant des caractéristiques de mort cellulaire. Les mécanismes impliqués sont divers et complexes et pourraient mettre en jeu la contribution d'autres cellules de l'immunité, dont les lymphocytes cytotoxiques. La présence d'une fibrose a été décrite principalement dans le tissu adipeux humain. Plusieurs types cellulaires sont associés aux zones fibrotiques, dont des macrophages et des mastocytes. Ad : Adipocytes ; F : fibrose.*

Le troisième processus en jeu est la polarisation des macrophages qui intervient en fonction de l'environnement cytokinique. En effet, deux phénotypes se distinguent : les macrophages de type M2 activés par la voie alternative, qui ont un phénotype plutôt anti-inflammatoire (sécrétion d'IL-10 entre autres), et les macrophages de type M1 activés par la voie du complément, qui ont un phénotype pro-inflammatoire (sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et de ROS entre autres) (**Figure 23**). Au cours de l'obésité, la proportion de macrophages polarisés M1 augmente favorisant ainsi cet état inflammatoire et la résistance à l'insuline (Lumeng et al., 2007; M. T. A. Nguyen et al., 2007).

**e. Remodelage fibro-inflammatoire irréversible**

L'installation de la fibrose consécutive à l'inflammation de bas grade est caractérisée par une surproduction de collagènes par différentes cellules, notamment les préadipocytes et les cellules fibroblastiques et endothéliales, provoquant un dépôt excessif de tissu conjonctif. Ce processus, similaire à la cicatrisation, altère la fonction de l'organe et donc induit un état pathologique par modification de l'architecture du tissu (**Figure 24**). La



fibrose intervient après activation des macrophages via TLR4, qui vont alors sécréter des médiateurs pro-fibrotiques notamment TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), permettant ainsi la mise en place de processus pro-fibrotiques au sein du TA pathologique (Ask et al., 2008; Vila et al., 2014).

**Figure 24. Aspect microscopique des dépôts de fibrose dans le tissu adipeux humain (Dalmás et al., 2011).**

*Des biopsies chirurgicales de TA sous-cutané et viscéral ont été marquées au rouge picosirius (marqueur des collagènes) pour révéler les zones fibrotiques. A : amas ; T : travée. Les flèches localisent la fibrose péri-cellulaire présente uniquement chez les sujets obèses.*

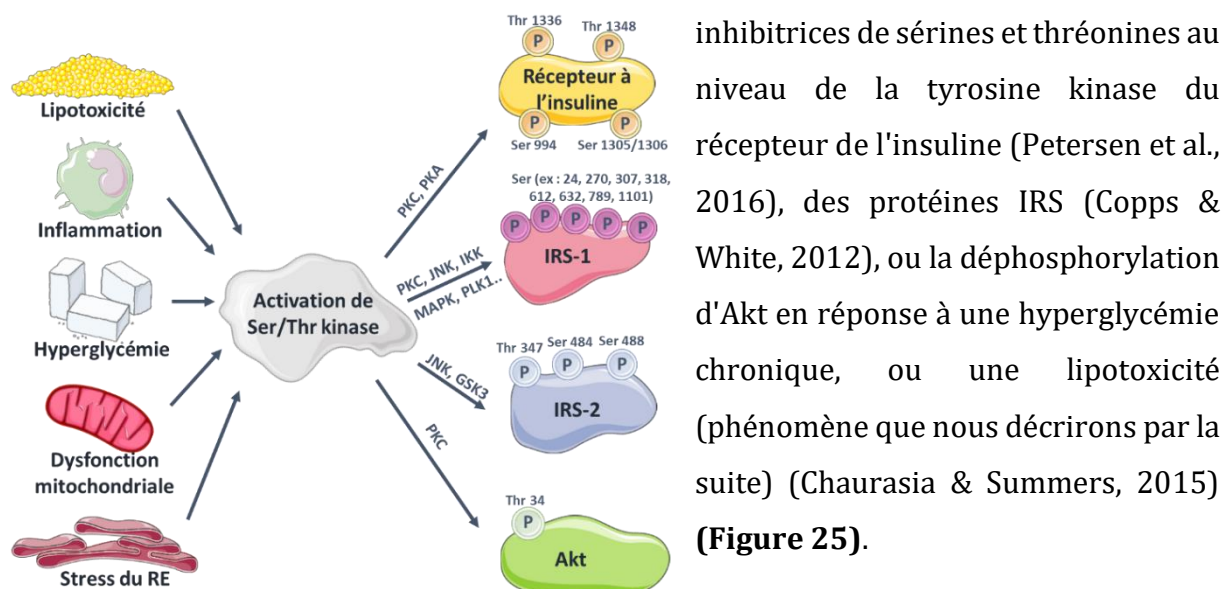
Dans le cadre de l'obésité, la matrice extracellulaire subit un remodelage actif afin de permettre l'expansion du TA et augmenter la capacité de stockage énergétique. Au-delà d'un certain seuil, l'état fibrotique se développe limitant alors la plasticité du TA et de ce fait sa capacité d'expansion (Khan et al., 2009). Cette diminution de plasticité, caractérisée par l'augmentation de collagène dans la matrice extracellulaire, est corrélée à l'insulinorésistance et l'hyperglycémie chronique observée au cours de l'obésité (Berria et al., 2006).

#### 4. Résistance à l'insuline du tissu adipeux

Comme nous l'avons décrit précédemment, le métabolisme du TA est fortement régulé par l'insuline. Cette dernière favorise le captage du glucose, la lipogenèse et le stockage de l'énergie sous forme de TG en période post-prandiale, alors qu'en période inter-prandiale, son faible taux circulant est favorable à la lipolyse. Au cours de l'obésité, le remodelage du TA s'accompagne d'une résistance à l'action de l'insuline dont les mécanismes sont encore mal connus.

##### a. Mécanismes dépendants d'Akt

D'une manière générale, il est reconnu que la principale origine de l'insulinorésistance repose sur des perturbations liées directement à Akt. Ainsi, de nombreux travaux ont démontré que des mutations monogéniques humaines, au niveau de la cascade de signalisation de l'insuline (récepteur de l'insuline, PI3 kinase et Akt), provoquent une résistance à l'insuline sévère (Czech, 2017; Parker et al., 2011). Une grande partie de ces travaux ont attribué la cause de la résistance à l'insuline à des phosphorylations



**Figure 25. Schéma récapitulatif des causes majeures de l'insulinorésistance (à partir de Boucher et al., 2014).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. L'activation des sérine/thréonine (Ser/Thr) kinases induit des phosphorylations inhibitrices sur des protéines de la signalisation insulinique. La lipotoxicité, l'inflammation, l'hyperglycémie et par la suite le stress oxydatif, ainsi que les dysfonctions mitochondriales et le stress du réticulum endoplasmique (RE), convergent tous vers l'activation de Ser/Thr kinases conduisant à l'inhibition du récepteur à l'insuline, des protéines IRS et Akt et favorisant l'insulinorésistance.



***b. Mécanismes indépendants de la voie Akt***

Indépendamment des mécanismes que nous venons de décrire, des données indiquent qu'en amont et en aval de la réponse à l'insuline certains événements, incluant le flux métabolique (Perry et al., 2015; Titchenell et al., 2016), des régulations transcriptionnelles liées à l'insuline (Guilherme et al., 2017; S. Kang et al., 2016) voire d'autres voies métaboliques (Kusminski et al., 2016; Sabio & Davis, 2010) peuvent être des événements tout aussi importants que les phosphorylations mentionnées chez la majorité des obèses diabétiques.

Ainsi, Sun et collaborateurs montrent qu'en amont du récepteur à l'insuline, dans le TA de souris nourries avec un régime riche en graisses, certaines adipokines (ici l'endotrophine) sont capables de provoquer un remodelage du TA vers un TA « pathologique » au profil fibrosé et pro-inflammatoire qui est associé à l'insulinorésistance (K. Sun et al., 2014). Kang et collaborateurs précisent que, dans de tels événements, il existe un remodelage de la matrice extracellulaire impliquant l'interaction avec certaines intégrines (L. Kang et al., 2011).

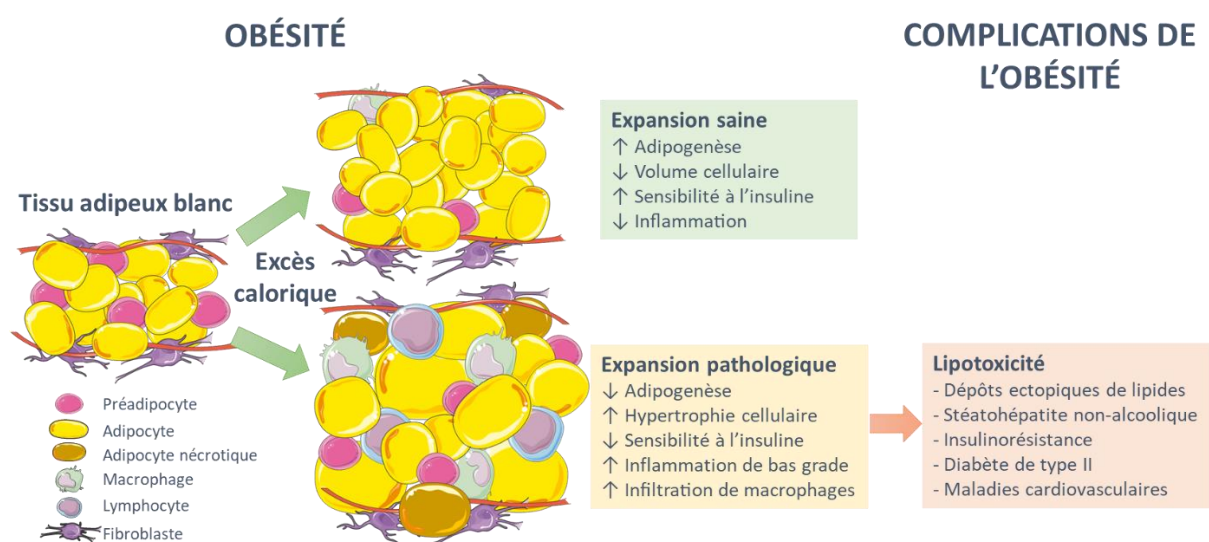
A l'inverse, en aval, la voie métabolique de l'utilisation du glucose adipocytaire, pour synthétiser *de novo* des AG, est fortement altérée. Cette lipogenèse, située en aval de la voie Akt, est réduite de manière drastique au cours de l'obésité avec une forte baisse de l'expression des enzymes : AcétylCoA carboxylase (ACC), synthase des acides gras (FAS) (Solinas et al., 2015) et ATP Citrate Lyase (ACL) (Tang et al., 2016). Ces effets découlent d'une diminution des facteurs de transcription lipogéniques, ChREBP $\alpha$  et ChREBP $\beta$  (Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein), potentiellement causée par les niveaux réduits de GLUT4 (Baraille et al., 2015).

Enfin, le contrôle par l'insuline de la lipolyse adipocytaire est un processus critique par lequel les adipocytes influencent la tolérance au glucose et la néoglucogenèse hépatique chez les animaux obèses/nourris avec un régime hyperlipidique (Titchenell et al., 2016). Il avait tout d'abord été suggéré que la phosphorylation et l'activation de la PDE3B par Akt pouvait expliquer l'inhibition de la lipolyse par l'insuline (Kitamura et al., 1999). Cependant, des résultats démontrent que l'inhibition de la phosphorylation de la phosphodiesterase par Akt n'élimine pas cette action de l'insuline (Czech, 2017). Le mécanisme d'action de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire reste donc une question

majeure, complexifiée par l'existence d'une action indirecte de l'insuline sur la lipolyse passant par le système nerveux central (A. C. Shin et al., 2017).

## 5. Lipotoxicité

L'obésité entraîne une insulino-résistance à l'origine, entre autres, d'une augmentation de la lipolyse et d'une diminution de la lipogénèse, contribuant à l'élévation chronique des AG circulants pouvant entraîner une augmentation de leur taux dans les tissus non-adipeux jusqu'à atteindre des niveaux toxiques. Les effets délétères de l'accumulation des lipides dans les tissus non-adipeux sont connus sous le nom de lipotoxicité. En effet, les TG peuvent remplir une fonction de stockage d'AG non estérifiés à longue chaîne mais aussi de leurs dérivés, tels que les céramides et les diacylglycérols (DAG) (Gustafson et al., 2007). Ainsi, un excès de DAG, de céramides et d'AG saturés, observé dans l'obésité, peut contribuer à l'inflammation chronique et avoir des effets néfastes sur de nombreux organes et systèmes (**Figure 26**). Dans ce contexte, l'inflammation chronique du TA, le dysfonctionnement mitochondrial et l'insulino-résistance sont intimement liés à la lipotoxicité (J.-P. Després & Lemieux, 2006).



**Figure 26.** Expansion du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité (à partir de Longo et al., 2019).

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art.

## **D. Traitements de l'obésité et des pathologies associées**

Au-delà de son profond impact sur la santé d'un individu, l'obésité a désormais des conséquences importantes sur notre société, tant en termes économiques que sociétaux. Cela en fait un enjeu majeur de santé publique. En effet, cette maladie touche toutes les catégories de population dans une forte proportion et elle est associée à un grand nombre d'autres pathologies. Il est donc essentiel de trouver des moyens de lutter contre cette pandémie. Plusieurs méthodes existent : la modification du mode de vie concernant l'alimentation et l'activité physique, les chirurgies bariatriques aussi appelées « chirurgies de l'obésité » et les traitements pharmacologiques à plus ou moins long terme (B. M. Wolfe et al., 2016).

### **1. Mode de vie et exercice physique**

Dans un premier temps, une modification du mode de vie, de l'alimentation et une augmentation de l'activité physique sont mis en place pour le traitement de l'obésité. L'objectif est alors de rétablir la balance énergétique (entre les apports et les dépenses énergétiques) en combattant la sédentarité pour augmenter la dépense énergétique et en réduisant la consommation d'aliments riches en énergie et pauvres en nutriments (Wadden et al., 2020). Si toutes ces modifications ne sont pas suffisantes dans le traitement de l'obésité et de ses pathologies associées (notamment DT2 et MCV), d'autres méthodes sont envisagées.

### **2. Chirurgies bariatriques**

Dans le cadre d'une obésité sévère, différentes chirurgies bariatriques peuvent être envisagées. Les plus courantes sont l'anneau gastrique, la sleeve et le by-pass.

L'anneau gastrique est une technique restrictive qui consiste en l'apposition d'un anneau ajustable en silicone au niveau de la partie supérieure de l'estomac réduisant alors la quantité d'aliments ingérables (Locke et al., 2015). La sleeve consiste en une réduction d'environ 85% de la taille de l'estomac. Il s'agit donc, tout comme l'anneau gastrique,

d'une technique restrictive (Barnett, 2013). Enfin, le by-pass est une technique combinant les propriétés restrictives de la sleeve et une malabsorption. Cette intervention consiste en une diminution de la taille de l'estomac associée à un court-circuit d'une grande partie de l'estomac et des intestins. Le contenu de l'estomac réduit est directement conduit au niveau du jéjunum (Wasserman & Inge, 2014).

En plus des effets anatomiques de ces procédures, la sleeve et le by-pass modulent les taux d'incrétines. En effet, ces interventions diminuent les taux de ghréline (hormone orexigénique) et augmente les taux de GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) et du peptide YY (hormones anorexigéniques) (Karamanakos et al., 2008; Korner et al., 2005). Malgré ces nombreux impacts bénéfiques sur la physiologie, ces techniques hautement invasives comportent des effets indésirables et elles sont souvent remplacées par des traitements pharmacologiques dans le cadre d'obésité moins sévère.

### 3. Pharmacothérapies

Différents types de pharmacothérapies existent sur le marché. Elles sont bien évidemment à associer à un mode de vie sain couplé à une activité physique régulière. Ces pharmacothérapies ont pour objectif, en plus d'induire une perte de poids, de contrôler les conséquences de l'obésité telles que l'hypertriglycéridémie et le DT2. Toutefois, il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de réel traitement « anti-obésité ».

Une première approche a ciblé la réduction de la prise alimentaire par suppression de l'appétit, avec des composés tels que le Phentermine, agoniste noradrénergique, ou le Lorcaserin, agoniste du récepteur sérotoninergique 5HT-2C (Pilitsi et al., 2019). Toutefois, leur utilisation reste controversée et la majeure partie de ces composés a été retirée du marché du fait d'effets secondaires importants dus à leur action sur le système nerveux central (euphorie, idées suicidaires, troubles cardiaques, etc.). Les études se sont alors tournées vers des composés plus sûrs, présentant moins d'effets indésirables.

Tout d'abord, le Liraglutide est un analogue de GLP-1 prescrit depuis plusieurs années dans le cadre du traitement du DT2 [9]. Il a été montré que son effet sur la glycémie s'accompagne d'une perte de poids, ce qui lui vaut d'être utilisé comme agent thérapeutique anti-obésité. Son action passe par une activation du récepteur du GLP-1 au

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

niveau de l'hypothalamus conduisant à la stimulation de neurones anorexigènes, associée à une inhibition des neurones orexigènes. D'autres analogues de GLP-1 sont sur le marché ou à l'étude comme le Sémaglutide [10]. Ces molécules permettent à la fois la réduction du poids corporel, de la glycémie (par stimulation de la sécrétion d'insuline et réduction de la sécrétion de glucagon) mais aussi de la vidange gastrique postprandiale.

L'Orlistat est une molécule aussi utilisée en thérapeutique mais avec une efficacité bien moindre que le Liraglutide. Son action passe par une inhibition des lipases gastro-intestinales permettant ainsi de réduire l'absorption des graisses mais il est à l'origine de nombreux effets indésirables digestifs [11]. D'autres thérapies sont également en cours de développement comme des combinaisons d'hormones telles que GLP-1/GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide).

Certaines des molécules citées précédemment, notamment les analogues de GLP-1, peuvent être associées à d'autres composés tels que la Metformine dans le traitement d'un DT2 insuffisamment contrôlé. La Metformine possède des effets anti-hyperglycémiant par réduction de la production hépatique de glucose, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline musculaire et le retard de l'absorption intestinale de glucose [12]. D'autres molécules peuvent aussi y être associées telles que des inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) comme la Sitagliptine, la Vildagliptine et la Saxagliptine qui permettent l'amélioration du contrôle glycémique par l'augmentation des incrétines GLP-1 et GIP [13, 14, 15].

Les différents composés actuellement utilisés ont démontré une excellente efficacité, notamment dans le traitement du DT2. Cependant, pour ces pathologies en lien avec l'obésité, aucun retour à la normale ni aucune perte significative de masse grasse n'ont été observés, suggérant ainsi un fort potentiel de développement et d'innovation thérapeutique. Parmi les différentes pistes de recherche actuelles, des traitements à double cibles thérapeutiques ont vu le jour et sont en phase de développement ou en cours d'étude clinique dont les agonistes GIP/récepteur au GLP-1 (comme le Tirzepatide) qui sont particulièrement efficaces dans le traitement du DT2 (Min & Bain, 2021). En parallèle, pour cette même pathologie, une multitude d'analogues de l'insuline à courte ou longue durée d'action sont actuellement disponibles (Ehren & Klein, 2019).

## II. Tissus adipeux : physiologie et physiopathologie

De nombreux travaux s'intéressent, depuis des années, à l'implication du Système Endocannabinoïde (SEC), et plus particulièrement des récepteurs aux cannabinoïdes-1 (CB1R), dans l'étiologie de l'obésité. Il est maintenant bien établi que les dérèglements liés à l'obésité s'accompagnent d'une hyperactivation du SEC caractérisée notamment par une augmentation du tonus endocannabinoïde cérébral (Di Marzo et al., 2001) et périphérique (Engeli et al., 2005), notamment du TA, chez la souris et chez l'Homme. Ainsi, il existe une corrélation positive entre le niveau d'ECs circulants et certains marqueurs de l'obésité, tels que l'IMC et le tour de taille (Matias et al., 2012).

Cette recherche autour des CB1R comme cible thérapeutique a commencé il y a une quinzaine d'années et s'inscrit dans une démarche globale de traitement de l'obésité, des pathologies associées et des dérégulations du TA. Ainsi, depuis le retrait du marché en 2008 de la première molécule « anti-obésité » ciblant les CB1R ayant fait preuve d'efficacité (i.e. le Rimonabant), la communauté scientifique s'attèle à caractériser de nouveaux composés. Des essais de co-administration d'agonistes du récepteur au GLP-1 et d'antagonistes des CB1R ont d'ailleurs récemment été réalisés et ont démontré une réduction de la masse corporelle notamment de la masse grasse et, de surcroît, une amélioration de l'action de l'insuline, de la dyslipidémie et de la stéatose hépatique (Zizzari et al., 2021).

## III. Le système endocannabinoïde

### A. Historique

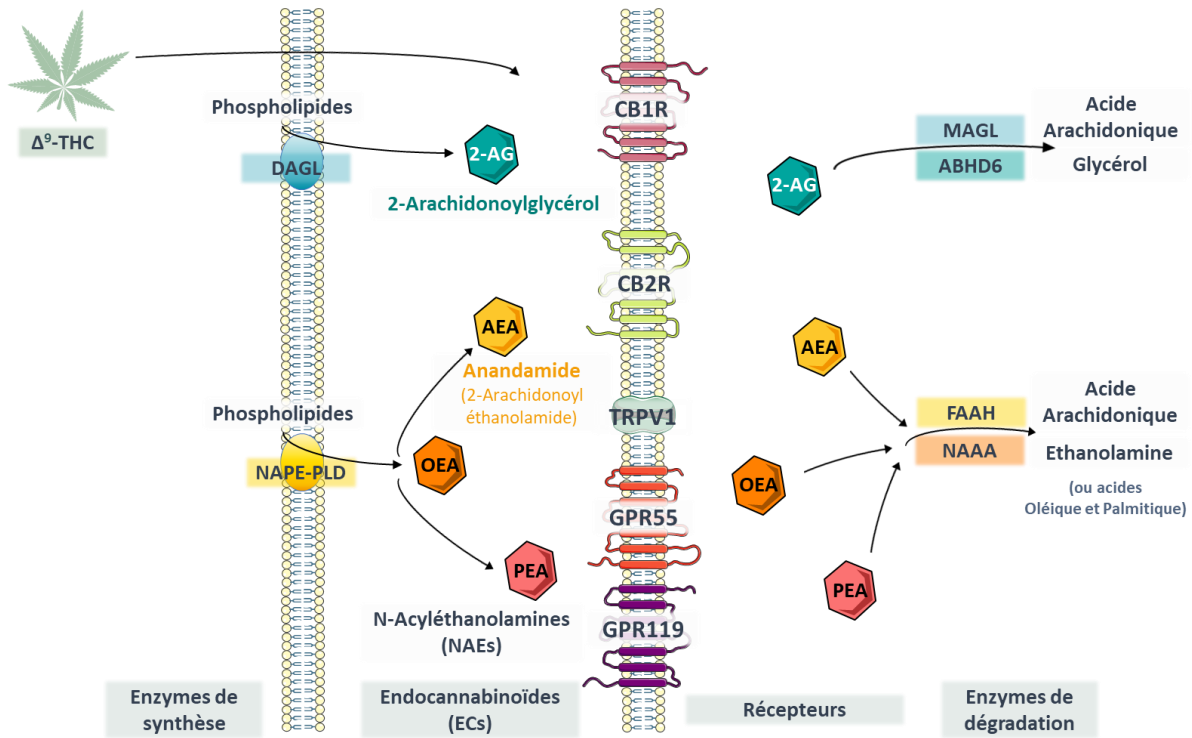
Depuis des milliers d'années la plante *Cannabis sativa* est utilisée à des fins récréatives et médicinales. Le plus ancien témoignage de son utilisation a été découvert sur une pierre provenant des pyramides d'Égypte et datant d'environ 2350 av. J.-C. (Ligresti et al., 2016). Les phytocannabinoïdes, contenus dans le cannabis, lui confèrent des propriétés psychoactives pouvant induire un état d'euphorie, des hallucinations, de l'analgésie ou encore stimuler l'appétit, justifiant ainsi leur utilisation dans les médecines ancestrales dans le cadre du traitement de la douleur ou encore du manque d'appétit (Behl et al., 2021).

C'est l'identification, dans les années 60, du composé psychoactif majoritaire de la plante *Cannabis sativa* : le  $\Delta^9$ -TetraHydroCannabinol aussi connu sous le nom de  $\Delta^9$ -THC, qui a permis l'étude de son mécanisme d'action et la caractérisation du SEC (Mechoulam & Gaoni, 1965). Par la suite, les recherches se sont intensifiées afin d'étudier le métabolisme, la biochimie et la pharmacologie de ce système, mettant ainsi en évidence son rôle dans de nombreuses fonctions biologiques (Pacher et al., 2006).

Vingt ans après la découverte du  $\Delta^9$ -THC, le groupe d'Allyn Howlett a montré que ce composé et certains de ces analogues synthétiques avaient la capacité de se fixer de manière énanti sélective sur des récepteurs de mammifères et d'inhiber l'adénylate cyclase de neuroblastomes murins (N18TG2) (Howlett et al., 1990). Un an plus tard, un récepteur couplé aux protéines G répondant au  $\Delta^9$ -THC a été identifié, cloné à partir de cellules humaines promyéloïdes et nommé récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1R) (Matsuda et al., 1990), suivi en 1993 par le récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (CB2R) (Munro et al., 1993). La découverte et la caractérisation de ces récepteurs a ensuite conduit à l'identification de leurs ligands endogènes, l'ArachidonoylEthanolAmide (AEA, anandamide) (Devane et al., 1992) et le 2-ArachidonoylGlycérol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995), nommés endocannabinoïdes (ECs).

L'identification de ces ligands endogènes a entraîné le changement de nom du système cannabinoïde qui a alors été appelé système endocannabinoïde (SEC). Ainsi, le SEC inclut les principaux récepteurs CB1R et CB2R, leurs ligands endogènes ainsi que les enzymes

de synthèse et de dégradation de ces molécules (Di Marzo, 2018; Pacher et al., 2006) (Figure 27).



**Figure 27. Le système endocannabinoïde (à partir de Cani et al., 2014).**

*$\Delta^9$ -THC :  $\Delta^9$ -TétraHydroCannabinol, OEA : N-Oléoyl EthanolAmide, PEA : N-Palmitoyl EthanolAmide, NAPE-PLD : N-AcylPhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D, DAGL : DiAcylGlycérol Lipase, CBR : récepteurs aux cannabinoïdes, GPR : G Protein-coupled Receptor, TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloïd-1, FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase, NAAA : N-Acylethanolamine hydrolysing Acid Amidase, MAGL : MonoAcylGlycérol Lipase, ABHD : Alpha/Beta-Hydrolase Domain containing.*

Le SEC a, par la suite, été associé à une variété de troubles neuropsychiatriques et neurodégénératifs tels que l'anxiété, le stress prolongé, la dépression, la psychose, les troubles d'Alzheimer et de Parkinson (Bisogno & Di Marzo, 2007). De plus, la signalisation des ECs a été impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que la douleur, la nausée, la reproduction, la réponse immunitaire et le cancer, indiquant une grande diversité des cibles biologiques modulées par ce système (Di Carlo & Izzo, 2003; Habayeb et al., 2002; Karsak et al., 2007; Parolaro et al., 2002; Pertwee, 2001; Tramèr et al., 2001). La caractérisation et la manipulation pharmacologique du SEC sont importantes puisqu'elles peuvent permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et développer des thérapies pour le traitement de nombreux troubles sans les effets secondaires communément retrouvés dans le cadre de traitements aux cannabinoïdes d'origine végétale comportant du  $\Delta^9$ -THC.



## B. Endocannabinoïdes et dérivés endogènes

Le SEC comporte deux ligands endogènes majeurs, l'AEA et le 2-AG, dérivés de l'acide arachidonique. Il existe également un certain nombre de composés, structurellement apparentés et partageant les mêmes voies de synthèse et de dégradation, appelés composés endocannabinoïde-like (EC-like), dérivés d'AG moins insaturés. Les N-AcylEthanolAmines (NAEs) tels que le N-Linoléoyl EthanolAmide (LEA), le N-OléoylEthanolAmide (OEA), le N-PalmitoylEthanolAmide (PEA), le N-PalmitOléoylEthanolAmide (POEA) et le N-StéaroylEthanolAmide (SEA) sont des homologues de l'AEA. De la même manière, il existe également des homologues du 2-AG qui sont des 2-MonoacylGlycérol tels que le 2-OléoylGlycérol (OG) et le 2-LinoléoylGlycérol (LG) (Pacher et al., 2020).

En termes d'interactions avec les récepteurs, l'AEA et le 2-AG peuvent se lier aux CB1R ou aux CB2R. Tandis que le 2-AG possède une même affinité pour les deux récepteurs, l'AEA possède une affinité moindre pour le CB1R et très faible pour le CB2R. L'AEA a aussi la propriété d'être un activateur du récepteur aux vanilloïdes TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid-1) (Smart et al., 2000; Zygmunt et al., 1999).

De leur côté, la plupart des composés EC-like ne se lient pas directement aux CBR mais peuvent moduler les actions des ECs (effet d'entourage) ou présenter des activités biologiques liées à leurs interactions avec d'autres récepteurs tels que GPR119 (pour l'OEA, le POEA, le LEA et le 2-OG), TRPV1 (pour l'OEA), GPR55 (pour le PEA) ou PPAR- $\alpha$  (pour l'OEA) (Hohmann et al., 2019; Pacher et al., 2020).

Enfin, deux ECs « supposés », le N-EicosaPentaénoylEthanolAmide (EPEA) et le N-DocosaHexaénoylEthanolAmide (DHEA), dérivés des AG polyinsaturés en n-3, sont capables de se lier avec une faible affinité aux CB1R et CB2R et peuvent avoir un rôle biologique dans le système nerveux central (Fisk et al., 2021; Isaac et al., 2021; McDougle et al., 2017).

## 1. Synthèse des ECs

Les NAEs (comprenant l'AEA) sont formés par transfert de l'AG en position sn-1 d'un phospholipide sur le groupement NH<sub>2</sub> de phosphatidyléthanolamine donnant ainsi un N-AcylPhosphatidylEthanolamine (NAPE) qui est ensuite transformé en NAEs notamment par l'enzyme N-AcylPhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D (NAPE-PLD). Si l'AG formant le NAE est l'acide arachidonique, le NAE formé sera de l'AEA (**Figure 28**).

Concernant le 2-AG, sa synthèse est la conséquence de l'action de la Phospholipase C (PLC) sur des phospholipides (phosphatidylinositol) formant des diacylglycérols (DAGs) qui, sous l'action des DiAcylGlycérol Lipases  $\alpha$  et  $\beta$  (DAGL), donneront des 2-AcylGlycérols (AcGs). Si l'AG présent dans le 2-AcG est un acide arachidonique, le 2-AcG sera du 2-AG. Les 2-AcGs sont donc des dérivés dépendant de la nature de l'AG présent en position sn-2 du phospholipide (K. Ahn et al., 2008) (**Figure 29**). Une seconde voie de synthèse minoritaire existe. Elle met en jeu la PhosphoLipase A1 (PLA1) et la LysoPhosphoLipase C (Lyso-PLC) (Higgs & Glomset, 1994).

Les enzymes de synthèse NAPE-PLD, DAGL $\alpha$  et DAGL $\beta$  sont considérées comme les enzymes les plus importantes de la biosynthèse des ECs mais un grand nombre d'autres voies de biosynthèse potentielles existent et impliquent des enzymes telles que la LysoPhosphatidique Acide phosphatase (LPA phosphatase) ou la GlycérophosphoDiEsterase 1 (GDE1) (K. Ahn et al., 2008). La faible proportion relative d'AEA par rapport aux autres NAEs est expliquée par la faible proportion d'acide arachidonique estérifié en position sn-1 des phospholipides.

En ce qui concerne leur libération, les ECs ont beaucoup été étudiés au niveau synaptique où ils occupent la fonction de neurotransmetteurs. Néanmoins, contrairement aux neurotransmetteurs « standards », ils sont synthétisés « à la demande » à partir de précurseurs lipidiques membranaires. Ils diffusent alors librement afin de se fixer sur leurs récepteurs spécifiques puis sont rapidement recaptés et métabolisés dans le compartiment intracellulaire (Howlett et al., 2004). En comparaison, les neurotransmetteurs « standards » sont, quant à eux, généralement synthétisés dans le cytoplasme des neurones et stockés dans des vésicules synaptiques avant d'être libérés au niveau de la fente synaptique par exocytose.

Ces voies de biosynthèse étant communes à celles de nombreux autres composés, il semble très compliqué de les manipuler pharmacologiquement ou génétiquement dans un but thérapeutique sans risquer d'interférer avec la biosynthèse d'autres NAEs et AcGs (K. Ahn et al., 2008). Toutefois, il est reconnu que la nature des AG présents dans l'alimentation peut affecter les contenus tissulaires en ECs en modifiant la composition des lipides membranaires. Des travaux ont d'ailleurs démontré qu'une consommation élevée d'acide linoléique augmente le taux d'ECs tissulaires et est associée à des altérations métaboliques (Alvheim et al., 2012, 2013, 2014).

## 2. Dégradation des ECs

### a. *Internalisation des ECs*

Dans le système nerveux, il a été montré que la dégradation rapide des ECs passe par une étape d'élimination de l'espace synaptique par internalisation. Un modèle d'internalisation de l'AEA et du 2-AG implique l'action d'un transporteur associé à la membrane plasmique de manière indépendante de l'ATP et facilité par un mécanisme de diffusion (Beltramo et al., 1997; Di Marzo et al., 1994; Hillard et al., 1997). Malgré de nombreuses publications dans le domaine, le clonage et l'identification moléculaire de ce transporteur n'ont pas encore pu être établis (Fowler, 2006; Glaser et al., 2005; Hillard & Jarrahian, 2003).

Une autre hypothèse est basée sur la possibilité qu'une grande partie de l'absorption de l'AEA soit réalisée par son enzyme de dégradation majoritaire, la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) (Deutsch et al., 2001; Glaser et al., 2003). En accord avec cette hypothèse, les cellules qui expriment des niveaux élevés de FAAH présentent un taux d'absorption d'AEA considérablement augmenté (Day et al., 2001; Deutsch et al., 2001; S. A. Moore et al., 2005). De plus, la plupart des inhibiteurs de transporteurs de l'AEA décrits à ce jour inhibent également la FAAH, y compris AM404, VDM11 et LY2018240 (Alexander & Cravatt, 2006; Dickason-Chesterfield et al., 2006; Jarrahian et al., 2000; Vandevoorde & Fowler, 2005). Les neurones des souris FAAH<sup>-/-</sup> possèdent également une internalisation altérée de l'AEA (Ortega-Gutiérrez et al., 2004). Toutes ces observations suggèrent que la FAAH est très impliquée dans l'absorption des ECs (Glaser et al., 2003).

L'endocytose a aussi été proposée comme mode alternatif d'internalisation des ECs (Bari et al., 2005; McFarland et al., 2004). Il a aussi été suggéré que différentes cellules peuvent utiliser des stratégies différentes pour l'accumulation intracellulaire d'ECs, bien que chaque type cellulaire étudié semble présenter une absorption due à la FAAH (Hillard & Jarrahian, 2003).

Le développement de nouveaux inhibiteurs sélectifs de l'absorption des ECs sans interaction avec la FAAH devrait, dans un futur proche, faciliter la caractérisation moléculaire de ce processus cellulaire.

#### *b. Dégradation des ECs*

L'AEA et le 2-AG diffèrent aussi par leurs voies de dégradation. L'AEA est dégradé majoritairement par la FAAH située au niveau du RE, formant alors de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine (**Figure 28**). D'autres enzymes peuvent être responsables de cette hydrolyse mais dans une moindre mesure telles que la FAAH2, identifiée chez l'Homme dans divers tissus périphériques, et la NAAA (N-Acylethanolamine hydrolysing Acid Amidase) retrouvée au sein des cellules immunitaires (K. Ahn et al., 2008).

Le 2-AG est quant à lui majoritairement hydrolysé par les MAGLs (MonoAcylGlycérol Lipases) en glycérol et acide arachidonique (**Figure 29**). Tout comme pour l'AEA, d'autres enzymes sont responsables d'une faible partie de son hydrolyse dont la FAAH (commune à l'AEA) et plus récemment les hydrolases ABHD 6 et 12 (Alpha/Beta-Hydrolase Domain containing 6 et 12) (K. Ahn et al., 2008). Les différents produits de dégradation de ces deux ECs (glycérol, éthanolamine et acide arachidonique) sont soit recyclés au sein des phospholipides membranaires, soit convertis sous l'action d'enzymes (lipooxygénases, cyclooxygénases et cytochrome P450 oxydases) en médiateurs appartenant à la famille des leucotriènes et des prostaglandines (Scheen et al., 2008).

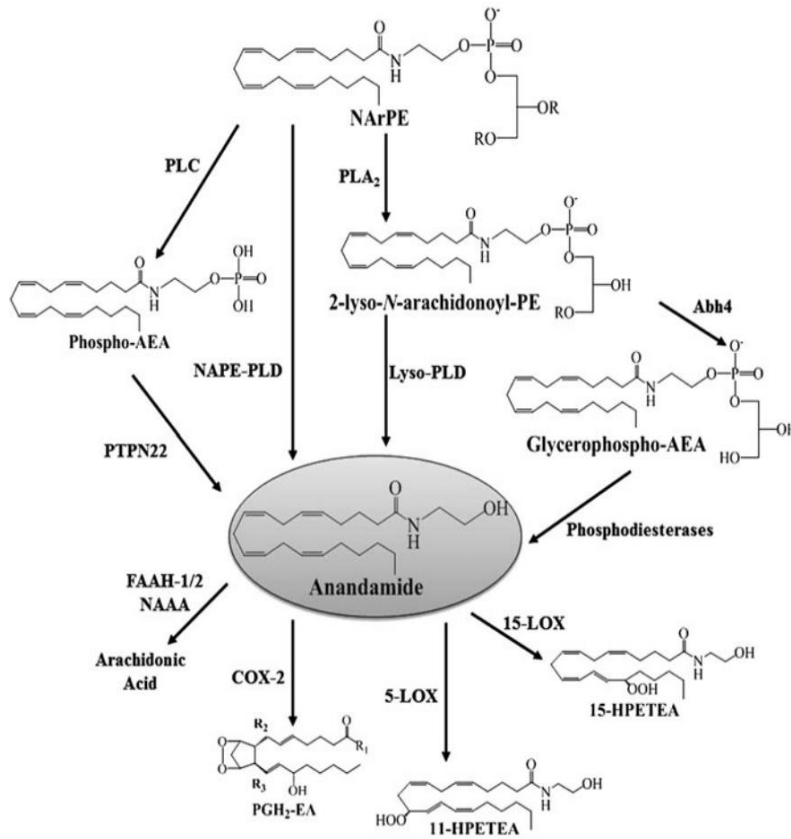


Figure 28. Voies de synthèse et dégradation de l'AEA (Cascio & Marini, 2015).

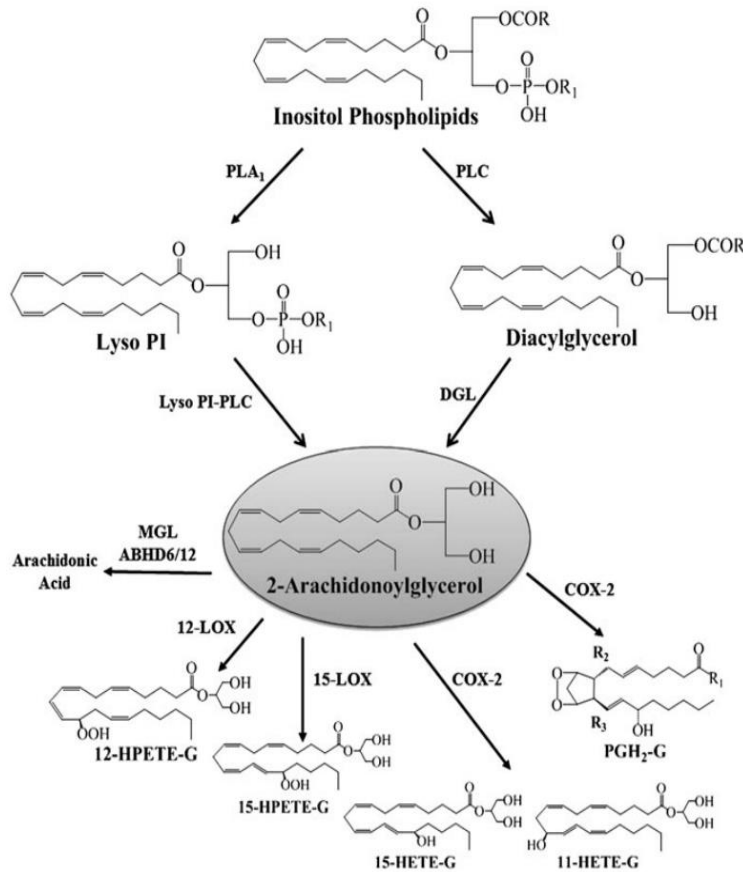


Figure 29. Voies de synthèse et dégradation du 2-AG (Cascio & Marini, 2015).

## C. Récepteurs aux ECs et signalisation

Le SEC central participe à la régulation de nombreuses fonctions cognitives, dont les circuits de récompense, et joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la prise alimentaire. Les CB1R centraux sont présents dans les terminaisons synaptiques, incluant les régions de cortex cérébral et de l'hippocampe, où ils régulent négativement le relargage des neuromédiateurs (Freund et al., 2003). Le SEC périphérique est particulièrement impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique via les CB1R en influençant le métabolisme des lipides et du glucose dans plusieurs tissus tels que le foie et le TA (Matias, Gonthier, et al., 2006; Pagotto et al., 2006; Quarta et al., 2011; Simon & Cota, 2017). A contrario, les CB2R sont majoritairement exprimés au sein du système immunitaire. Ils sont présents dans de nombreux organes tels que la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques, expliquant ainsi les effets immunomodulateurs des cannabinoïdes (Galiègue et al., 1995).

Le SEC régule la balance énergétique via ses récepteurs à la fois centraux et périphériques (Bensaid et al., 2003; Ruiz de Azua et al., 2017). Ils sont aussi présents en périphérie notamment dans le TA, la glande surrénale et les cellules immunitaires dans une moindre mesure (Ruiz de Azua et al., 2017; Sugamura et al., 2009). L'activation des CB1R entraîne une augmentation de l'absorption du glucose et de l'activité de la LPL ainsi que la stimulation de la lipogenèse et de l'adipogenèse (Cota et al., 2003; Karaliota et al., 2009; Ruiz de Azua et al., 2017).

Que ce soit au niveau central ou périphérique, ces récepteurs sont en lien avec de nombreuses voies métaboliques et exercent leurs effets à travers différentes transductions cellulaires du signal telles que la baisse du taux d'AMPC, l'inhibition des canaux calciques voltage dépendants (de type N et P/Q), l'ouverture des canaux potassiques ou encore l'activation des MAP kinases.

### 3. Les récepteurs aux cannabinoïdes

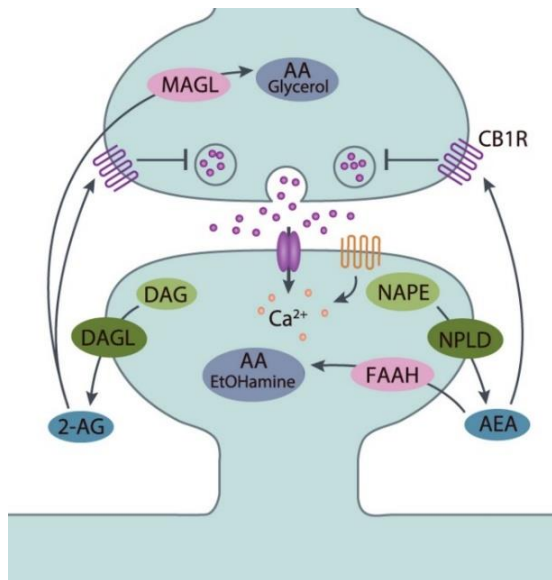
#### a. Le récepteur CB1

Le CB1R, tout comme CB2R, appartient à la famille des RCPG. Il est composé de 7 hélices transmembranaires couplées à une protéine  $G_{i/o}$ . Il s'agit d'un récepteur ubiquitaire tout d'abord identifié dans le cerveau, où la densité de CB1R est la plus importante, puis au niveau périphérique (Howlett et al., 2004). Il s'agit du RCPG le plus largement exprimé dans le cerveau humain (Irving et al., 2008; Mackie, 2005).

La fixation de ligands endogènes ou exogènes sur les CB1R cérébraux sont responsables des effets les plus connus des cannabinoïdes : troubles de l'humeur et de la mémoire à court terme (CB1R de l'hippocampe), akinésie, ataxie et mouvements involontaires (CB1R des ganglions de la base) ou encore effets antiémétiques et hypothermie (CB1R du thalamus, de l'hypothalamus et de l'area postrema) (Jelsing et al., 2009). Les souris CB1R<sup>-/-</sup> (invalidées pour le gène *Cnr1* codant pour les CB1R) présentent des anomalies comportementales et des défauts de plasticité synaptique, illustrant le lien entre signalisation dépendante des ECs et des CB1R et fonction neurale (Kishimoto & Kano, 2006; Marsicano et al., 2002; Steiner et al., 1999; Zimmer et al., 1999). Les CB1R présentent les concentrations les plus élevées sur les segments d'axones péri-synaptiques des neurones glutamatergiques et contenant de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (Katona et al., 1999, 2006), bien que des preuves fonctionnelles soutiennent également leur présence à des niveaux inférieurs sur les corps cellulaires neuronaux (Freund et al., 2003).

Le principal effet physiologique de l'activation du CB1R dans le système nerveux central est de moduler la communication synaptique entre les neurones, et cela se produit principalement via la régulation présynaptique de la libération des neurotransmetteurs (Freund et al., 2003) selon un processus de signalisation rétrograde (**Figure 30**). Suite à la dépolarisation de la terminaison postsynaptique, induite par la libération du neurotransmetteur, les ECs sont synthétisés *de novo* à partir de précurseurs phospholipidiques (Zou & Kumar, 2018). La NAPE est hydrolysée par la phospholipase D spécifique de la NAPE-PLD pour donner l'AEA, et le DAG est converti en 2-AG par la DAGL. Les deux ECs (qui ne sont pas stockés dans des vésicules) sont libérés dans la fente synaptique et activent les CB1R présynaptiques couplés à une protéine  $G_{i/o}$ , inhibant l'adénylate cyclase, régulant les canaux ioniques et en particulier les canaux calciques. La

diminution des flux calciques limitant la fusion des vésicules synaptiques, c'est finalement la libération du neurotransmetteur qui sera diminuée (Zlebnik & Cheer, 2016; Zou &



Kumar, 2018). Les ECs sont ensuite dégradés dans les compartiments présynaptiques et postsynaptiques. L'AEA est converti en acide arachidonique et en éthanolamine par la FAAH localisée dans la cellule postsynaptique, tandis que le 2-AG est hydrolysé de manière présynaptique en acide arachidonique et en glycérol par la MAGL (Zlebnik & Cheer, 2016).

*Figure 30. Régulation de la transmission synaptique par le SEC (Zlebnik & Cheer, 2016).*

AA : Acide Arachidonique, EtOHamine : Ethanolamine.

L'expression des CB1R dans les astrocytes et la microglie est considérablement plus faible que dans les neurones et reste encore controversée (Molina-Holgado et al., 2002; Ramírez et al., 2005). Curieusement, CB1R possède des aptitudes inédites d'interaction de signalisation avec d'autres systèmes de neurotransmetteurs pour établir, maintenir ou moduler la communication synaptique entre les neurones (Alger, 2002; Berghuis et al., 2007; Harkany et al., 2007; Howlett, 1995; Irving et al., 2000, 2008).

CB1R est aussi exprimé au niveau périphérique, bien qu'à des niveaux plus faibles que dans le système nerveux central, où il joue, entre autres, un rôle dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique (Howlett et al., 2002; Matias & Di Marzo, 2007; Pagotto et al., 2006; Quarta et al., 2011; Ruiz de Azua et al., 2017; Scheen, 2009; Simon & Cota, 2017). Ainsi, CB1R est exprimé dans de nombreux tissus périphériques dont la glande surrénale, le cœur, le poumon, la prostate, le foie, l'utérus, l'ovaire, les testicules, la moelle osseuse, le thymus, les amygdales, le pancréas, le muscle squelettique, le tractus gastro-intestinal et le TA (DiPatrizio et al., 2011; Galiègue et al., 1995; González-Mariscal et al., 2019; Malenczyk et al., 2015; Matias, Bisogno, et al., 2006; B. Mukhopadhyay et al., 2010). Les principaux mécanismes physiologiques et physiopathologiques dans lesquels les CB1R sont impliqués seront détaillés dans la **partie III.D** du manuscrit.



#### ***b. Le récepteur CB2***

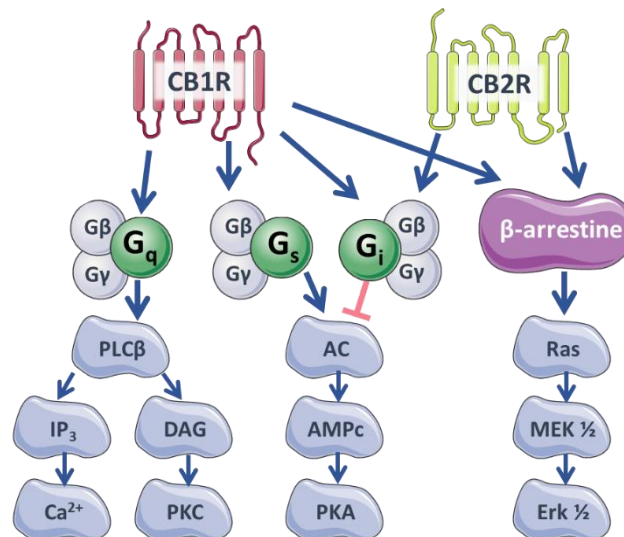
Le deuxième récepteur aux cannabinoïdes a été isolé à l'aide d'une stratégie basée sur la PCR afin de sélectionner les RCPG dans des cellules myéloïdes différenciées (Munro et al., 1993). Le CB2R partage 44% d'homologie d'acides aminés avec CB1R et un profil de liaison proche, lui permettant d'être qualifié de sous-type de ce récepteur.

Le CB2R est abondamment exprimé dans les organes périphériques à vocation immunitaire notamment au niveau des macrophages, de la rate, des amygdales, du thymus et des leucocytes ainsi qu'au niveau des poumons et des testicules (Brown et al., 2002; Galiègue et al., 1995; Munro et al., 1993). De premières études ont suggéré que les CB2R étaient absents du cerveau sain (Brown et al., 2002; Griffin et al., 1999). Par la suite, d'autres études ont montré l'expression de ce récepteur au sein de cellules cérébrales malades comme dans les astrocytes dans la maladie d'Alzheimer (Benito et al., 2003; Esposito et al., 2007) et dans la sclérose en plaques (Benito et al., 2007). Plusieurs études indiquent que l'expression des CB2R est augmentée en réponse à leur activation et à l'inflammation des cellules immunitaires (Klein, 2005; Stella, 2010). Plus tard, l'expression de CB2R a été détectée dans le système nerveux central sain (Van Sickle et al., 2005). Cependant, cette possibilité reste sujet à débat à cause des nombreux biais techniques liés à une absence d'anticorps spécifiques pour CB2R et à l'utilisation fréquente de ligands présentant une affinité trop faible pour CB2R (Soethoudt et al., 2017).

Parce que CB2R est associé à l'immuno-modulation, de nombreux travaux ont étudié le lien entre ses polymorphismes et divers troubles immunitaires. Le variant le plus étudié est nommé Q63 et est associé à l'hépatite ainsi qu'à d'autres troubles du système immunitaire tels que la thrombocytopénie (Coppola et al., 2015; Mahmoud Gouda & Mohamed Kamel, 2013). De manière intéressante, ce polymorphisme ainsi que deux autres du gène *CNR2* ont été associés à la schizophrénie dans la population japonaise démontrant alors le rôle important mais mal connu du CB2R dans de nombreuses pathologies (Ishiguro et al., 2010).

#### 4. Voies de signalisation activées par les CB1R

Les ECs, via les CB1R, agissent principalement sur quatre voies de signalisation cellulaire dépendantes des protéines G : l'activité de l'adénylate cyclase, l'activation de la voie des MAP kinases, la voie PI3K/Akt et la perméabilité de canaux ioniques. A cela s'ajoute une signalisation dépendante des  $\beta$ -arrestines (**Figure 31**). L'activation de ces différentes voies de signalisation dépend de la localisation des CB1R. L'activation des CB1R situés à la surface cellulaire inhibent la formation d'AMPC et l'afflux de calcium (Zou & Kumar, 2018). Les CB1R internalisés agissent sur les voies de signalisation via la  $\beta$ -arrestine. Les CB1R intracellulaires ne sont pas transloqués vers la membrane plasmique. Ils forment alors une sous-population avec des propriétés pharmacologiques distinctes de leurs homologues localisés sur la membrane plasmique (Zou & Kumar, 2018). Les CB1R situés sur les lysosomes peuvent augmenter les concentrations de calcium intracellulaire par la libération de réserves internes de calcium et augmenter la perméabilité des lysosomes. Les CB1R mitochondriaux inhibent la respiration cellulaire mitochondriale et la production d'AMPC, régulant ainsi le métabolisme énergétique cellulaire (Zou & Kumar, 2018).



**Figure 31. Voies de signalisation dépendantes des CBR (d'après Cayman Chemical et Zou & Kumar, 2018).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. AC : Adénylate Cyclase.

*a. Signalisation dépendante des récepteurs couplés aux protéines G*

*i. Adénylate cyclase*

L'action des cannabinoïdes sur l'adénylate cyclase a été étudiée par Howlett & Fleming en 1984 après activation de cette enzyme par la forskoline, un diterpène ayant démontré une capacité à augmenter l'activité de l'adénylate cyclase. Les auteurs ont montré une inhibition pharmacologique spécifique et dose-dépendante des agonistes CB1R sur l'activité de cette enzyme associée à une diminution de la synthèse d'AMPc dans des cellules de neuroblastomes (Dolby & Kleinsmith, 1977; Howlett & Fleming, 1984) (**Figure 32**). La réversibilité de cette action a été observée au sein de plusieurs études comme celle de Dolby & Kleinsmith en 1977 ou de Eldeeb et collaborateurs en 2016. L'accumulation d'AMPc parfois observée en présence de faibles concentrations d'agonistes des CB1R pourrait ainsi s'expliquer par une activation réduite des protéines  $G_i$ , limitant ainsi l'influence inhibitrice tonique des protéines  $G_i$  sur l'adénylate cyclase (Eldeeb et al., 2016). Cependant, au sein de la famille  $G_{i/o}$ , il semble que des agonistes puissent distinguer quels sous-types de protéines  $G_{i/o}$  sont effectivement activés et dissociés de CB1R (Clarke, 2005; S. Mukhopadhyay & Howlett, 2005). Ces données pourraient être intéressantes dans le cadre de développements de molécules ciblant seulement l'activation de certains sous-types de protéines G suite à la fixation d'un composé sur les CB1R.

*ii. MAP kinases*

Des études réalisées sur des cellules WI-38 (fibroblastes pulmonaires fœtaux humains) ont démontré que la présence d'AEA augmentait de manière dose-dépendante l'activité des MAP kinases (Bouaboula, Poinot-Chazel, et al., 1995). L'annulation de cet effet par la toxine pertussique (PTX) a permis de démontrer l'implication de protéines de type  $G_i$ . La toxine ajoute un ADP-ribose au niveau de la sous-unité  $\alpha_{i/o}$  des protéines G hétérotrimériques empêchant alors la fixation de cette protéine au récepteur (Krueger & Barbieri, 1995). Les MAP kinases activent à leur tour d'autres kinases comme P38-kinase et JNK, impliquées dans la régulation de l'expression de gènes et dans les processus de mort cellulaire par apoptose (Bouaboula, Poinot-Chazel, et al., 1995; J. Liu et al., 2000; Rueda et al., 2000).

La fixation d'agonistes sur les CB1R induit également la phosphorylation et l'activation de Erk 1/2, impliqué dans la régulation de la synthèse protéique ainsi que dans l'expression de gènes liés à la prolifération et la différenciation cellulaire (**Figure 32**).

#### iii. PI3K/Akt

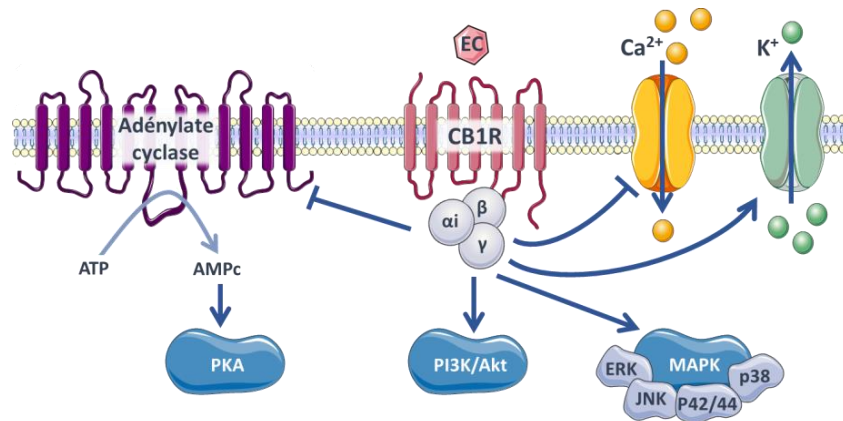
La voie PI3K/Akt est également impliquée dans la signalisation des CB1R conférant ainsi au SEC un rôle dans la régulation de la survie cellulaire et du métabolisme du glucose (Gómez del Pulgar et al., 2000) (**Figure 32**). Cette voie joue un rôle majeur dans de nombreux effets périphériques CB1R-dépendants. En effet, l'activation de la sérine/thréonine protéine kinase B (PKB) plus connue sous le nom de Akt, par l'insuline ou des facteurs de transcription, stimule le captage du glucose en induisant la translocation de Glut-4 à la membrane plasmique et la glycolyse via l'activation de la 6-phosphofructo-2-kinase (Coffer et al., 1998; Downward, 1998). Cette voie est également associée à des effets pro-apoptotiques étudiés dans le cadre du développement de traitements antitumoraux. Ces effets passent par l'augmentation de médiateurs comme les céramides et par la phosphorylation inactivatrice notamment de la Caspase-9 et de facteurs de transcriptions augmentant l'activité du facteur nucléaire NFκB (voie de transduction impliquée dans l'inflammation) (Galve-Roperh et al., 2000; Laezza et al., 2020, 2020).

#### iv. Canaux ioniques

L'activation des CB1R est également capable de moduler l'activité de canaux ioniques. Ainsi, des agonistes CB1R entraînent une inhibition stéréosélective et dose-dépendante des canaux calciques voltage-dépendants de type L, N et P/Q et une activation des canaux potassiques (Pertwee, 1997). En effet, les CB1R sont couplés aux canaux K<sup>+</sup> (modulés par l'AMPC) et Ca<sup>2+</sup> via des protéines de type G<sub>i/o</sub> (**Figure 32**). Il a par exemple été constaté que le 2-AG et l'AEA sont impliqués dans la modulation de la plasticité cérébrale via des canaux calciques de type L, comme démontré notamment au niveau de l'amygdale et du striatum de rats (Adermark et al., 2009; Puente et al., 2011).

D'autre part, les CB1R et CB2R peuvent activer l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE – Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger) de type 1 contribuant ainsi à la protection des cellules nerveuses vis à vis des

variations de pH intracellulaires (Bouaboula et al., 1999). Cette stimulation des NHE-1 par les CB1R est réalisée par des protéines de type  $G_{i/o}$  après activation de la MAP kinase p42/44.



**Figure 32. Signalisation des CB1R dépendante des protéines G.**

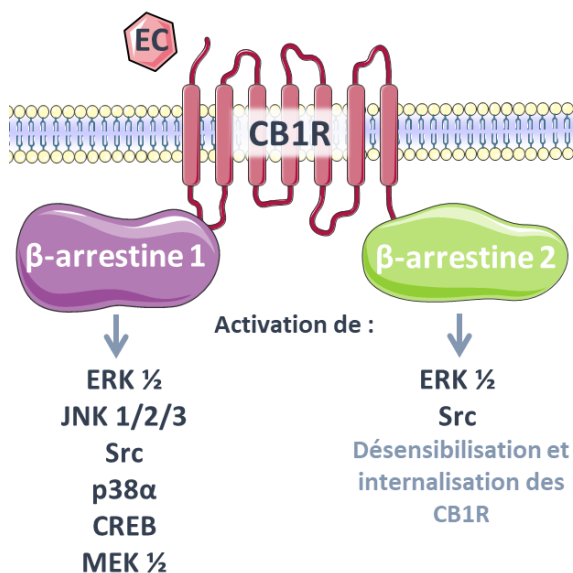
Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art. Les CB1R sont couplés aux protéines  $G_{i/o}$  et inhibent l'activité de l'adénylate cyclase (AC), la formation d'AMPc et l'activité de la protéine kinase A (PKA). Ce récepteur est capable de supprimer l'afflux de calcium via un canal calcique voltage-dépendant et d'activer des canaux potassiques. Plusieurs protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), dont Erk1/2, p38 et JNK, sont activées par CB1R. La voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt est également activée par CB1R.

### **b. Signalisation dépendante des $\beta$ -arrestines**

Les  $\beta$ -arrestines ont été initialement identifiées entre la fin des années 1980 et le début des années 1990 comme des protéines clés dans les processus d'inactivation des RCPG par internalisation consécutivement à la fixation de leurs ligands, aussi appelés désensibilisation (Schmid & Bohn, 2009). La désensibilisation de récepteurs fait partie des mécanismes biologiques pouvant conduire à des phénomènes de tolérance à une grande variété d'agonistes de RCPG, comme c'est le cas pour les CB1R (Gainetdinov et al., 2004; Henderson-Redmond et al., 2020). La désensibilisation implique le découplage du RCPG de sa ou ses protéines G apparentées, via la phosphorylation du récepteur par des RCPG kinases, suivie de l'interaction du RCPG phosphorylé avec une ou plusieurs protéines de la famille des arrestines (DeWire et al., 2007; Gainetdinov et al., 2004; C. A. Moore et al., 2007). Il a d'ailleurs été démontré que des souris génétiquement modifiées, dépourvues de  $\beta$ -arrestine 2, présentent une réponse aiguë accrue au  $\Delta^9$ -THC et une diminution de la désensibilisation des CB1R dans certaines régions cérébrales suite à l'administration répétée d'agonistes cannabinoïdes (Breivogel et al., 2008; P. T. Nguyen et al., 2012).

Quatre isoformes de la famille des arrestines avec une forte homologie ont été décrites chez les mammifères. L'arrestine 1 et l'arrestine 4 (arrestines visuelles) sont exprimées uniquement dans la rétine et les arrestines 2 et 3 (appelées  $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2) sont exprimées de manière ubiquitaire (E. V. Gurevich & Gurevich, 2006). L'extrémité C-terminale des  $\beta$ -arrestines se lie à la clathrine et à la protéine adaptatrice 2 permettant ainsi l'élimination des récepteurs désensibilisés de la surface cellulaire par endocytose (Laporte et al., 1999). Plus récemment une troisième fonction a été décrite : le recrutement des  $\beta$ -arrestines par des récepteurs phosphorylés initie une signalisation indépendante des protéines G qui entraîne l'activation de plusieurs effecteurs tels que Erk  $\frac{1}{2}$ , JNK et Src (Tyrosine Kinase Src) (E. V. Gurevich & Gurevich, 2006; Shenoy & Lefkowitz, 2011) (**Figure 33**).

La  $\beta$ -arrestine 1 régule la sensibilité des récepteurs de manière dépendante du ligand (Breivogel & Vaghela, 2015). La signalisation due à cette  $\beta$ -arrestine en aval des CB1R a en premier lieu été démontrée dans la lignée cellulaire embryonnaire de rein humain HEK293 en utilisant une combinaison de siRNA des  $\beta$ -arrestines 1 et 2. Ainsi, de plus en plus de preuves indiquent que des cascades de signalisation CB1R-dépendantes sont directement régulées par la  $\beta$ -arrestine 1 contrôlant ainsi la transcription de nombreux



gènes du métabolisme tandis que l'endocytose des récepteurs serait régulée par la  $\beta$ -arrestine 2 (K. H. Ahn et al., 2013).

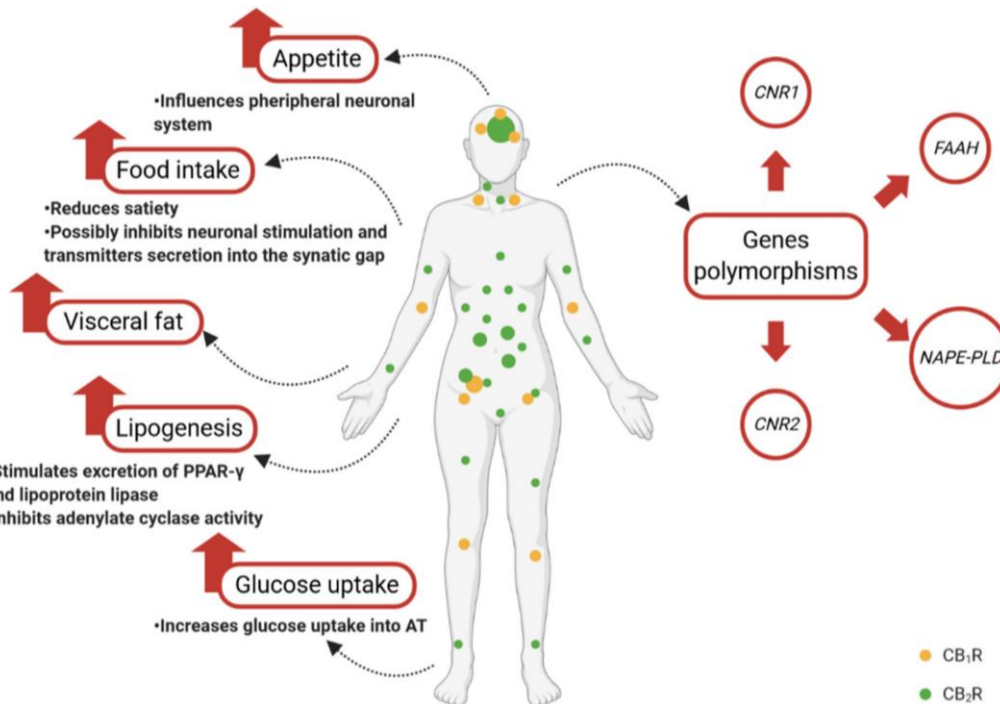
Parmi les cascades de signalisation déclenchées par les CB1R, celles contrôlées par les  $\beta$ -arrestines ont été suggérées comme de bons candidats pour expliquer certains des effets bénéfiques attribués aux composés thérapeutiques actuels (Ibsen et al., 2017, 2019; Z. Liu et al., 2021; Morales et al., 2020).

**Figure 33. Signalisation des CB1R par les  $\beta$ -arrestines (à partir de Noguerras-Ortiz & Yudowski, 2016).**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art.

## D. SEC et métabolisme glucido-lipidique : physiologie et physiopathologie

Il est maintenant bien établi que l'obésité est associée à une hyperactivation du SEC. Des études ont d'ailleurs montré une corrélation positive entre la graisse viscérale et les ECs circulants, suggérant une augmentation de la production des ECs associée à une diminution de leur dégradation par le TA (Di Marzo & Matias, 2005). L'hyperactivité du SEC, telle qu'elle est rencontrée au cours de l'obésité, se manifeste dans plusieurs organes clés du métabolisme énergétique et conduit à un ensemble d'effets contribuant, entre autres, à l'installation d'une résistance à l'insuline et à une dérégulation globale du métabolisme glucido-lipidique. Cette hyperactivation concerne aussi bien le système nerveux central que les organes périphériques (**Figure 34**).



**Figure 34. Illustration schématique de la localisation et du rôle du système endocannabinoïde dans la régulation des processus métaboliques (Schulz et al., 2021).**

CB<sub>1</sub>R : récepteur cannabinoïde de type 1, CB<sub>2</sub>R : récepteur cannabinoïde de type 2, CNR1 : gène du récepteur endocannabinoïde de type 1, CNR2 : gène du récepteur endocannabinoïde de type 2, FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase, NAPE-PLD : N-Acyl PhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D.

## 1. Système nerveux central et contrôle de la prise alimentaire

Le SEC joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, il a notamment la capacité de moduler l'appétit et la digestion en exerçant notamment des effets sur des systèmes liés au stress (axe HPA – Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien) et sur le système de récompense (Hill & Gorzalka, 2006).

La possibilité que le SEC soit dérégulé pendant l'obésité et le diabète a été proposée suite à la prise de conscience que les niveaux d'ECs et de CB1R, dans les tissus nerveux et non nerveux impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique, sont sous le contrôle d'hormones, dont les niveaux sont modifiés au cours de ces troubles métaboliques. Le SEC influence en particulier la sécrétion de différentes hormones, dont des hormones régulant l'appétit, telles que la ghréline (hormone orexigénique) et la leptine (hormone anorexigénique). Les CB1R et les ECs (AEA et 2-AG) sont présents dans l'hypothalamus et il a été démontré que la marijuana et l'AEA stimulent la prise alimentaire (González et al., 1999; Mechoulam et al., 1998; Williams & Kirkham, 1999). Il a, par ailleurs, été suggéré que la leptine inhiberait au niveau hypothalamique la synthèse des ECs (Di Marzo et al., 2001). Chez les rongeurs obèses avec un système de signalisation de la leptine défectueux, des niveaux élevés d'ECs sont fréquemment observés dans les tissus qui présentent une expression importante du récepteur à la leptine ou dans l'hypothalamus, où la leptine diminue la biosynthèse des ECs (Di Marzo et al., 2001). Il a notamment été démontré que le blocage des CB1R permet la restauration de la signalisation hypothalamique de la leptine (Tam et al., 2017). Cette hormone permet notamment de réduire l'apport énergétique en augmentant la production de neuropeptides anorexigènes, tels que l'hormone  $\alpha$ -mélanocytaire ( $\alpha$ MSH –  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone), et en diminuant les facteurs orexigéniques notamment le neuropeptide Y (NPY) (Schwartz et al., 1997; Stephens et al., 1995). Peu d'études ont examiné les interactions entre les cannabinoïdes et le NPY, cependant leurs similitudes fonctionnelles et leur localisation au niveau des mêmes structures cérébrales suggèrent une interaction. Il est donc très probable que les cannabinoïdes améliorent la libération du NPY (Gamber et al., 2005).

Il est intéressant de noter qu'outre son rôle au niveau cérébral, le SEC est présent au niveau périphérique et de nombreuses études montrent que les CB1R sont à l'origine de



la dérégulation du métabolisme de plusieurs organes clés du métabolisme glucido-lipidique comme l'intestin, le foie (Osei-Hyiaman et al., 2005), le pancréas (Starowicz et al., 2008), le muscle et le TA (Matias, Petrosino, et al., 2008).

## 2. Tissus non-adipeux

### a. *Tractus gastro-intestinal*

Dans le tractus gastro-intestinal, les récepteurs aux cannabinoïdes régulent notamment la motilité, la sécrétion, les vomissements, la satiété et l'inflammation (DiPatrizio, 2016; Duncan et al., 2005, 2008; Galiazzo et al., 2018; Izzo, 2004; Y. Lee et al., 2016; Sharkey & Wiley, 2016; Storr & Sharkey, 2007; Wright et al., 2008). CB1R est notamment exprimé par les neurones du système nerveux entérique des rongeurs, du cobaye, du porc, et du furet (Coutts et al., 2002; Duncan et al., 2005; Kulkarni-Narla & Brown, 2000; Van Sickle et al., 2001). CB2R peut être exprimé par les macrophages, les plasmocytes, les mastocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales et les neurones entériques (Duncan et al., 2008; Facci et al., 1995; Ke et al., 2016; Svensson et al., 2010; Wright et al., 2008). Plusieurs études suggèrent que CB1R et CB2R pourraient avoir un rôle protecteur dans les maladies inflammatoires de l'intestin chez l'homme, suggérant ainsi le potentiel thérapeutique du ciblage de ces voies (Di Marzo & Izzo, 2006; Di Marzo & Piscitelli, 2011; DiPatrizio, 2016; Fabisiak & Fichna, 2017; Gyires & Zádori, 2016; Izzo, 2004). Il a été démontré que l'activation de CB1R réduit les vomissements, la motilité et la sécrétion intestinales, et inhibe la sécrétion d'acide gastrique et la relaxation du sphincter inférieur de l'œsophage (Izzo & Coutts, 2005). Parallèlement, l'activation de CB2R, dans des conditions pathologiques telles que les maladies inflammatoires de l'intestin ou l'inflammation endotoxique, réduit la motilité intestinale (Izzo, 2004).

Par ailleurs, de nombreuses recherches se concentrent sur le lien entre obésité, dysbiose intestinale, troubles inflammatoires de l'intestin et SEC (Ahmad et al., 2017; Jansma et al., 2021; Muccioli et al., 2010). Le SEC apparait comme une voie métabolique située au croisement de la dysbiose microbienne et de l'intégrité de la barrière intestinale (Cani et al., 2016). En effet, la perméabilité intestinale peut être modifiée, à la fois par les LPS et le

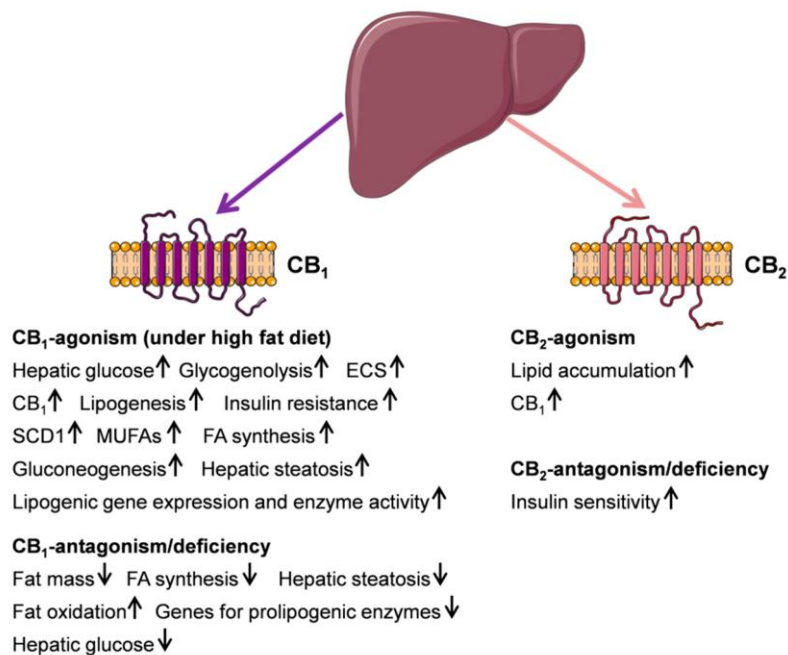
SEC, et il se trouve que la synthèse des ECs est altérée par les LPS via des mécanismes dépendant de la signalisation de leurs récepteurs (Di Marzo et al., 1999; Hoareau et al., 2009; J. Liu et al., 2003; Maccarrone et al., 2001). Ainsi, la dysbiose microbienne pourrait interférer avec l'équilibre normal du SEC, altérant alors l'intégrité de la barrière intestinale et pouvant conduire au développement de pathologies de l'intestin (Muccioli et al., 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires précis impliqués ne sont pas encore complètement élucidés (Jansma et al., 2021).

D'autre part, des études ont suggéré que les LPS pourraient également moduler le métabolisme du TA en réduisant l'adipogenèse induite par les ECs. Ces données indiquent que le microbiote intestinal serait capable d'influencer la physiologie du TA, à travers les boucles régulatrices du système LPS-ECs, et ainsi avoir des fonctions critiques dans la plasticité de ce tissu au cours de l'obésité (Muccioli et al., 2010).

#### ***b. Foie***

Plusieurs études, utilisant des antagonistes des CB1R périphériques ou des souris présentant une invalidation spécifique de *Cnr1* dans les hépatocytes, ont démontré le rôle clé de ces récepteurs face à l'apparition des dérégulations consécutives au développement de l'obésité (Y. Kim et al., 2020; Roger et al., 2020). L'administration d'un régime hyperlipidique induit une augmentation de la synthèse des AG hépatiques ainsi que le développement d'une stéatose, phénomènes limités par le Rimonabant et absents chez les souris CB1R<sup>-/-</sup> (Murdolo et al., 2007). Par ailleurs, l'activation de CB1R affecte le métabolisme lipidique hépatique en augmentant l'expression de gènes et l'activité d'enzymes lipogéniques telles que la FAS et l'ACC $\alpha$  (Cinar et al., 2014; Osei-Hyiaman et al., 2005) et en inhibant l'AMPK (Kola et al., 2005). Cette dernière, une fois activée, bloque les voies anaboliques et stimule les voies cataboliques, favorisant de ce fait l'oxydation des AG et limitant la lipogénèse dans le foie. Il en résulte une hausse de la synthèse *de novo* des AG chez les souris sauvages, effet qui n'est pas observé chez les souris CB1R<sup>-/-</sup> (Osei-Hyiaman et al., 2005; Ravinet Trillou et al., 2003). Les propriétés stéatogènes des CB1R résultent de l'activation combinée, dans les hépatocytes, de la lipogénèse médiée par SREBP1c, de la réduction de l'oxydation des AG via l'inhibition de l'AMPK, et de la diminution de la libération de VLDL riches en TG (Gary-Bobo et al., 2007; Mallat et al.,

2013; Osei-Hyiaman et al., 2008; Tam et al., 2010). D'autre part, le traitement, par du Rimonabant, d'explants de foie de souris augmente l'oxydation des graisses, démontrant que l'agonisme inverse des CB1R hépatiques limite l'expression des gènes codant pour des enzymes pro-lipogéniques (Jourdan et al., 2012) (**Figure 35**).



**Figure 35. Illustration schématique de la fonction des CBR dans le métabolisme hépatique (Bazwinsky-Wutschke et al., 2019).**

*FA : Fatty Acid, ECS : EndoCannabinoid System, SCD1 : Stearyl-CoA Desaturase-1, MUFA : MonoUnsaturated Fatty Acid.*

L'obésité entraîne une hyperactivation du SEC hépatique, comme indiqué par l'augmentation des niveaux d'AEA et de CB1R dans ce tissu chez la souris après trois semaines de régime hyperlipidique (Kunos, 2007; Osei-Hyiaman et al., 2005). Cette hyperactivation est associée à l'apparition d'une stéatose et d'une insulino-résistance hépatiques (Bazwinsky-Wutschke et al., 2019; Osei-Hyiaman et al., 2005; Quarta & Cota, 2020) (**Figure 35**). Les travaux de J. Liu et collaborateurs en 2013 ont permis d'expliquer ce mécanisme, puisqu'il a été démontré que l'activation des CB1R hépatiques par les ECs, déclenche des voies en aval de la résistance à l'insuline. L'une de ces enzymes cibles, impliquées dans la progression de la résistance à l'insuline, est la Stéaroyl-CoA Désaturase-1 (SCD1). Elle génère des AG monoinsaturés qui ont la capacité d'inhiber la FAAH, favorisant ainsi l'augmentation des niveaux hépatiques d'AEA chez les souris obèses. Le SEC hépatique est donc étroitement lié à SCD1 puisque la régulation positive

de l'un contribue à l'activation de l'autre, favorisant la lipogenèse et la résistance à l'insuline chez les souris obèses (J. Liu et al., 2013).

En ce qui concerne le métabolisme glucidique, l'activation des CB1R entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose en augmentant la glycolyse et/ou la néoglucogenèse (Jourdan et al., 2016). Des expériences, sur des rats obèses, ont notamment démontré une réduction de la production hépatique de glucose par une perfusion périphérique avec du Rimonabant (Nogueiras, Veyrat-Durebex, et al., 2008). Ces effets glycémiques directs, également observés après traitement chronique avec l'antagoniste périphérique JD-5037, impliquent une amélioration de l'action systémique de l'insuline. En effet, le blocage chronique des CB1R périphériques, chez des souris obèses, entraîne une amélioration de la signalisation hépatique de l'insuline (Cinar et al., 2014; J. Liu et al., 2019), en partie à l'origine d'une augmentation de la clairance du glucose plasmatique induite par l'insuline (Cinar et al., 2014; J. H. Han et al., 2019; Tam et al., 2012). Cette hausse de la sensibilité hépatique à l'insuline dépend de l'activation de la voie Sirt1/mTORC2/Akt et de l'augmentation d'expression des enzymes hépatiques engendrant une dégradation accrue de la céramide (sphingolipide impliqué dans la résistance à l'insuline) (Cinar et al., 2014; J. Liu et al., 2019). Enfin, ces effets semblent hépato-spécifiques puisque l'inactivation de *Cnr1* dans les hépatocytes protège contre l'installation d'une insulino-résistance chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (J. Liu et al., 2012).

#### *c. Pancréas*

Les îlots pancréatiques humains et murins présentent un SEC autonome. Il est actuellement admis que les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques expriment CB1R ainsi que les enzymes de synthèse et de dégradation des ECs (Bermúdez-Silva et al., 2008; González-Mariscal et al., 2016; W. Kim et al., 2011), bien que certaines études contradictoires existent (Bermúdez-Silva et al., 2008; Starowicz et al., 2008). Contrairement au CB1R, le CB2R n'est pas exprimé dans les cellules  $\beta$  (González-Mariscal et al., 2016; Nakata & Yada, 2008). Le rôle de ce dernier dans la sécrétion d'insuline est largement inexploré et reste conflictuel (Bermúdez-Silva et al., 2008; Juan-Picó et al., 2006; X. Zhang et al., 2016).

Les ECs, synthétisés à la demande, sont sécrétés de manière glucose-dépendante, c'est-à-dire que lorsque les niveaux de glucose augmentent, les cellules  $\beta$  sécrètent des ECs (principalement du 2-AG) (Bermúdez-Silva et al., 2008; W. Kim et al., 2011). L'activation des CB1R des cellules  $\beta$  réduit les niveaux de GLUT2 et de Glucokinase, senseurs cellulaires du glucose nécessaires pour l'absorption et le métabolisme du glucose dans les cellules  $\beta$  (H. Shin et al., 2018; Vilches-Flores et al., 2010). Par ailleurs, l'activation des CB1R réduit l'afflux de  $Ca^{2+}$ , inhibant alors l'exocytose des granules contenant de l'insuline par les protéines liant  $Ca^{2+}$ , réduisant ainsi la sécrétion d'insuline (González-Mariscal et al., 2018; W. Kim et al., 2011; Nakata & Yada, 2008; H. Shin et al., 2018). La diminution CB1R-dépendante des taux d'AMPc intracellulaires est également impliquée dans l'altération de la sécrétion d'insuline (González-Mariscal et al., 2018; W. Kim et al., 2011; Nakata & Yada, 2008; H. Shin et al., 2018).

L'hyperglycémie persistante et l'obésité sont associées à l'apoptose des cellules  $\beta$  induite par le stress (Montane et al., 2014). Le SEC est impliqué dans ce phénomène puisque la sous-unité  $G_i$  des CB1R se lie directement, lorsqu'elle est activée par les ECs, au domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, bloquant alors son activation par phosphorylation (W. Kim et al., 2012). En conséquence, la voie en aval de ce récepteur est inhibée, y compris le blocage de la phosphorylation d'Akt, conduisant à l'apoptose des cellules. Il est important de noter que le blocage des CB1R restaure la prolifération cellulaire et préserve leur viabilité en cas de stress (González-Mariscal et al., 2018; W. Kim et al., 2011).

D'autres mécanismes indirects impliquant le SEC interviennent également dans l'altération de la production d'insuline par le pancréas au cours de l'obésité, comme ceux conduisant à une inflammation ou à une diminution de la production d'incrétines. L'activation de CB1R dans les cellules immunitaires et les cellules  $\beta$  conduit à l'initiation d'une inflammation, qui entraîne une infiltration de cellules immunitaires dans et autour des îlots pancréatiques chez les rongeurs obèses (González-Mariscal et al., 2018; Jourdan et al., 2013, 2017). Dans les macrophages résidents des îlots, la stimulation de CB1R induit leur polarisation en macrophages pro-inflammatoires de type M1, en activant à la fois l'inflammasome NLRP3 (qui conduit à la sécrétion d'IL- $1\beta$ ) et la p38 MAPK (qui conduit à la sécrétion de CCL2), ce qui accroît par conséquent le recrutement des macrophages (Jourdan et al., 2013, 2017).

La sécrétion post-prandiale par l'intestin des incrétines (GIP et GLP-1) et leur liaison à leurs récepteurs couplés aux protéines G<sub>s</sub> (GIPR et GLP-1R, respectivement), active l'adénylate cyclase de manière glucose-dépendante pour augmenter l'AMPc intracellulaire et améliorer la sécrétion d'insuline (Drucker et al., 1987; Montrose-Rafizadeh et al., 1994). La production des incrétines étant elle-même dépendante de l'activité adénylate cyclase, et donc inhibée par les CB1R, la sécrétion d'insuline sera indirectement diminuée lors d'une activation du SEC (González-Mariscal et al., 2016, 2018; W. Kim et al., 2011; Nakata & Yada, 2008; H. Shin et al., 2018)

#### *d. Muscle squelettique*

Les CB1R sont exprimés à la fois dans le muscle squelettique de la souris et de l'Homme (Cavuoto, McAinch, Hatzinikolas, Janovská, et al., 2007; Pagotto et al., 2006). Dans ce tissu, le tonus endocannabinoïde semble stimulé au cours de l'obésité comme suggéré par les travaux de Matias et collaborateurs indiquant une augmentation du 2-AG après un régime hyperlipidique chez la souris (Matias, Gonthier, et al., 2006). Des résultats similaires non publiés ont également été obtenus au laboratoire (Demizieux et al., 2016, données personnelles) faisant état d'une augmentation des concentrations de 2-AG et d'AEA dans le gastrocnémien de souris soumises 16 semaines à un régime riche en graisses saturées. Les conséquences d'une hyperactivation du SEC dans le muscle n'ont pas encore été totalement élucidées mais des données suggèrent qu'elle pourrait induire une réduction de la sensibilité à l'insuline et, associée aux effets pancréatiques conduisant à une libération excessive d'insuline, favoriser l'hyperglycémie chronique (Matias, Petrosino, et al., 2008; Starowicz et al., 2008).

Certains des effets lipogéniques, liés à l'activation des CB1R, ont également été décrits dans le muscle. Cavuoto et collaborateurs en 2007 ont montré une augmentation de l'expression de l'AMPK après un traitement de cellules musculaires humaines par l'antagoniste des CB1R AM251. Un effet inverse a été observé après co-traitement avec l'AEA, effet déjà démontré en présence de  $\Delta^9$ -THC et de 2-AG (Kola et al., 2005). Ces données suggèrent, qu'au cours de l'obésité, la hausse consécutive des taux d'ECs circulants pourrait entraîner une inhibition de l'oxydation du glucose et des AG dans le muscle squelettique consécutive à une réduction de l'activité de l'AMPK (Cavuoto,

McAinch, Hatzinikolas, Cameron-Smith, et al., 2007). Par ailleurs, l'absence de CB1R spécifiquement au niveau musculaire prévient la résistance à l'insuline induite par l'alimentation en augmentant la signalisation insulinique (González-Mariscal et al., 2019). L'absence de CB1R musculaires améliore également les performances mitochondriales, entraînant une augmentation de la dépense énergétique sans modification de la masse corporelle. Ces résultats montrent collectivement que CB1R dans le muscle joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme énergétique et des performances physiques (González-Mariscal et al., 2019). D'autre part, des traitements ont été réalisés, sur souris soumises à un régime hyperlipidique, avec l'antagoniste des CB1R périphériques MRI-1891 qui possède une signalisation biaisée vers la  $\beta$ -arrestine 2 (Z. Liu et al., 2021). Ces traitements ont permis d'améliorer l'insulinorésistance musculaire induite par le régime chez les souris sauvages mais pas chez les souris  $\beta$ -Arr2<sup>-/-</sup>. Ces données renforcent l'idée d'un rôle majeur de CB1R dans l'installation de l'insulinorésistance musculaire.

Enfin, CB2R et TRPV1 sont également présents dans les muscles squelettiques humains et de rongeurs, ce qui suggère que certains des effets des ECs et NAEs observés pourraient s'exercer par le biais de ces récepteurs (Cavuoto, McAinch, Hatzinikolas, Janovská, et al., 2007). Il a d'ailleurs été montré que l'OEA stimule la  $\beta$ -oxydation des AG sans pour autant exercer d'effets sur l'absorption ou l'oxydation du glucose dans le muscle strié squelettique (Guzmán et al., 2004). Par conséquent, de nombreux travaux seront encore nécessaires afin de comprendre le rôle des ECs et NAEs dans le contrôle de l'utilisation du glucose et de l'oxydation des AG par le muscle squelettique.

#### *e. Rein*

Dans des conditions physiologiques, le SEC est impliqué dans la régulation de l'homéostasie rénale comme le maintien de l'hémodynamique rénale, de la réabsorption tubulaire du sodium et l'excrétion urinaire des protéines (Dao & François, 2021). Ces effets sont généralement dus à l'activation du CB1R (**Tableau 5**) (Chua et al., 2019). Des altérations de l'expression et de l'activité des CB1R ont été mises en évidence dans le cadre de diverses maladies rénales, telles que la néphropathie diabétique, les maladies chroniques rénales et différents types de lésions rénales (Dao & François, 2021).

**Tableau 5. Rôles principaux du SEC au niveau rénal (Chua et al., 2019).**

<i>Structure rénale</i>	<b>Récepteur</b>	<b>Ligand</b>	<b>Effet physiologique</b>
<i>Rein</i>	<b>CB1</b>	<b>AEA</b>	↑ Marqueurs de stress oxydatif ↑ Apoptose ↑ Inflammation
<i>Artérioles juxta-médullaire afférente et efférente</i>	<b>CB1</b>	<b>AEA</b>	↑ Vasodilatation
<i>Vaisseaux glomérulaires</i>	<b>?</b>	<b>AEA</b>	↑ Flux sanguin ↓ Rythme de filtration
<i>Anse de Henle</i>	<b>CB1</b>	<b>AEA</b>	↑ Production de NO <sub>2</sub> ↓ Transport Na <sup>+</sup>
<i>Podocytes et cellules mésangiales</i>	<b>CB1</b>	<b>WIN-55212-2</b>	↑ Excrétion urinaires des protéines ↑ Expression de VEGF ↓ Taux et expression de la Néphrine

Tout d'abord, la néphropathie diabétique, dont l'obésité constitue un facteur de risque (Abrass, 2004), se caractérise par une hypertrophie et une hyperfiltration glomérulaires, qui peuvent entraîner une albuminurie, une fibrose rénale, un déclin du débit de filtration glomérulaire et une insuffisance rénale terminale (Declèves & Sharma, 2010; Johnson et al., 2012). Plusieurs études ont démontré l'implication du SEC dans les podocytes, les cellules mésangiales et dans les lésions des cellules tubulaires, ainsi que dans l'activation des CB1R dans la néphropathie diabétique (Drori et al., 2019; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014, 2018; Udi et al., 2017). De plus, il a été démontré que CB1R est régulé à la hausse dans d'autres troubles rénaux marqués par une inflammation interstitielle et une fibrose, y compris la néphrite interstitielle aiguë (François et al., 2016). Une étude de Jenkin et collaborateurs en 2016 a révélé que l'activation de CB2R contribue à la réduction du dysfonctionnement rénal lié à l'obésité en diminuant la protéinurie, la clairance de la créatinine et les marqueurs fibrotiques rénaux (Dao et al., 2019; Lecru et al., 2015).

Par ailleurs, il existe de plus en plus de preuves indiquant le rôle important des CB1R et des CB2R ainsi que de leur modulation dans la pathogenèse de diverses formes d'insuffisance rénale aiguë. En ce qui concerne les lésions rénales aiguës, les agonistes sélectifs des CB1R et CB2R ont un effet dose-dépendant dans la prévention des lésions tubulaires après une ischémie rénale dans le rein de souris (Feizi et al., 2008).



### 3. Tissu adipeux

#### a. *Régulation du tonus endocannabinoïde dans le TA*

La première preuve d'une élévation périphérique du tonus endocannabinoïde chez l'Homme provient d'études chez des femmes en surpoids et obèses souffrant d'hyperphagie boulimique et des femmes ménopausées obèses, chez lesquelles des taux sanguins élevés d'AEA ou d'AEA et de 2-AG ont été relevés (Engeli et al., 2005; P. Monteleone et al., 2005). Cependant, une autre étude menée chez des humains en surpoids ou obèses a montré, qu'au niveau tissulaire, seul le TAV présentait une augmentation des taux de 2-AG, suggérant des mécanismes de régulation dépôts-spécifiques (Matias, Gonthier, et al., 2006). L'hyperactivité du SEC dans les dépôts adipeux viscéraux vs sous-cutanés a été confirmée par d'autres études montrant une corrélation positive entre les taux plasmatiques de 2-AG et la quantité de graisse intra-abdominale (Blüher et al., 2006; Côté et al., 2007). Chez la souris obèse, le tonus endocannabinoïde apparaît également diminué, inchangé et augmenté respectivement dans les dépôts de TA sous-cutané, mésentérique et épидидymaire (D'Eon et al., 2008; Matias, Gonthier, et al., 2006; Starowicz et al., 2008).

Bien que les ECs ne soient pas considérés comme des hormones circulantes, les données humaines suggèrent que les niveaux plasmatiques de 2-AG (qui sont au moins deux ordres de grandeur inférieurs à ceux mesurés dans les tissus) sont en partie le résultat d'un excès de production des organes périphériques et notamment du TA.

L'expansion du TAV ne semble pas être le seul facteur responsable d'une hyperactivation du SEC dans le TA puisqu'il a été observé que, chez des patients non obèses (IMC <30) atteints de DT2, les taux plasmatiques d'AEA et de 2-AG étaient plus élevés par rapport à ceux des témoins appariés non diabétiques (Matias, Gonthier, et al., 2006). Dans ce sens, il est confirmé que l'insuline diminue les taux d'ECs et régule positivement la dégradation des ECs chez les animaux minces, dans les préadipocytes 3T3L1 (D'Eon et al., 2008) et les cellules graisseuses sous-cutanées humaines (Murdolo et al., 2007). Ainsi, une résistance à l'insuline pourrait être associée à des niveaux élevés d'ECs.

Au final, il semble exister une relation de cause à effet entre l'hyperactivité du SEC, en particulier dans les dépôts de graisse viscérale, et les facteurs de risque cardio-

métaboliques humains, comme suggéré par la corrélation positive entre les taux plasmatiques élevés de 2-AG, les TG, la glycémie à jeun, la sensibilité à l'insuline et la baisse du HDL-cholestérol chez les patients obèses (Blüher et al., 2006; Côté et al., 2007).

#### i. Régulation des CB1R

Les résultats concernant l'expression de CB1R dans l'obésité humaine sont controversés. Une régulation à la baisse a été observée dans les dépôts adipeux épiploïques et sous-cutanés par certains auteurs (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Kempf et al., 2007), mais pas par d'autres (Matias, Gonthier, et al., 2006). Löfgren et collaborateurs en 2007 n'ont mis en évidence aucun changement dans les niveaux d'ARNm de *CNR1* dans le TAV et le TASC de patients obèses, et aucune corrélation avec l'expression génique de l'adiponectine. Il a également été rapporté qu'au cours de l'obésité, les niveaux d'ARNm de *CNR1* sont augmentés dans la graisse viscérale et la graisse abdominale sous-cutanée, et diminués dans la graisse sous-cutanée glutéale (Pagano et al., 2007). D'après ces données, il apparaît que la mesure de l'expression des enzymes du métabolisme des ECs et de *CNR1* est particulièrement sensible aux différences dans les procédures expérimentales, les cohortes de patients et les dépôts adipeux sélectionnés, et nécessite une enquête plus approfondie.

Par ailleurs, tandis qu'au cours de l'obésité, l'expression génique et protéique de CB1R est généralement augmentée dans le TA blanc de rongeurs, elle apparaît diminuée chez l'Homme obèse (Bensaid et al., 2003; Matias et al., 2016; Starowicz et al., 2008). Cette observation pourrait être expliquée par une boucle de rétroaction négative consécutive à la hausse des ECs circulants (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2016). À l'inverse, les taux de CB1R (et de CB2R) restent inchangés dans la graisse sous-cutanée ou mésentérique de souris rendues obèses à la suite d'un régime hyperlipidique (Starowicz et al., 2008).

#### ii. Métabolisme des ECs

La baisse d'expression des enzymes dégradant les ECs pourrait être à l'origine de l'élévation de leurs concentrations dans les tissus périphériques, comme cela a été observé dans le TAV et le TASC de patients obèses (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005;

Löfgren et al., 2007). L'absence de régulation positive par l'insuline de l'expression de la *FAAH* a été rapportée dans le TASC de patients obèses vs minces (Murdolo et al., 2007). D'autres études rapportent des résultats contradictoires suggérant même que l'augmentation des ECs circulants ne résulte pas d'une diminution de leur dégradation dans le TA (Cable et al., 2014; Engeli et al., 2005; Pagano et al., 2007). Par ailleurs, Sipe et collaborateurs en 2005 ont trouvé une corrélation entre le surpoids/l'obésité et un polymorphisme faux-sens dans le gène de la *FAAH*, bien que ce résultat n'ait pas été confirmé par d'autres auteurs (D. P. Jensen et al., 2007). Finalement, aucun consensus ne se dégage vraiment de la littérature concernant la régulation des enzymes de dégradation des ECs au cours de l'obésité. De plus, des modifications peuvent également affecter l'expression des enzymes de biosynthèse des ECs, en accord avec les niveaux élevés d'ECs dans la graisse viscérale vs sous-cutanée des patients obèses (Pagano et al., 2007).

La synthèse des ECs par les adipocytes peut également être modulée par les apports nutritionnels en AG. En effet, un faible apport en AG polyinsaturés n-3 associé à une forte proportion d'acide arachidonique, sont à l'origine d'une augmentation des concentrations tissulaires d'ECs et notamment de 2-AG. Ainsi, une alimentation enrichie en AG polyinsaturés n-3 réduit les niveaux d'AEA et de 2-AG dans le TAV des rats Zucker, tandis que le même traitement diminue, dans une moindre mesure, les niveaux de 2-AG dans le cerveau (Batetta et al., 2009; Di Marzo et al., 2010; Matias, Carta, et al., 2008; Matias et al., 2016; Matias, Petrosino, et al., 2008). De plus, une diminution des niveaux de 2-AG et d'AEA et des quantités d'acide arachidonique estérifié en position sn-2 et position sn-1 des phospholipides, a été observée après l'incubation d'adipocytes 3T3-F442A de souris avec de l'acide docosahexaénoïque (DHA) indiquant que les AG n-3 pourraient moduler les niveaux de phospholipides adipocytaires qui agissent comme précurseurs des ECs (Matias, Carta, et al., 2008; Matias et al., 2016).

#### ***b. Adipogenèse***

De plus en plus de preuves indiquent que le SEC joue un rôle important dans l'adipogenèse. Par exemple, les taux d'ECs et les niveaux d'expression de CB1R augmentent après la différenciation des cellules 3T3 murines et des préadipocytes humains en adipocytes matures (Bensaid et al., 2003; Gasperi et al., 2007; Matias,

Gonthier, et al., 2006; Pagano et al., 2007; Roche et al., 2006). La stimulation des CB1R préadipocytaires murins et humains s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'acteurs clés de la différenciation (notamment PPAR $\gamma$ ) et d'une augmentation de la taille des adipocytes par enrichissement en TG (Matias, Gonthier, et al., 2006; Pagano et al., 2007). Il existe également des preuves indirectes du rôle des CB1R dans la détermination du nombre d'adipocytes dans le TA. En effet, il a été démontré que le blocage de ce récepteur inhibe la prolifération des cellules 3T3 murines (Gary-Bobo et al., 2006) suggérant que la prolifération des préadipocytes pourrait être favorisée par l'hyperactivation du SEC. Ainsi, dans le cas d'une balance énergétique positive, la stimulation des CB1R adipeux serait en faveur d'une hausse du stockage énergétique, en assurant la production d'un nombre suffisant d'adipocytes, augmentant ainsi les capacités d'accumulation maximale de graisse.

Parallèlement, des études, menées *in vitro* sur des adipocytes murins blancs et bruns immortalisés et *in vivo* chez la souris obèse, démontrent que l'antagonisme des CB1R périphériques favorise directement la transdifférenciation des adipocytes blancs en un phénotype d'adipocytes bruns, riches en mitochondries et capables de thermogénèse (Hsiao et al., 2015; Perwitz et al., 2010). Ces données suggèrent que l'activation des CB1R limiterait la transdifférenciation ou le brunissement des adipocytes blancs en adipocytes beiges.

Il est intéressant de noter que le récepteur TRPV1, présent dans les préadipocytes, pourrait également participer à la régulation de l'adipogénèse en inhibant ce processus après activation par l'AEA (L. L. Zhang et al., 2007). Ainsi, l'AEA et le 2-AG, qui lui n'active pas les TRPV1, pourraient jouer des rôles différents dans l'adipogénèse d'autant plus que, dans certaines conditions, l'activation des récepteurs TRPV1 inhibe la biosynthèse du 2-AG (Maccarrone et al., 2008).

#### ***c. Lipolyse et lipogénèse***

Le SEC est impliqué dans la prise en charge du glucose par les adipocytes. Dans les préadipocytes 3T3L1 et chez la souris obèse, l'AEA et le 2-AG activent les CB1R augmentant l'absorption de glucose insulino-dépendante en facilitant la translocation du

transporteur de glucose 4 (GLUT4) vers la membrane plasmique (Bajzer et al., 2011; Gasperi et al., 2007; Motaghedi & McGraw, 2008; Pagano et al., 2007). Des expériences *in vitro* ont montré une inversion de cet effet par le blocage de CB1R (Motaghedi & McGraw, 2008). Cependant, *in vivo* chez la souris obèse, des données contradictoires ont été obtenues puisque le blocage des CB1R a induit une hausse de l'expression de GLUT4 et une hausse de la glycolyse adipocytaire (Jbilo et al., 2005).

Par ailleurs, la stimulation de CB1R dans les adipocytes primaires de souris conduit à une augmentation de l'activité de la LPL en réduisant la disponibilité de l'AMPc (Cota et al., 2003; Matias, Gonthier, et al., 2006) ou en augmentant l'expression du facteur de transcription lipogénique SREBP-1c et de ses cibles, telles que l'ACC $\alpha$  et la FAS (Bellocchio et al., 2008; Osei-Hyiaman et al., 2005). Ces observations démontrent l'implication forte du SEC dans la régulation de la lipogenèse.

La littérature suggère que l'activation du SEC dans le TA est associée à une diminution de la lipolyse, limitant ainsi la mobilisation des graisses à jeun et favorisant leur stockage. En effet, il a été démontré dans divers tissus périphériques que les cannabinoïdes inhibent la libération de noradrénaline présynaptique par les neurones sympathiques (Ishac et al., 1996; Ralevic & Kendall, 2009; Szabo et al., 2001; Vizi et al., 2001). Par conséquent, il est probable que les ECs, en agissant sur l'innervation sympathique du TA, limitent la mobilisation des AGL au cours du jeûne. D'ailleurs, une augmentation du tonus sympathique et de la lipolyse a été observée suite au blocage des CB1R (Mølhøj et al., 2010). Cependant, certaines études ont également signalé un effet inhibiteur direct des ECs sur la lipolyse adipocytaire, comme indiqué dans le cadre d'études sur des 3T3-L1 (Teixeira et al., 2010) et sur des explants de TA de rat (Muller et al., 2017).

#### ***d. Inflammation***

L'expansion du TA blanc est associée à une infiltration macrophagique significative et une surproduction de cytokines pro-inflammatoires qui sont des événements importants dans l'apparition de la résistance à l'insuline et du SM. Plusieurs études indiquent que le blocage des CB1R réduit l'inflammation locale (J. H. Han et al., 2018; Jourdan et al., 2013, 2017, 2017). Cet effet pourrait résulter de l'inactivation des CB1R macrophagiques,

puisque leur stimulation par l'AEA entraîne une augmentation de l'expression de *Ccl2*, *Nlrp3*, *Il1b* et *Tnf* (impliqués dans la polarisation des macrophages de type M1) au sein de cellules RAW264.7, tandis que leur blocage reverse ces modifications (K. H. Han et al., 2009; Jourdan et al., 2013, 2017). Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats diabétiques et des souris obèses (J. H. Han et al., 2018; Jourdan et al., 2013, 2017, 2017). De surcroît, une étude récente a indiqué que les CB1R sont des acteurs clés dans la régulation des interactions entre adipocytes, système nerveux sympathique et cellules immunitaires (Ruiz de Azua et al., 2017). Ces données ont suggéré que l'inactivation spécifique de CB1R dans les adipocytes contribue à la thermogenèse adaptative et au brunissement du TA blanc induisant la polarisation des macrophages de type M2, agissant comme une source locale de catécholamines (Ruiz de Azua et al., 2017).

#### *e. Fonction endocrine*

Au-delà de son rôle primordial dans le stockage énergétique, le TA blanc présente des fonctions endocriniennes puisqu'il est capable de sécréter diverses substances et cytokines bioactives. La production de ces facteurs peut être modulée par le SEC (van Eenige et al., 2018). L'expression de l'adiponectine, adipokine insulino-sensibilisatrice, est inhibée par l'activation des CB1R et est augmentée par son blocage dans les préadipocytes 3T3L1 (Bensaid et al., 2003; Matias, Gonthier, et al., 2006) et dans les explants de TA humain (Ge et al., 2013). Ces données ont été confirmées *in vivo* puisque, chez les animaux et les humains obèses traités avec des antagonistes de CB1R, la production d'adiponectine est restaurée (Bensaid et al., 2003; Jourdan et al., 2010; Tam et al., 2010, 2012). Similairement, CB1R semble contrôler la production de la leptine, adipokine anorexigène réduisant la prise alimentaire par action sur ses récepteurs hypothalamiques. L'incubation de préadipocytes 3T3L1 avec différents agonistes de CB1R augmente la sécrétion de leptine, tandis que son blocage la diminue (Tam et al., 2012). Une étude récente a également rapporté une diminution significative, dans le TASC et le TAV de souris obèses, de la concentration d'adipokines moins favorables (telles que la résistine, l'apeline, la visfatine, l'IL-6 et l'interféron- $\gamma$ ) suite au blocage des CB1R (Jorgačević et al., 2019). Il est également intéressant de noter que l'activation des CB2R semble abaisser l'expression protéique de PPAR $\gamma$ , de la leptine, de l'IL-6 et de TNF $\alpha$  et

augmenter les taux d'adiponectine et d'IL-4 dans les adipocytes issus de patients obèses (Rossi et al., 2016).








#### 4. Polymorphisme CB1R

Enfin, des corrélations entre les polymorphismes de *CNR1*, le gène codant pour CB1R, et l'apparition de phénotypes mince ou obèse, dans diverses populations humaines adultes, ont également été trouvées (Gazzerro et al., 2007; T. D. Müller et al., 2007). De toute évidence, toute conclusion quant à la pertinence pathologique de ces résultats doit attendre d'autres études évaluant l'impact de ces mutations sur l'activité fonctionnelle des CB1R et identifiant les séquences de *CNR1* qui sont pertinentes dans le cadre du développement de l'obésité. Cette dernière question a été en partie abordée dans une étude menée auprès de 1932 cas d'obésité et 1173 témoins non obèses d'origine européenne (Benzinou et al., 2008). Sur 25 polymorphismes à nucléotide unique (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) de *CNR1* génotypés, 12 ont montré des preuves d'association avec l'obésité infantile et adulte. Les SNP introniques rs806381 et rs2023239 étaient également associés à un IMC plus élevé chez les individus obèses suisses et les individus danois. Le génotypage de tous les variants connus a permis d'identifier deux SNP (rs6454674 et rs10485170) plus fortement associés à l'IMC (Benzinou et al., 2008).

#### E. Les CB1R, une nouvelle cible thérapeutique

Comme démontré précédemment, le SEC est fortement impliqué dans les mécanismes de régulation de l'appétit et le métabolisme énergétique (Di Marzo et al., 2001). Sa dérégulation au cours de l'obésité s'accompagne de complications métaboliques et de modifications délétères sur de nombreux organes (Pacher & Kunos, 2013) (**Tableau 6**).

**Tableau 6. Le système endocannabinoïde dans l'obésité et le diabète de type II (Di Marzo, 2008).**

Dysregulation of the peripheral endocannabinoid system in high-fat diet-induced hyperglycaemia and obesity				
	Site of action	Effect of CB <sub>1</sub> activation	Effects of a HFD	Potential consequences
	Epididymal adipose tissue	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Lipogenesis (LDL, FAS)</li> <li>↑ PPAR-γ expression</li> <li>↑ Glucose uptake</li> <li>↓ AMPK activity</li> <li>↓ Adiponectin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ 2-AG Sustained</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Energy storage</li> <li>↑ Dyslipidaemia</li> <li>↑ Insulin resistance</li> <li>↑ Excessive visceral fat</li> </ul>
	Subcutaneous adipose tissue	See above	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ 2-AG, AEA Sustained</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Subcutaneous fat</li> <li>↑ Visceral and ectopic fat</li> </ul>
	Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Insulin release?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ 2-AG, AEA Early and sustained</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Hyperinsulinaemia?</li> </ul>
	Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Fatty acid synthesis</li> <li>↓ AMPK activity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ AEA</li> <li>↑ CB<sub>1</sub> Early</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Dyslipidaemia</li> <li>↑ Dyslipoproteinaemia</li> <li>↑ Steatosis</li> </ul>
	Skeletal muscle	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ AMPK activity?</li> <li>↓ Glucose uptake?</li> <li>↓ Glucose oxidation?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ 2-AG Early</li> <li>↑ CB<sub>1</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Insulin resistance?</li> <li>↓ Energy expenditure</li> </ul>
	Heart		<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ 2-AG, AEA Early and sustained</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Pericardial fat?</li> <li>↑ Cardiovascular risk?</li> </ul>
	Kidneys	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Glomerular filtration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ 2-AG, AEA Late and sustained</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Hypertrophy?</li> <li>↑ Perirenal fat?</li> <li>↑ Renal failure</li> </ul>

The possible (and, in some cases, just hypothesised) consequences of CB<sub>1</sub> activation and over-activation are also shown. Note how the upregulation of endocannabinoid tone can have different effects on AEA and 2-AG (with subsequent differential impact on the activity of cannabinoid and TRPV1 receptors, as suggested in Fig. 3), and in a time-dependent way ('early' is usually associated with HFD-induced hyperglycaemia; 'sustained', with overt HFD-induced obesity). AEA, anandamide; HFD, high-fat diet

Ce constat a conduit les industries pharmaceutiques à s'atteler au développement de molécules ayant la capacité de bloquer les CB1R. En effet, au cours de l'obésité, l'hyperactivation du SEC met principalement en jeu les récepteurs aux cannabinoïdes centraux et périphériques de type 1 (Matias, Petrosino, et al., 2008; Nogueiras, Rohner-Jeanrenaud, et al., 2008).



## 1. Le Rimonabant et les antagonistes de 1<sup>ère</sup> génération

Après l'identification de cette nouvelle cible thérapeutique, de nombreuses molécules ont vu le jour et ont fait l'objet d'essais cliniques de phase III dont celles décrites dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7. Stades de développement clinique des antagonistes CB1R de première génération (Adapté de Cinar et al., 2020).**

Dénomination commune <i>Nom chimique</i> (société)	Indications cliniques Essais cliniques en monothérapie	Rapports d'études cliniques
<b>Rimonabant</b> SR141716A (Sanofi)	<p>Dyslipidémie, Obésité</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00386061) -RIO-Europe</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00029835) -RIO-LIPIDS</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00029861) -RIO-North America</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00325546) -RIO-ASIA</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00481923) -REBA</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00481975) -CRAVING</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00434096) -VENUS*</p> <p>Dyslipidémie, Obésité, Diabète de type II</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00299325) -VICTORIA</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00239967) -ADAGIO-Lipids</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00257257) -SERENADE</p> <p>Diabète de type II et prédiabète *</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00325650) -RAPSODI *</p> <p>Complications diabétiques, dyslipidémie, obésité, maladie rénale, diabète de type II*</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00458081) - RIALTO *</p> <p>Maladie coronarienne, dyslipidémie, obésité</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00124332) -STRADIVARIUS</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00263042) -CRESCENDO *</p> <p>Fibrose hépatique, NAFLD sans diabète *</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00576667) -STRONG *</p> <p>Fibrose hépatique, NAFLD avec diabète*</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00577148) -STRONG-2*</p> <p>Dépendance à l'alcool</p> <p><i>Ph-2</i> (NCT00075205)</p> <p>Sevrage tabagique</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00459173, NCT00464165, NCT00358228) -STRATUS</p> <p>Syndrome de Prader-Willi *</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00603109)*</p>	<p>(Van Gaal et al., 2005)</p> <p>(J.-P. Després et al., 2005)</p> <p>(Pi-Sunyer et al., 2006)</p> <p>(Pataky et al., 2013)</p> <p>(Triay et al., 2012)</p> <p>(J.-P. Després et al., 2009)</p> <p>(Rosenstock et al., 2008)</p> <p>(Nissen et al., 2008)</p> <p>(Topol et al., 2010)</p> <p>(George et al., 2010)</p> <p>(Robinson et al., 2018)</p>
<b>Taranabant</b> MK-0364, L-000899055 (Merck)	<p>Obésité</p> <p><i>Ph-2</i> (NCT00109148) and (NCT00131430)</p> <p>Sevrage tabagique</p> <p><i>Ph-2</i> (NCT00109135)</p>	<p>(Addy et al., 2008)</p> <p>(Morrison et al., 2010)</p>
<b>Otenabant</b> CP-945598, CE-156706 (Pfizer)	<p>Fibrose hépatique, NAFLD *</p> <p><i>Ph-2</i> (EudraCT2008-004088-21)</p> <p>Obésité*</p> <p><i>Ph-3</i> (NCT00396448), (NCT00375401), (NCT00483171)*</p> <p>Obésité et diabète de type II*</p>	<p>(Aronne et al., 2011)</p>

	<i>Ph-3 (NCT00391196)*</i>	
<b>Ibipinabant</b> <i>BMS-646256</i> <i>SLV-319</i> (Solvay)	<b>Obésité*</b> <i>Ph-2 (NCT00388609)*</i> <b>Obésité, diabète de type II *</b> <i>Ph-3 (NCT00541567)*</i>	
<b>Surinabant</b> <i>SR14778</i> (Sanofi)	<b>Obésité</b> <i>Ph-2 (NCT00239174)</i> Sevrage tabagique <i>Ph-2 (NCT00432575)</i>	

\*Essais interrompus en raison des effets secondaires centraux du Rimonabant.

Dans ce contexte, le Rimonabant (antagoniste des CB1R centraux et périphériques) constitue la première molécule « anti-obésité » mise sur le marché en 2006 qui a montré des effets intéressants. Ce traitement a permis de diminuer significativement la masse corporelle chez des personnes en surpoids atteintes du SM avec une efficacité équivalente voire meilleure que celle des traitements anti-obésité existants (Christensen et al., 2007). Par ailleurs, le Rimonabant a également amélioré de nombreux paramètres incluant la prise alimentaire, la glycémie à jeun, l'hyperinsulinémie ainsi que le cholestérol et les TG plasmatiques (Christensen et al., 2007; J.-P. Després et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006; Scheen et al., 2006; Van Gaal et al., 2005).

Malgré les très nombreux effets bénéfiques du Rimonabant observés sur le métabolisme énergétique, le blocage des CB1R localisés dans le cerveau a provoqué l'apparition d'effets indésirables graves tels que l'augmentation de l'anxiété, la dépression et les idées suicidaires (Christensen et al., 2007), lui valant alors un retrait du marché en 2008 seulement deux années après le début de sa commercialisation (Le Foll et al., 2009). Cependant, plusieurs études ont suggéré qu'une partie des effets bénéfiques observés lors des études sur le Rimonabant pouvait être dus aux CB1R périphériques notamment la réduction de la prise alimentaire et l'amélioration de pathologies liées à l'obésité dont la dyslipidémie, l'insulinorésistance, l'accumulation ectopique de lipides et la lipotoxicité (Blüher et al., 2006; Cavuoto, McAinch, Hatzinikolas, Cameron-Smith, et al., 2007; Curioni & André, 2006; Jourdan et al., 2012; Y. L. Liu et al., 2005; Matias, Gonthier, et al., 2006). Cette idée a été renforcée par la mise en évidence de CB1R fonctionnels au sein de tissus périphériques comme élégamment rappelé dans cette revue (Tam et al., 2018). Par conséquent, de nouvelles molécules ont été développées avec un passage restreint de la barrière hémato-encéphalique (BHE) afin de minimiser les risques de troubles psychiatriques en conservant une partie des effets métaboliques bénéfiques d'ores et déjà

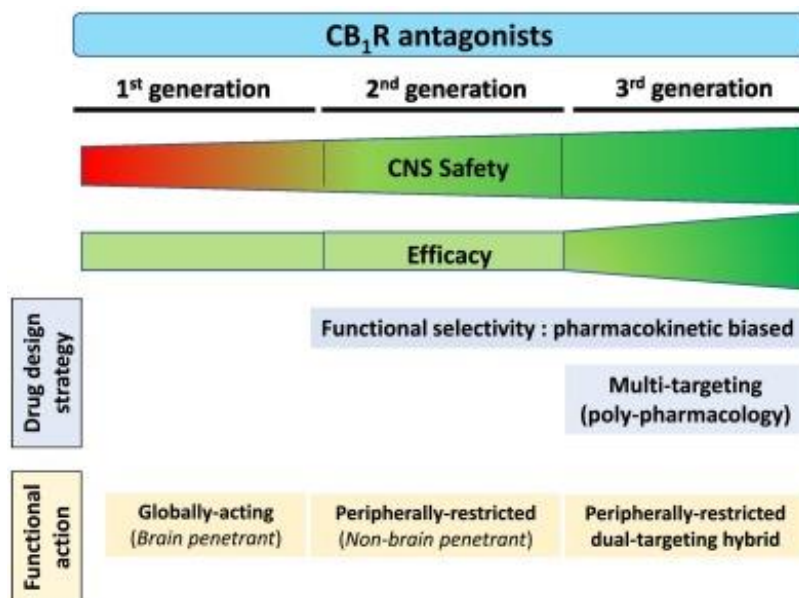
observés avec le Rimonabant (Maccarrone et al., 2015). Ces antagonistes des CB1R présentant une action limitée à la périphérie sont nommés « antagonistes périphériques » ou « antagonistes de 2<sup>ème</sup> génération ».

## 2. Les antagonistes de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération à action périphérique

AM-6545, dérivé du Rimonabant, est le premier antagoniste de 2<sup>ème</sup> génération à avoir vu le jour (**Figure 36**). Il a présenté des effets bénéfiques sur de nombreux paramètres comprenant entre autres la masse corporelle, l'insulinorésistance ou encore la stéatohépatite non-alcoolique (Tam et al., 2010), démontrant ainsi l'intérêt de développer ce type de composés. Par la suite de nombreuses molécules prometteuses ont été développées. Parmi elles, la molécule JD-5057 initialement développée par Jenrin Discovery puis maintenant sous licence par Corbus Pharmaceuticals sous le nom CRB-4001. JD-5037 a été étudié de manière extensive sur de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* au cours de recherches précliniques et son efficacité thérapeutique sur des modèles animaux d'obésité, de SM ou encore de DT2 est bien documentée (Cinar et al., 2014; Jourdan et al., 2013; Tam et al., 2012). Le composé est décrit comme hautement sélectif des CB1R périphériques sans cibles indésirables connus et constitue désormais un outil de choix dans la poursuite de la compréhension de l'implication de CB1R dans les dérégulations métaboliques associées à l'obésité.

Depuis le retrait du marché du Rimonabant, de nombreuses molécules à action périphérique ont été développées (Cinar et al., 2020) et ces découvertes ont amené la recherche vers un nouveau type de molécule combinant l'antagonisme des CB1R périphériques et une seconde cible thérapeutique (**Figure 36**). Ces composés sont nommés « antagonistes de 3<sup>ème</sup> génération ». L'une des molécules les plus représentatives de ce nouveau groupe de composé est la forme (*S*) de MRI-1867 qui est un composé hybride avec une activité antagoniste spécifique des CB1R périphériques combinée à une activité antagoniste iNOS (Nitric Oxide Synthase inductible, génératrice de ROS). MRI-1867 est sous licence par la société Inversago Pharma sous le nom INV-101 avec l'objectif d'un développement clinique. De récentes publications sur des modèles de rongeurs décrivent un effet exacerbé de la combinaison de ces cibles sur des fibroses hépatiques et

pulmonaires (Cinar et al., 2016, 2017; Iyer, Cinar, Katz, et al., 2017) ainsi que sur les maladies rénales associées à l'obésité (Udi et al., 2020) et la dyslipidémie (Roger et al., 2020). MRI-1867 fait l'objet d'une étude clinique de phase I dans le but d'étudier chez l'Homme sa sécurité, sa tolérance et sa pharmacocinétique dans le cadre du traitement du syndrome de Prader-Willi et de la stéatohépatite non-alcoolique [16].



**Figure 36.** Les différentes générations d'antagonistes des CB1R (Cinar et al., 2020).

Enfin, le développement de ces nouvelles molécules explore également la sélectivité fonctionnelle ou pharmacocinétique biaisée qui permet d'orienter la cinétique d'inhibition du CB1R vers la signalisation dépendante des protéines G ou la signalisation dépendante des  $\beta$ -arrestines (K. H. Ahn et al., 2013; Reiter et al., 2012) (**Figure 36**). Les composés biaisés peuvent être des antagonistes de 2<sup>ème</sup> génération, à la cible thérapeutique unique, ou de 3<sup>ème</sup> génération, à double cible thérapeutique tels que la molécule MRI-1891 (Z. Liu et al., 2021). MRI-1891 est actuellement sous licence par la société Inversago Pharma, au même titre que MRI-1867, sous le nom INV-202 et fait l'objet d'une étude clinique de phase I. Cette molécule permet principalement l'inhibition de la voie de la  $\beta$ -arrestine 2 induite par le blocage de CB1R par rapport à celle des protéines G. Cette étude est menée dans une optique de traitement de maladies métaboliques telles que le syndrome de Prader-Willi, la stéatohépatite non-alcoolique, le diabète de type I, la néphropathie diabétique ou les pathologies rénales chroniques [17].

# Problématique

---

Il est communément admis que l'obésité est associée à une augmentation des concentrations d'ECs dans différents tissus et particulièrement dans le cerveau (Di Marzo & Matias, 2005). La principale conséquence de cette hyperactivation centrale du SEC, impliquant les CB1R, est la stimulation de la prise alimentaire et la prise de poids (González et al., 1999; Mechoulam et al., 1998; Williams & Kirkham, 1999). De ce fait, le blocage de ces récepteurs est très vite devenu une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre l'obésité. Ainsi, le Rimonabant a été le premier antagoniste des CB1R mis sur le marché en 2006. Son efficacité a été démontrée par l'étude RIO (Rimonabant In Obesity) qui fait état d'une perte de poids, d'une réduction du tour de taille et d'une amélioration de plusieurs paramètres liés au risque métabolique (J.-P. Després et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006; Scheen et al., 2006; Van Gaal et al., 2005). Toutefois, l'inactivation des CB1R centraux pouvant s'accompagner d'effets psychotropes sévères (dépression), la molécule a été retirée du marché en 2008.

Un certain nombre d'études a suggéré qu'une partie des effets bénéfiques exercés par le Rimonabant sur le métabolisme énergétique était due à une action de la molécule sur les CB1R périphériques indépendamment des effets centraux augmentant la prise alimentaire (Blüher et al., 2006; Curioni & André, 2006; Jourdan et al., 2012). Cette hypothèse est renforcée par des données de la littérature qui associent l'activation du SEC à une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique dans différents organes. Ainsi, il est bien démontré que l'activation spécifique des CB1R hépatiques active la néoglucogenèse, la lipogenèse *de novo* et diminue la  $\beta$ -oxydation des AG. D'autre part, il a été montré que la stimulation du SEC conduit à une diminution de la captation de glucose par les muscles (Cavuoto, McAinch, Hatzinikolas, Cameron-Smith, et al., 2007; Y. L. Liu et al., 2005) et à une diminution de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (Matias, Gonthier, et al., 2006). Finalement, une hyperactivation du SEC au niveau périphérique, semble conduire à des dérégulations du métabolisme glucido-lipidique dans plusieurs organes périphériques majeurs et pourrait provoquer à terme le développement de pathologies associées à l'obésité telles que l'insulino-résistance, le diabète, une dyslipidémie ou la stéatose hépatique.

Le TA, qui constitue le principal organe de stockage énergétique de l'organisme, joue un rôle prépondérant dans le développement de la résistance à l'insuline au cours de l'obésité (Virtue & Vidal-Puig, 2010). En effet, de nombreuses études démontrent que

l'hypertrophie du TA s'accompagne d'une dérégulation du métabolisme adipocytaire qui conduit, entre autres, à une libération excessive d'AGL (Gustafson et al., 2007). Ces AGL sont libérés par le TA au cours de la lipolyse, un mécanisme qui permet, en situation physiologique, le déstockage des graisses pour fournir de l'énergie aux organes périphériques à la suite d'un jeûne ou d'un exercice physique. Cependant, au cours de l'obésité, le développement pathologique du TA conduit à la modification des populations adipocytaires. Des adipocytes fonctionnels se multiplient permettant la gestion de l'excès d'apport énergétique par le stockage de TG (hyperplasie) et des adipocytes devenus hypertrophiques ou « post-fonctionnels » traduisant alors un dépassement de la capacité de stockage optimale permettant la gestion des réserves énergétiques. Ces modifications conduisent à une dérégulation du contrôle de la lipolyse avec pour conséquence une libération excessive d'AGL à l'origine de dépôts ectopiques de lipides dans des organes périphériques comme le foie, le muscle, le pancréas et le cœur conduisant ainsi à des effets délétères et à l'installation de la résistance à l'insuline (Boden, 1997; Boden et al., 2002; DeFronzo et al., 1981; Engeli et al., 2005; Shulman, 2000; Warram et al., 1990).

Le TA fait partie des tissus périphériques possédant des récepteurs aux cannabinoïdes et étant capable de produire des ECs (Bensaid et al., 2003). La dérégulation du SEC dans le TA au cours de l'obésité est évoquée dans plusieurs études à la fois chez la souris et l'Homme (Engeli et al., 2005; Matias, Petrosino, et al., 2008; Osei-Hyiaman et al., 2005; Starowicz et al., 2008). Cependant le nombre de travaux étudiant les effets de l'activation de ce système sur le métabolisme glucido-lipidique du TA est limité et la plupart des travaux abordent le rôle des CB1R de manière indirecte en utilisant des antagonistes de ces récepteurs sur des modèles cellulaires ou animaux. La majorité de ces études suggère un rôle lipogénique de l'activation du SEC dans le TA (Cota et al., 2003) alors que son rôle dans le contrôle de la lipolyse adipocytaire est moins largement décrit.

Le premier objectif de ma thèse a donc été de chercher à préciser le rôle des ECs dans la régulation de l'activité lipolytique adipocytaire au cours de l'obésité.

Le TA étant lui-même un important producteur d'ECs pouvant exercer des effets autocrines et endocrines, mon second objectif a été de développer un protocole permettant d'évaluer les capacités sécrétoires des différents dépôts de TA. La finalité de

cette approche est d'essayer d'établir un lien entre les ECs sécrétés par le TAV et le TASC, leur capacité à activer les CB1R et les dérégulations métaboliques liées à l'obésité.

Outre leur impact sur le métabolisme, les ECs pourraient également avoir des effets sur la différenciation et le renouvellement des adipocytes et ainsi agir sur les capacités d'expansion et le remodelage du TA. Dans ce contexte, le troisième objectif de mon travail a été de mettre en place une méthode de culture de cellules de la Fraction Stroma-Vasculaire (FSV) à partir de TA en vue d'étudier l'impact d'agonistes et d'antagonistes des CB1R sur l'adipogenèse.

Enfin, mon dernier objectif a été de poursuivre un travail initié au laboratoire consistant à caractériser l'activité biologique de nouveaux antagonistes des CB1R issus du commerce, fournis par des collaborateurs ou développés en interne. Pour cela, j'ai principalement appliqué une méthode *in vitro* utilisant des cellules HEK 293 CB1Rm présentant une transfection stable du CB1R et des approches *in vivo* menées sur des souris obèses.



## Résultats et Discussion

---

## I. Effets de l'activation des CB1R sur la lipolyse en période interprandiale

Dans un travail précédemment conduit au laboratoire, Muller et collaborateurs (Muller et al., 2017) ont mis en évidence que l'activation du SEC pouvait favoriser la mobilisation des graisses en période postprandiale via une inhibition de l'action anti-lipolytique dépendante des CB1R. Étant donné qu'une libération excessive d'AGL est considérée comme un événement précoce contribuant à l'apparition de la résistance à l'insuline, il a été suggéré que le SEC du TA pouvait de cette façon être impliqué dans la mise en place des dérégulations métaboliques liées à l'obésité.

Toutefois, dans cette étude, il est apparu que les effets de l'activation des CB1R sur la lipolyse n'étaient pas reproduits *in vitro* en absence d'insuline, ni *in vivo* dans des conditions de faible insulïnémie (jeûne léger). C'est pourquoi nous avons mis en place une nouvelle série d'expériences combinant des approches *in vivo* et *in vitro* afin de déterminer les conséquences de l'activation du SEC sur l'activité lipolytique dans des conditions de faible insulïnémie. En effet, une altération de la capacité de mobilisation des graisses pourrait favoriser le stockage, conduire à des dérégulations du métabolisme du TA liées à son expansion pour finalement contribuer à la mise en place de l'insulinorésistance. Dans cette étude, nous avons également cherché à déterminer quels pourraient être les effets de l'inactivation du SEC sur la lipolyse dans le TA obèse.

## A. Article de thèse



# Endocannabinoids Produced by White Adipose Tissue Modulate Lipolysis in Lean but Not in Obese Rodent and Human

Chloé Buch<sup>1†</sup>, Tania Muller<sup>1†</sup>, Julia Leemput<sup>1</sup>, Patricia Passilly-Degrace<sup>1</sup>, Pablo Ortega-Deballon<sup>2</sup>, Jean-Paul Pais de Barros<sup>3</sup>, Bruno Vergès<sup>1,4</sup>, Tony Jourdan<sup>1</sup>, Laurent Demizieux<sup>1</sup> and Pascal Degrace<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Pieter de Lange,  
University of Campania  
Luigi Vanvitelli, Italy

### Reviewed by:

Morvarid Kabir,  
Cedars Sinai Medical Center,  
United States  
Letizia Palomba,  
Università degli Studi di  
Urbino Carlo Bo, Italy

### \*Correspondence:

Pascal Degrace  
Pascal.degrace@u-bourgogne.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and  
share first authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

Received: 28 May 2021

Accepted: 15 July 2021

Published: 09 August 2021

### Citation:

Buch C, Muller T,  
Leemput J, Passilly-Degrace P,  
Ortega-Deballon P, Pais de Barros J-P,  
Vergès B, Jourdan T, Demizieux L and  
Degrace P (2021) Endocannabinoids  
Produced by White Adipose Tissue  
Modulate Lipolysis in Lean but Not in  
Obese Rodent and Human.  
Front. Endocrinol. 12:716431.  
doi: 10.3389/fendo.2021.716431

<sup>1</sup> Team Pathophysiology of Dyslipidemia, INSERM UMR1231, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, <sup>2</sup> Department of Digestive, Thoracic and Surgical Oncology, University Hospital, Dijon, France, <sup>3</sup> Lipidomic Platform, INSERM UMR1231, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, <sup>4</sup> Department of Endocrinology-Diabetology, University Hospital, Dijon, France

White adipose tissue (WAT) possesses the endocannabinoid system (ECS) machinery and produces the two major endocannabinoids (ECs), arachidonylethanolamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Accumulating evidence indicates that WAT cannabinoid 1 receptors (CB1R) are involved in the regulation of fat storage, tissue remodeling and secretory functions but their role in controlling lipid mobilization is unclear. In the present study, we used different strategies to acutely increase ECS activity in WAT and tested the consequences on glycerol production as a marker of lipolysis. Treating lean mice or rat WAT explants with JLZ195, which inhibits ECs degrading enzymes, induced an increase in 2-AG tissue contents that was associated with a CB1R-dependent decrease in lipolysis. Direct treatment of rat WAT explants with AEA also inhibited glycerol production while mechanistic studies revealed it could result from the stimulation of Akt-signaling pathway. Interestingly, AEA treatment decreased lipolysis both in visceral and subcutaneous WAT collected on lean subjects suggesting that ECS also reduces fat store mobilization in Human. In obese mice, WAT content and secretion rate of ECs were higher than in control while glycerol production was reduced suggesting that over-produced ECs may inhibit lipolysis activating local CB1R. Strikingly, our data also reveal that acute CB1R blockade with Rimonabant did not modify lipolysis *in vitro* in obese mice and human explants nor *in vivo* in obese mice. Taken together, these data provide physiological evidence that activation of ECS in WAT, by limiting fat mobilization, may participate in the progressive tissue remodeling that could finally lead to organ dysfunction. The present findings also indicate that acute CB1R blockade is inefficient in regulating lipolysis in obese WAT and raise the possibility of an alteration of CB1R signaling in conditions of obesity.

**Keywords:** endocannabinoid system (ECS), adipose tissue, lipolysis and fatty acid metabolism, obesity, cannabinoid (CB) receptor 1, cAMP, Akt, hormono-sensible lipase

## INTRODUCTION

The role of peripheral endocannabinoid system (ECS) in regulating energy homeostasis has been the focus of many studies and strong evidence suggests that cannabinoid 1 receptors (CB1R) activation by the two major endocannabinoids (ECs), N-arachidonylethanolamide (also referred to as anandamide or AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), stimulates food intake and exerts coordinated actions on several organs finally promoting energy storage and fat accumulation (1). The existence of the ECS machinery in white adipose tissue (WAT) (2–5) and the fact that adipocyte-specific CB1R knock-out mice remain leaner than their wild-type littermates when fed a high fat diet support the view that CB1R regulates adipocyte biology, including lipid homeostasis (6, 7). Regulation of WAT mass is a dynamic process together with lipid accumulation and mobilization. During fasting conditions, lipolysis is activated leading to the release NEFA and glycerol from triglyceride stores into the circulation. Catecholamines and insulin are two major regulators of this tightly controlled metabolic pathway. Catecholamine binding to beta-adrenergic receptors stimulates the adenylyl cyclase/cAMP/protein kinase A (PKA) cascade ultimately activating perilipin and hormone sensitive lipase (HSL) (8). During the fed state, lipolysis is negatively regulated by insulin which triggers cAMP breakdown by phosphodiesterase 3B (PDE3B), through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt dependent pathways (9, 10). It should be noted that insulin is also involved in regulating lipolysis in the fasting state since this hormone exerts an antilipolytic action even at relatively low plasma concentrations (11).

Interestingly, obesity development in mice and humans is associated with an increase in circulating ECs (2, 12, 13) suggesting that fat depots are an important source for plasma ECs. Although their capacity to induce physiological and pathophysiological exocrine effects on extra adipose organs is still matter of debate (14), data support that locally produced ECs are involved in autocrine regulation processes for WAT homeostasis. Thus, it has been demonstrated that CB1R activation in adipocytes favors energy storage by different additional mechanisms, such as enhancement of lipoprotein lipase activity, glucose uptake and adipogenesis (4, 6, 15–17). Numerous studies have reported an ECS involvement in the regulation of fat mobilization (18, 19). However, conclusions were mostly drawn from analysis of gene or protein expression obtained from animals that were chronically treated with CB1R antagonists (20, 21). Thus, these observations might be the result of indirect responses. Moreover, studies showing direct evidence of ECS-induced lipolysis modulation through physiological approaches are very scarce and often contradictory. For instance, some *in vitro* experiments reported either an inhibitory or a stimulating effect of ECs on lipolytic activity likely depending on the presence of insulin (22–24).

The present study was designed to clarify the direct effects of an acute activation of CB1R on adipose tissue lipolysis and precise the mechanisms involved. This notion deserves particular attention since a decrease in fasting lipolysis is predicted to promote fat storage and therefore to contribute to

the metabolic deregulations associated with WAT remodeling (25, 26). Using both *in vivo* and *in vitro* approaches, we provide physiological evidence that acute CB1R activation in WAT reduces fasting lipolysis both in rodent and human. In addition, mechanistic analysis strongly supports it could result from the stimulation of PI3K/Akt signaling pathway. Strikingly, we also show that blockade of CB1R does not modify lipolysis in obese WAT while ECs production is increased.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Diets

C57BL/6J male mice (10–12 week-old) and Wistar rats (250–350 g) from JanvierLabs (Le Genest Saint Isle, France) were housed on a 12/12h light/dark schedule at 22–23°C with *ad libitum* access to water and to a standard diet (STD; A04; UAR, Epinay-sur-Orge, France). For experiments using high fat diet (HFD) mice, 4-week-old C57BL/6J mice were fed *ad libitum* a diet containing 60% of calories from lipids (lard), 20% from protein and 20% from carbohydrates (cat. no. E15742-34, Sniff, Soest, Germany) for 16 weeks. In the meantime, control mice (LEAN) were fed the corresponding low fat diet containing 5% of calories from lard (cat. no. S9259-E010, Sniff). Animals were fasted before each *in vivo* experiment or tissue collection.

### Drugs

All chemicals and media were supplied by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) except for Rimonabant (SR141716) purchased from Sanofi Aventis (Paris, France); AEA and JZL195 from Bio-Techne (Noyal Châtillon sur Seiche, France); JD-5037 from CliniSciences (Nanterre, France); Arachidonoyl Ethanolamide-D4 and Forskolin from Interchim (Montluçon, France).

All drugs administered by intraperitoneal (i.p.) injection were diluted in 0.1% DMSO, 0.025% TWEEN 80, 0.9% NaCl or simply dissolved in DMSO when added in the culture medium.

### In Vivo Experiments With Lean and Obese Mice

#### JZL195 experiments

24h-fasted mice were subjected to an intraperitoneal injection of the dual inhibitor of the degradation enzymes for AEA and 2-AG, FAAH, and MAGL, JZL195 (20 mg/kg) or vehicle (0.1% DMSO/0.025% Tween 80 in 0.9% NaCl). Blood samples were recovered every hour at the tail tip and for 3 hours. Blood samples were centrifuged 10 min at 6,500 g 4°C and plasma was recovered in order to measure glycerol content by using colorimetric glycerol FS assays (DiaSys, Condom, France). At the end of 3 hours, mice were sacrificed and epididymal WAT was recovered for endocannabinoid quantitation and determination of glycerol release by culture explants as described for rat explants.

#### Experiments on HFD mice

Basal lipolysis was evaluated in 24h-fasted obese mice subjected to an intraperitoneal injection of Rimonabant (10 mg/kg) or

JD5037 (3 mg/kg) or vehicle (0.1% DMSO/0.025% Tween 80 in NaCl 0.9%). Blood samples were collected at 0, 15, 30, 45 and 60 min for determination of plasma glycerol content. Stimulated lipolysis was measured similarly after i.p. administration of BRL37344 (5 mg/kg). To study the impact of the specific CB1R inactivation on Akt activity and cAMP WAT levels, some mice were injected with Rimonabant and sacrificed at 15 and 45 min respectively. Some animals were dedicated to the preparation of WAT explants for glycerol and ECs production.

## Preparation and Treatment of Rodent and Human WAT Explants

### Rat and mice epididymal explants

After collection, epididymal WAT was rinsed in warm medium (DMEM-HAM/F12) supplemented with 1% BSA and 0,12% sodium bicarbonate and dissected into ~10 mg pieces. Then, 5–6 explants were pre-incubated 30 min in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C under slight agitation in the same medium.

For JZL195 experiments, tissue ECs content were measured after a 3h-incubation of explants with 10 µM of the inhibitor or vehicle (0,1% DMSO). Some JZL195-treated explants were also rinsed and placed in fresh DMEM-HAM/F12 for 1 h in order to determine glycerol and/or NEFA production in presence or not of norepinephrine (1 µM) and Rimonabant (1 µM).

In other experiments, we directly tested the effect of AEA (5 µM) on NE-stimulated glycerol production by rat WAT explants in the presence or not of Rimonabant (1 µM).

For experiments dedicated to signaling pathway analyses, WAT explants were treated with either forskolin (10 µM) and AEA (5 µM) or vehicle (0,1% DMSO) during 15 min for cAMP assays or either with AEA (5 µM) or vehicle alone during 15 min for immunoblotting assays. At the end of incubation time, explants were collected and frozen in liquid nitrogen for further analyses.

### Human visceral and subcutaneous WAT explants

Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue (VAT and SAT) was collected from adult male patients who underwent abdominal surgery at the University Hospital (Dijon, France). The participants were selected based on their body mass index (BMI) calculated as mass/height<sup>2</sup> and categorized as normal-weighted (BMI < 29.9 kg/m<sup>2</sup>) and obese (BMI > 29.9 kg/m<sup>2</sup>). Ten normal-weighted (BMI: 24.5 ± 0.55; age: 49 ± 3 years) and 10 obese (BMI: 38.3 ± 0.95; age: 44 ± 4) individuals were recruited. Patients with inflammatory bowel disease, cancer, infection, previous bariatric surgical procedures or active prescription for medication that could affect lipolysis were excluded from the study. Once recovered, tissues were kept in DMEM-HAM/F12 supplemented with 1% BSA and 0,12% sodium bicarbonate and immediately transferred to the laboratory. Then tissues were submitted to the same experimental protocol as rodent explants.

## Glycerol, NEFA, and cAMP Assays

Glycerol and NEFA in plasma or culture medium were measured by colorimetric method using respectively glycerol FS and NEFA FS commercial kits (DiaSys, Grabels, France) according to

supplier's information. Intracellular cAMP levels were determined by a competitive ELISA method using a cAMP Complete ELISA kit (Enzo Life Science, Villeurbanne, France). Briefly, frozen WAT samples were extracted with 0.1 M of HCl in a Mini-Beadbeater (BioSpec Products) and then centrifuged twice at 800 g for 10 min at 4°C. The cAMP assay was performed on the supernatant following the supplier's instructions.

## Endocannabinoid Extraction and Quantitation by Mass Spectrometry

Extraction procedure was adapted from (27). Briefly, adipose tissue samples (50–80 mg) were homogenized in a Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK, United states) with 500 µL of ice-cold MeOH/Tris (50 mM, pH 8) 1:1 containing 11.2 ng of d4-anandamide standard. Then, 2 ml of ice-cold CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1/1 and 500 µL of Tris (50 mM, pH 8) were added to each homogenate. Tubes were vortexed and centrifuged for 10 min at 3,000 g (-2°C). The organic layer was recovered, and the water phase was extracted one more time with ice-cold CHCl<sub>3</sub>. The combined extracts were dried under N<sub>2</sub> and resolubilized in 120 µL of ice-cold CHCl<sub>3</sub>. Proteins were precipitated with 2 ml of ice-cold acetone, incubated for 30 min at -20°C, and centrifuged for 10 min at 3,000 g (-2°C). The supernatant was carefully transferred to new tubes and dried under N<sub>2</sub>.

ECs extraction from sample medium was performed according to (28). Briefly, Supelclean<sup>TM</sup> LC-18 SPE cartridges (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) were conditioned with 1 ml acetonitrile followed by 1 ml 0.1M phosphate buffer (pH 9.1). Then 1ml of sample medium added with 2 ng of d4-anandamide standard and acidified with 20 µl ortho-phosphoric acid (85%) was loaded onto the cartridge. Cartridges were washed with 1ml 40% acetonitrile and dried by centrifugation. Elution was performed with 1ml acetonitrile/ammonia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (98:2, v/v) and dried under N<sub>2</sub>. Finally, the dried residue was reconstituted in MeOH and injected into a 1200 LC system coupled to a 6460-QqQ MS/MS system equipped with an electrospray ionization source (Agilent Technologies) as previously described (22). ECs were quantitated by the isotope dilution method by using deuterated standards.

## Western Blotting

For immunoblotting, WAT proteins were extracted using a Mini-Beadbeater (BioSpec Products) in RIPA lysis buffer (NaCl 150 mM, Triton 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 8) supplemented with a phosphatase and protease inhibitor cocktail. Then, extracts were incubated on ice for 1 h and centrifuged twice at 15,000 g for 20 min at 4°C to clarify protein lysate from fat. Protein concentration was determined with the BCA Protein Assay Kit (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). 25 µg of proteins were resolved in gradient (4–20%) SDS-PAGE gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and blotted onto nitrocellulose membranes with the Transblot system (Bio-Rad). After 2 h in blocking buffer

(BSA 5%), the membranes were incubated with primary antibodies recognizing phospho-Akt T308, phospho-Akt S473, phospho-Akt S474, phospho-PKA-C T197, phospho-HSL S660, total form of Akt, PKA-C and HSL, and  $\beta$ -actin (Table S1). Appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were used for detection. Finally, proteins of interest were visualized by enhanced chemiluminescence with the Bio-Rad Chemi-Doc MP Imaging System after substrate incubation (Clarity, Bio-Rad). Bands were quantified by densitometric analysis performed by ImageLab software. All antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, United States) except  $\beta$ -actin (Merck-Millipore, Molsheim, France).

### RT-PCR

Total mRNAs from tissues were extracted with Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France), and 1  $\mu$ g RNA was reverse transcribed with the Iscript cDNA Kit (Bio-Rad). Real-time PCR was performed as described previously (22) by using a StepOnePlus real-time PCR system (Life Technologies, Saint-Aubin, France). For each gene, a standard curve was established from four cDNA dilutions (1/5 to 1/100) and used to determine the relative gene expression variation after normalization with the geometric mean of three housekeeping genes, TATA box binding protein (TBP), L38, and ATP5e. Forward and reverse primer sequences used for amplification are presented in Table S2.

### Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed statistically with GraphPad InStat software (GraphPad Software, La Jolla, CA) by two-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test or by Student's *t*-test. When appropriate, data were analyzed by paired sample *t*-test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Elevation of Endocannabinoid Tone by JZL195 Decreases Fasting Lipolysis in WAT

We designed a set of *in vivo* and *in vitro* experiments using JZL195, a dual inhibitor of the ECs degrading enzymes, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL) as a strategy to elevate WAT ECS tone. First, JZL195 treatment induced an increase in 2-AG levels in WAT collected three hours after the injection in comparison with vehicle-treated control mice while the same trend was observed for anandamide ( $p = 0.100$ ) (Figure 1A). Interestingly, the JZL195 injection was followed by a significant decrease in plasma glycerol levels at time 1 h and 2 h that was not observed in control mice suggesting that the activation of ECS was associated with a decrease in fat mobilization (Figure 1B).

Because this *in vivo* JZL195 treatment could have impacted lipolysis by modifying the ECS tone in extra adipose tissues and/or altering norepinephrine production by sympathetic nerve

endings, we designed an *ex-vivo* experiment in order to selectively test the effects of local ECS activation on lipolysis. For this, rat WAT explants were directly treated with JZL195 for three hours before measuring glycerol and FFA production rates. In these conditions, JZL195 treatment also increased 2-AG tissue content (Figure 1C) and was still associated with a decrease in both basal (Figure 1D) and catecholamine-stimulated lipolysis (Figure 1E). Interestingly, blockade of CB1R with Rimobabant in explants treated with JZL195 normalized glycerol and NEFA production (Figure 1E).

### CB1R Activation Decreases Lipolysis in Rat WAT Explants Through an Akt-Dependent Mechanism

The model of rat WAT explants treated with AEA was further used to study how CB1R signaling may alter lipolysis. We first validated our model showing that compared with vehicle, norepinephrine-stimulated glycerol release was decreased in explants treated with AEA in a CB1R-dependent manner as this effect was abrogated by co-treatment with Rimobabant (Figure 2A) and did not exist in CB1R KO mice (Figure S1).

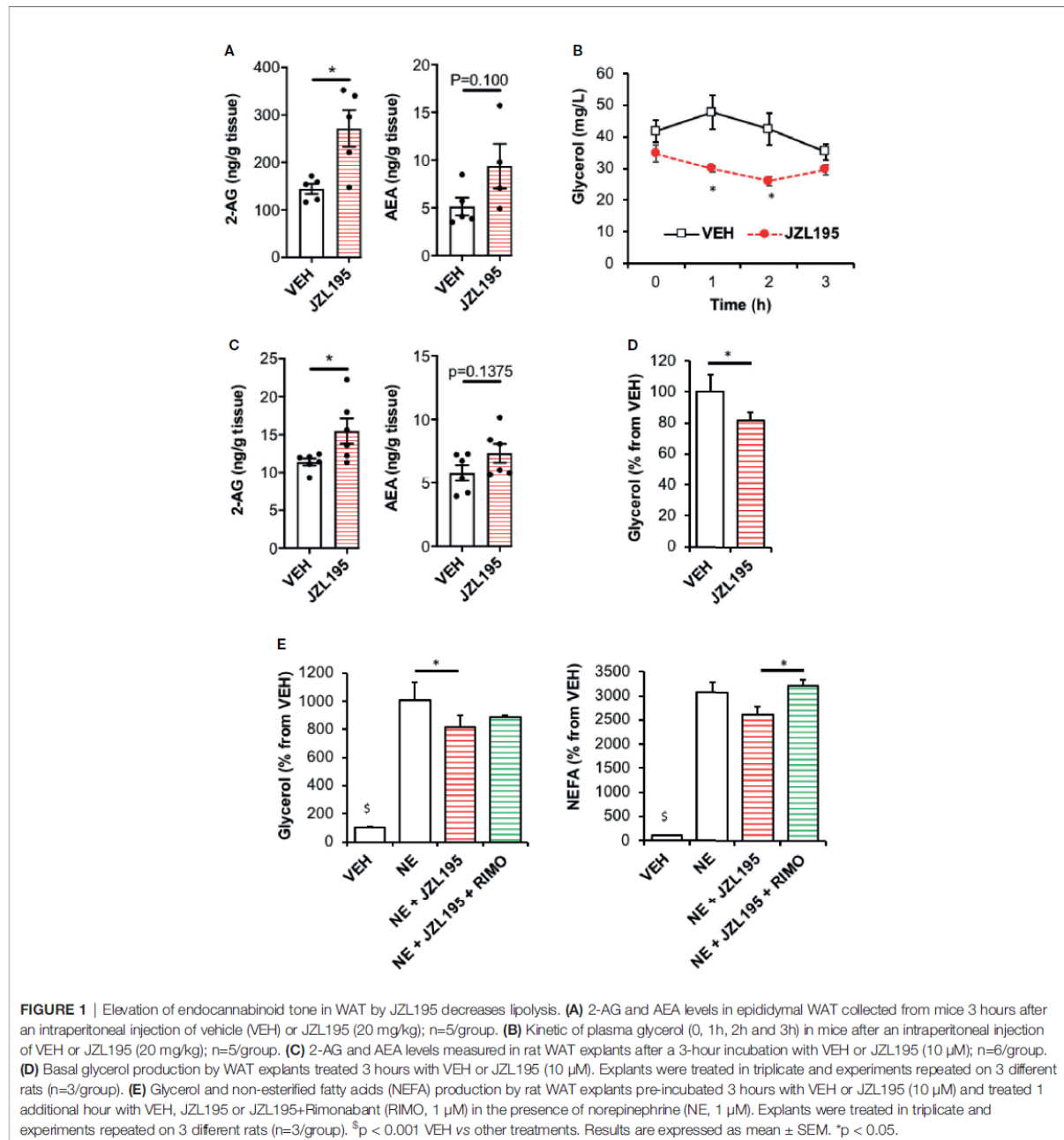
In another set of experiments, we observed that the stimulating effect of forskolin (direct activator of adenylyl cyclase) on intracellular cAMP levels was counteracted in the presence of AEA (Figure 2B). This indicates that, in this model of WAT explants, CB1R is able to modulate cAMP levels independently of beta-adrenergic receptors signaling but rather through inhibiting adenylyl cyclase and/or stimulating PDE-3B activity. Consistent with this, Akt (T308/S473 and S474) and PKA T197 phosphorylation was stimulated by AEA treatment and associated with a decrease in HSL activation (Figure 2C).

In order to verify whether our findings also apply to Human, we studied the impact of AEA on norepinephrine-stimulated glycerol production by VAT and SAT collected on lean subjects.

As expected, glycerol release in medium was increased by norepinephrine and decreased by insulin for both fat depots. Interestingly, AEA treatment decreased norepinephrine-stimulated glycerol release suggesting ECS also reduced the capacity to mobilize fat stores in human WAT (Figure 2D).

### AEA Production Is Increased in WAT of HFD Mice While Lipolysis Is Reduced

To test whether the ECS also regulate fat mobilization in obese WAT, we challenged mice with a HFD for 16 weeks. Compared to lean mice, HFD mice displayed hyperinsulinemia and global insulin-resistance as illustrated by insulin tolerance test and p-Akt levels in adipose tissue (Figure S2). Interestingly and as expected, epididymal fat pads of HFD mice had significant higher tissue contents of 2-AG and AEA compared to lean mice (Figure 3A). We further measured the secretion of ECs in the culture medium of freshly collected epididymal tissue explants from HFD and lean mice. In accordance with tissue contents, AEA levels produced for 2h were higher in epididymal HFD explants than in control while 2-AG levels were not significantly increased (Figure 3B). Consistent with an increase in ECS tone in the WAT of obese mice, mRNA levels of genes



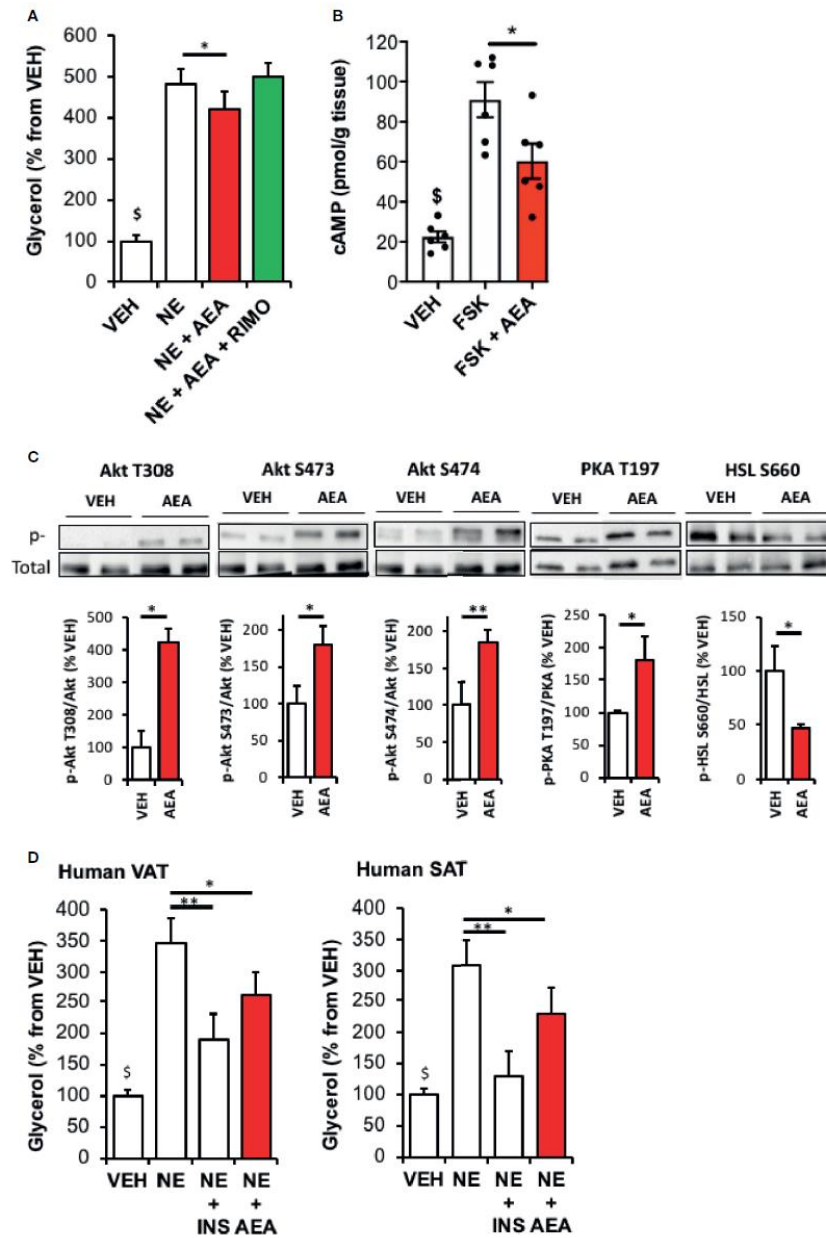
coding for CB1R, NAPEPLD and DAGL were also higher than in control while that coding for the ECS degrading enzymes FAAH and MAGL, were unchanged (Figure 3C). Interestingly, we concomitantly observed that glycerol and NEFA release by fresh WAT derived from HFD mice was lower compared with control mice both in basal conditions and in response to norepinephrine stimulation (Figure 3D). On the whole, it can be assumed that ECS over-produced in obese WAT locally

activate CB1R and exert the same inhibitory effect on lipolysis described earlier in settings using exogenous AEA.

### Blockade of CB1R Does Not Modify Lipolysis in Obese Mice and Human WAT

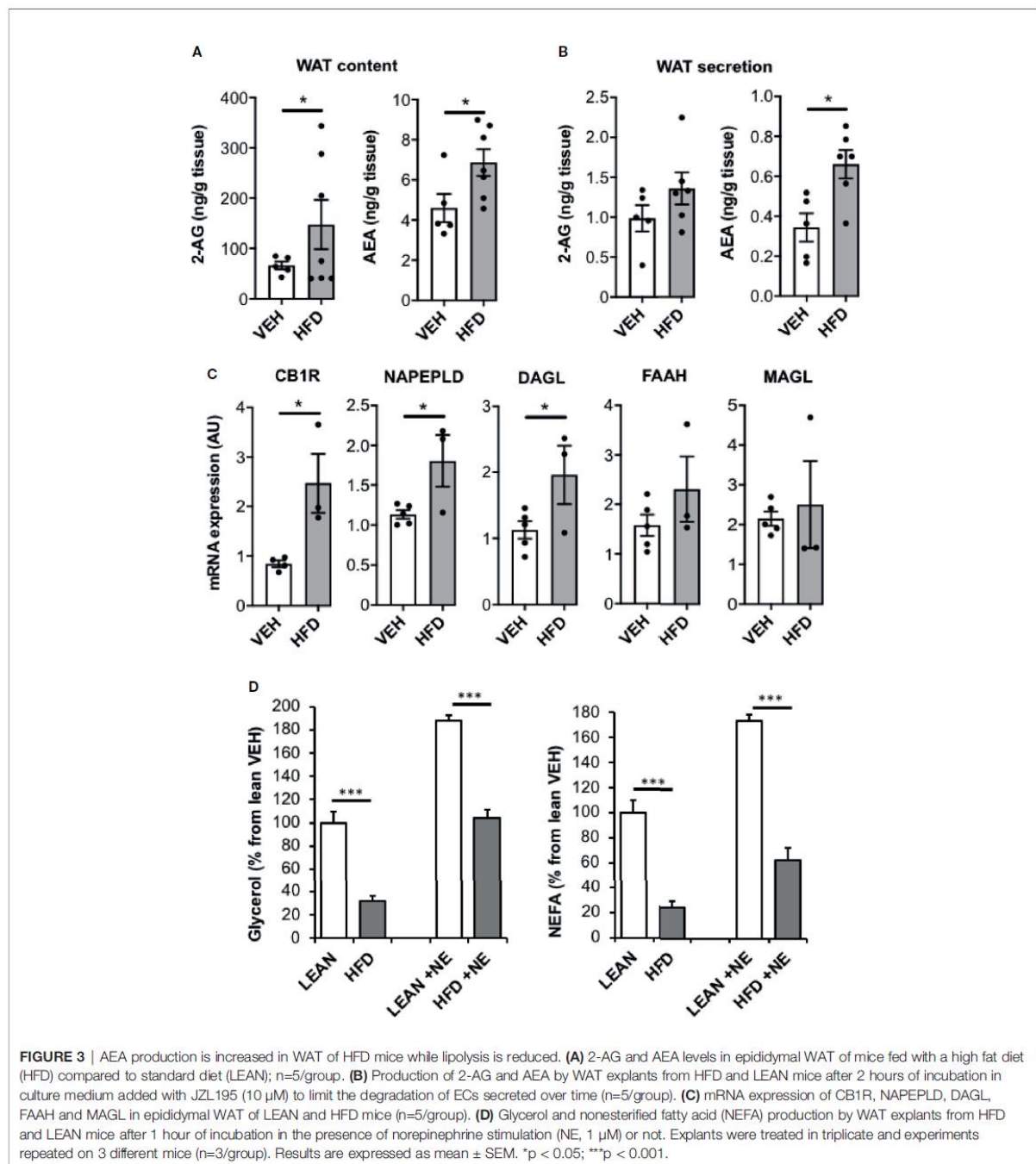
We then examined whether a relationship could exist between the increase of ECS tone observed in the WAT of HFD mice and the concomitant decrease in lipolysis. Since the assay medium

# I. Effets de l'activation des CB1R sur la lipolyse en période interprandiale



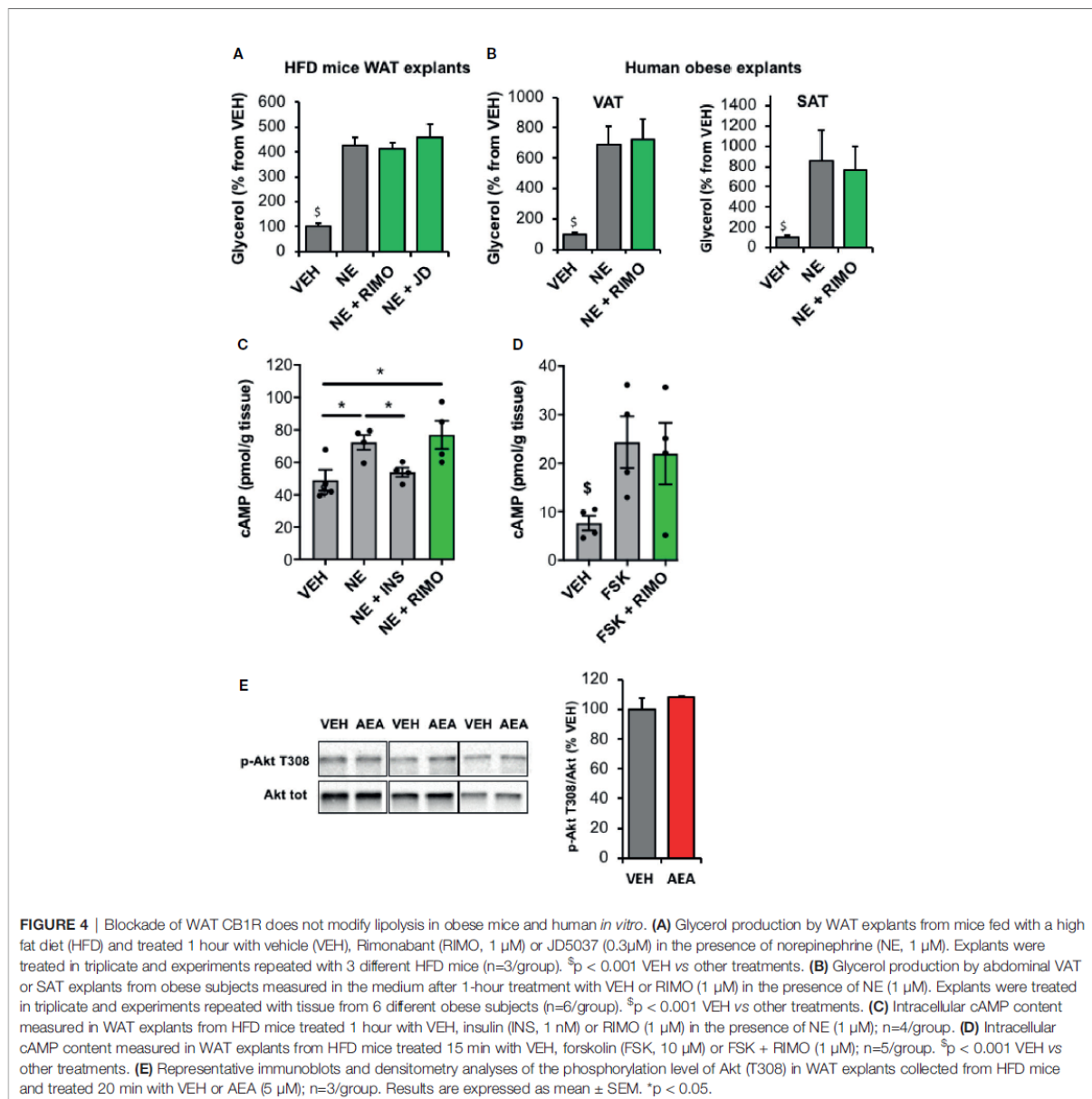
**FIGURE 2** | CB1R activation by AEA decreases WAT lipolysis through an Akt-dependent mechanism. **(A)** Glycerol production by rat WAT explants pre-incubated 30 min with vehicle (VEH) or AEA (5  $\mu$ M) and incubated 1 hour with VEH, AEA, AEA+Rimonabant (RIMO, 1  $\mu$ M) in the presence of norepinephrine (NE, 1  $\mu$ M). Explants were treated in triplicate and experiments repeated on 3 different rats (n=3/group).  $^{\S}p < 0.001$  VEH vs other treatments. **(B)** Intracellular cAMP content in rat WAT explants treated 15 min either with VEH, forskolin (FSK, 10  $\mu$ M) or FSK+AEA (5  $\mu$ M). Explants were treated in triplicate and experiments repeated on 3 different rats (n=3/group).  $^{\S}p < 0.001$  VEH vs other treatments. **(C)** Representative immunoblots and densitometry analyses of the phosphorylation level of Akt (T308, S473, S474), PKA-C (T197) and HSL (S660) in rat WAT explants treated 15 min with VEH or AEA (5  $\mu$ M). **(D)** Glycerol production by Human VAT or SAT explants pre-incubated 30 min with VEH or AEA (5  $\mu$ M) and incubated 1 hour with VEH, AEA or insulin (INS, 500 nM) in the presence of norepinephrine (NE, 1  $\mu$ M). Explants were treated in triplicate and experiments repeated on 7 different subjects (n=7/group).  $^{\S}p < 0.001$  VEH vs NE and NE+AEA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .





used to measure lipolytic activity was deprived in insulin, regulation due to an alteration of insulin-sensitivity should be excluded. On the other hand, pathways regulating cAMP production might be involved as CB1R hyperactivation could lead to a decrease in cAMP production in HFD WAT. To test this hypothesis, we exposed epididymal explants to the CB1R

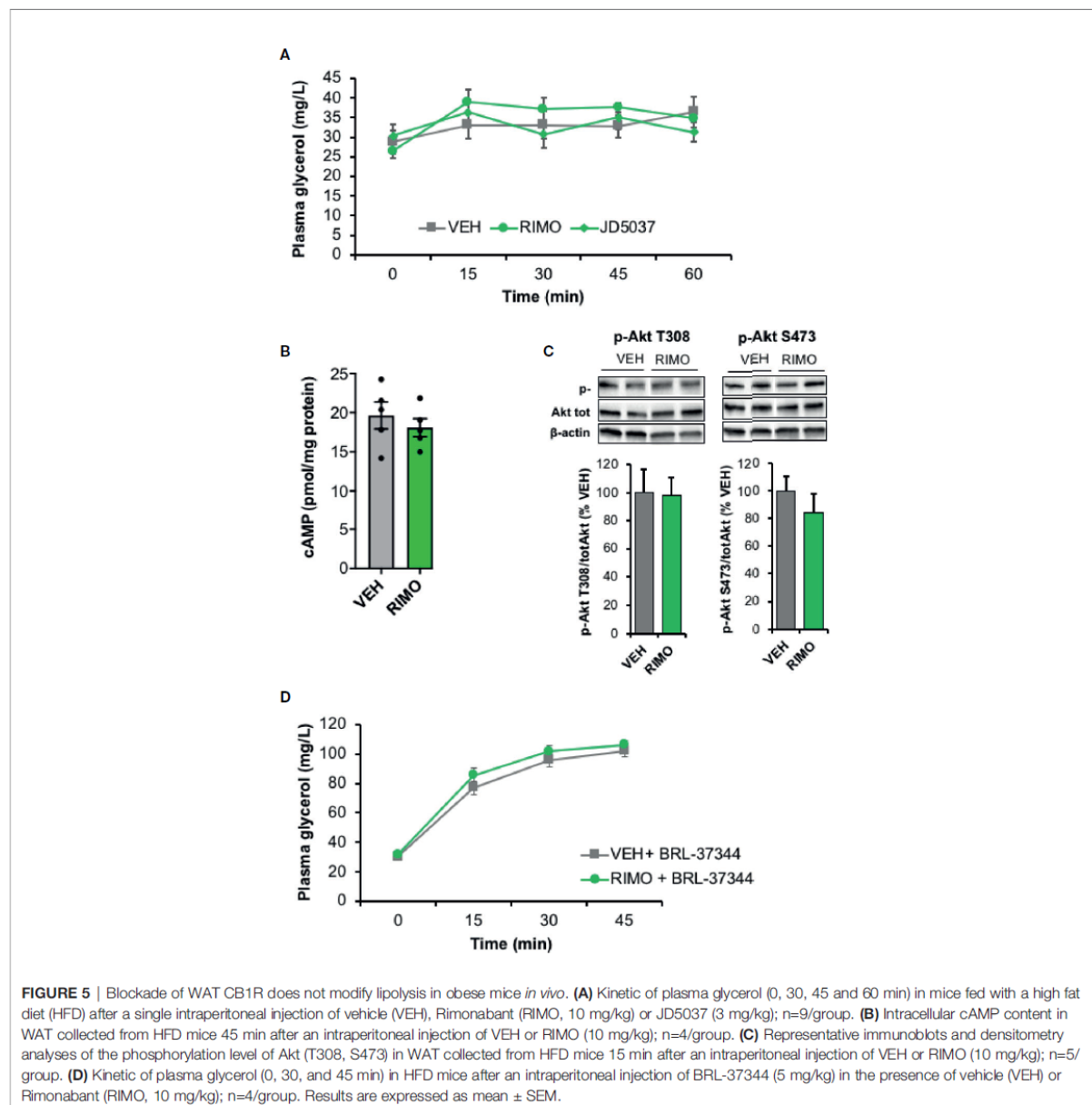
blockers Rimonabant and JD5037 during norepinephrine stimulation and measured glycerol release. While a stimulating action of Rimonabant existed in WAT explants from lean mice (Figure S3), we observed that CB1R blockade had no apparent effect on norepinephrine-stimulated lipolysis in these *ex-vivo* conditions (Figure 4A). Interestingly, the same conclusion was



drawn from experiments performed with both VAT and SAT explants collected from obese subjects and treated with Rimonabant (Figure 4B). In addition, while norepinephrine and insulin did modulate cellular cAMP levels in epididymal explants of obese mice as expected, treatment with the CB1R inverse-agonist Rimonabant which is known to stimulate adenylate cyclase, did not potentiate the effect of norepinephrine (Figure 4C). Furthermore, while AEA was able to decrease cAMP levels after stimulation of adenylate cyclase by forskolin in lean WAT (Figure 2B), Rimonabant did not modify this pathway in obese WAT (Figure 4D). In line with this, the stimulating effect

of AEA on Akt phosphorylation reported in WAT explants from lean mice (Figure 2C) was abrogated in WAT explants from insulin-resistant mice (Figure 4E).

When the impact of CB1R blockade on lipolysis was tested *in vivo*, acute administration of Rimonabant or JD5037 to HFD mice did not significantly modify basal plasma glycerol production (Figure 5A). In accordance with the *in vitro* data, Rimonabant injection to HFD mice did not cause any change in cAMP WAT content (Figure 5B). These results were unexpected since CB1R inverse agonists are known to increase cAMP levels and could increase lipolysis by this way. Besides, Akt activity in WAT was also



not modified by the injection of Rimonabant indicating that insulin-dependent mechanisms were not affected by the CB1R blocker in HFD-treated mice (Figure 5C). We also noticed that Rimonabant had no effect on lipolysis when stimulated with BRL-37344, a selective activator of  $\beta$ 3-adrenergic receptors (Figure 5D) suggesting that related regulating pathways were not modified by CB1R in our conditions. Finally, these *in vivo* and *in vitro* results obtained from obese WAT, collectively suggest that in the context of obesity, CB1R do not interfere with lipolysis as it does in control WAT.

## DISCUSSION

In addition to play an important role in maintaining whole body energy homeostasis, WAT also helps to prevent ectopic lipid deposition and lipotoxicity due to its unique lipid storage capacity (29, 30). In the postprandial state, high plasma insulin levels typically stimulate fatty acid storage and suppress intracellular lipolysis (31). Conversely, when mobilization of endogenous energy stores is required in conditions like prolonged fasting or exercise, NEFA release is promoted by the combined effects of

reduced plasma insulin and increased production of catecholamines (32).

It has been proposed that ECs and CB1R are essential mediators for functions aimed at accumulating energy for future use (1). In line with this, our investigation is the first one to demonstrate, using *in vivo* and *in vitro* strategies, that an acute elevation of ECS tone in WAT induces a rapid decrease in fasting lipolysis that could result from the activation of insulin signaling pathway. These findings join with and add to others indicating ECS activation promotes fat accumulation enhancing fatty acid uptake, lipogenesis and cell differentiation (18). Of note, parallel experiments performed on VAT and SAT explants collected from healthy subjects indicate that the inhibition of lipolysis by AEA also applied to human for both visceral and subcutaneous fat depots.

Evidence exists for an effect of ECs on norepinephrine release by sympathetic terminals innervating WAT (33). In line with this, the decrease in plasma glycerol contents observed in JZL195-treated or HFD mice could be the consequence of the backward action of ECs produced in excess by WAT on presynaptic CB1R which would lead to the inhibition of norepinephrine release as previously suggested (34). However, this possibility should be excluded in our study since the variations in lipolysis were maintained in experiments with tissue explants in the presence of exogenous norepinephrine.

Data obtained from experiments performed with FSK (Figure 2B) also suggest that the reduction in lipolysis may also be consecutive to a decreased in cAMP cellular levels since CB1R is negatively coupled to adenylyl cyclase through Gi/o signaling (35).

However, our findings support the view of the existence of another mechanism by which ECS may limit fat mobilization through the stimulation of the PI3K/Akt signaling pathway leading to an increase in cAMP degradation and finally to an inhibition of lipolysis. The existence of a crosstalk between ECS and insulin signaling pathways has been reported in different tissues while the potential mechanisms involved remain unclear. Indeed, it has been shown that acute or long-term modulation of CB1R activity affected insulin signaling through different mechanisms and induced sometimes divergent effects (36–39). In line with this, we reported in a previous work (22) that acute stimulation of CB1R impaired insulin-induced Akt phosphorylation in adipose tissue whereas Akt-pathway was activated in the present experiments performed in absence of insulin. In agreement with our finding, it has been clearly demonstrated that activation of CB1R produced a robust stimulation of Akt in Chinese hamster ovary cells transfected with CB1R in insulin-free conditions (40).

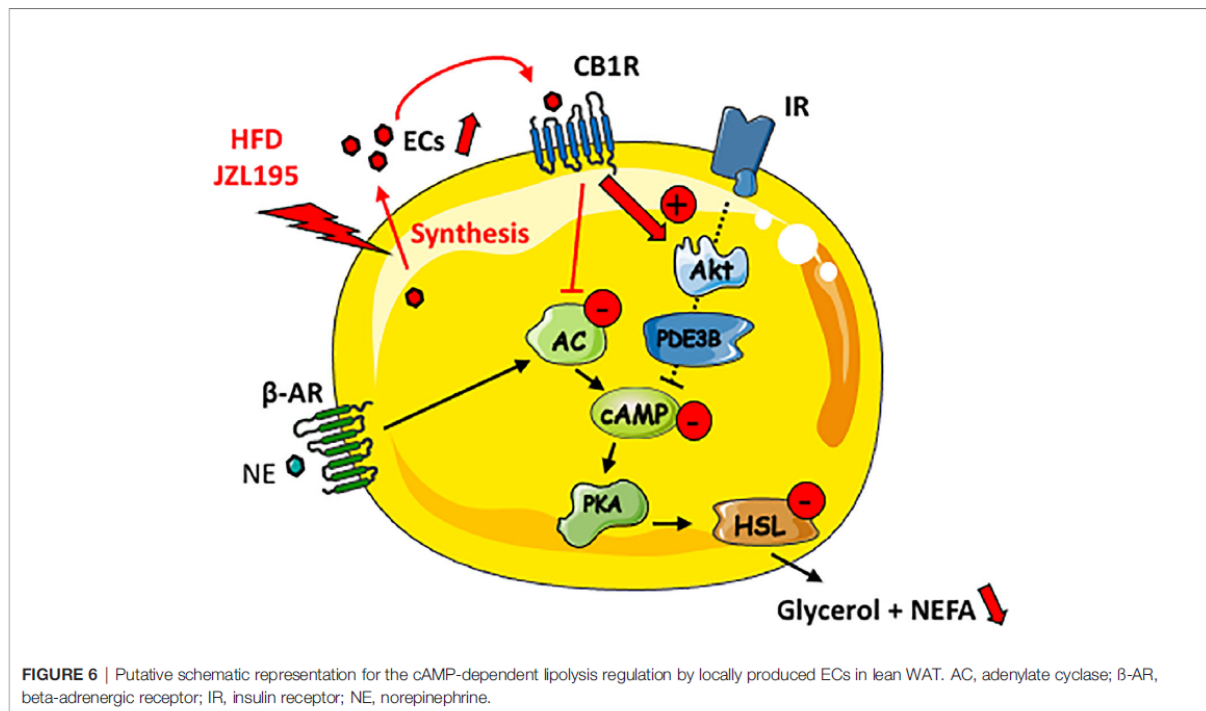
In addition to promote fat storage, a decrease in lipolysis is also predicted to decrease ectopic TG deposit and protect from the development of metabolic diseases (41). However, as the capacity of WAT to expand is limited, excessive lipid accumulation progressively induces adipose tissue hypertrophy favoring adipocyte dysfunction and finally impact the whole metabolism (42, 43). Taken together, our data support the concept that activation of ECS in WAT may progressively contribute to fat remodeling and tissue dysfunction limiting fat mobilization.

Dysfunctional WAT in obesity is characterized by an increase in basal lipolysis and an impairment of fat mobilization (44, 45).

More specifically, the stimulating effect of catecholamines on lipolysis is reduced in SAT but increased in VAT (25). Besides, ECS tone has been positively correlated to fat mass and associated with metabolic risk both in human and mice (12, 46). Different studies have shown that WAT ECS is dysregulated by HFD feeding and associated with alterations of ECs tissue and plasma concentration (47, 48). However, data specifically dealing with the production rate of ECs by hypertrophied WAT are lacking. Our results provide direct evidence that epididymal WAT (referred to as VAT) from insulin-resistant mice secretes more AEA than lean mice. Since we observed a concomitant reduction in plasma glycerol production in HFD mice, we hypothesized that over-produced ECs may inhibit lipolysis activating local CB1R. Because the CB1R inverse-agonist Rimonabant is known to increase cAMP (49), it was expected to normalize or stimulate fat mobilization in HFD WAT. In direct line with this, two well-illustrated and elegant recent studies demonstrated the stimulating effect of CB1R blockade on lipolysis in adipocytes from lean rats (50) and in 3T3 cells (51). In the present work, while the action of Rimonabant also existed in lean WAT explants, no effect of the drug was observed on lipolysis in WAT explants from HFD mice. These findings are in accordance with another study in which the authors failed to show a direct action of Rimonabant on lipolysis at the tissue level in obese rats (52).

It is unclear why acute CB1R blockade neither modified cAMP levels nor Akt activity in obese adipose tissue. However, one explanation could be that the crosstalk existing between CB1R and Akt-pathway is ineffective in hypertrophied WAT in which the whole insulin-signaling pathway is altered (53). It could also be speculated that an alteration of some G-protein receptor-coupled mechanisms occurs in pathological adipocytes leading to an impairment of CB1R-mediated transduction signals. Indeed, in obese WAT, long-term exposure of CB1R to ECs may induce cellular adaptations such as CB1R desensitization as already described in brain (54).

Many studies have reported that CB1R blockade with Rimonabant or other peripheral-restricted antagonists increased energy expenditure and decreased fat mass (55). However, these conclusions mostly resulted from chronic pharmacological treatments that may induce long-term adaptations in different organs and thus indirectly improve WAT metabolism including fat mobilization. The major role of WAT CB1R in regulating energy balance has also been illustrated in a model of transgenic mouse with selective and inducible CB1R deletion in adipocytes. Indeed, the triggering of CB1R deletion in mice with established obesity induced body weight reduction and metabolism improvement (7). In their study, the authors placed CB1R at the center a crosstalk between adipocytes, immune cells and the sympathetic nervous system affecting WAT inflammation and adipocyte reprogramming. Thus, even if we did not show any effect of acute CB1R antagonism, one could speculate that peripheral CB1R blockers exert their beneficial effects over the long-term stimulating adipocyte browning as already observed in cell cultures (56) and counteracting the action of overproduced ECs on tissue inflammatory status targeting macrophages which



represent a substantial proportion in the WAT of obese subjects (57). Further studies should be conducted to investigate the effects of ECs produced by expanding WAT on adipocyte reprogramming and on the secretion of pro-inflammatory cytokines from both adipocytes and non-adipocyte fraction.

In conclusion, our study suggests that ECs secreted by WAT adipose exert an autocrine action on CB1R leading to the stimulation of PI3K/Akt signaling pathway which in turn limits fat mobilization (Figure 6). Thus, reducing WAT ECs production using pharmacological or nutritional strategies could help to prevent metabolic dysregulations link to fat mass expansion. The present findings also indicate that acute CB1R blockade is inefficient in regulating lipolysis in obese WAT, suggesting that the well-known beneficial effects of peripheral CB1R antagonists on WAT remodeling depend on other indirect and long-term mechanisms.

## AUTHOR'S NOTE

Parts of this work have been presented at the 29<sup>th</sup> International Cannabinoid Research Society symposium (ICRS), July 2019, Bethesda, MD.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by French Committee for the Protection of Persons (CPP) (<https://www.clinicaltrials.gov>). Unique identifier: NCT03202706). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by Local ethics committee (CE2A, Dijon, France) for animal experimentation (APAFIS n°13948).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB, TM, LD, PP-D and PD designed, performed and analyzed the experiments. CB, TM, LD, JL, and PD wrote the manuscript. J-PP determined tissue endocannabinoid contents. POD organized human sample collection. TJ and BV supervised the experiments and critically revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by INSERM, University of Burgundy and Franche-Comté and by a French government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program Investissements d'Avenir with the reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank H el ene Choubley from the Lipidomic platform of INSERM UMR1231 for excellent technical assistance in the LCMS analysis of endocannabinoids.

## REFERENCES

- Piazza PV, Cota D, Marsicano G. The CB1 Receptor as the Cornerstone of Exostasis. *Neuron* (2017) 93(6):1252–74. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.002
- Bluher M, Engeli S, Kloting N, Berndt J, Fasshauer M, Batkai S, et al. Dysregulation of the Peripheral and Adipose Tissue Endocannabinoid System in Human Abdominal Obesity. *Diabetes* (2006) 55(11):3053–60. doi: 10.2337/db06-0812
- Gonthier MP, Hoareau L, Festy F, Matias I, Valenti M, Bes-Houtmann S, et al. Identification of Endocannabinoids and Related Compounds in Human Fat Cells. *Obes (Silver Spring Md)* (2007) 15(4):837–45. doi: 10.1038/oby.2007.581
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, Function, and Dysregulation of Endocannabinoids in Models of Adipose and Beta-Pancreatic Cells and in Obesity and Hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91(8):3171–80. doi: 10.1210/jc.2005-2679
- Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, et al. Presence of the Cannabinoid Receptors, CB1 and CB2, in Human Omental and Subcutaneous Adipocytes. *Histochem Cell Biol* (2006) 126(2):177–87. doi: 10.1007/s00418-005-0127-4
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, et al. The Endogenous Cannabinoid System Affects Energy Balance via Central Orexinergic Drive and Peripheral Lipogenesis. *J Clin Invest* (2003) 112(3):423–31. doi: 10.1172/jci17725
- Ruiz de Azua I, Mancini G, Srivastava RK, Rey AA, Cardinal P, Tedesco L, et al. Adipocyte Cannabinoid Receptor CB1 Regulates Energy Homeostasis and Alternatively Activated Macrophages. *J Clin Invest* (2017) 127(11):4148–62. doi: 10.1172/jci83626
- Langin D. Adipose Tissue Lipolysis Revisited (Again): Lactate Involvement in Insulin Antilipolytic Action. *Cell Metab* (2010) 11(4):242–3. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.003
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu Rev Nutr* (2007) 27:79–101. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734
- Langin D. Control of Fatty Acid and Glycerol Release in Adipose Tissue Lipolysis. *C R Biol* (2006) 329(8):598–607. doi: 10.1016/j.crv.2005.10.008
- Nurjhan N, Campbell PJ, Kennedy FP, Miles JM, Gerich JE. Insulin Dose-Response Characteristics for Suppression of Glycerol Release and Conversion to Glucose in Humans. *Diabetes* (1986) 35(12):1326–31. doi: 10.2337/diab.35.12.1326
- Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Batkai S, et al. Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes* (2005) 54(10):2838–43. doi: 10.2337/diabetes.54.10.2838
- Kuipers EN, Kantae V, Maarse BCE, van den Berg SM, van Eenige R, Nahon KJ, et al. High Fat Diet Increases Circulating Endocannabinoids Accompanied by Increased Synthesis Enzymes in Adipose Tissue. *Front Physiol* (2018) 9:1913. doi: 10.3389/fphys.2018.01913
- Hillard CJ. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where Are They Going? *Neuropsychopharmacol: Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* (2018) 43(1):155–72. doi: 10.1038/npp.2017.130
- Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide Induced PPARgamma Transcriptional Activation and 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation. *Eur J Pharmacol* (2005) 517(3):174–81. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.05.032
- Pagano C, Pilon C, Calcano A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, et al. The Endogenous Cannabinoid System Stimulates Glucose Uptake in Human Fat Cells via Phosphatidylinositol 3-Kinase and Calcium-Dependent Mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* (2007) 92(12):4810–9. doi: 10.1210/jc.2007-0768

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.716431/full#supplementary-material>

- Vettor R, Pagano C. The Role of the Endocannabinoid System in Lipogenesis and Fatty Acid Metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2009) 23(1):51–63. doi: 10.1016/j.beem.2008.10.002
- Matias I, Belluomo I, Cota D. The Fat Side of the Endocannabinoid System: Role of Endocannabinoids in the Adipocyte. *Cannabis Cannabinoid Res* (2016) 1:1:176–85. doi: 10.1089/can.2016.0014
- Myers MN, Zachut M, Tam J, Contreras GA. A Proposed Modulatory Role of the Endocannabinoid System on Adipose Tissue Metabolism and Appetite in Periparturient Dairy Cows. *J Anim Sci Biotechnol* (2021) 12(1):21. doi: 10.1186/s40104-021-00549-3
- Hsiao WC, Shia KS, Wang YT, Yeh YN, Chang CP, Lin Y, et al. A Novel Peripheral Cannabinoid Receptor 1 Antagonist, BPR0912, Reduces Weight Independently of Food Intake and Modulates Thermogenesis. *Diabetes Obes Metab* (2015) 17(5):495–504. doi: 10.1111/dom.12447
- Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Peleraux A, et al. The CB1 Receptor Antagonist Rimonabant Reverses the Diet-Induced Obesity Phenotype Through the Regulation of Lipolysis and Energy Balance. *FASEB J: Off Publ Fed Am Societies Exp Biol* (2005) 19(11):1567–9. doi: 10.1096/fj.04-3177fje
- Muller T, Demizieux L, Troy-Fioramonti S, Gresti J, Pais de Barros JP, Berger H, et al. Overactivation of the Endocannabinoid System Alters the Antilipolytic Action of Insulin in Mouse Adipose Tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2017) 313(1):E26–36. doi: 10.1152/ajpendo.00374.2016
- Sidibeh CO, Pereira MJ, Lau Borjesson J, Kamble PG, Skrtic S, Katsogiannos P, et al. Role of Cannabinoid Receptor 1 in Human Adipose Tissue for Lipolysis Regulation and Insulin Resistance. *Endocrine* (2017) 55(3):839–52. doi: 10.1007/s12020-016-1172-6
- Teixeira D, Pestana D, Faria A, Calhau C, Azevedo I, Monteiro R. Modulation of Adipocyte Biology by  $\delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol. *Obes (Silver Spring)* (2010) 18(11):2077–85. doi: 10.1038/oby.2010.100
- Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryd en M, et al. Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. *Diabetes* (2005) 54(11):3190–7. doi: 10.2337/diabetes.54.11.3190
- Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, et al. Decreased Expression and Function of Adipocyte Hormone-Sensitive Lipase in Subcutaneous Fat Cells of Obese Subjects. *J Lipid Res* (1999) 40(11):2059–66.
- Wang L, Liu J, Harvey-White J, Zimmer A, Kunos G. Endocannabinoid Signaling via Cannabinoid Receptor 1 is Involved in Ethanol Preference and Its Age-Dependent Decline in Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(3):1393–8. doi: 10.1073/pnas.0336351100
- Grauwiler SB, Scholer A, Drewe J. Development of a LC/MS/MS Method for the Analysis of Cannabinoids in Human EDTA-Plasma and Urine After Small Doses of Cannabis Sativa Extracts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2007) 850(1-2):515–22. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.12.045
- Cusi K. The Role of Adipose Tissue and Lipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rep* (2010) 10(4):306–15. doi: 10.1007/s11892-010-0122-6
- McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, et al. Downregulation of Adipose Tissue Fatty Acid Trafficking in Obesity: A Driver for Ectopic Fat Deposition? *Diabetes* (2011) 60(1):47–55. doi: 10.2337/db10-0867
- Rouss LR, Jensen MD. Postprandial Free Fatty Acid Kinetics Are Abnormal in Upper Body Obesity. *Diabetes* (1993) 42(11):1567–73. doi: 10.2337/diab.42.11.1567
- Gjedsted J, Gormsen LC, Nielsen S, Schmitz O, Djurhuus CB, Keiding S, et al. Effects of a 3-Day Fast on Regional Lipid and Glucose Metabolism in Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue. *Acta Physiol (Oxf)* (2007) 191(3):205–16. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01740.x

33. Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. Inhibition of Exocytotic Noradrenaline Release by Presynaptic Cannabinoid CB1 Receptors on Peripheral Sympathetic Nerves. *Br J Pharmacol* (1996) 118(8):2023–8. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15639.x
34. van Eenige R, van der Stelt M, Rensen PCN, Kooijman S. Regulation of Adipose Tissue Metabolism by the Endocannabinoid System. *Trends Endocrinol Metab* (2018) 29(5):326–37. doi: 10.1016/j.tem.2018.03.001
35. Howlett AC, Fleming RM. Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase. Pharmacology of the Response in Neuroblastoma Cell Membranes. *Mol Pharmacol* (1984) 26(3):532–8.
36. Eckardt K, Sell H, Taube A, Koenen M, Platzbecker B, Cramer A, et al. Cannabinoid Type 1 Receptors in Human Skeletal Muscle Cells Participate in the Negative Crosstalk Between Fat and Muscle. *Diabetologia* (2009) 52(4):664–74. doi: 10.1007/s00125-008-1240-4
37. Kim W, Lao Q, Shin YK, Carlson OD, Lee EK, Gorospe M, et al. Cannabinoids Induce Pancreatic Beta-Cell Death by Directly Inhibiting Insulin Receptor Activation. *Sci Signal* (2012) 5(216):ra23. doi: 10.1126/scisignal.20025195/216/ra23
38. Lipina C, Stretton C, Hastings S, Hundal JS, Mackie K, Irving AJ, et al. Regulation of MAP Kinase-Directed Mitogenic and Protein Kinase B-Mediated Signaling by Cannabinoid Receptor Type 1 in Skeletal Muscle Cells. *Diabetes* (2010) 59(2):375–85. doi: 10.2337/db09-0979
39. Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J, et al. Hepatic Cannabinoid Receptor-1 Mediates Diet-Induced Insulin Resistance via Inhibition of Insulin Signaling and Clearance in Mice. *Gastroenterology* (2012) 142(5):1218–28.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.032
40. Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. The CB1 Cannabinoid Receptor is Coupled to the Activation of Protein Kinase B/Akt. *Biochem J* (2000) 347(Pt 2):369–73. doi: 10.1042/0264-6021:3470369
41. Grouse A, Tavernier G, Valle C, Moro C, Mejhert N, Dinel AL, 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. doi: 10.1371/journal.pbio.1001485
42. Choe SS, Huh JY, Hwang JJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2016) 7:30. doi: 10.3389/fendo.2016.00030
43. Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, et al. Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation. *Mol Cell Biol* (2015) 35(10):1686–99. doi: 10.1128/mcb.01321-14
44. Arner P, Langin D. Lipolysis in Lipid Turnover, Cancer Cachexia, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Trends Endocrinol Metab* (2014) 25(5):255–62. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.002
45. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and Lipid Mobilization in Human Adipose Tissue. *Prog Lipid Res* (2009) 48(5):275–97. doi: 10.1016/j.plipres.2009.05.001S0163-7827(09)00020-4[pii]
46. D'Eon TM, Pierce KA, Roix JJ, Tyler A, Chen H, Teixeira SR. The Role of Adipocyte Insulin Resistance in the Pathogenesis of Obesity-Related Elevations in Endocannabinoids. *Diabetes* (2008) 57(5):1262–8. doi: 10.2337/db07-1186
47. Rossmesl M, Pavlisova J, Janovska P, Kuda O, Bardova K, Hansikova J, et al. Differential Modulation of White Adipose Tissue Endocannabinoid Levels by N-3 Fatty Acids in Obese Mice and Type 2 Diabetic Patients. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* (2018) 1863(7):712–25. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.03.011
48. Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, et al. Endocannabinoid Dysregulation in the Pancreas and Adipose Tissue of Mice Fed With a High-Fat Diet. *Obes (Silver Spring)* (2008) 16(3):553–65. doi: 10.1038/oby.2007.106
49. Pertwee RG. Inverse Agonism and Neutral Antagonism at Cannabinoid CB1 Receptors. *Life Sci* (2005) 76(12):1307–24. doi: 10.1016/j.lfs.2004.10.025
50. Müller GA, Herling AW, Wied S, Müller TD. CB1 Receptor-Dependent and Independent Induction of Lipolysis in Primary Rat Adipocytes by the Inverse Agonist Rimonabant (SR141716A). *Molecules* (2020) 25(4):896. doi: 10.3390/molecules25040896
51. Paszkiewicz RL, Bergman RN, Santos RS, Frank AP, Woolcott OO, Iyer MS, et al. A Peripheral CB1R Antagonist Increases Lipolysis, Oxygen Consumption Rate, and Markers of Being in 3T3-L1 Adipocytes Similar to RIM, Suggesting That Central Effects Can Be Avoided. *Int J Mol Sci* (2020) 21(18):6639. doi: 10.3390/ijms21186639
52. Mølhøj S, Hansen HS, Schweiger M, Zimmermann R, Johansen T, Malmlof K. Effect of the Cannabinoid Receptor-1 Antagonist Rimonabant on Lipolysis in Rats. *Eur J Pharmacol* (2010) 646(1–3):38–45. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.08.006
53. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT Pathway in Obesity and Type 2 Diabetes. *Int J Biol Sci* (2018) 14(11):1483–96. doi: 10.7150/ijbs.27173
54. Wu DF, Yang LQ, Goschke A, Stumm R, Brandenburg LO, Liang YJ, et al. Role of Receptor Internalization in the Agonist-Induced Desensitization of Cannabinoid Type 1 Receptors. *J Neurochem* (2008) 104(4):1132–43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05063.x
55. Quarta C, Cota D. Anti-Obesity Therapy With Peripheral CB1 Blockers: From Promise to Safe(?) Practice. *Int J Obes (Lond)* (2020) 44(11):2179–93. doi: 10.1038/s41366-020-0577-8
56. Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Buning J, Drenckhan M, Zarse K, et al. Cannabinoid Type 1 Receptor Blockade Induces Transdifferentiation Towards a Brown Fat Phenotype in White Adipocytes. *Diabetes Obes Metab* (2010) 12(2):158–66. doi: 10.1111/j.1463-1326.2009.01133.x
57. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity Is Associated With Macrophage Accumulation in Adipose Tissue. *J Clin Invest* (2003) 112(12):1796–808. doi: 10.1172/jci19246

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Buch, Muller, Leemput, Passilly-Degrace, Ortega-Deballon, Pais de Barros, Vergès, Jourdan, Demizieux and Degrace. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## B. Conclusion

Les résultats de cette étude nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'une action autocrine des ECs produits par le TA sur les CB1R adipocytaires qui conduirait à limiter la mobilisation des graisses par la stimulation de la voie de signalisation PI3K/Akt. De la même manière, il est envisageable que les ECs produits par les adipocytes soient à l'origine d'effets endocrines, sur les organes extra-adipeux. Il pourrait donc exister un lien entre la production des ECs par le TA, les taux d'ECs circulants et les effets néfastes de l'hyperactivation du SEC sur les organes extra-adipeux observés au cours de l'obésité.

L'étude des capacités sécrétoires du TA et notamment la production d'ECs apparaît donc primordiale dans la compréhension du rôle du TA dans le développement de l'obésité et les désordres métaboliques associés.



## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

Le TA produisant une part importante des ECs circulants (Kuipers et al., 2019), il nous est apparu primordial d'étudier la capacité de ce tissu à sécréter ces composés qui, comme évoqué précédemment, sont susceptibles d'exercer des effets endocrines et exocrines.

Pour cela, nous avons développé un protocole original basé sur le dosage d'ECs dans le milieu de culture après incubation d'explants de TA. Le milieu est collecté à différents temps, afin de réaliser des cinétiques de production d'ECs par ces explants de TA. Du fait de leur rôle distinct dans la physiopathologie de l'obésité, les expériences ont porté à la fois sur le TAV et le TASC. L'étude de la production des ECs par les TA est aussi applicable pour l'analyse de l'impact de l'obésité en comparant du TA sain et du TA pathologique. L'originalité de cette approche réside dans le fait que, au-delà de réaliser nos études chez la souris, nous avons pu effectuer le même type de mesure chez l'Homme grâce à des biopsies de patients humains, dans le cadre d'un protocole établi avec le CHU de Dijon. Enfin, cette approche permet également d'étudier les conséquences du blocage des CB1R sur les capacités sécrétoires du TA provenant de sujets obèses.

### *Méthodologie*

Les explants de TA issus de souris minces et obèses, ici des mâles C57BL/6J soumis pendant 16 semaines soit à un régime hyperlipidique, soit au régime contrôle correspondant, ont été incubés pendant 4 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu de culture complet (OptiMEM, 1% BSA, 1% P/S).

La production des ECs dans le milieu de culture est mesurée toutes les heures pendant 4h en présence ou non de JZL-195, un inhibiteur des enzymes de dégradation des ECs (FAAH et MAGL) combiné ou non à des antagonistes des CB1R (Rimonabant et JD-5037). Les ECs présents dans le milieu sont tout d'abord extraits sur colonne SPE-C18 puis dosés par chromatographie en phase liquide couplée à une analyse par spectrométrie de masse (Matériel et Méthodes, **Partie III.A**).

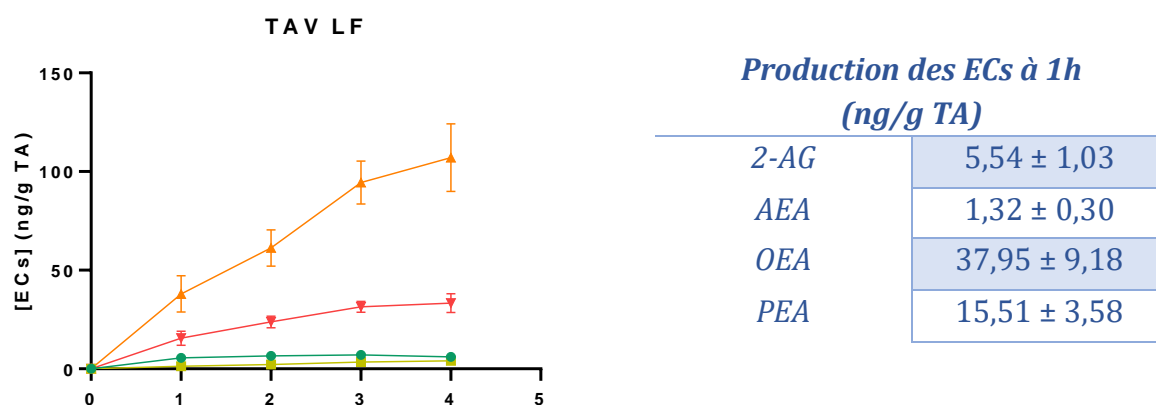
## A. Production des ECs par le TA de souris minces

Tout d'abord, cette approche a été utilisée pour mesurer les niveaux de production des différents ECs par le TAV et le TASC de souris minces afin de valider la méthode et de produire des valeurs contrôles qui pourront servir de référence lors des expériences menées sur les tissus provenant d'animaux obèses.

### 1. Production des ECs par le TAV de souris minces

La première étape a consisté à déterminer la cinétique de production des principaux ECs et NAEs à partir d'explants de TAV de souris minces sans tenir compte des éventuelles réactions de dégradation enzymatiques, c'est-à-dire en absence de JZL-195.

La **Figure 37** montre que la quantité de ces composés retrouvée dans le milieu de culture augmente au cours du temps démontrant leur accumulation. Les quantités de composés produits varient de la façon suivante : OEA > PEA > 2-AG > AEA. Ces proportions sont cohérentes avec celles des dosages plasmatiques et tissulaires retrouvées dans la littérature (Argueta & DiPatrizio, 2017; Di Marzo et al., 2009; Izzo et al., 2009; Krott et al., 2016; Little et al., 2018; Matias, Petrosino, et al., 2008). Ainsi dans ces études, les quantités d'OEA et de PEA sont toujours bien plus importantes que celles d'AEA et de 2-AG.



**Figure 37. Production des différents endocannabinoïdes (ECs) sur 4h et quantité produite à 1h par le TAV et le TASC de souris minces.**

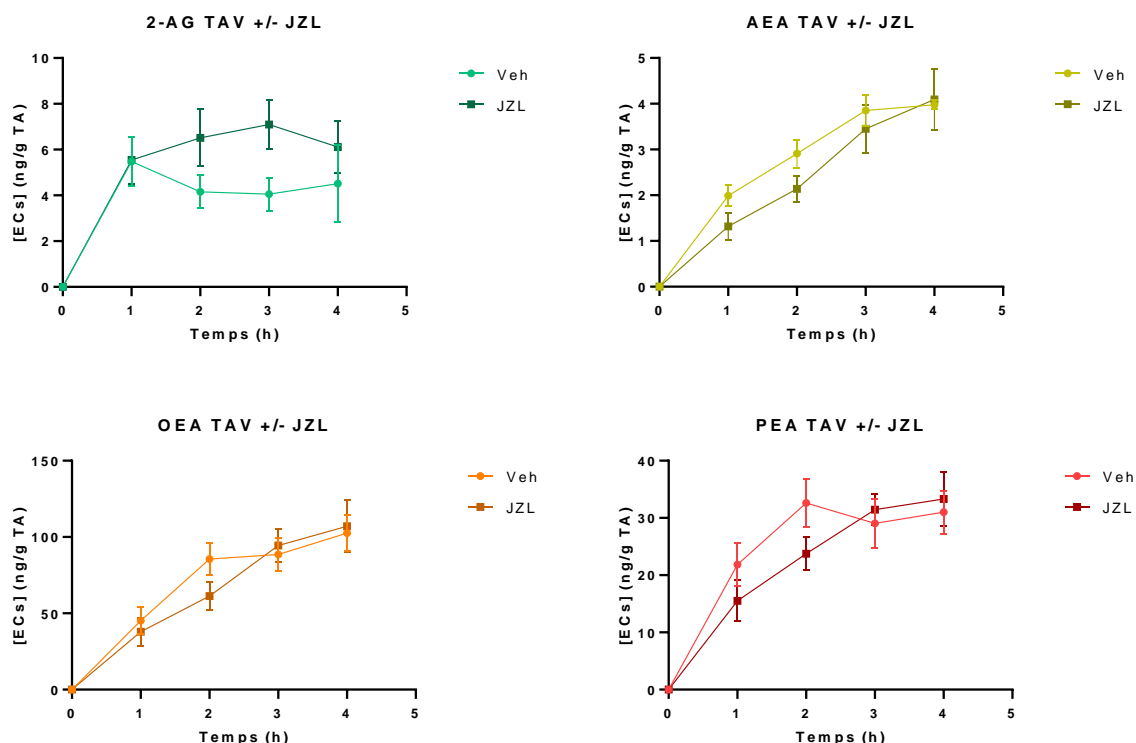
Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, LF : Low Fat.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

On note également que le ratio 2-AG/AEA est souvent compris entre 10 et 100 dans ces travaux concernant le plasma ou les tissus, alors qu'il n'est que d'environ 4 dans le milieu de culture d'explants au temps 1h, ce point sera discuté par la suite.

### 2. Production des ECs par le TAV de souris minces en présence d'inhibiteur des enzymes de dégradation (JZL-195)

Les ECs mesurés dans le milieu de culture résultent de l'activité de synthèse des explants mais, du fait de leur caractère très labile, il est envisageable que la concentration de ces composés soit affectée par des réactions de dégradation. Afin de s'affranchir de ces réactions et ne déterminer que l'activité de synthèse de ces composés, les explants de TAV et de TASC de souris minces ont été incubés en présence d'un inhibiteur des enzymes de dégradation FAAH et MAGL : le JZL-195 à 10 $\mu$ M (**Figure 38**).



**Figure 38. Production des ECs sur 4h produits par du TAV de souris minces en présence et en absence de JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques sont non significatives. TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, LF : Low Fat.

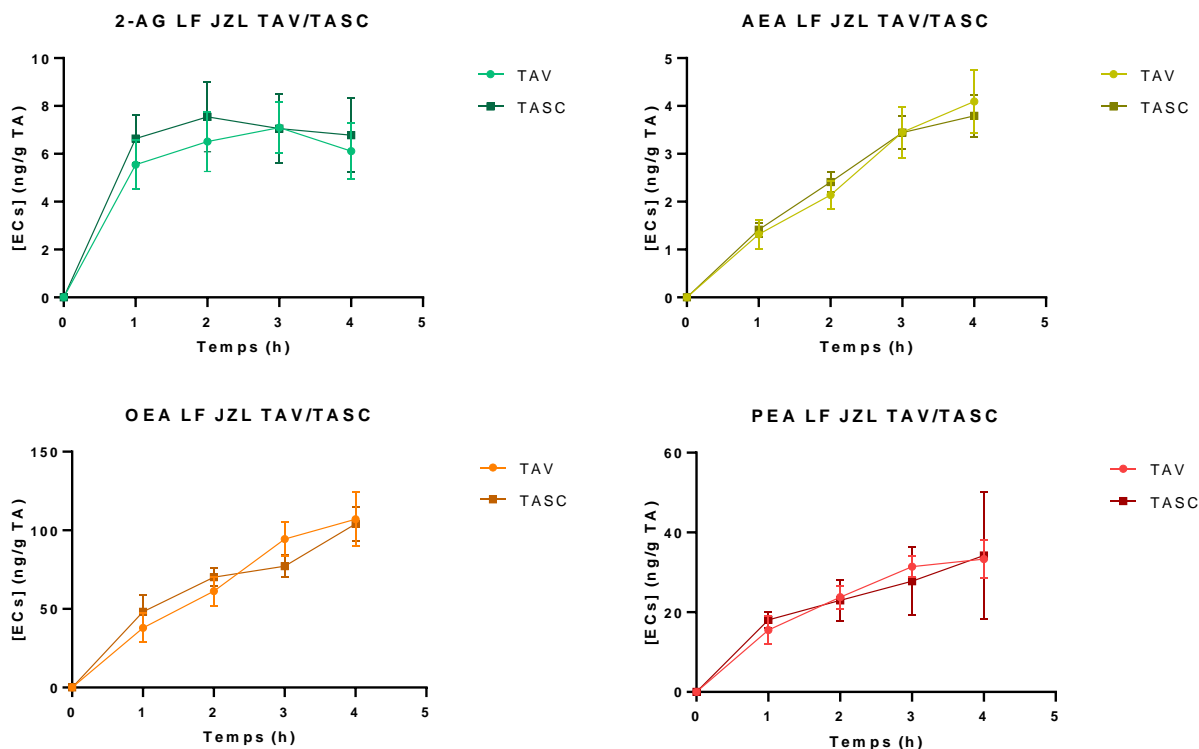
## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

Les résultats indiquent que l'inhibition des enzymes de dégradation FAAH et MAGL n'induit pas de modification significative des cinétiques d'apparition des ECs et NAEs, avec toutefois une tendance à l'augmentation pour le 2-AG (**Figure 38**). Ceci suggère une faible activité de dégradation des ECs dans le milieu de culture du TAV de la souris mince. Néanmoins, la suite des études sur les souris minces et obèses a été effectuée en présence de JZL-195 afin d'étudier uniquement l'aspect production des ECs.

### 3. Production des ECs par le TA chez la souris mince, comparaison entre le TAV et le TASC

Chez la souris mince en présence de JZL-195, aucune différence de production des ECs et des NAEs entre le TAV et le TASC n'est observable (**Figure 39**). Pourtant dans la littérature, une différence de concentration tissulaire en ECs entre le TAV et le TASC est rapportée avec notamment environ 2,5 fois plus d'AEA et 2,2 fois plus de 2-AG dans le TASC que dans le TAV (Starowicz et al., 2008). Il est peu probable que cette divergence soit due à des différences d'activité de dégradation des ECs du fait de la présence de JZL-195. Des hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence dont la possibilité d'une recapture des composés produits par les explants qui serait plus importante dans le TASC ou encore des capacités de sécrétion plus efficaces par le TAV que par le TASC.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse



**Figure 39. Production des ECs sur 4h par le TAV et le TASC de souris minces en présence de JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques sont non significatives. TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané, LF : Low Fat.

**Il est connu que la production des ECs chez les individus obèses, et notamment les souris, est modifiée. C'est pourquoi, il nous est apparu opportun de répéter le même type d'investigation chez la souris obèse.**

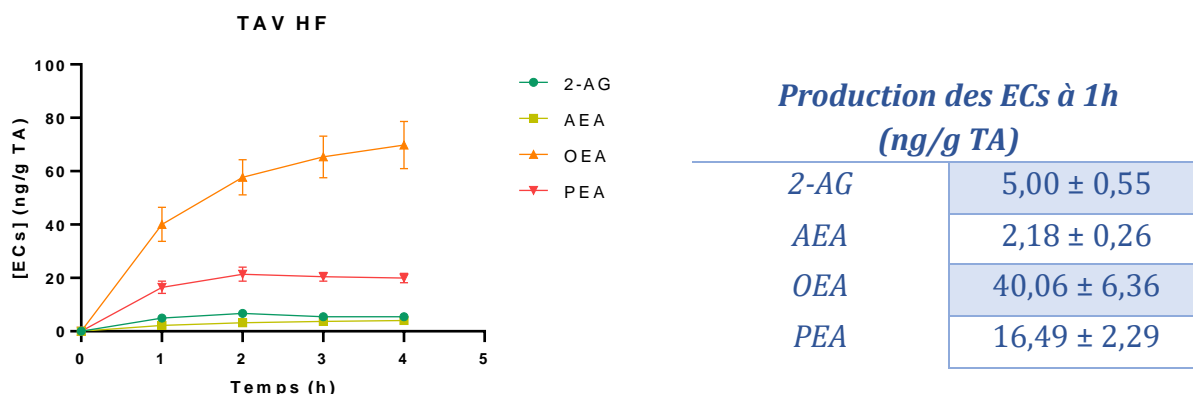
## B. Production des ECs par le TA de souris obèses

### 1. Cinétique de production des ECs par le TAV de souris obèses

De la même manière que pour la souris mince, nous avons tout d'abord cherché à déterminer la cinétique de production des principaux ECs et NAEs, mais cette fois à partir d'explants de TAV prélevés sur des souris obèses.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

Comme observé chez les souris minces et dans la littérature (concentrations tissulaires et plasmatiques), les composés les plus produits sont, dans l'ordre décroissant, l'OEA, puis le PEA, puis le 2-AG et pour finir l'AEA (**Figure 40**).



**Figure 40. Production des différents ECs sur 4h et quantité produite à 1h par le TAV de souris obèses.**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, HF : High Fat.

Comme nous l'avons observé chez la souris mince, le ratio 2-AG/AEA dans le cas des souris obèses au temps 1h est d'environ 2, ce qui est inférieur à ce qui est retrouvé dans la littérature (entre 10 et 100) (Argueta & DiPatrizio, 2017; Di Marzo et al., 2009; Izzo et al., 2009; Krott et al., 2016; Little et al., 2018; Matias, Petrosino, et al., 2008).

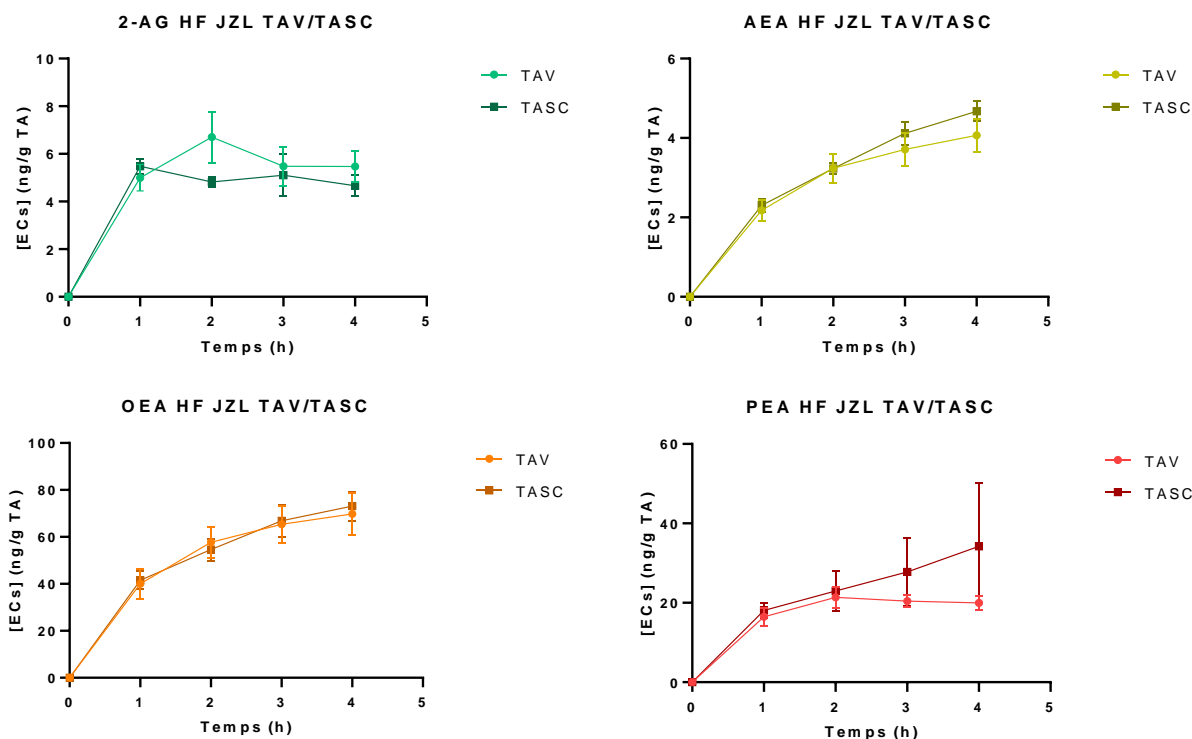
### 2. Production des ECs par le TA chez la souris obèse, comparaison entre le TAV et le TASC

Comme précédemment, l'activité de synthèse des principaux ECs et NAEs a été évaluée à partir d'explants de TAV et de TASC de souris obèses incubés 4h en présence de JZL-195 à 10µM.

Comme pour la souris mince, les données ne mettent en évidence aucune différence de production des ECs et NAEs chez la souris obèse entre le TAV et le TASC (**Figure 41**). Ces résultats sont globalement cohérents avec la littérature qui décrit des concentrations tissulaires en ECs relativement similaires entre le TAV et le TASC chez la souris obèse. Pour reprendre l'exemple tiré des travaux de Starowicz et collaborateurs, les concentrations d'AEA mesurées sont de 24,3pmol/g dans le TAV pour 13,7pmol/g dans

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

le TASC après 14 semaines de régime hyperlipidique avec des souris présentant une masse corporelle supérieure à 40g et une glycémie à jeun supérieure à 160mg/dL (Starowicz et al., 2008). Concernant le 2-AG, les valeurs présentées dans la littérature sont conflictuelles, ce qui rend difficile une comparaison avec les résultats que nous avons obtenus (Krott et al., 2016; Little et al., 2018).



**Figure 41. Production des ECs sur 4h par le TAV et le TASC de souris obèses en présence de JZL-195.**

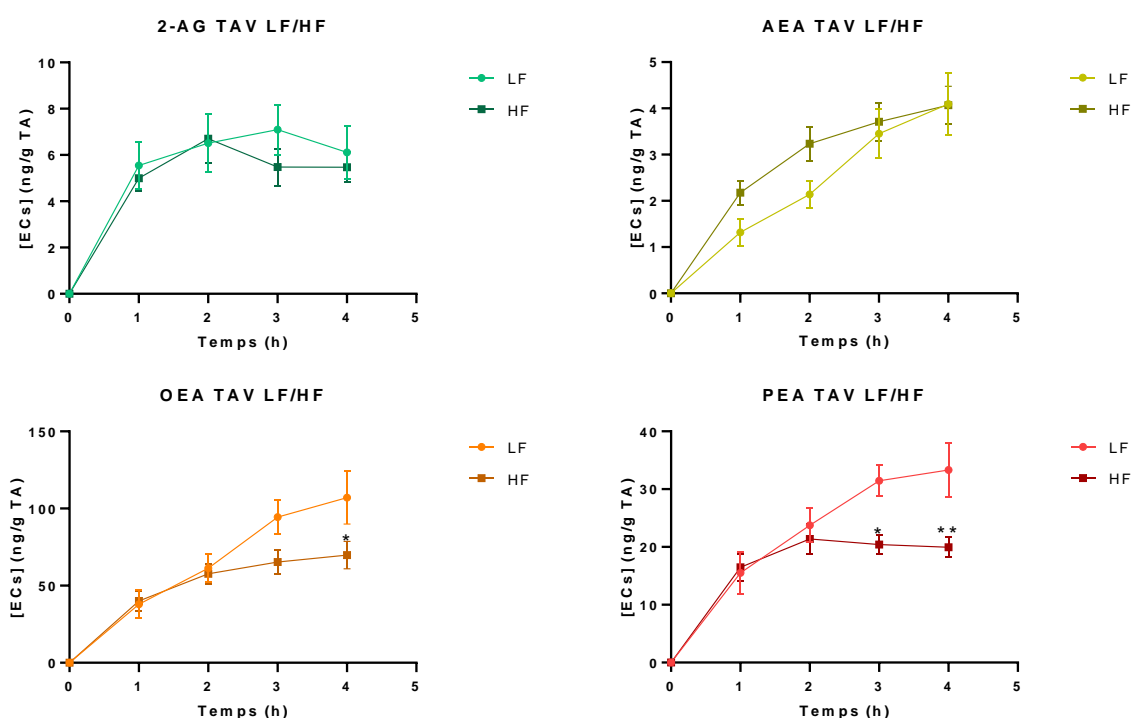
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques sont non significatives. TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané, HF : High Fat.

**Les TAV et TASC ont des caractéristiques physiologiques et métaboliques qui leur sont propres et ils contribuent différemment à l'apparition des dérégulations liées à l'obésité. Ainsi, il est reconnu que l'obésité androïde, caractérisée par une quantité importante de TAV, est plus délétère pour l'organisme que l'obésité gynoïde, qui se caractérise par une accumulation de TASC. C'est pourquoi nous allons porter un intérêt particulier à l'impact de l'obésité sur le métabolisme des ECs dans ces deux tissus.**

## C. Effets de l'obésité sur la production d'ECs par le TAV et le TASC

### 1. Effets de l'obésité sur la production des ECs par le TAV

Afin d'observer les effets de l'obésité, nous avons repris et compilé les données obtenues dans les TAV de souris minces et obèses (**Figures 39 et 41**). Ainsi, dans le cas du TAV, les souris obèses produisent moins d'OEA et de PEA que les souris minces. Cette différence est notamment observable après 3 et 4h d'incubation (**Figure 42**). En parallèle, bien que non significative, il semble y avoir une tendance à l'augmentation de la production d'AEA après un régime hyperlipidique dans les 2 premières heures.



**Figure 42. Production des ECs sur 4h par le TAV de souris minces et obèses en présence de JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe mince (Low Fat - LF, High Fat - HF) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ . TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral.

La tendance à l'augmentation de la production de l'AEA chez la souris obèse est en accord avec les données de la littérature qui indiquent une augmentation assez importante de l'AEA circulante au cours de l'obésité. En ce qui concerne le 2-AG, les données sont controversées (Argueta & DiPatrizio, 2017; Di Marzo et al., 2009; Izzo et al., 2009; Little et al., 2018; Matias, Petrosino, et al., 2008). Il a également été montré que l'obésité



## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

induisait une augmentation de l'expression des enzymes de synthèse des ECs NAPE-PLD et DAGL associée à une baisse de l'expression de l'enzyme de dégradation FAAH (Kuipers et al., 2019; Starowicz et al., 2008). Cette augmentation du ratio NAPE-PLD/FAAH au cours de l'obésité suggère une accumulation plus importante des NAEs (AEA, OEA et PEA). Ces enzymes synthétisent et dégradent les NAEs ce qui augmenterait leur demi-vie. Cette demi-vie plus élevée pourrait aussi expliquer des effets délétères accrus des ECs produits par la souris obèse qui exerceraient alors des effets paracrines et/ou autocrines de manière plus prolongée.

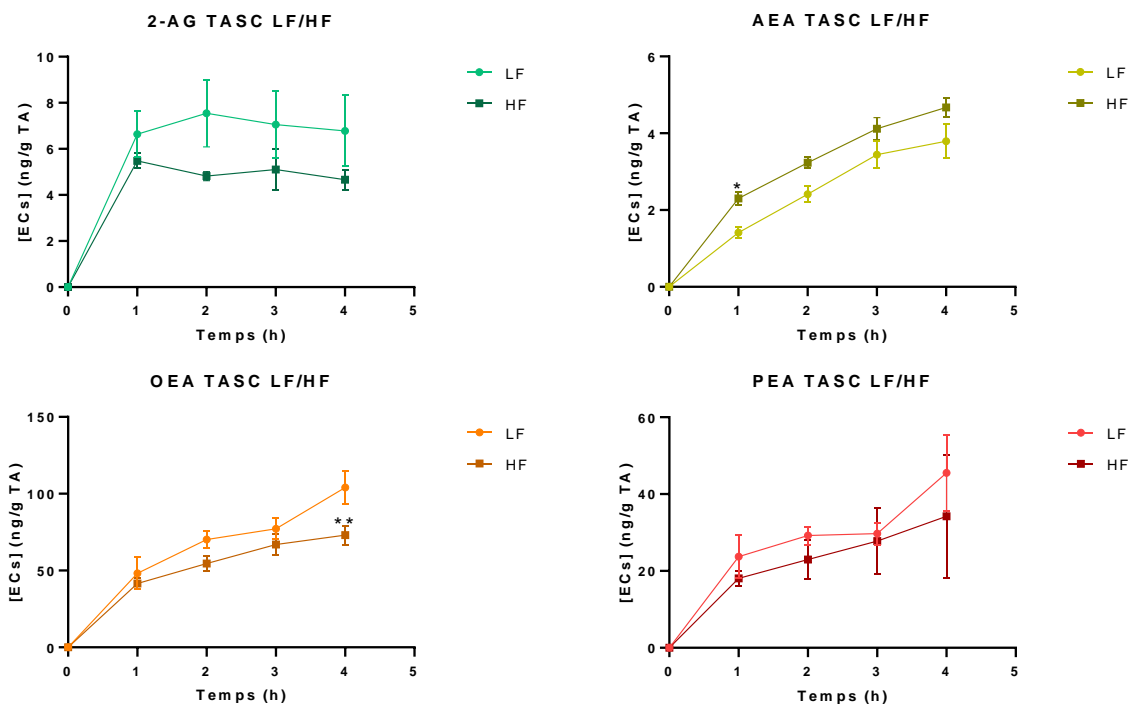
Enfin, les différences de production observées entre l'AEA, l'OEA et le PEA peuvent sembler contre-intuitives puisque ces trois composés partagent les mêmes voies de synthèse et de dégradation, ce qui suggère des variations de quantités coordonnées. Néanmoins, il a déjà été noté dans la littérature des modifications différentes des taux d'AEA, d'OEA et de PEA (Ayakannu, Taylor, Marczylo, Maccarrone, et al., 2019; Kaczocha et al., 2018; Lowin et al., 2015; A. M. Monteleone et al., 2016). Par exemple, il a été mis en évidence une corrélation positive concernant seulement l'OEA et l'AEA dans des études sur myomètre normal et fibromes. L'augmentation du rapport NAPE-PLD/FAAH, observée dans ce cas, est biaisée vers ces deux NAEs, entraînant une préférence pour la dégradation du PEA et donc des niveaux significativement diminués de PEA (Ayakannu, Taylor, Marczylo, & Konje, 2019).

### 2. Effets de l'obésité sur la production des ECs par le TASC

De la même manière, le TASC de souris obèse surproduit de l'AEA notamment à 1h (**Figure 43**). En parallèle, une diminution de la production d'OEA est observée, ce qui semble être aussi le cas pour le PEA mais de manière non significative.

Cette augmentation de la production d'AEA chez la souris obèse est cohérente avec les données plasmatiques recueillies sur différents modèles et notamment chez l'Homme qui démontrent une augmentation de la concentration plasmatique d'AEA au cours de l'obésité mais aucune modification des concentrations plasmatiques de 2-AG (Argueta & DiPatrizio, 2017; Di Marzo et al., 2009; Izzo et al., 2009; Little et al., 2018; Matias, Petrosino, et al., 2008).

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse



**Figure 43. Production des ECs sur 4h par le TASC de souris minces et obèses en présence de JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe mince (Low Fat – LF, High Fat – HF) sont symbolisées par \*\*  $p < 0,01$ . TA : Tissu Adipeux, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané.

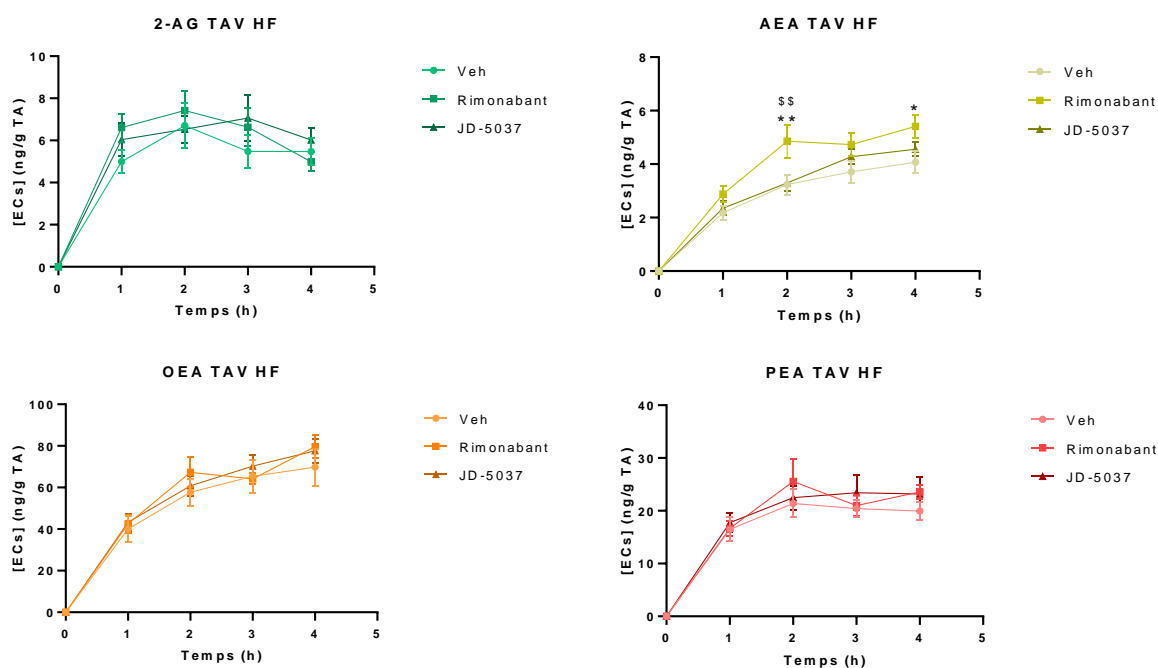
Contrairement à l'AEA, l'OEA et le PEA sont associés à des effets bénéfiques sur l'obésité. L'OEA est une molécule anorexigène tandis que le PEA possède des effets anti-inflammatoires via leur action sur PPAR $\alpha$  (Izzo et al., 2010). Leur diminution de production par le TA au cours de l'obésité associée à une surproduction de l'AEA pourrait donc être à l'origine d'effets délétères autocrines et endocrines.

**Le SEC est hyperactivé au cours de l'obésité avec notamment une augmentation des ECs circulants (Di Marzo et al., 2009). Nos observations en termes de production d'ECs par le TAV et le TASC chez la souris mince et obèse sont en accord avec ces données de la littérature. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la compréhension des mécanismes de production des ECs à pour objectif de trouver des solutions thérapeutiques pour contrer ces augmentations délétères. Parmi les solutions, il existe des outils pharmacologiques que sont les antagonistes. Les antagonistes des CB1R permettent in vivo de diminuer l'activité du SEC, il est donc intéressant d'étudier l'impact de ces antagonistes sur les capacités sécrétoires de ces tissus.**

## D. Effets du blocage des CB1R sur la production des ECs par le TAV et le TASC

### 1. Production des ECs par le TAV et le TASC de souris obèses en présence d'antagonistes des CB1R

Les effets de l'activation du SEC ont tout d'abord été testés sur des explants de TA de souris obèses, c'est-à-dire dans un contexte thérapeutique. Pour cela, des explants de TAV et TASC ont été incubés avec deux agonistes inverses des CB1R (Rimonabant à 0,1 $\mu$ M et JD-5037 à 0,1 $\mu$ M) en présence de JZL-195. La justification du choix de deux agonistes inverses est portée par le fait que, contrairement au Rimonabant, le JD-5037 est une molécule de 2<sup>ème</sup> génération dont les effets sont limités aux tissus périphériques (sa perméabilité ne lui permet pas de passer la BHE). La cinétique de production des ECs et des NAEs a été suivie sur une durée de 4h (**Figure 44**).



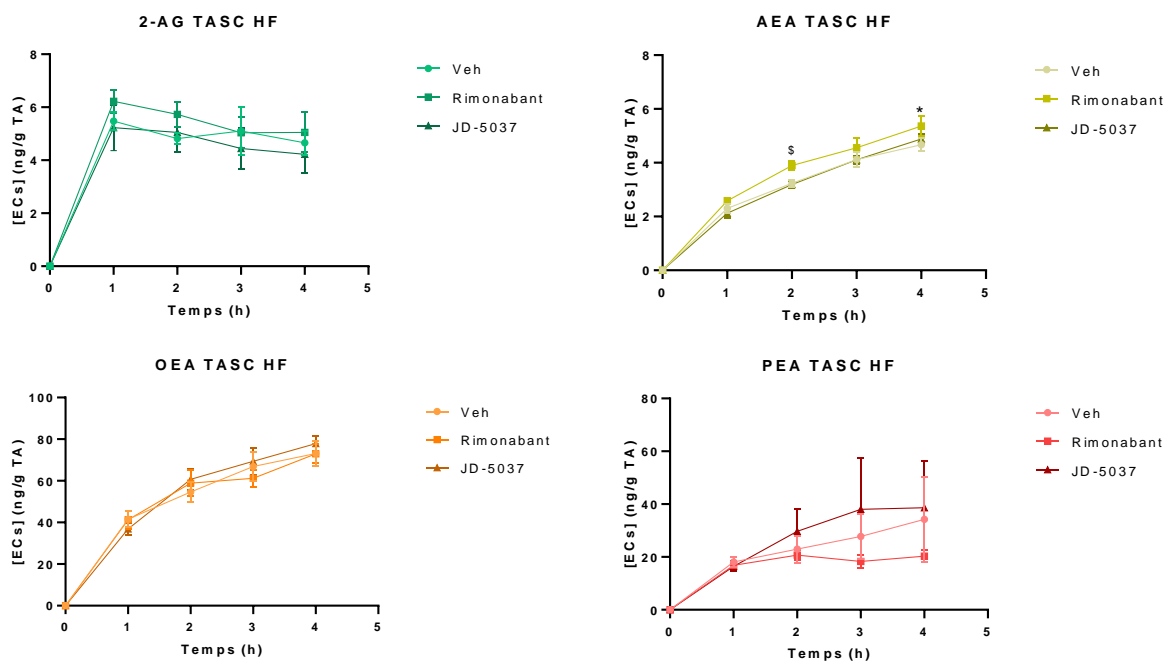
**Figure 44. Production des ECs sur 4h par le TAV de souris obèses en présence de JZL-195 et d'antagonistes des CB1R.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ . Les différences statistiques par rapport au JD-5037 sont symbolisées par \$\$  $p < 0,01$ . TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, HF : High Fat.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

Les deux antagonistes CB1R testés, le Rimonabant et le JD-5037, ne modulent pas la production du 2-AG, de l'OEA et du PEA par le TAV (**Figure 44**). La production de l'AEA est quant à elle augmentée par le Rimonabant tandis que le JD-5037 n'a pas d'effet.

Les mêmes résultats sont observés pour le TASC. En effet, aucun des deux antagonistes, Rimonabant et JD-5037, ne module la production du 2-AG, de l'OEA et du PEA tandis que seul le Rimonabant stimule la production de l'AEA (**Figure 45**).



**Figure 45. Production des ECs sur 4h par le TASC de souris obèses en présence de JZL-195 et d'antagonistes des CB1R.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ . Les différences statistiques par rapport au JD-5037 sont symbolisées par \$  $p < 0,05$ . TA : Tissu Adipeux TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané, HF : High Fat.

Ces données suggèrent que les deux molécules (Rimonabant et JD-5037) exercent des effets différents sur les voies de synthèse des ECs. Plusieurs études suggèrent que la production des ECs est régulée par la voie AMPc/PKA (Krott et al., 2016; Martínez-León et al., 2019). Le mode d'action différentiel des deux molécules pourrait donc dépendre de l'AMPc. Il a d'ailleurs été mis en évidence que les antagonistes des CB1R pouvaient, en se fixant sur le récepteur, activer de manières différentes ses voies de transduction du signal (protéines G et  $\beta$ -arrestines 1 et 2). Tandis que le Rimonabant module de manière équivalente la signalisation dépendante des protéines G et des  $\beta$ -arrestines (Z. Liu et al., 2021), le mode d'action de JD-5037 passe par le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 1 associé à

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

la voie de signalisation Akt (Tan et al., 2020). Dans ces études, ces deux antagonistes n'ont pas été comparés directement mais des découvertes récentes suggèrent que différentes conformations des RCPG modulent l'activation de la protéine G induite par l'agoniste et le recrutement de la  $\beta$ -arrestine (Z. Liu et al., 2021; Reiter et al., 2012). Ainsi, une phosphorylation spécifique à l'extrémité C terminale des RCPG, induit par les RCPG kinases, détermine le recrutement de la  $\beta$ -arrestine dans les RCPG et régule leur fonction intracellulaire (V. V. Gurevich & Gurevich, 2006). De nouveaux antagonistes des CB1R, dont fait partie MRI-1891, sont actuellement en cours de développement afin d'utiliser ce mode d'action différentiel et sont nommés antagonistes « biaisés » (Z. Liu et al., 2021). Ces données peuvent donc amener à penser que le Rimonabant et JD-5037 induisent une transduction et une signalisation différentes après fixation sur le CB1R avec pour hypothèse une augmentation intracellulaire de l'AMPC plus importante après fixation du Rimonabant. Cela justifie aussi l'utilisation de ces deux molécules dans nos études.

Par ailleurs, il a été démontré que l'activité d'un agoniste inverse est aussi dépendante de l'isoforme du CB1R exprimée (González-Mariscal 2016). Ainsi, le Rimonabant possède une affinité un peu plus élevée (environ 3 fois) pour la forme totale du CB1R tandis que JD-5037 a une affinité significativement plus élevée (environ 30 fois) pour le récepteur CB1b, isoforme présente notamment chez l'Homme et non répertoriée à l'heure actuelle chez le rat ou la souris (Q.-R. Liu et al., 2019). La répartition de différentes isoformes des CB1R au niveau adipocytaire et sa modulation au cours de l'obésité pourrait en partie expliquer ces différences d'action entre antagonistes. En effet, si l'isoforme CB1R total est majoritaire au niveau adipocytaire, le Rimonabant posséderait un effet plus important qui engendrerait une augmentation plus forte des taux intracellulaires d'AMPC qu'avec JD-5037. Ces modifications pourraient être à l'origine d'une augmentation de la production d'AEA consécutive à une inhibition plus intense de la FAAH (Martínez-León et al., 2019).

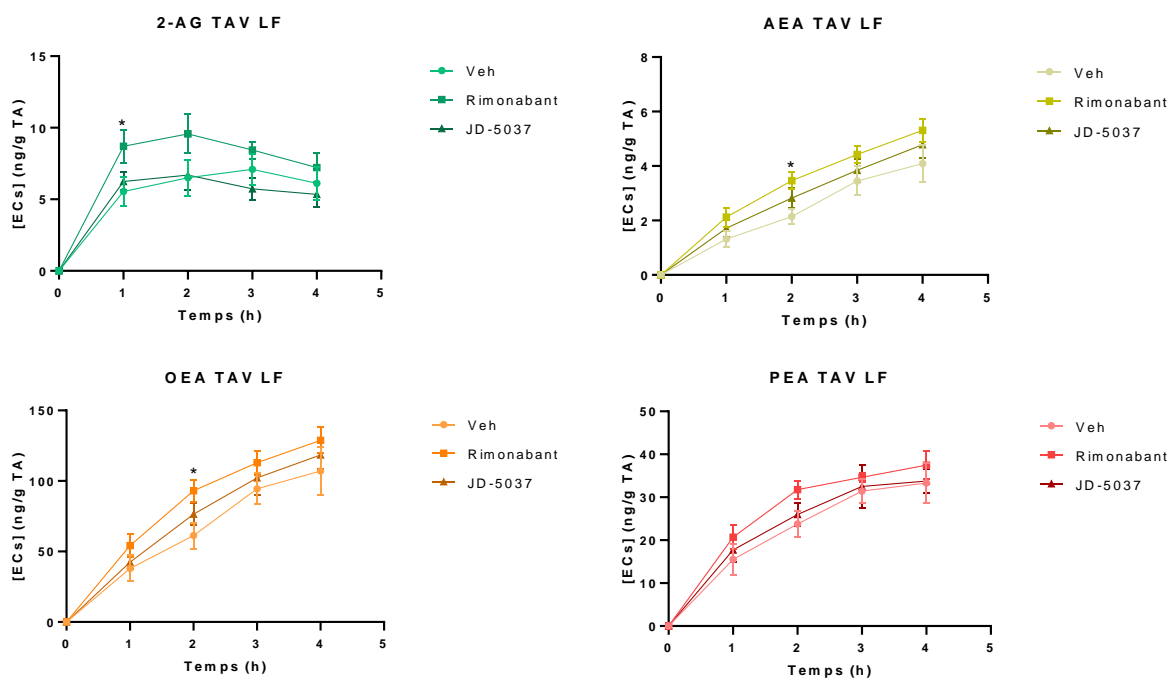
Par ailleurs, ces expériences sont menées sur du TA de souris obèses qui peut présenter une certaine hétérogénéité concernant les caractéristiques des adipocytes constitutifs. En effet, il contient des adipocytes pathologiques (hypertrophiques), mais il contient aussi des adipocytes sains (de taille normale et au métabolisme non dérégulé). Lorsque des explants de TA pathologique sont traités avec des antagonistes des CB1R, les effets observés peuvent résulter à la fois d'une modulation directe du métabolisme des

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

adipocytes hypertrophiés et des adipocytes sains. C'est pourquoi il nous est apparu intéressant d'étudier l'effet de ces molécules sur des explants de TA sain.

### 2. Production des ECs par le TAV de souris minces en présence d'antagonistes des CB1R

Lorsqu'elle est testée sur des explants de TAV prélevé sur des souris minces, la molécule JD-5037 n'induit pas de modification de la production d'ECs ou de NAEs sur les 4h de production (**Figure 46**). En revanche, le Rimonabant semble exercer un effet stimulateur sur la production de chacun des composés. En effet, la production de 2-AG est significativement augmentée au temps 1h, celles de l'AEA, l'OEA et du PEA au temps 2h.



**Figure 46. Production des ECs sur 4h par le TAV de souris minces en présence de JZL-195 et d'antagonistes des CB1R.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ . TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, LF : Low Fat.

L'OEA est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire tandis que le PEA possède des effets anti-inflammatoires via leur action sur PPAR $\alpha$  (Izzo et al., 2010). La restauration de leur taux après traitement au Rimonabant témoigne d'une modification bénéfique de

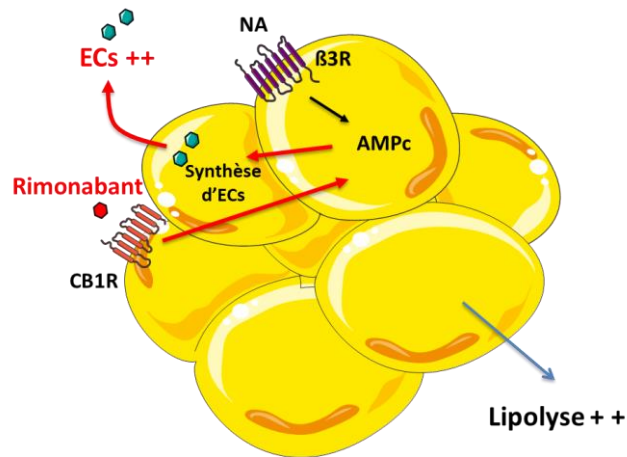
## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

l'activité du SEC dans les adipocytes sains puisque leur diminution consécutive à un régime hyperlipidique a été observée dans les résultats précédents (**Figures 42 et 43**).

Ainsi, la tendance stimulatrice du Rimonabant sur la production d'ECs, qui se dessinait dans les expériences menées sur les explants de TAV et de TASC provenant de souris obèses, est devenu significatif dans le cas des explants issus de souris minces. Ceci suggère que les adipocytes sains répondent mieux que les adipocytes hypertrophiés. L'augmentation de production de l'AEA par le Rimonabant était déjà observée sur le TAV et le TASC de souris obèses (**Figures 44 et 45**). Cette augmentation de la production d'AEA chez la souris obèse est cohérente avec les données plasmatiques recueillies sur différents modèles et notamment chez l'Homme, qui démontrent une augmentation de la concentration plasmatique d'AEA au cours de l'obésité mais aucune modification des concentrations plasmatiques de 2-AG (Argueta & DiPatrizio, 2017; Di Marzo et al., 2009; Izzo et al., 2009; Little et al., 2018; Matias et al., 2008).

Une hypothèse peut être formulée quant au mode d'action du Rimonabant sur la production des ECs. En effet, les ECs exercent un rétrocontrôle négatif qui s'oppose à l'activation des voies de production de l'AMPc (**Figure 47**). Sur notre modèle d'explants, les terminaisons nerveuses innervant le TA ne sont plus présentes, limitant alors l'activité sympathique. Toutefois, le Rimonabant, par son activité agoniste inverse des CB1R, est capable d'activer la PKA et d'augmenter les taux d'AMPc intracellulaire par arrêt de stimulation de l'activité de la PDE3B (G. A. Müller et al., 2020). Or, l'activation de la PKA et la hausse de l'AMPc intracellulaire augmentent la production des ECs avec notamment une réduction de l'activité de l'enzyme de dégradation FAAH (Grimaldi et al., 2009; Maccarrone, 2009; Martínez-León et al., 2019). Il est également probable que les ECs ainsi produits ne puissent exercer d'effets autocrines sur les CB1R adipocytaires, compte tenu de leur blocage par le Rimonabant.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse



**Figure 47. Représentation schématique de l'effet probable du Rimonabant sur la production d'ECs par des explants de tissu adipeux.**

NA : Noradrénaline ; ECs : Endocannabinoïdes, CB1R : Récepteur aux Cannabinoïdes 1, β3R : Récepteur β<sub>3</sub>-adrénergique

**Comme nous l'avons dit précédemment, l'étude de la production des ECs et leur régulation (notamment par l'utilisation d'antagonistes) a pour finalité une approche thérapeutique chez l'Homme. Il nous est donc paru essentiel de réaliser le même type d'étude chez des patients obèses.**

### **E. Production des ECs par le TA issu de sujets obèses**

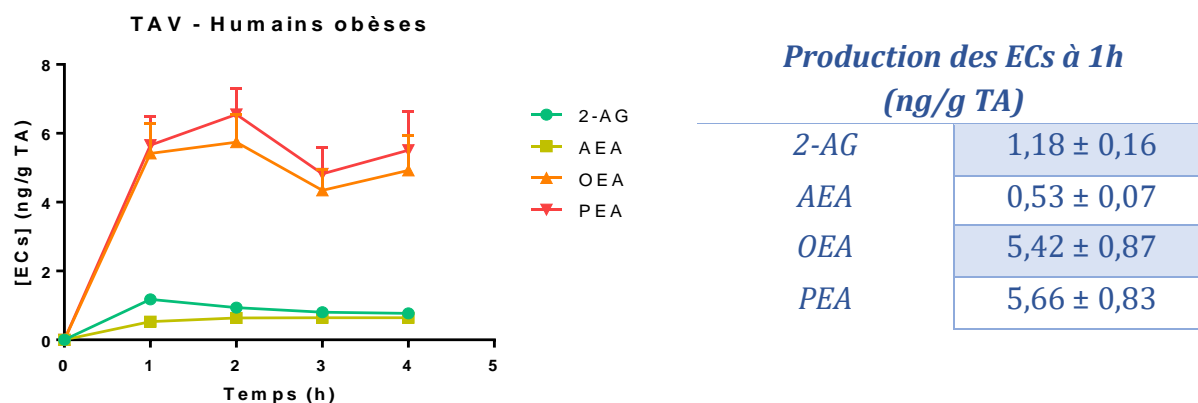
Une démarche expérimentale identique à celle réalisée chez la souris a donc été menée sur des explants de TA humains. Dans le cadre d'un protocole établi en collaboration avec le Professeur Pablo Ortega Deballon (Chef du service de chirurgie digestive du CHU de Dijon), des échantillons de TAV et TASC ont pu être collectés sur des patients obèses afin d'étudier la sécrétion des ECs et NAEs (CB1R - 2015-A01619-40, **Annexe 4**). Les sujets obèses non diabétiques inclus dans l'étude doivent être des hommes, âgés de 18 à 70 ans et possédant un IMC strictement supérieur à 30. Les critères de non-inclusion comprennent la présence d'un diabète ou de pathologies associées (cancer ou maladies inflammatoires chroniques). L'IMC moyen des sujets obèses inclus dans ces résultats est de 47 pour un âge moyen de 41 ans.



## 1. Cinétique de production des ECs par le TAV de sujets obèses

De la même manière que chez la souris, nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence l'accumulation au cours du temps des ECs et NAEs à partir d'explants de TAV (Matériel et Méthodes, **Partie III.B**).

La **Figure 48** montre que la quantité de ces composés, retrouvée dans le milieu de culture, augmente au cours du temps démontrant leur accumulation. Dans les explants de TAV humain, l'OEA et le PEA sont produits en plus grande quantité par le TAV par rapport au 2-AG et à l'AEA. Ces résultats sont cohérents avec les concentrations plasmatiques de la littérature et les données de production obtenues sur le modèle murin (**Figure 40**) (Argueta & DiPatrizio, 2017; Di Marzo et al., 2009; Izzo et al., 2009; Little et al., 2018; Matias, Petrosino, et al., 2008).



**Figure 48. Cinétique de production des différents ECs sur 4h et quantité produite à 1h par le TAV de sujets obèses.**

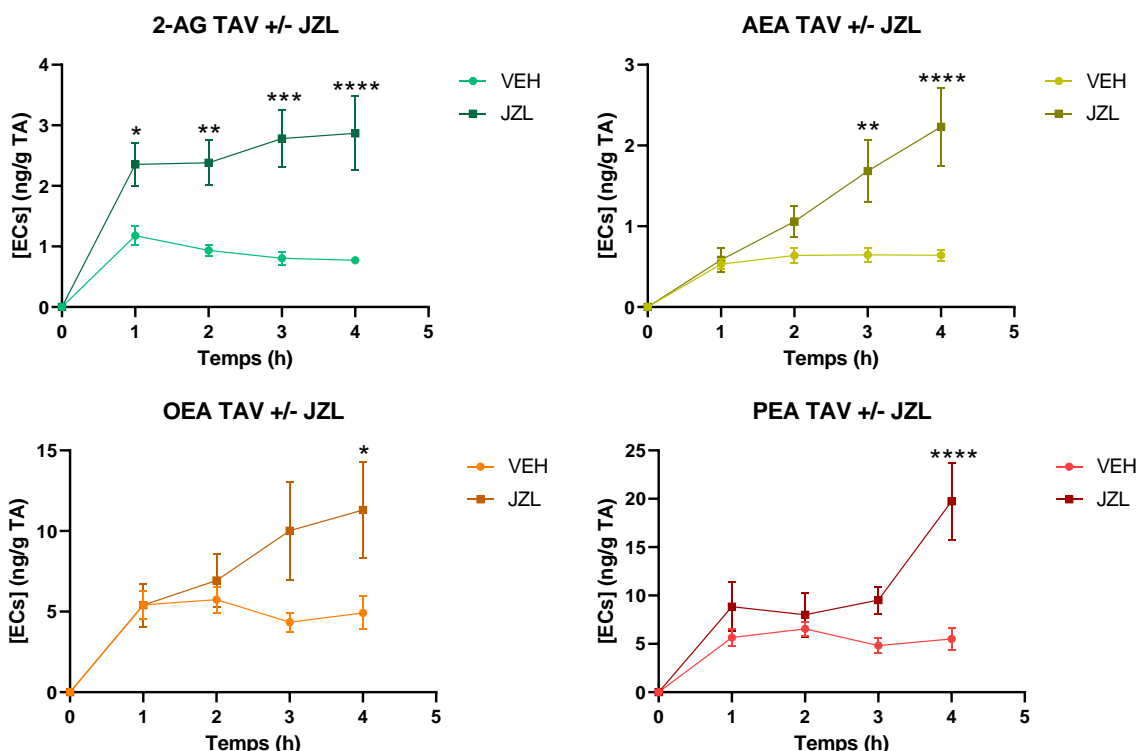
Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral.

## 2. Effets du JZL-195 sur la production du TAV et du TASC

Nous avons ensuite cherché, comme précédemment chez la souris, à distinguer les capacités de synthèse des ECs et des NAEs en mesurant leur accumulation qui témoignent du ratio synthèse/dégradation. Pour cela, la même stratégie a été suivie avec l'utilisation du JZL-195 lors des incubations afin d'inhiber la dégradation des composés par la FAAH et la MAGL.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

L'ajout de JZL-195 dans le milieu d'incubation des explants de TAV induit une augmentation importante de l'accumulation de tous les composés étudiés : 2-AG, AEA, OEA et PEA (**Figure 49**). Cette augmentation est observable dès 1h pour le 2-AG, dès 3h pour l'AEA et devient significative au temps 4h dans le cas de l'OEA et du PEA.



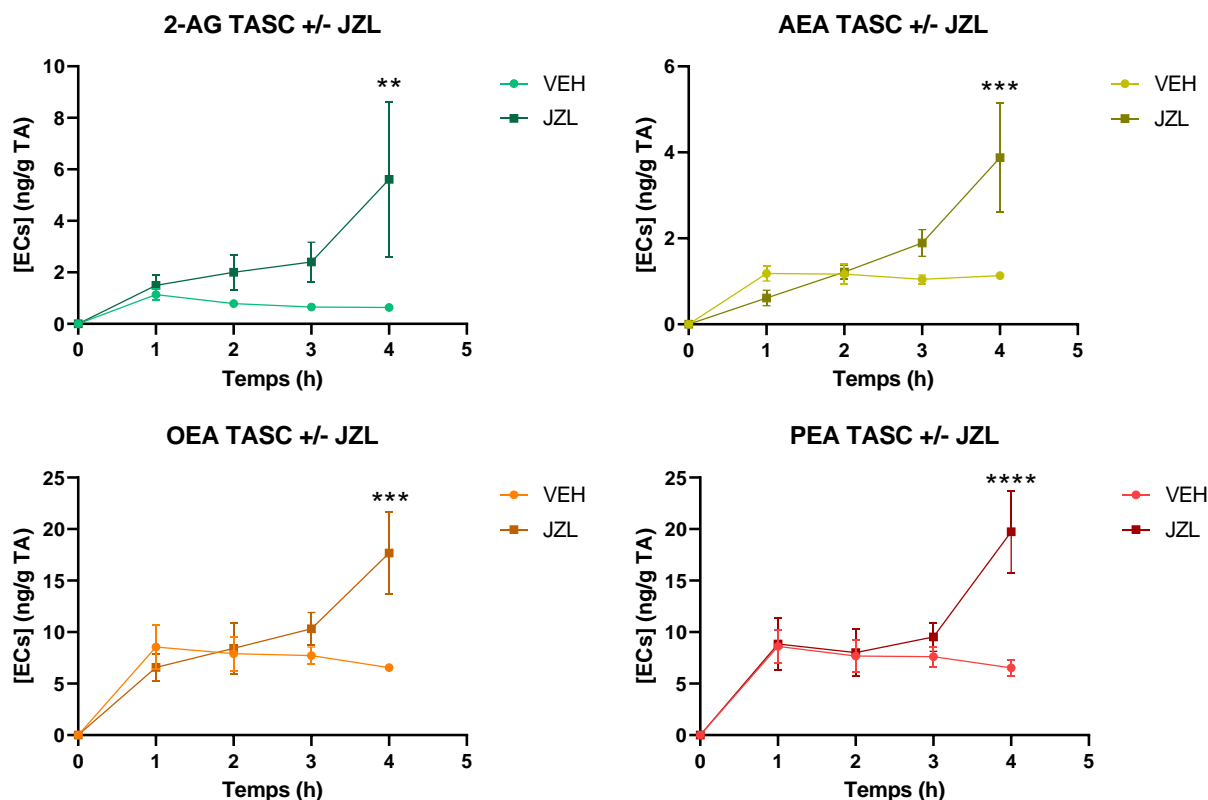
**Figure 49. Accumulation des ECs sur 4h à partir de TAV d'humains obèses en présence ou non de JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral.

La présence de l'inhibiteur des enzymes de dégradation FAAH et MAGL dans le milieu de culture du TASC induit également une augmentation de la quantité du 2-AG, de l'AEA, l'OEA et du PEA (**Figure 50**). Toutefois cette augmentation est beaucoup moins marquée que dans le TAV et n'est significative qu'au temps 4h pour chacun des composés étudiés.

Ces observations communes au TAV et au TASC démontrent un effet important du JZL-195 sur l'accumulation des ECs et des NAEs. Il est important de noter que cet effet n'était pas observé pour des explants de souris pourtant analysés dans des conditions similaires (**Figure 38**) ce qui suggère une activité de dégradation plus importante dans le TA humain que dans le TA de souris obèse. Ces résultats laissent donc penser qu'il existe des différences concernant l'activité des voies de dégradation des ECs entre l'Homme et le rongeur.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse



**Figure 50.** Accumulation des ECs sur 4h à partir de TASC d'humains obèses en présence ou non de JZL-195.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . TA : Tissu Adipeux, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané.

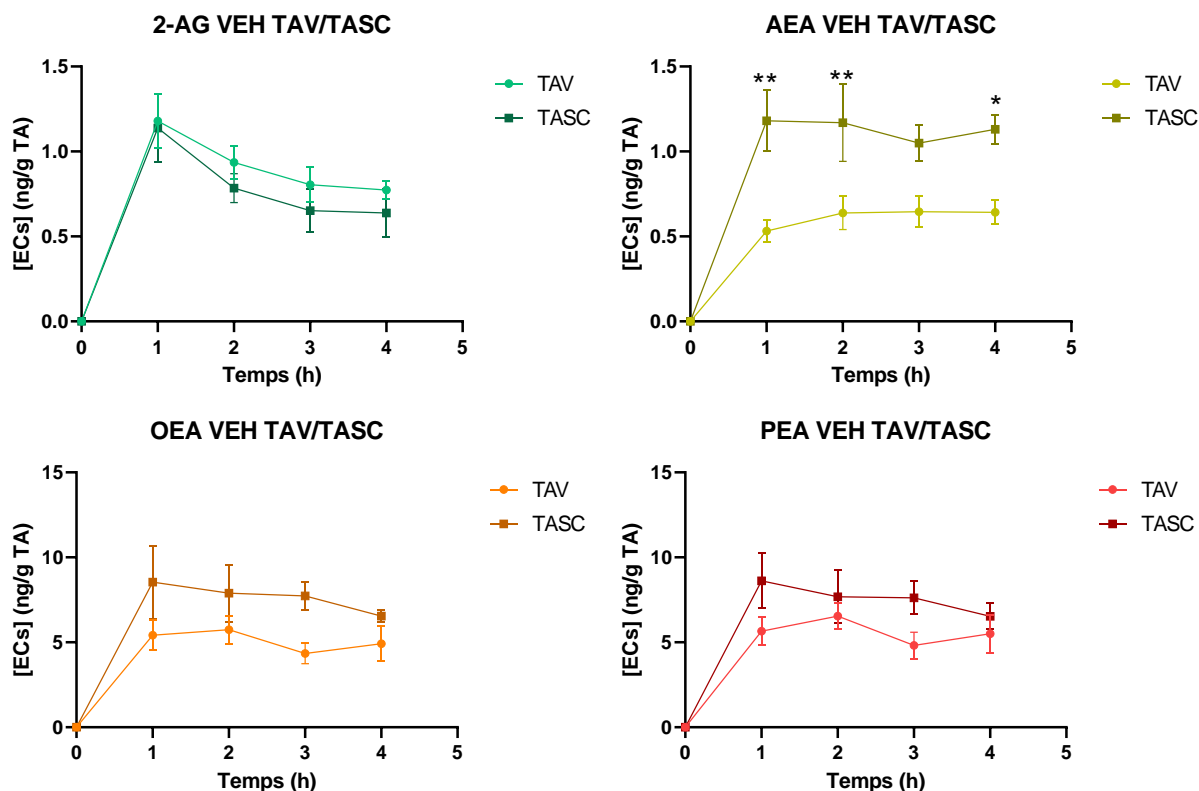
### 3. Production des ECs par le TA chez l'Homme obèse, comparaison entre le TAV et le TASC

Nous avons ensuite compilé les données précédentes afin de comparer les capacités de production des ECs et des NAEs par les deux types de TA collectés : le TAV et le TASC. Étant donné que des différences de production ont été observées en présence et en absence de JZL-195, les comparaisons ont été effectuées dans les deux conditions.

En absence de JZL-195, les quantités d'AEA mesurées dans le milieu de culture du TASC sont significativement plus importantes (**Figure 51**). La même tendance est observée pour les NAEs (OEA et PEA) tandis qu'aucune différence n'est constatée concernant le 2-AG. De prime abord, ces résultats semblent indiquer une activité de synthèse plus importante dans le TASC par rapport au TAV. Toutefois, compte tenu de l'effet du JZL-195

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

précédemment évoqué, il est également possible que l'activité de dégradation soit plus faible dans le TASC.



**Figure 51. Dosage des ECs produits à partir de TAV et de TASC de sujets obèses.**

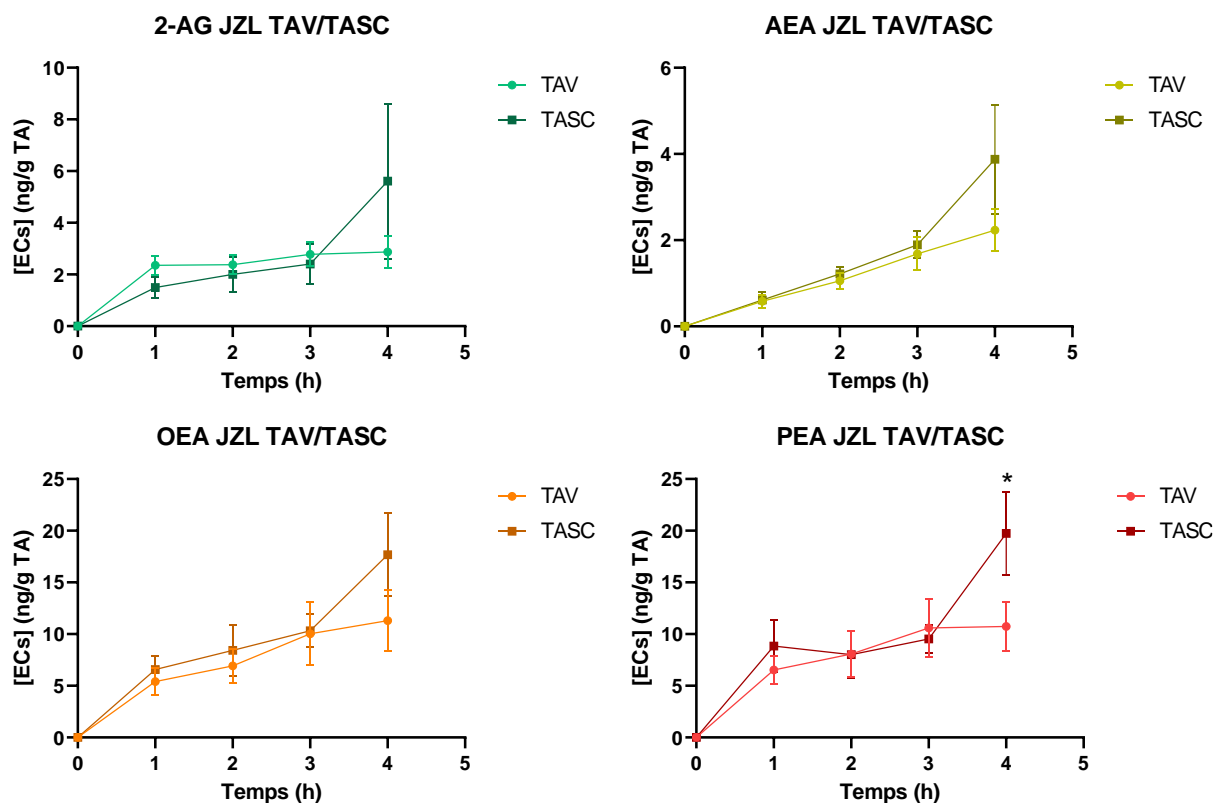
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au TAV sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ . Veh : Véhicule, TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané.

Ainsi, l'analyse des données de production obtenues en présence de JZL-195 ne montre pas de différences dans les quantités d'ECs et de NAEs retrouvées dans les milieux de culture du TAV et du TASC (**Figure 52**). Une tendance se dessine avec une production plus importante à 4h du PEA dans le TASC qui n'est pas significative pour le 2-AG, l'AEA et l'OEA.

Finalement, l'ensemble de ces données suggère d'une part, que l'activité de production des ECs et des NAEs est peu différente entre le TAV et le TASC (en excluant le point 4h) et d'autre part, qu'il existe une forte activité de dégradation dans le TAV. En effet, en absence de JZL-195, les quantités d'ECs et de NAEs sont plus élevées dans le milieu d'incubation du TASC que dans le milieu d'incubation du TAV. Cette différence est supprimée par l'inhibition de la dégradation enzymatique. Ces résultats sont cohérents avec la littérature puisque l'expression génique de la *FAAH* est plus importante dans le TAV que dans le TASC

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

chez les sujets obèses, suggérant alors une activité de dégradation plus importante dans le TAV que dans le TASC (Blüher et al., 2006).



**Figure 52. Dosage des ECs produits à partir de TAV et de TASC de sujets obèses en présence de JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au TAV sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ . TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané.

A ce stade, il serait donc intéressant de poursuivre cette étude pour comparer ces données à celles obtenues à partir de TA de sujets minces. En effet, des différences concernant l'activité du SEC ont été relevées entre le TA sain et obèse. Ainsi, l'expression génique et protéique des CB1R qui, de façon générale est plus faible dans le TASC que dans le TAV quel que soit la corpulence de l'individu, voit son niveau encore diminuer dans le TASC de sujets obèses (Bennetzen et al., 2010; Blüher et al., 2006). Ces différences concernent également l'expression des enzymes de synthèse et de dégradation de l'AEA et des NAEs, *NAPLD* et *FAAH*. En effet, l'expression de *NAPLD*, impliquée dans la synthèse de ces composés, est augmentée chez les sujets obèses principalement dans le TAV (Pagano et al., 2007) tandis que l'expression de *FAAH* est diminuée chez ces sujets (Blüher et al., 2006), ce qui est en faveur d'une production plus importante d'AEA par le TA obèse.

*Ces résultats préliminaires permettent de valider notre approche méthodologique et ouvrent un large éventail de perspectives. Toutefois, au cours de toutes les études présentées, les cinétiques de production du 2-AG, même en présence d'inhibiteur de dégradation (JZL-195), présentent un plateau indiquant l'absence d'accumulation de cet EC contrairement aux autres composés étudiés (AEA, OEA et PEA). C'est pourquoi, avant d'approfondir cette approche méthodologique, nous avons cherché à optimiser le protocole de quantification du 2-AG.*

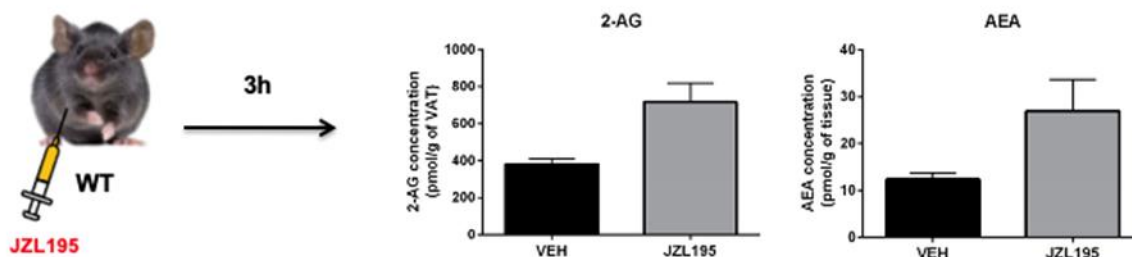
## **F. Optimisation de la quantification du 2-AG produit par les explants de TA**

Que ce soit avec des explants de souris ou humains, nous avons observé que les proportions de 2-AG et d'AEA présentes dans les milieux de culture ne sont pas totalement conformes à celles trouvées dans la littérature ou précédemment mesurées au laboratoire dans le plasma et les tissus. En effet, le ratio 2-AG/AEA est généralement de l'ordre de 10 à 100. Pour exemple, Krott et collaborateurs en 2016 ont obtenu un ratio 2-AG/AEA dans le TA blanc de souris minces de 10 ; Rossmeisler et collaborateurs en 2018 ont obtenu un ratio dans le TA blanc compris entre 20 et 40 chez des souris minces et obèses ; Engeli et collaborateurs en 2014 ont eu des ratios 2-AG/AEA plasmatiques compris entre 10 et 25 chez des sujets minces et obèses et Spoto et collaborateurs en 2006 ont obtenu un ratio proche de 70 dans le TASC de sujets minces.

Des mesures récentes réalisées au laboratoire, sur du TA prélevé sur des souris traitées ou non au JZL-195 (même méthode de dosage que pour les explants), ont également indiqué un rapport intracellulaire 2-AG/AEA de 20 à 40 (**Figure 53**) alors que ce rapport est généralement autour de 5 dans le milieu de culture (Matériel et Méthodes, **Partie IV.A**). Afin d'essayer d'expliquer cette différence, nous avons mis en place une série d'expériences basées sur deux hypothèses concernant le 2-AG :

- La première est que la production du 2-AG pourrait être inhibée par TRPV1
- La seconde est une dégradation importante du 2-AG dans le milieu de culture.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse



**Figure 53. ECs présents dans le TAV après traitement in vivo au JZL-195.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. VEH : Véhicule, WT : Wild Type, VAT : Visceral Adipose Tissue.

### 1. Hypothèse 1 : Production du 2-AG inhibée par TRPV1

Lors d'expériences de mise au point comprenant des cinétiques longues (12 à 24h), nous avons constaté une forte hausse de la quantité de 2-AG dans le milieu après 10 à 12h d'incubation (données non présentées). Après étude de la littérature, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ce rebond de production du 2-AG serait lié à l'inactivation du récepteur TRPV1. En effet, l'AEA, en plus d'être un agoniste des CB1R, est un agoniste du récepteur TRPV1 qui, une fois activé peut inhiber la DAGL à l'origine de la production du 2-AG (Maccarrone et al., 2008). Ainsi, le retard de production observé lors de nos études préliminaires pourrait être consécutif à une activation des TRPV1 par l'AEA produit par les explants. Le rebond de production du 2-AG correspondrait alors au temps nécessaire à la désensibilisation des TRPV1, levant alors l'inhibition de la production du 2-AG (Maccarrone et al., 2008).

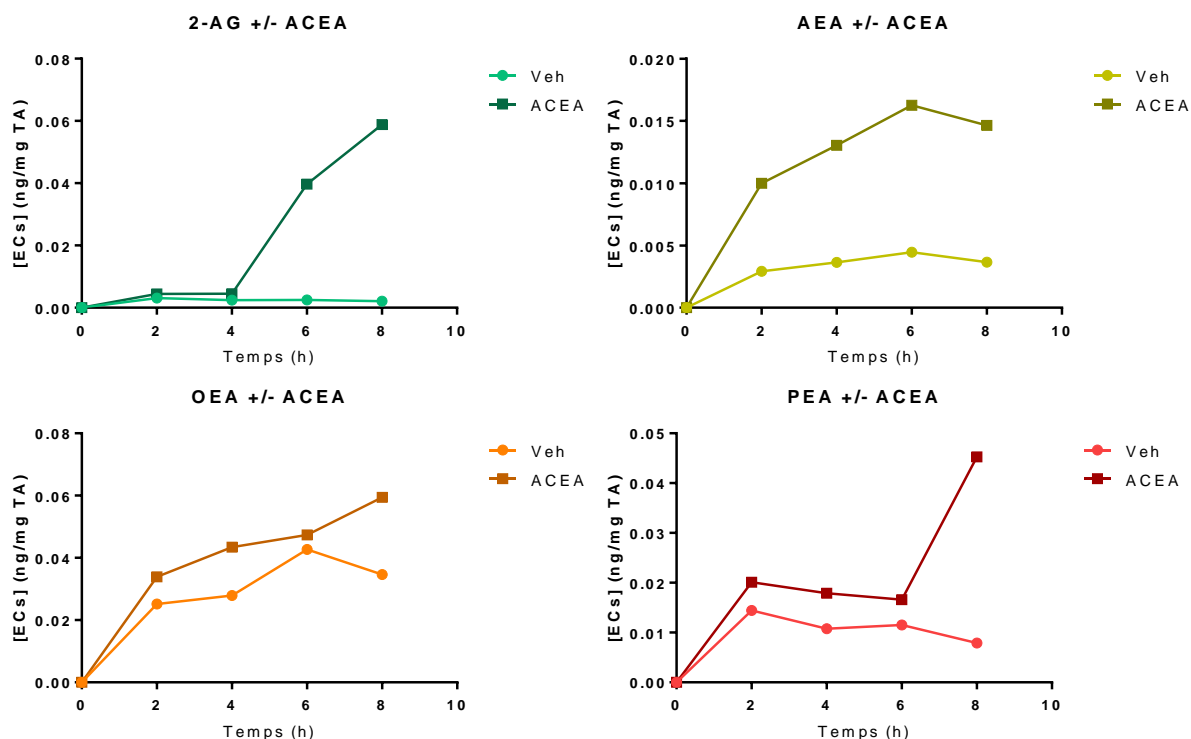
#### a. Test de désensibilisation des TRPV1 avec de l'ACEA

Afin d'étudier cette hypothèse, des explants de TAV ont été incubés en présence d'ACEA (Arachidonyl-2'-ChloroEthylAmide – agoniste des CB1R non métabolisable) à 1 $\mu$ M qui, en plus d'être un activateur des CB1R, est également un agoniste TRPV1 (Baker & McDougall, 2004) dans le but de désensibiliser ces récepteurs et ainsi lever l'inhibition de la production de 2-AG (Matériel et Méthodes, **Partie III.A.2**).

En présence d'ACEA, la quantité de 2-AG accumulée dans le milieu contenant les explants augmente très significativement dès 6h d'incubation alors qu'elle reste faible jusqu'au

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

temps 8h avec le véhicule. **(Figure 54)**. Même si ce résultat semble en accord avec l'existence d'un phénomène d'inhibition de la production du 2-AG lié à la présence d'agonistes CB1R/TRPV1, il ne semble pas pouvoir expliquer la faible quantité de 2-AG détectée dans le milieu pendant la période 0-4h. La question de la réalité physiologique se pose également puisque ces résultats ont été obtenus *in vitro* après un ajout important d'ACEA. De plus, la présence de l'ACEA semble stimuler la production de l'AEA et des NAEs, ce qui n'est pas compatible avec nos objectifs.



**Figure 54. Production d'ECs sur 8h en présence ou en absence d'ACEA.**

Les résultats sont exprimés en moyenne. Veh : Véhicule, TA : Tissu Adipeux.

Notre objectif est de quantifier la production des ECs et des NAEs sur une période courte, après le prélèvement, afin de s'affranchir au maximum des phénomènes de régulation qui pourraient être liés aux conditions de culture et respecter au mieux la réalité physiologique. C'est pourquoi, dans un second temps nous avons tenté d'inhiber directement les TRPV1 plutôt que d'agir sur leur désensibilisation.

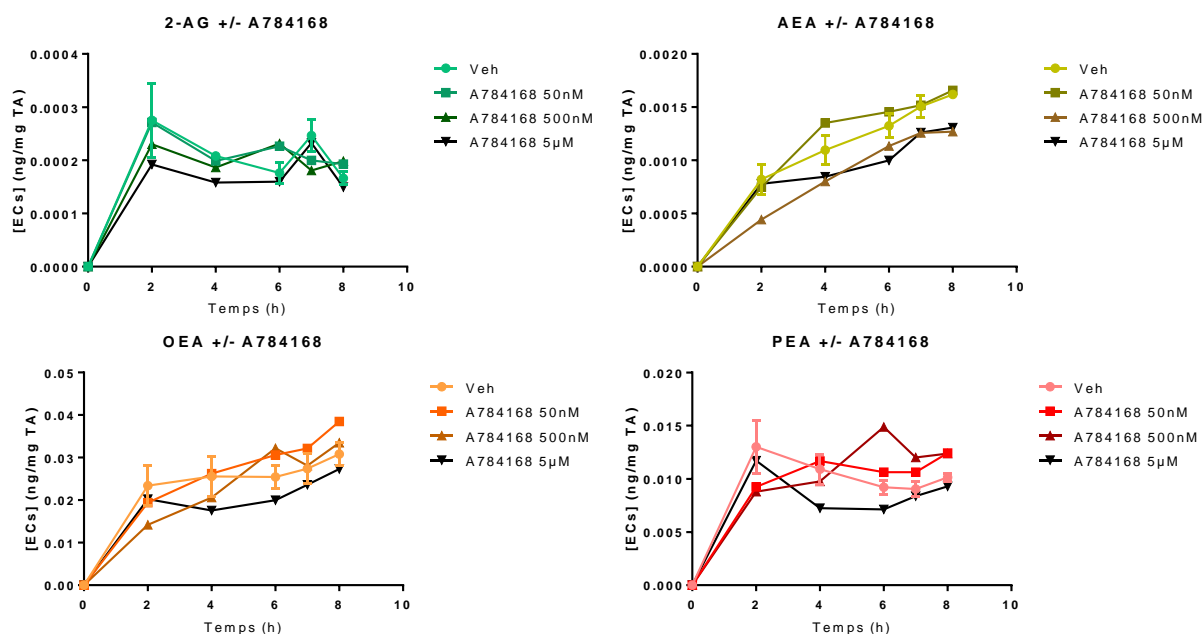


## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

### *b. Test d'inhibition des TRPV1 avec A784168*

Les explants de TAV ont donc été incubés 8h en présence d'un antagoniste des TRPV1, le A784168, à différentes concentrations (50 nM, 500 nM et 5 µM).

Les résultats indiquent que le A784168, quelle que soit sa concentration, ne stimule pas la production de 2-AG par les explants au cours des 8 heures de traitement (**Figure 55**).



**Figure 55. Production d'ECs en présence de l'antagoniste de TRPV1 A784168.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques sont non significatives. Veh : Véhicule, TA : Tissu Adipeux.

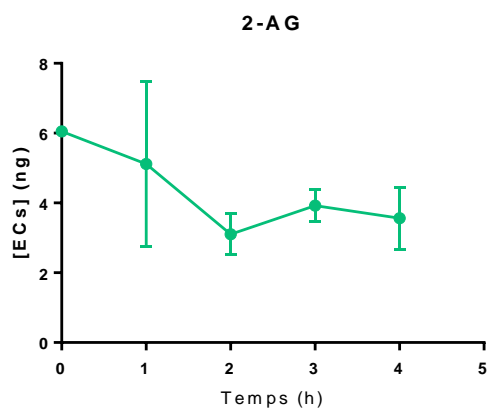
Finalement, les faibles taux de 2-AG mesurés dans le milieu de culture ne semblent donc pas être dus à une inhibition de la synthèse via les récepteurs TRPV1. Une deuxième hypothèse a donc été explorée : celle d'une dégradation importante du 2-AG synthétisé qui interviendrait malgré la présence de JZL-195 et empêcherait d'observer son accumulation.

## 2. Hypothèse 2 : Dégradation importante du 2-AG

### a. *Evaluation de la dégradation du 2-AG dans le milieu de culture*

Afin de tester l'hypothèse d'une dégradation du 2-AG dans le milieu de culture, nous avons étudié le devenir, au cours du temps, d'une quantité connue de composé ajoutée en début d'incubation soit dans du milieu vierge soit dans du milieu ayant été en contact avec des explants.

Ainsi, dans un 1<sup>er</sup> temps, 1 $\mu$ M de 2-AG a été incubé pendant 4h dans du milieu de culture vierge (en absence de TA) afin de détecter une éventuelle dégradation spontanée du composé. Dans ces conditions, les quantités mesurées restent relativement constantes au cours du temps, ce qui témoigne d'une stabilité correcte du 2-AG dans le milieu de culture à 37°C (**Figure 56**).



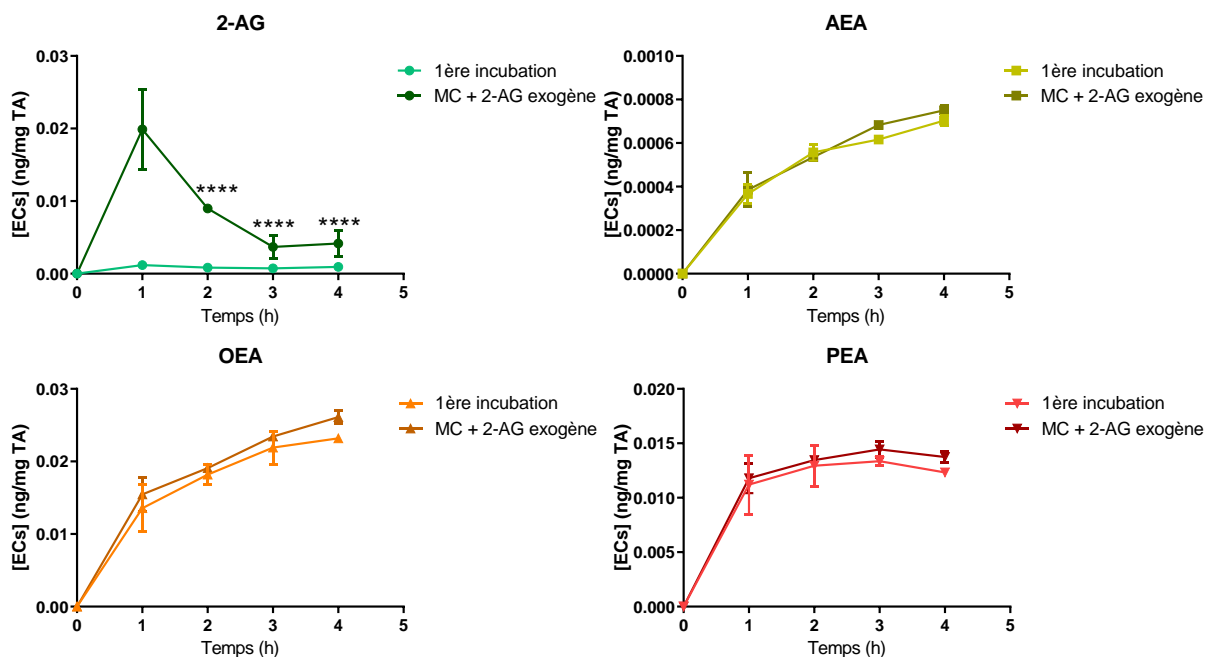
**Figure 56. Dégradation spontanée du 2-AG dans le milieu de culture.**

*Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques sont non significatives.*

Nous avons ensuite évalué la stabilité du 2-AG dans un milieu ayant préalablement été incubé avec du TAV (milieu conditionné) pendant différentes durées (1, 2, 3 et 4h). 1 $\mu$ M de 2-AG exogène a ensuite été ajouté dans chaque milieu recueilli (1, 2, 3 et 4h) avant une nouvelle incubation pendant 4h. La concentration de 2-AG exogène a été réévaluée chaque heure pendant les 4h d'incubation. Parallèlement, les ECs et les NAEs produits pendant le conditionnement des milieux et lors de la seconde incubation en présence de 2-AG exogène ont également été quantifiés.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

Dans le milieu conditionné, la concentration de 2-AG exogène est très fortement diminuée après 2, 3 et 4h d'incubation confirmant alors une activité de dégradation importante, probablement due à la présence d'enzymes de dégradation libérées dans le milieu par le TAV lors de la 1<sup>ère</sup> incubation (**Figure 57**).



**Figure 57. Milieu conditionné durant 1, 2, 3 ou 4h avec du TAV puis incubé 1, 2, 3 ou 4h respectivement avec du 2-AG.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport aux valeurs à 1h d'incubation sont symbolisées par \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . TA : Tissu Adipeux, MC : Milieu Conditionné.

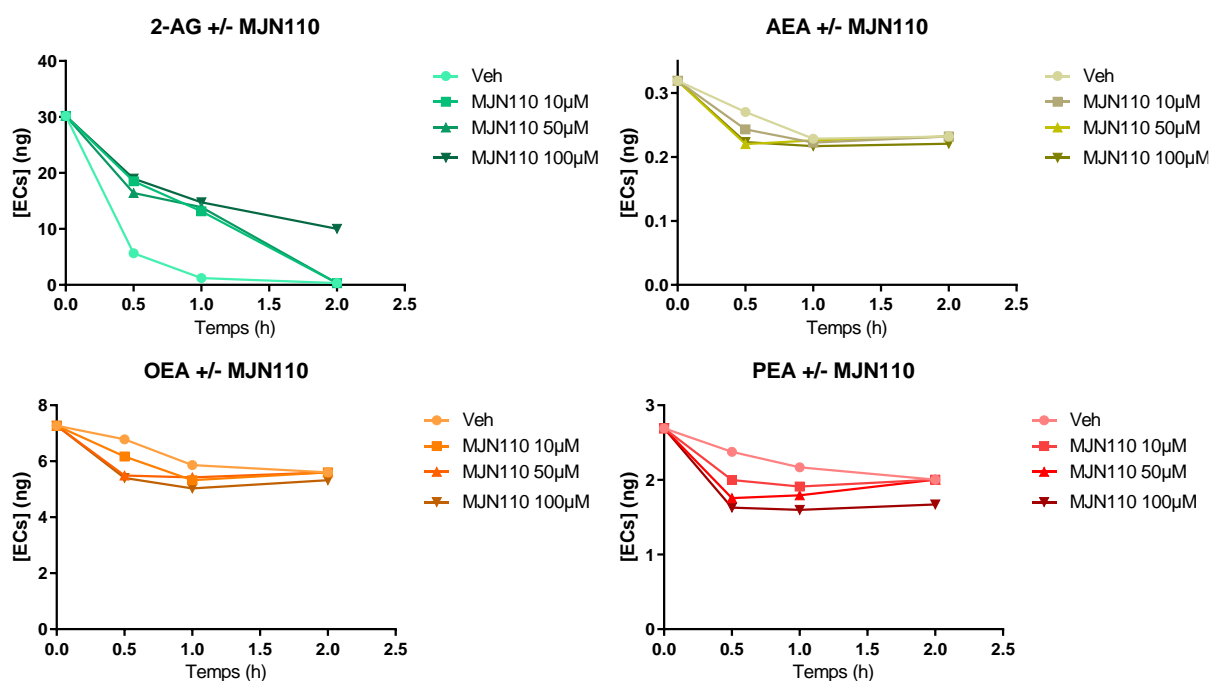
A l'inverse du 2-AG, et comme observé précédemment, l'AEA et les NAEs s'accumulent dans le milieu au cours de la première incubation. Lors de la seconde incubation sans TA (milieu conditionné + 2-AG exogène), les quantités d'AEA et les NAEs sont inchangées ce qui témoigne de la stabilité de ces composés à 37°C ainsi qu'une absence de dégradation par des enzymes relarguées dans le milieu par les explants lors de la première incubation. Compte tenu de ces observations, nous avons ensuite répété les expériences en utilisant un inhibiteur spécifique de la MAGL de façon à limiter l'activité enzymatique responsable de la dégradation du 2-AG.

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

### *b. L'inhibiteur spécifique de la MAGL MJN110 limite la dégradation du 2-AG dans le milieu de culture*

Comme précédemment, la dégradation de 2-AG exogène a été évaluée après ajout d'une quantité connue du composé dans un milieu préalablement incubé 2 heures avec du TAV mais cette fois en présence ou non de MJN110, à trois concentrations différentes (10, 50 et 100  $\mu\text{M}$ ). Les quantités d'ECs et de NAEs produits ont été évaluées aux temps 30 min, 1h et 2h.

En l'absence de MJN110, le 2-AG est dégradé de manière quasi-totale en l'espace d'une heure tandis que les concentrations d'AEA, d'OEA et de PEA diminuent de 10 à 25% sur la même durée (**Figure 58**).



**Figure 58. Dégradation d'ECs sur 2h en présence de l'inhibiteur de la MAGL MJN110.**

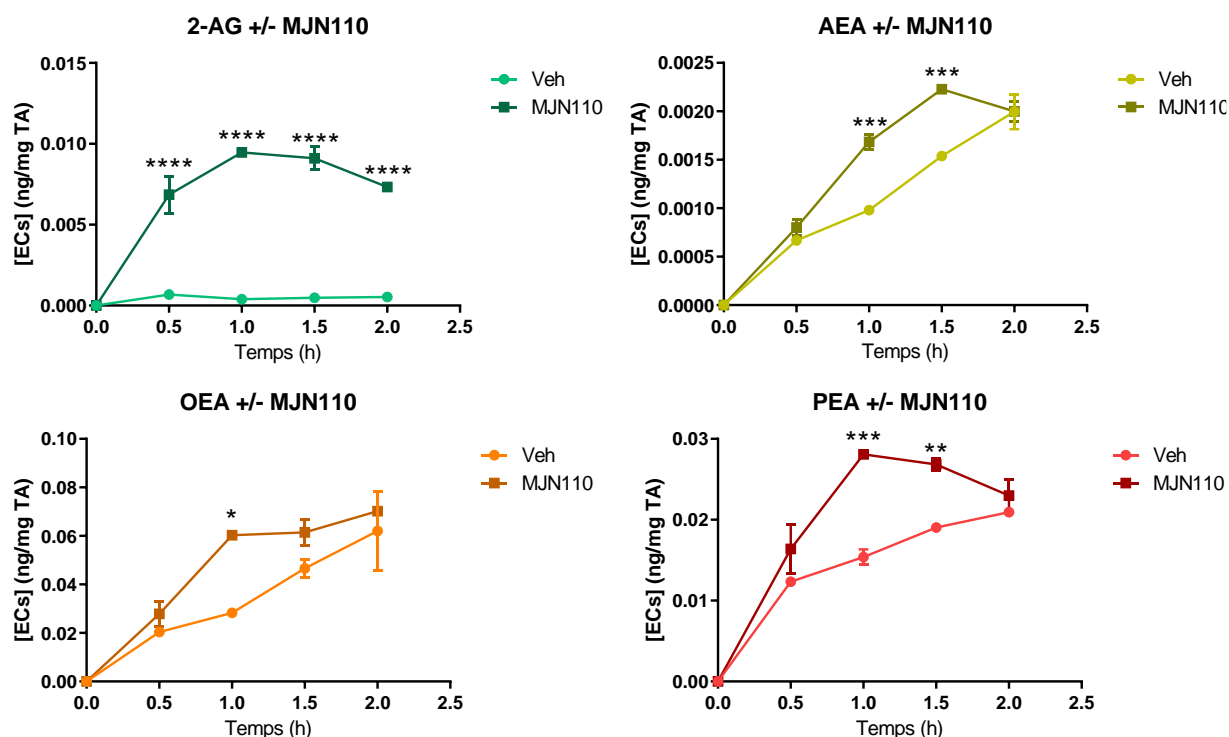
Les résultats sont exprimés en moyenne. Veh : Véhicule.

Le MJN110 permet de ralentir fortement la dégradation du 2-AG et l'effet semble prolongé dans le cas d'une utilisation à 100  $\mu\text{M}$  sans modifier les concentrations d'AEA, d'OEA et de PEA. Cette dégradation n'est pas complètement inhibée et semble s'accroître au cours du temps, il conviendra pour les expériences futures de privilégier des temps de mesure courts (moins de 2h).

## II. Production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux sain et obèse

Compte tenu des résultats précédents, dans l'expérience suivante, la production des ECs par des explants de TAV a été évaluée sur un temps plus court (2h) et en présence d'une concentration de MJN110 à 100  $\mu$ M.

Dans ces conditions, nous observons une très forte augmentation des quantités de 2-AG produites et une accumulation dans le milieu de culture au cours de la première heure, révélatrice d'une production constante par les explants de TAV (**Figure 59**).



**Figure 59. Production d'ECs sur 2h en présence de MJN110 à 100 $\mu$ M.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . TA : Tissu Adipeux, Veh : Véhicule.

De plus, dans ces conditions, les valeurs de rapport 2-AG/AEA se rapprochent des valeurs (10) relevées dans la littérature. Il est à noter que le blocage de l'activité MAGL par le MJN110 favorise également, dans une bien moindre mesure, l'accumulation des autres composés (AEA, OEA et PEA) avec des facteurs de stimulation de production au temps 1h compris entre 1,7 et 2,1. Cet effet pourrait s'expliquer par une inhibition de la dégradation de ces molécules, liée à la forte accumulation du 2-AG. En effet, il a été démontré que le 2-AG avait la capacité d'inhiber la FAAH et ainsi limiter la dégradation de l'AEA, l'OEA et le PEA (Cravatt et al., 1996).

## G. Conclusion

L'ensemble de ces résultats valide un protocole original permettant pour la première fois des mesures réelles de production d'ECs et NAEs par le TA. Cette approche méthodologique ouvre sur un large éventail de perspectives visant à explorer plus en détail les mécanismes régulant la production des ECs et des NAEs par les différents dépôts adipeux et dans différentes situations pathologiques.

Ainsi, nous envisageons de compléter les expériences précédentes en évaluant la production d'ECs et de NAEs par les TA, à partir de biopsies prélevées chez l'Homme et la souris sains/obèses/obèses diabétiques de type II en distinguant la graisse viscérale et sous-cutanée abdominale. Il conviendra également de préciser le rôle joué par les CB1R du TA dans les mécanismes régulant la sécrétion des ECs et des NAEs en utilisant des antagonistes spécifiques ou du tissu prélevé sur des souris CB1R<sup>-/-</sup>. Des mesures d'expression des récepteurs et des enzymes du SEC seront réalisées sur les tissus afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des variations de sécrétions des ECs et des NAEs observées. En parallèle, des dosages ELISA seront également effectués sur les milieux de culture afin de mesurer la production d'adipokines (adiponectine, leptine, TNF $\alpha$ ...) par les différents tissus soumis aux différentes conditions expérimentales.

Dans ce contexte, un protocole d'étude clinique (ENDOCATA – 2020 – A02388 – 31) a été mis en place, en collaboration avec le service de Gastro-entérologie du CHU de Dijon dirigé par le professeur Pablo Ortega-Deballon (**Annexe 5**). Ce protocole autorise la collecte de TAV et de TASC issu de 45 hommes répartis en trois groupes : sujets sains, obèses, et obèses diabétiques. Cette collecte d'échantillons nous permettra d'analyser les cinétiques de production des ECs et des NAEs, l'activité des enzymes de synthèse et de dégradation de ces composés, l'expression de marqueurs clés du SEC ainsi que la sécrétion d'adipokines par les différents dépôts adipeux.

Ce projet devrait nous permettre de déterminer si la surproduction des ECs, observée au cours de l'obésité, est associée à une modification des capacités sécrétoires du TA (adipokines, cytokines) qui pourraient être dues à des effets autocrines des ECs impliquant les CB1R, en distinguant le TAV et le TASC. De plus, nous pourrions également étudier plus en détail l'impact du blocage des CB1R du TA pathologique humain sur ces capacités sécrétoires.

## **III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire**

Comme démontré dans la littérature et d'après nos résultats obtenus à partir d'explants, l'activité du SEC dans le TA est augmentée au cours de l'obésité, ce qui se traduit par une augmentation de la production des ECs. Étant donné qu'une action des ECs sur la différenciation cellulaire a été décrite dans d'autres tissus (Garcia-Arencibia et al., 2019), il semble raisonnable de penser que ces molécules pourraient avoir une influence sur des étapes de l'adipogenèse et ainsi moduler l'apparition de nouveaux adipocytes. Il est d'ores et déjà établi que l'activation spécifique des CB1R augmente le processus de lipogenèse dans les adipocytes (Cota et al., 2003). Plusieurs études utilisant des lignées cellulaires 3T3 ont également montré un rôle du SEC sur la différenciation (Gary-Bobo et al., 2006; Paszkiewicz et al., 2020).

C'est pourquoi, nous avons cherché à étudier le rôle des ECs sur la régulation de la différenciation adipocytaire en utilisant des cellules provenant directement de TA sain et pathologique de souris. Pour cela, nous avons entrepris de mettre au point une approche méthodologique permettant l'isolement des cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV) de souris, l'entretien de cette primo-culture et l'induction de leur différenciation en adipocytes. Dans un second temps, ce modèle a fait l'objet d'expériences préliminaires visant à étudier l'action d'agonistes et d'antagonistes des CB1R sur l'adipogenèse.

### **A. Mise au point des conditions de culture et de différenciation de cellules de la Fraction Stroma-Vasculaire**

#### **1. Isolement et mise en culture**

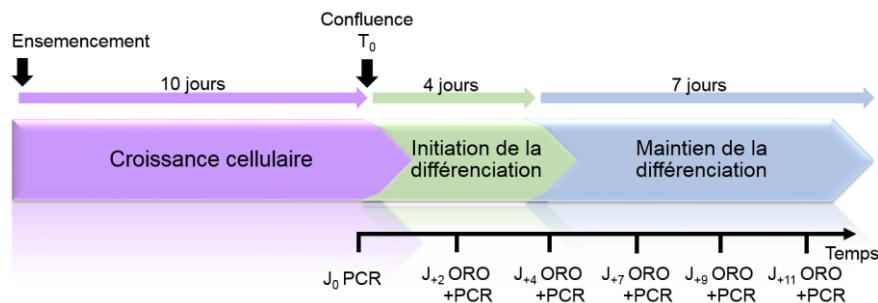
Les cellules de la FSV ont été isolées à partir de TAV de souris minces (mâles C57BL/6J). Une fois collecté, le TA a été dissocié mécaniquement et enzymatiquement (à l'aide de collagénase et de dispase) puis les cellules de la FSV ont été récupérées, après plusieurs étapes de tamisage et centrifugation, et ont été mises en suspension dans du milieu de

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire

culture complet (MCC : DMEM/F12, 10% SVF, 1% P/S). Elles ont alors étéensemencées dans des plaques 12 puits placées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Le MCC a été changé toutes les 48h (Matériel et Méthodes, **Partie III.D.2**).

## 2. Induction et suivi de la différenciation

Après 10 jours de culture durant lesquels les cellules de la FSV se sont multipliées et l'obtention de puits à 100% de confluence, la différenciation de ces cellules a été induite pendant 4 jours avec un milieu de différenciation (MCC, insuline 5µg/mL, IBMX 0,5mM, dexaméthasone 2,5µM, indométacine 125µM, rosiglitazone 0,5mM) puis maintenue à l'aide d'un milieu de maintien (MCC, insuline 5µg/mL). Le suivi des différents stades de différenciation a été effectué par marquage à l'Oil Red O et par la mesure de l'expression de gènes marqueurs à 2, 4, 7, 9 et 11 jours après l'initiation de la différenciation (**Figure 60**).



**Figure 60. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV.**

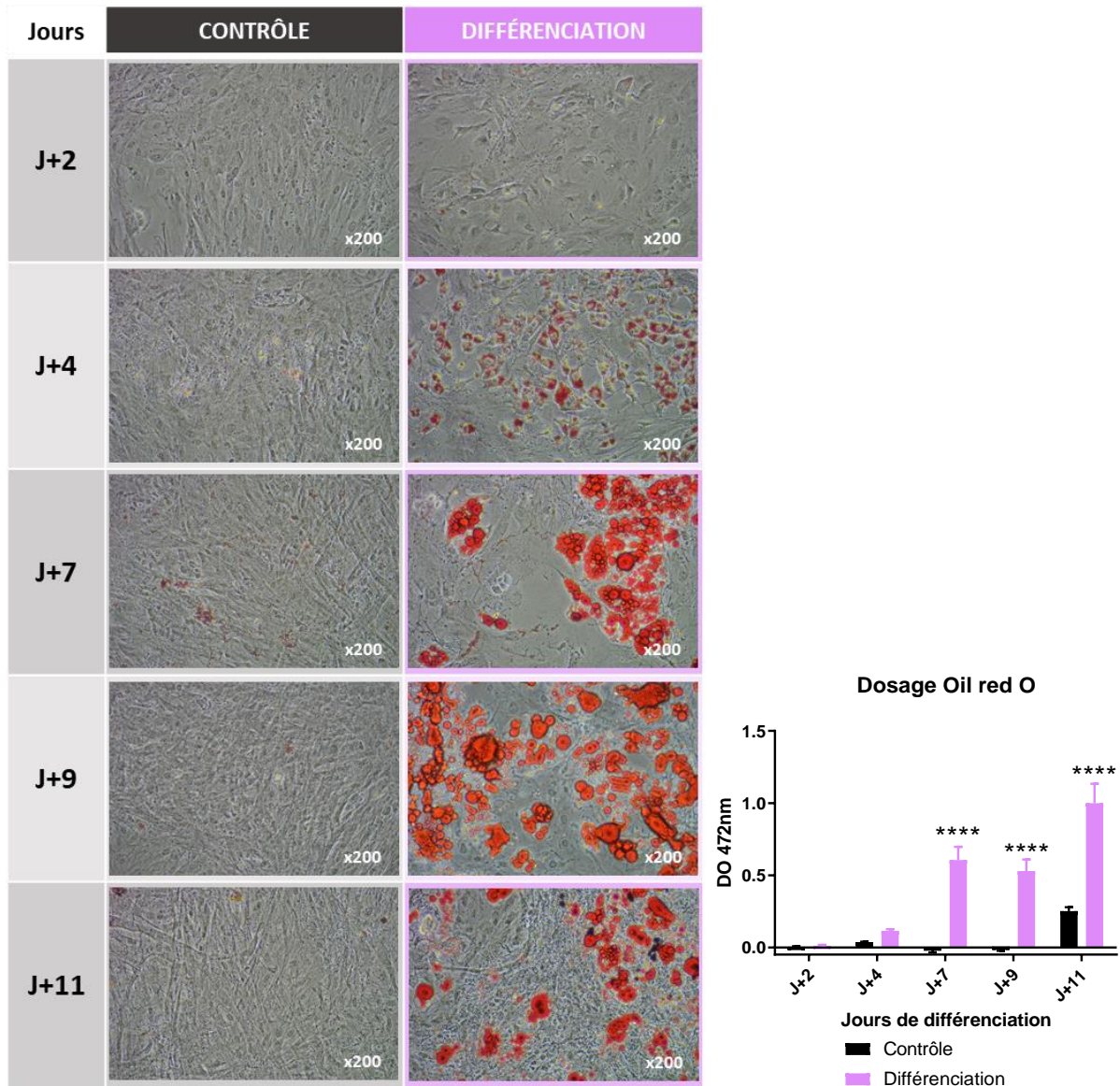
ORO : Oil Red O, PCR : Polymerase Chain Reaction.

La différenciation adipocytaire est consécutive à l'activation de l'expression de gènes par des facteurs de transcription, dont CEBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Ces cellules commencent non seulement à exprimer les gènes nécessaires à la fonction adipocytaire, mais subissent également des changements de morphologie pour devenir des adipocytes arrondis avec une large vacuole lipidique. Le marquage à l'Oil Red O permet une identification morphologique rapide des adipocytes matures stockant des lipides et les analyses d'expression géniques permettent de détecter les différents stades d'induction de la différenciation.



*a. Suivi de la différenciation par marquage à l'Oil Red O*

L'analyse des résultats de la coloration à l'Oil Red O indique que la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et des préadipocytes en adipocytes est bien induite par notre protocole de différenciation (**Figure 61**).



**Figure 61. Marquage à l'Oil Red O à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation et détermination spectrophotométrique de la quantité d'Oil Red O intracellulaire.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe Contrôle sont symbolisées par \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

En effet, les observations microscopiques après coloration à l'Oil Red O nous permettent de mettre en évidence le début du stockage de lipides dès le jour 4 et la présence d'une large vacuole lipidique teintée de rouge au jour 7, caractéristique des adipocytes. Ces

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire

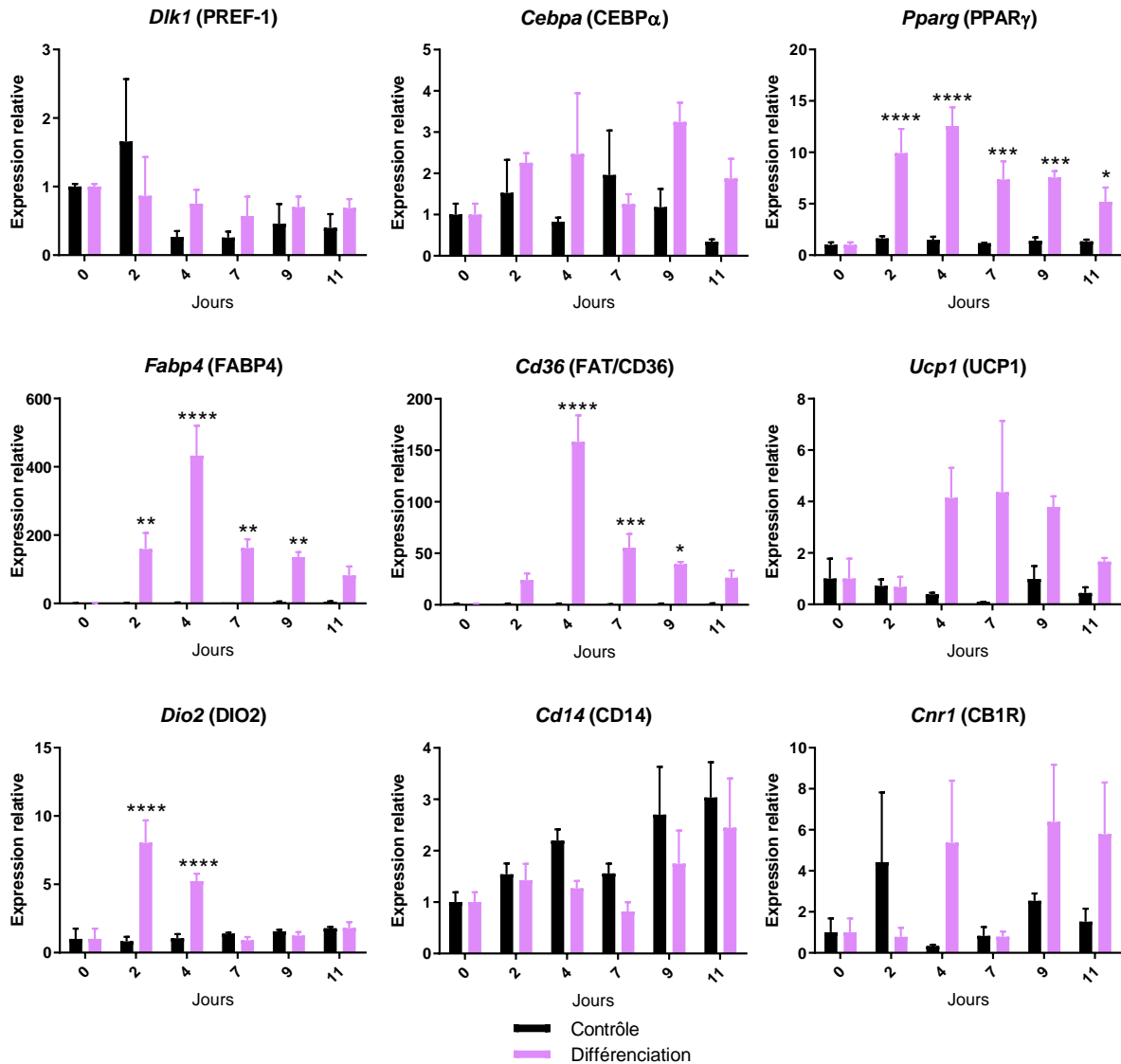
observations sont confirmées par le dosage colorimétrique qui montre une forte augmentation du stockage des lipides à partir du jour 7. La coloration n'est pas visible dans les puits contrôles, ce qui valide l'efficacité du milieu de différenciation sélectionné.

#### *b. Suivi de la différenciation par mesure de l'expression génique*

Concernant les marqueurs moléculaires, nous avons dans un premier temps examiné l'expression de *Dlk-1* (codant pour PREF-1) qui joue un rôle crucial dans les premières étapes de la différenciation adipocytaire. L'expression constitutive de PREF-1 inhibe l'adipogenèse (Jing et al., 2009; H. S. Sul, 2009) et il a été démontré qu'une régulation négative de PREF-1 est nécessaire pour que la différenciation des préadipocytes s'opère (Hudak & Sul, 2013). Ainsi, il est fortement exprimé dans les préadipocytes (dont la lignée 3T3-L1), mais n'est pas détectable dans les cellules adipeuses matures (Smas & Sul, 1996). La dexaméthasone, l'IBMX et l'insuline, trois composants des agents de différenciation standards et retrouvés dans notre milieu de différenciation, inhibent la transcription de *Dlk-1* et favorisent ainsi l'adipogenèse (H. Sul et al., 2000). Toutefois, dans nos expériences nous n'observons pas de baisse drastique de l'expression de *Dlk-1* au cours du temps (**Figure 62**).

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'expression de *Dlk-1* est déjà très diminuée au temps T0. En effet, les cellules ont précédemment été soumises à une phase de croissance cellulaire de 10 jours permettant d'atteindre un état de confluence de 100% indispensable à la bonne différenciation des préadipocytes (Djian et al., 1982; Pairault & Green, 1979). Un arrêt de croissance (confluence de 100%) induit les facteurs de transcription CEBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (H. Sul et al., 2000). De plus, la régulation négative de l'expression de *Dlk-1* est décrite comme un processus rapide (Hudak et al., 2014). Les gènes *Cebpa* et *Pparg* sont d'ailleurs détectés à T0, témoignant d'une possible initiation de la différenciation.

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire



**Figure 62. Mesures d'expression génique à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe Contrôle sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

L'expression de *Cebpa* et *Pparg* peut être induite par des composés capables d'activer certaines voies comme celle de l'AMPC ou celle liée aux récepteurs aux glucocorticoïdes. Le milieu de différenciation (MCC, insuline, IBMX, dexaméthasone, indométacine, rosiglitazone) utilisé dans notre protocole semble remplir sa fonction à en juger par l'augmentation de l'expression de *Cebpa* et *Pparg*. On note toutefois une augmentation plus marquée pour *Pparg* que pour *Cebpa*, ce qui pourrait s'expliquer par la présence de rosiglitazone (puissant inducteur de PPAR $\gamma$ ). Ces facteurs de transcription stimulent à leur tour l'expression de gènes favorisant l'adipogenèse. La différenciation se caractérise par l'apparition de nombreuses protéines du métabolisme lipidique dont les

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire

transporteurs membranaires d'acides gras FAT/CD36 et les transporteurs cytosoliques FABP4. Dans notre étude, l'expression des gènes codant pour ces deux protéines est augmentée à partir du 2<sup>ème</sup> jour de différenciation avec un pic observé au jour 4 démontrant ainsi la bonne induction du processus d'adipogenèse et la formation d'adipocytes matures au sein de notre culture de cellules de FSV.

UCP1 et DIO2 (Déionidase de Type 2) sont quant à elles deux protéines majoritairement exprimées au sein des adipocytes bruns (Kozak, 2011). DIO2 est une enzyme capable de convertir l'hormone thyroxine (T4) en sa forme active triiodothyronine (T3) qui, en agissant sur son récepteur, régule l'expression de la protéine UCP1. Leur augmentation d'expression dans des adipocytes blancs est synonyme d'induction d'un processus de brunissement avec installation d'une activité thermogénique (Shabalina et al., 2013). Dans nos expériences, ces deux marqueurs voient leur expression augmentée aux jours 2 et 4 (non statistique pour *Ucp1*) ce qui pourrait correspondre à une action de la rosiglitazone présente dans le milieu de différenciation (Elabd et al., 2009). Cela pourrait également traduire le fait que, lors de leur différenciation, les adipocytes présentent un phénotype transitoire proche de celui des adipocytes bruns comme proposé par Jo et collaborateurs en 2011. Ainsi, ces observations suggèrent que notre protocole pourra être adapté pour étudier l'impact de composés sur le brunissement.

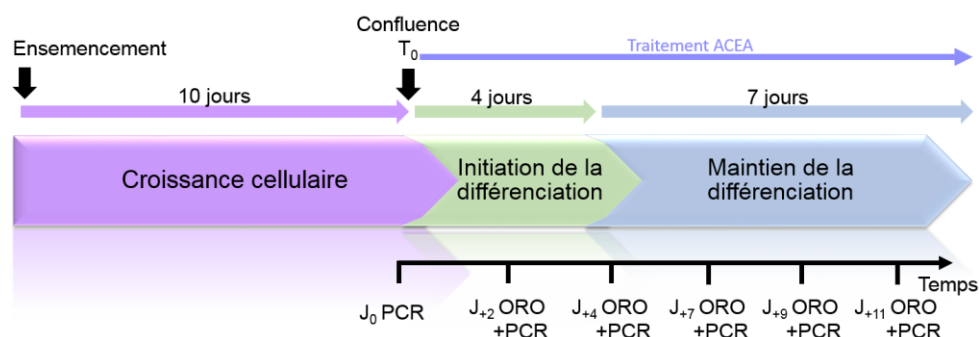
L'expression du marqueur *Cd14* a été mesurée afin d'estimer la présence éventuelle de macrophages pro-inflammatoires de type M1 et ainsi d'apprécier la pureté de nos cellules. En effet, compte tenu des conditions de préparation, il ne devrait pas, en théorie, y avoir de macrophages présents. Toutefois ce point mérite d'être vérifié puisque leur présence pourrait modifier le microenvironnement par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et ainsi avoir un impact sur la différenciation. Dans cette expérience, aucune modification de l'expression de *Cd14* n'a été relevée suggérant la pureté de notre préparation cellulaire et l'absence de différenciation de macrophages pendant la durée.

Enfin, nous avons mesuré l'expression génique du CB1R, afin de valider la possibilité de traiter ces cellules avec des activateurs ou inhibiteurs de ces récepteurs. Les ARNm codant pour CB1R dans ces cultures de cellules de la FSV ont bien été détectés et nous avons observé une tendance à l'augmentation de leur quantité au cours de la différenciation. Ces données suggèrent la présence des CB1R au sein des adipocytes à tous les stades de la différenciation et la possibilité d'une activation par les ECs produits *in vivo* par les

adipocytes matures. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une expérience préliminaire visant à évaluer les effets de l'activation des CB1R par l'ACEA sur la différenciation des cellules de la FSV de souris minces.

## B. Effet de l'activation des CB1R sur la différenciation de cellules de la FSV de souris minces

En parallèle de l'expérience décrite précédemment, des puits ont été traités avec un ajout d'ACEA à 1 $\mu$ M (agoniste des CB1R non métabolisable) ou de véhicule dans le milieu pendant toute la durée de la différenciation, c'est-à-dire pendant les 4 jours d'initiation mais aussi pendant les 7 jours de maintien (**Figure 63**). De la même manière, la différenciation a été suivie par coloration à l'Oil Red O et analyse de l'expression génique (Matériel et Méthodes, **Partie III.D.2**).

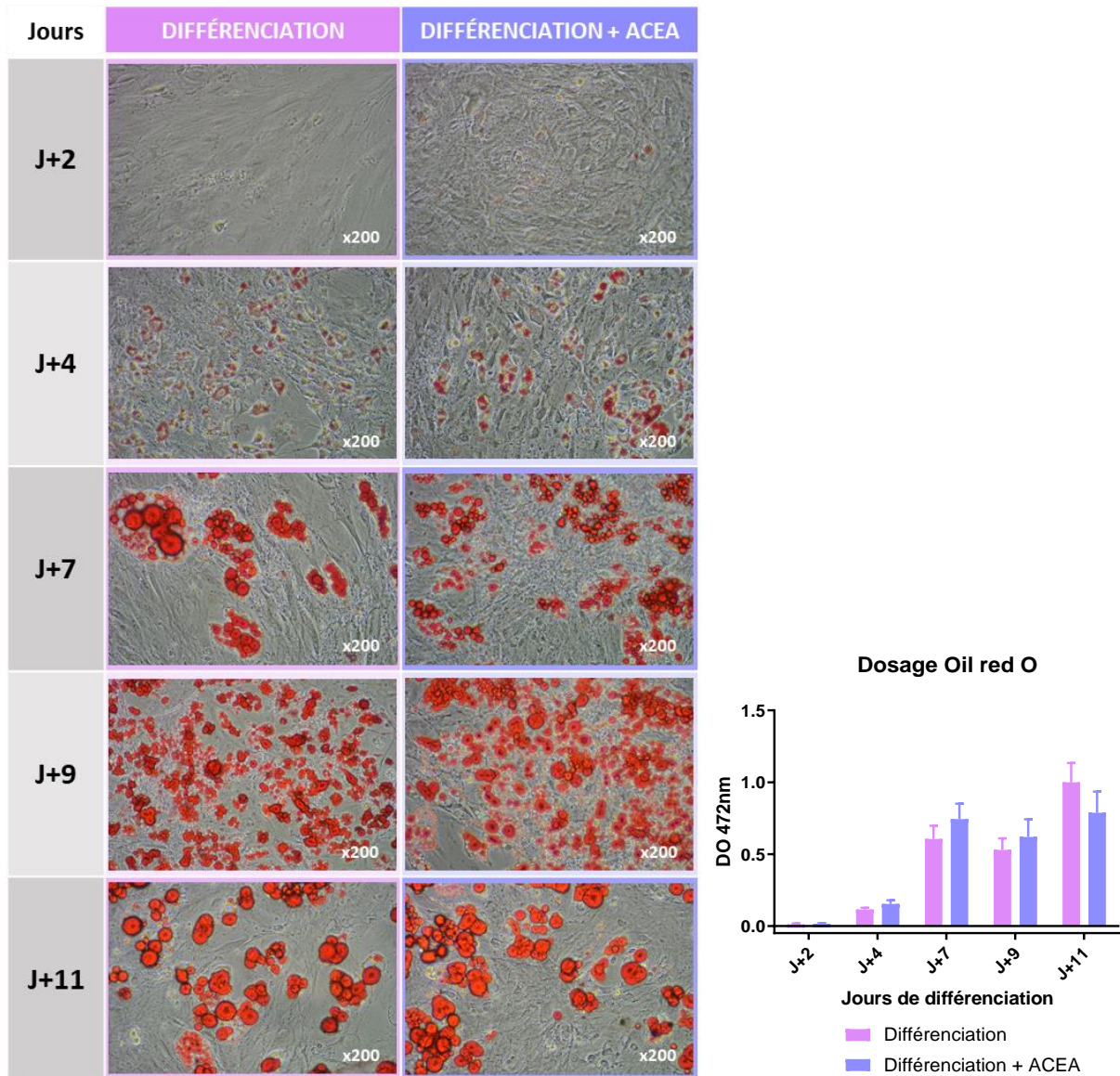


**Figure 63. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées à l'ACEA.**

ORO : Oil Red O, PCR : Polymerase Chain Reaction.

### 1. Coloration à l'Oil Red O

L'observation au microscope des cellules après coloration à l'Oil Red O ne révèle pas de différences concernant la taille et le nombre de gouttelettes lipidiques entre les puits traités à l'ACEA et ceux traités au véhicule. Ce constat visuel est confirmé par le dosage spectrométrique du colorant (**Figure 64**).



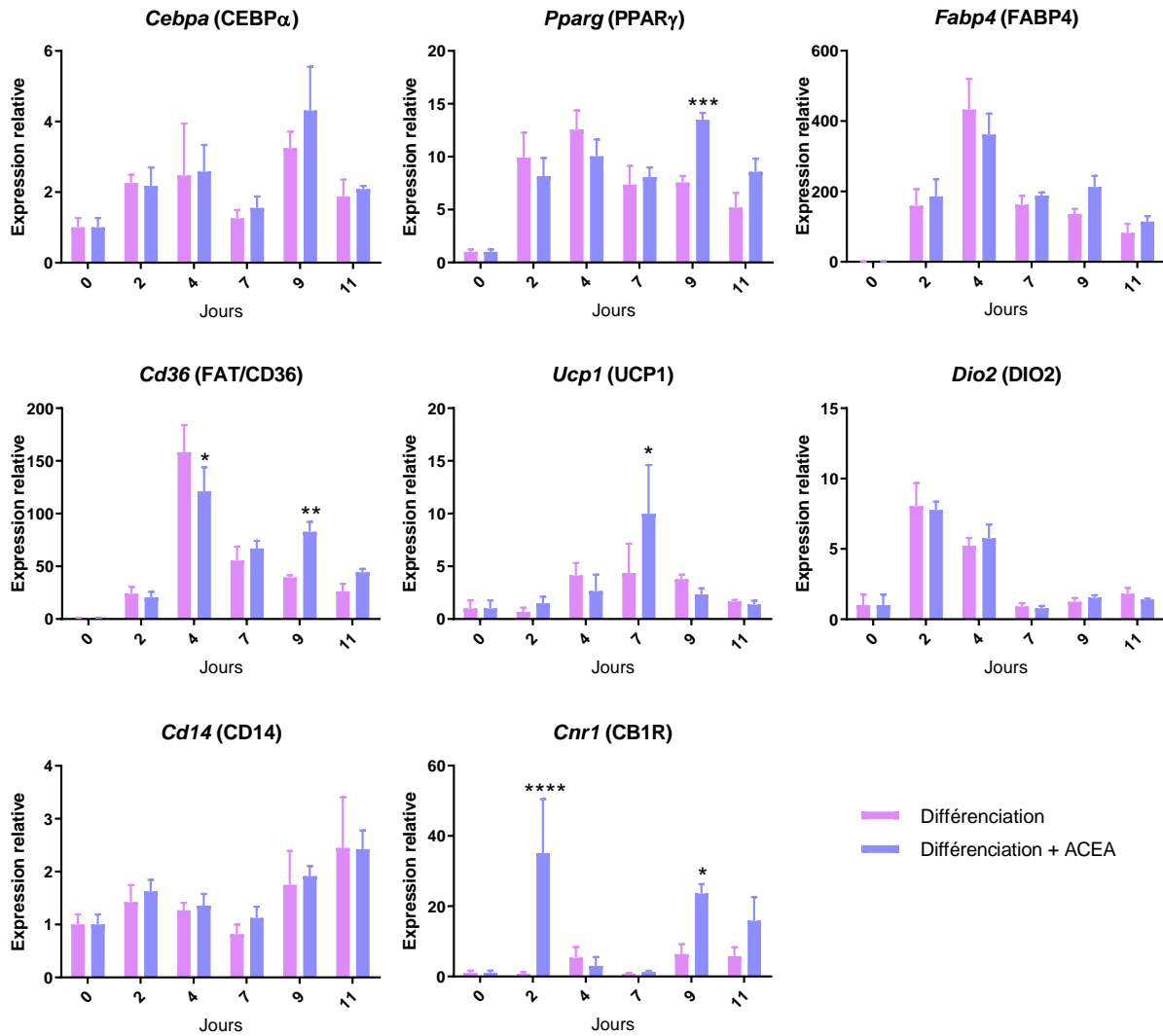
**Figure 64. Marquage à l’Oil Red O à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation en présence ou non d’ACEA.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

## 2. Mesure de l’expression génique

L’analyse moléculaire ne révèle pas d’effets marqués de l’ACEA sur l’expression des marqueurs de différenciation (**Figure 65**). L’expression du facteur de transcription *Ppar $\gamma$*  est significativement induite par l’ACEA au 9<sup>ème</sup> jour et elle est associée à une augmentation de l’expression de *Cd36*. Ceci suggère que l’activation des CB1R pourrait favoriser le captage et le transport intracellulaire des AG, favorisant ainsi la lipogenèse dans les adipocytes matures.

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire



**Figure 65. Mesures d'expression génique à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 en présence ou non d'un traitement à l'ACEA.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe Différenciation sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La présence d'ACEA a par ailleurs induit l'expression de *Cnr1* (codant pour CB1R) au temps 9 jours. Ces résultats concordent avec les études de Karaliota et collaborateurs réalisées en 2009 qui ont observé, en présence d'AEA, une induction de la différenciation associée à une hausse de l'expression de *Pparg* et *Cnr1*, sur un modèle d'adipocytes de rat. Ces données suggèrent donc que l'activation des CB1R par l'ACEA promeut la différenciation adipocytaire bien qu'aucune modification qualitative ou quantitative des résultats de la coloration à l'Oil Red O n'ait été notée à ce stade. L'induction de l'expression de la protéine thermogénique UCP1 consécutive à l'activation des CB1R par l'ACEA, peut également être relevée. Cette hausse concorde avec les résultats de Miralpeix et

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire

collaborateurs en 2019 qui ont relevé que l'augmentation des concentrations plasmatiques d'ECs, observée au cours de l'obésité, s'accompagnait d'une hausse de l'expression des marqueurs thermogéniques dans le TA brun.

Nous avons également vérifié que l'ACEA ne stimulait pas l'expression de *Cd14* qui aurait pu traduire la différenciation de cellules inflammatoires.

L'expression de *Cnr1* a également été fortement stimulée par l'ACEA au temps 2 jours qui correspond à la période d'induction de la différenciation par le milieu de culture additionné d'insuline, d'IBMX, de dexaméthasone, d'indométacine et de rosiglitazone, suggérant une interaction entre l'un de ces facteurs et les voies de régulation du récepteur.

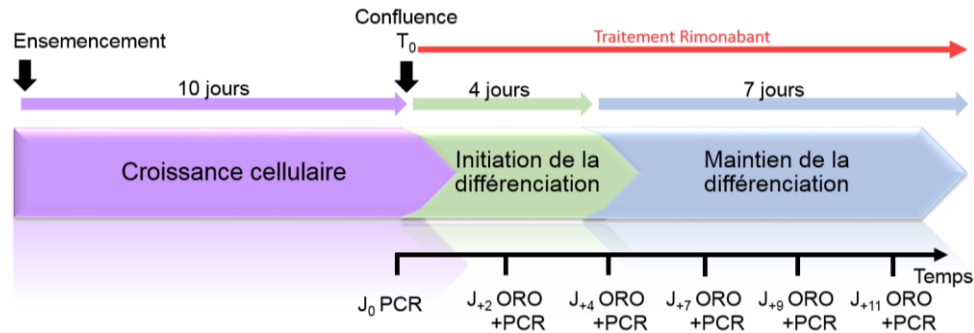
Ces expériences préliminaires démontrent que notre protocole est adapté à l'étude des conséquences de l'activation du SEC sur l'adipogenèse. Même si les premiers résultats suggèrent que l'activation des CB1R pourrait favoriser la lipogenèse, il n'est pas exclu que des effets sur la phase de différenciation existent. C'est pourquoi, il conviendra par la suite de faire correspondre les périodes de traitement avec les différentes phases de l'adipogenèse.

### C. Effets du blocage des CB1R sur la différenciation de la FSV de souris obèses

Le même type d'expérience a également été réalisé en utilisant des souris soumises à régime hyperlipidique, avec pour principal objectif de vérifier que notre protocole d'isolement et de culture de cellules de FSV s'applique au TA obèse. Le SEC étant hyperactivé dans le TA hypertrophié et les antagonistes des CB1R étant capables de diminuer la masse grasse, il semblait intéressant d'étudier l'effet du Rimonabant sur les différentes étapes de la différenciation. Tout comme pour le traitement *in vitro* avec l'ACEA sur les cellules de la FSV issues de souris minces, du Rimonabant (1 $\mu$ M) a été ajouté pendant toute la durée de la différenciation (**Figure 66**). Enfin, l'évolution de la différenciation a été suivie par coloration à l'Oil Red O et analyse de l'expression génique.



### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire



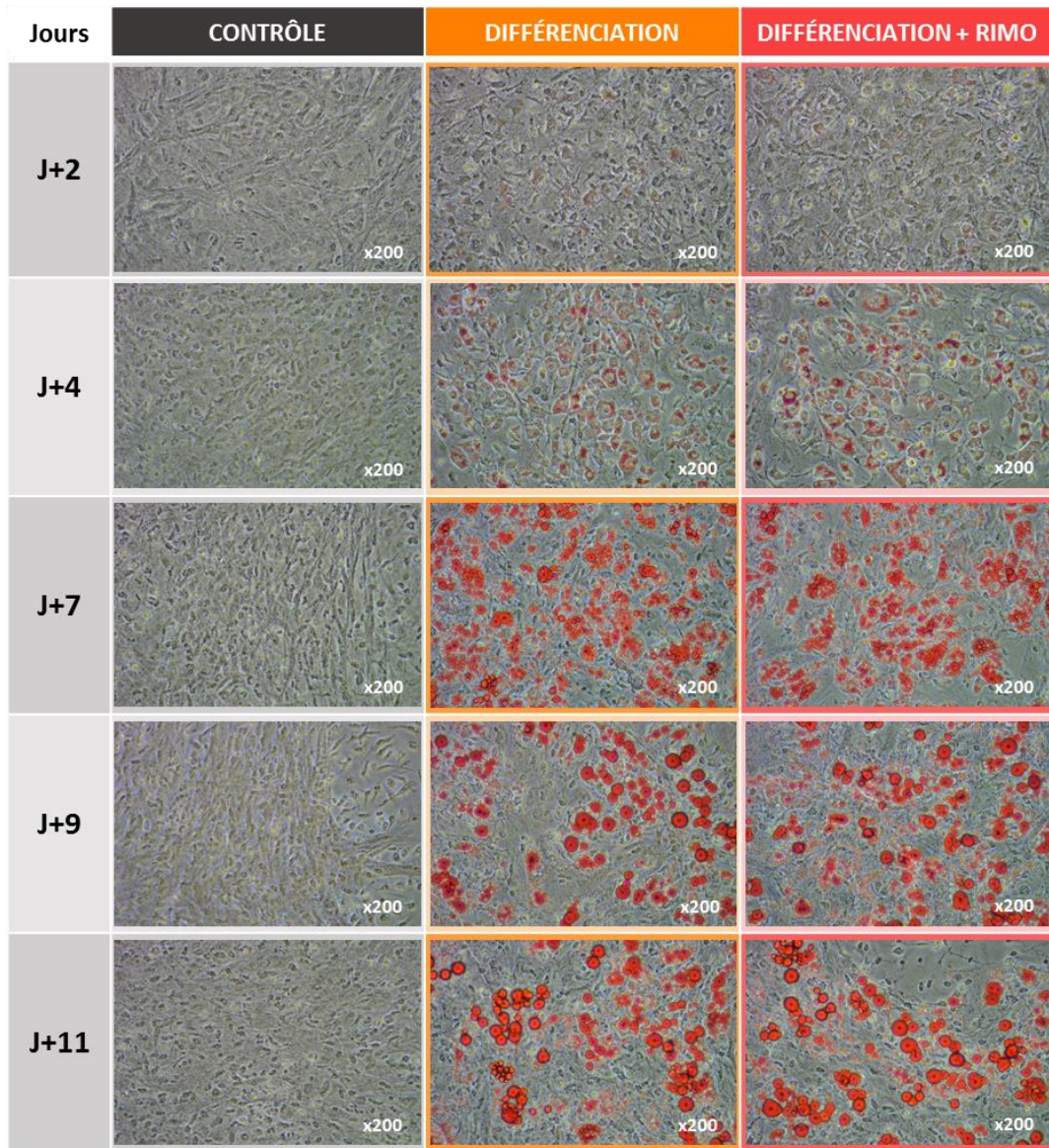
**Figure 66. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées au Rimonabant.**

ORO : Oil Red O, PCR : Polymerase Chain Reaction.

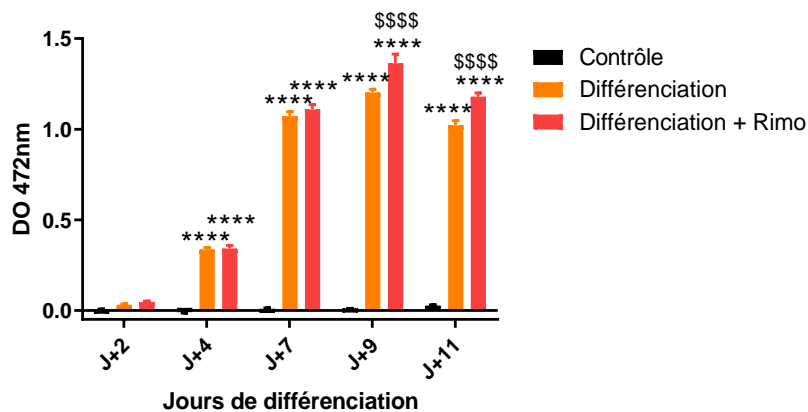
#### 1. Coloration à l'Oil Red O

Ces expériences nous ont tout d'abord permis de valider le protocole d'isolement, de mise en culture et d'induction de la différenciation sur des cellules de la FSV issues de souris obèses. En effet, un nombre suffisant de cellules de la FSV a pu être isolé et leur croissance cellulaire, ainsi que leur morphologie, étaient comparables à celles observées chez la souris mince. La coloration à l'Oil Red O permet de mettre en évidence une bonne induction de la différenciation avec une augmentation de la coloration dès le 4<sup>ème</sup> jour de différenciation (**Figure 67**). Il est très intéressant de noter qu'à partir du 9<sup>ème</sup> jour de différenciation, la coloration à l'Oil Red O est significativement plus marquée dans les adipocytes traités au Rimonabant que dans ceux traités avec le véhicule (**Figure 67**). De prime abord, ce résultat semble suggérer que l'inactivation des CB1R favorise l'accumulation de lipides dans les adipocytes matures.

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire



**Dosage Oil red O**



**Figure 67. Marquage Oil Red O à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 de différenciation à partir de FSV de souris obèse en présence ou non de Rimonabant.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe Contrôle sont symbolisées par \*\*\*\*  $p < 0,0001$  ; Les différences statistiques par rapport au groupe Différenciation sont symbolisées par \$\$\$  $p < 0,0001$ .

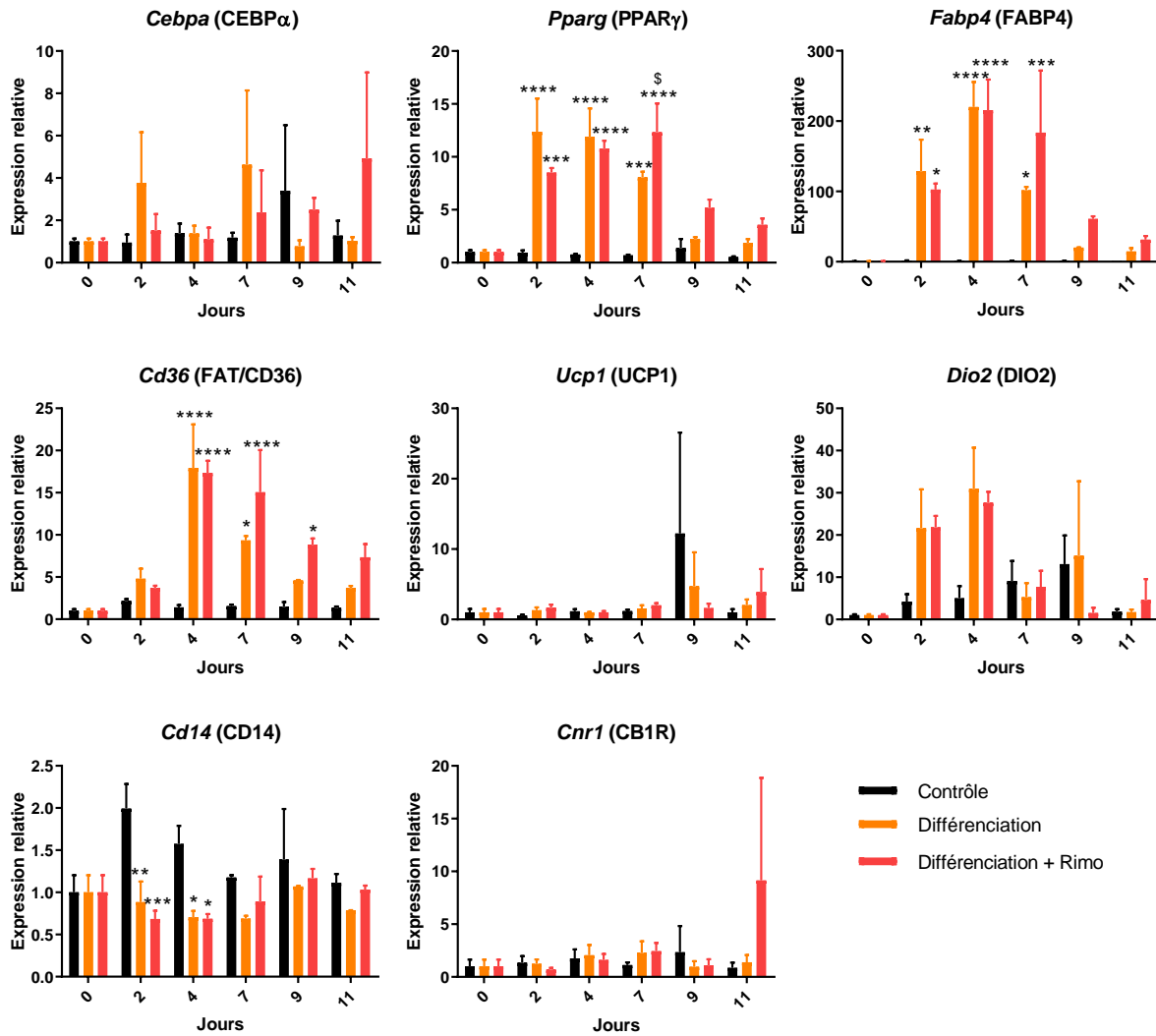
## 2. Mesure de l'expression génique

Les données issues des colorations Oil Red O ne permettent pas de déterminer s'il s'agit d'une augmentation du nombre d'adipocytes accumulant des lipides (induction de la différenciation) ou d'une quantité plus importante de lipides contenus dans chaque adipocyte (lipogenèse). Cette question revêt une importance particulière car une stimulation de la lipogenèse dans des adipocytes différenciés peut conduire à une hypertrophie et à un métabolisme pathologique. A l'inverse, une induction de la différenciation de préadipocytes néo-recrutés peut permettre de répartir la charge lipidique dans un plus grand nombre de cellules saines et d'augmenter ainsi le potentiel de stockage. C'est cette dernière situation qui est rencontrée lors d'un traitement par les glitazones (de Souza et al., 2001). L'analyse des cinétiques d'expression des marqueurs pourrait nous renseigner à ce sujet.

D'une manière générale, les profils d'expression des marqueurs au cours de la différenciation sont similaires aux observations faites sur les cellules de la FSV issues de souris minces. Ainsi, une forte augmentation de l'expression du gène codant pour PPAR $\gamma$  dès le 2<sup>ème</sup> jour de différenciation est retrouvée. Elle s'accompagne d'une régulation à la hausse de l'expression de *Cd36* et *Fabp4* respectivement dès le 4<sup>ème</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour (**Figure 62 et 68**).

Il est à noter que la présence de Rimonabant induit une hausse de l'expression de *Pparg* à 7 jours de différenciation. Ceci peut être rapproché des données issues de la coloration Oil Red O indiquant une augmentation du stockage des lipides en présence de Rimonabant, à 9 et 11 jours de différenciation (**Figure 67**). Une accélération de la différenciation induite par le Rimonabant, comme suggérée par la hausse d'expression de *Pparg*, pourrait être la résultante de son action sur l'AMPc intracellulaire. En effet, la fixation du Rimonabant sur les CB1R limite l'activation de la protéine G $_{i/o}$  à l'origine d'une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase (Howlett, 1995) qui conduit à augmenter les taux intracellulaires d'AMPc (J. Yarwood et al., 1998), élément potentialisateur de l'adipogenèse (Reusch et al., 2000). Une potentialisation de l'adipogenèse consécutive à l'action du Rimonabant pourrait être en faveur d'une expansion du TA mais également comme évoqué précédemment, d'une réduction de la proportion des adipocytes hypertrophiques caractéristiques du TA pathologique.

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire



**Figure 68. Mesures d'expression génique à J+2, J+4, J+7, J+9 et J+11 à partir de FSV de souris obèses en présence ou non de Rimonabant.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe Contrôle sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$  ; Les différences statistiques par rapport au groupe Différenciation sont symbolisées par \$  $p < 0,05$ .

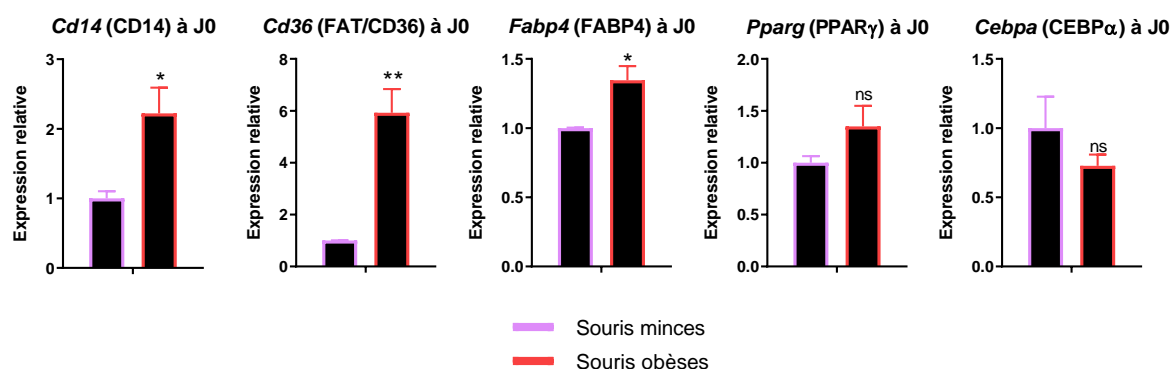
Par ailleurs, le Rimonabant n'a pas modifié l'expression des gènes codant pour *Ucp1* et *Dio2*, impliqués dans les processus de brunissement du TA (**Figure 68**). Ces résultats sont plutôt inattendus puisqu'il a déjà été montré que le blocage des CB1R par cet antagoniste pouvait être à l'origine d'une trans-différenciation d'adipocytes blancs vers un phénotype brun, associée à une forte induction de l'expression d'*Ucp1* (Perwitz et al., 2010). Toutefois, dans cette étude utilisant une lignée d'adipocytes humains blancs immortalisés, l'origine du dépôt adipeux n'est pas précisée et il est très probable qu'il s'agisse de TASC, plus enclin au brunissement que le TAV (Zuriaga et al., 2017). Dans notre cas, les cellules de la FSV étant issues de TAV murin, il est possible qu'elles soient réfractaires au

brunissement. C'est pourquoi, il est programmé de réitérer cette étude sur des cellules de la FSV issue de TASC.

Dans l'expérience précédente réalisée sur des cellules de la FSV de souris minces, l'activation des CB1R par l'ACEA avait stimulé sa propre expression. Dans ce cas, l'expression de *Cnr1* ne semble pas être modifiée par l'action antagoniste du Rimonabant.

## D. Conclusion

Même si les profils d'expression des marqueurs au cours de la différenciation semblent similaires pour les cellules de la FSV issues de souris minces et obèses, l'analyse des résultats de qPCR laisse entrevoir des différences concernant les caractéristiques des cellules au temps 0. Par exemple, l'expression « basale » de *Cd36* et *Fabp4* apparaît nettement plus élevée dans la FSV issue de souris obèses par rapport à celle issue de souris minces (**Figure 69**). Finalement, ceci suggère la présence d'un plus grand nombre de cellules ayant commencé leur différenciation au temps 0. Il en est de même pour le marqueur d'inflammation *Cd14* qui tend à être surexprimé dans la FSV obèse, indiquant une probable contamination par des macrophages.



**Figure 69. Mesure d'expression génique à J0 à partir de FSV de souris minces et obèses.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au groupe de souris minces sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

Il conviendra donc, au cours des prochaines expérimentations, d'étudier en plus de la différenciation, l'impact des agonistes et antagonistes CB1R sur l'étape proliférative des cellules souches mésenchymateuses et préadipocytes. En effet, La prolifération des

### III. Etude du rôle du SEC sur la différenciation adipocytaire

précurseurs adipocytaires pourrait être modulée par les ECs, notamment ceux sécrétés par le TA, et pourraient ainsi contribuer au développement de TA pathologique.

De la même manière, il est maintenant bien établi que les dépôts viscéraux et sous-cutanés ont des caractéristiques distinctes puisque le premier affecte davantage l'état métabolique des individus obèses que le second (Tran & Kahn, 2010). La graisse viscérale a un niveau plus élevé de macrophages infiltrés, de lymphocytes T et de cellules NK (O'Rourke et al., 2009) et est liée à la libération de cytokines pro-inflammatoires, contribuant au risque accru de maladies liées à l'obésité (Tran & Kahn, 2010). Les résultats présentés ici proviennent uniquement de l'étude du TAV murin. Compte tenu des différences métaboliques entre le TAV et le TASC, il serait important d'inclure à ce projet une étude comparative entre ces dépôts adipeux.

En parallèle, il conviendra d'inclure des analyses par cytométrie permettant d'évaluer la viabilité cellulaire, la pureté de nos isollements et de caractériser les populations cellulaires. De plus, nous pourrions également réaliser des analyses fonctionnelles sur les adipocytes nouvellement différenciés incluant des mesures de production d'ECs, d'adipokines et d'activité lipolytique.

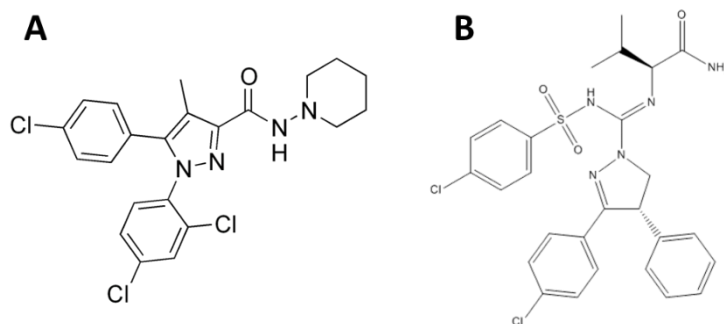
## IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

Dans l'optique d'étudier les effets à plus long terme du blocage des CB1R du TA, nous avons entrepris de réaliser des études chroniques sur des souris obèses traitées par des antagonistes CB1R dont l'action est limitée à la périphérie. Les effets de ces composés sur le métabolisme glucido-lipidique seront étudiés et un intérêt particulier sera porté aux conséquences de l'inactivation des CB1R sur le TA avec une distinction entre les différents dépôts. Ces résultats seront comparés à ceux de l'antagoniste CB1R de référence, le Rimonabant. Le premier composé utilisé est un bloqueur CB1R déjà caractérisé issu du commerce, le JD-5037 (Chorvat et al., 2012), récemment renommé CRB-4001 et actuellement en phase de développement clinique (Société Corbus Pharmaceuticals).

Dans cette partie, nous utiliserons également d'autres antagonistes CB1R strictement périphériques, synthétisés par l'EA1155 « Chimie Médicinale et Drug Discovery » IICiMed de la Faculté de Pharmacie de Nantes dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur Jean-Michel Robert. Le fait que ces molécules soient en phase de maturation et pas encore caractérisées nous a conduit à tester au préalable leur activité vis-à-vis du CB1R grâce à une méthode *in vitro*, avant la mise en place d'études chroniques *in vivo*.

### A. JD-5037

La première étude chronique réalisée a concerné le Rimonabant et le JD-5037 (**Figure 70**). JD-5037 est une molécule déjà caractérisée comme agoniste inverse vis-à-vis de CB1R et qui ne passe pas la BHE (Tam et al., 2012). Des effets bénéfiques ont été rapportés dans le cadre du traitement de l'obésité avec notamment des effets sur la tolérance au glucose, la résistance à l'insuline, la triglycémie à jeun, la masse du foie et les enzymes hépatiques (Cinar et al., 2014; J. Liu et al., 2019; Tam et al., 2012).



**Figure 70. Structure moléculaire (A) du Rimonabant et (B) de JD-5037.**

## 1. Étude chronique

### a. Méthodologie

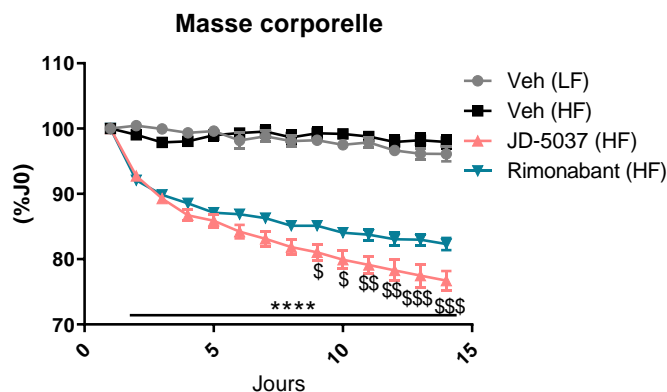
Pour l'étude chronique des souris C57BL/6J, rendues obèses par un régime hyperlipidique à base de lard, ont reçu une dose quotidienne par gavage de Rimonabant (10mg/kg), de JD-5037 (3mg/kg) ou de véhicule pendant 14 jours (Matériel et Méthodes, **Partie IV.B.1**). La posologie de JD-5037 est plus faible que celle du Rimonabant puisque ce composé possède une affinité plus importante pour CB1R et ces posologies sont bien documentées (Tam et al., 2012). En parallèle, un lot contrôle a été constitué avec des souris minces traitées par gavage avec le véhicule. Le poids des animaux a été suivi quotidiennement durant le traitement. A l'issue du traitement, les souris ont été sacrifiées en vue de réaliser des analyses (dosages plasmatiques, analyses d'expression génique, production d'ECs par le TAV et le TASC, etc.).

### b. Évolution de la masse corporelle et des paramètres plasmatiques

Les pesées sur les 14 jours de traitement démontrent une réduction très importante ( $p < 0,0001$ ) de la masse corporelle des souris obèses dès le deuxième jour de traitement avec le Rimonabant et le JD-5037 (**Figure 71**). A partir du 9<sup>ème</sup> jour de traitement une différence de perte de poids apparaît entre les souris obèses traitées au JD-5037 et celles traitées au Rimonabant avec une perte de poids plus marquée chez les souris traitées avec le JD-5037.



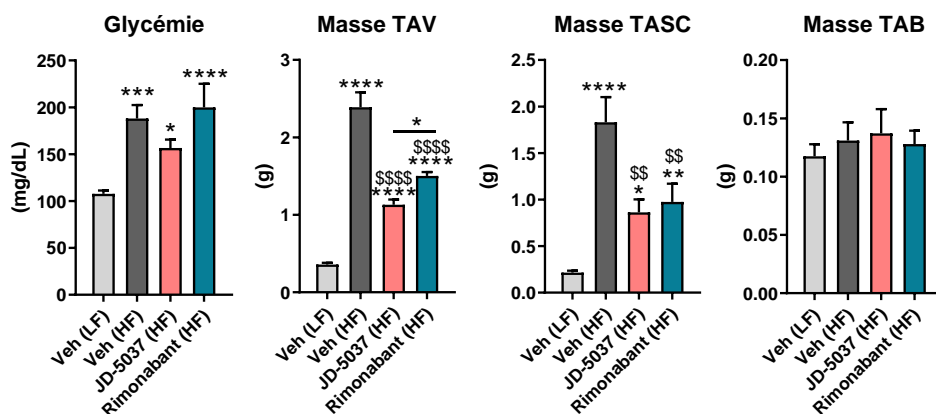
#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



**Figure 71. Variation de la masse corporelle pendant les 14 jours de traitement.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (Low Fat - LF) et au Veh (High Fat - HF) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; Les différences statistiques entre JD-5037 (HF) et Rimonabant (HF) sont symbolisées par \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  et \$\$\$  $p < 0,001$ . Veh : Véhicule.

Comme attendu, le régime hyperlipidique a induit une forte augmentation de la masse de TA blanc sans toutefois affecter le TA brun. La perte de masse corporelle observée chez les souris obèses traitées avec l'une ou l'autre des molécules est associée à une diminution de la masse grasse qui est similaire pour le TAV et le TASC mais ne concerne pas le TAB (**Figure 72**). D'autre part, la mesure de la glycémie à jeun révèle que les animaux obèses sont devenus hyperglycémiques et que seul le traitement avec le JD-5037 réduit significativement la glycémie à jeun.



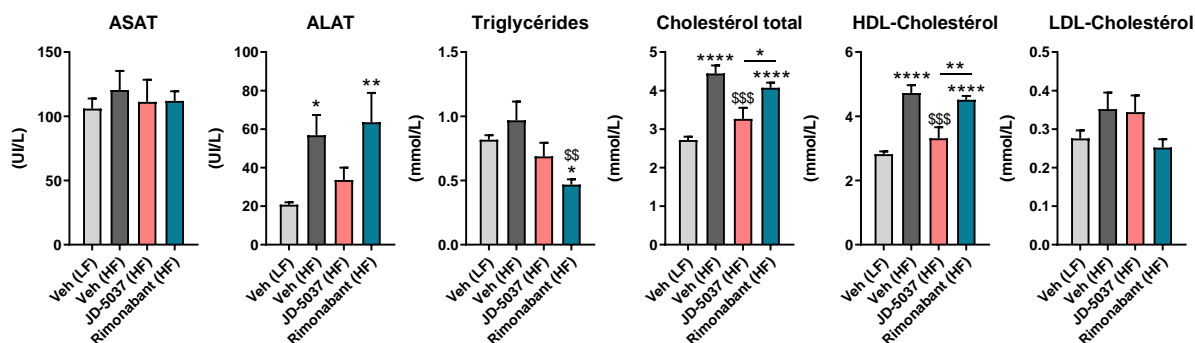
**Figure 72. Glycémie à jeun et masse des tissus adipeux.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (Low Fat - LF) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; Les différences statistiques par rapport au Veh (High Fat - HF) sont symbolisées par \$\$  $p < 0,01$  et \$\$\$  $p < 0,001$ . Veh : Véhicule, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané, TAB : Tissu Adipeux Brun.

Les enzymes hépatiques Aspartate AminoTransférase (ASAT) et Alanine AminoTransférase (ALAT) sont des marqueurs de souffrance cellulaire étudiés afin de relever une éventuelle toxicité hépatique. Aucune des deux drogues n'agit sur ces

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

paramètres. Toutefois, il est à noter que l'ALAT, augmentée après le régime hyperlipidique, n'est normalisée que par le traitement avec JD-5037. En ce qui concerne les paramètres lipidiques, une diminution des concentrations de TG avec le traitement par le Rimonabant est observée. Une diminution du cholestérol total et du HDL-cholestérol est observée après traitement oral par le JD-5037. Enfin, une tendance à la baisse du LDL-cholestérol est observable avec le traitement au Rimonabant uniquement (**Figure 73**).



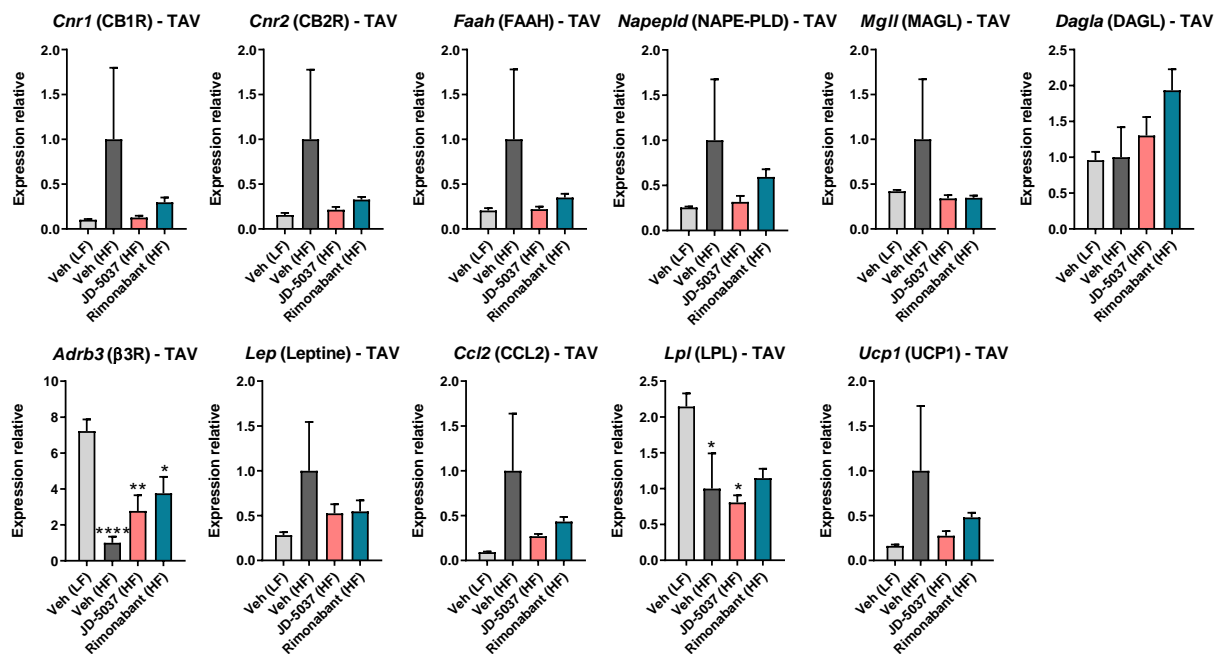
**Figure 73. Paramètres plasmatiques.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (Low Fat – LF) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,0001$ ; Les différences statistiques par rapport au Veh (High Fat – HF) sont symbolisées par \$\$  $p < 0,01$  et \$\$\$  $p < 0,001$ . Veh : Véhicule.

#### c. Expression génique dans les tissus adipeux

Le régime hyperlipidique auquel les souris ont été soumises est à l'origine, dans le TAV, d'une tendance à l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines du SEC (CB1R, CB2R, FAAH, NAPLD et MAGL) suggérant une hyperactivation de celui-ci (**Figure 74**). L'expression d'autres marqueurs pouvant renseigner sur l'état physiopathologique du TA a été mesurée. Ainsi, l'expression de *Lep* codant pour la leptine, *Ccl2* codant pour la chimiokine CCL2 ou *Ucp1* codant pour la protéine thermogénique UCP1, montre également une tendance à l'augmentation pendant que celle *Lpl* (LPL) et *Adrb3* (récepteur  $\beta_3$ -adrénergique) diminue significativement. Généralement, l'activité de la LPL dans le TA est corrélée au degré de résistance à l'insuline et aux taux circulants d'ECs, ce qui rend le résultat obtenu chez la souris obèse inattendu. Néanmoins, le gène de la LPL étant soumis à de multiples mécanismes de régulation post-traductionnelle, il est possible que la mesure des ARNm ne reflète pas la réalité physiologique (Preiss-Landl et al., 2002).

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



**Figure 74. Expression génique dans le TAV.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (Low Fat – LF) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,0001$ . HF : High Fat, Veh : Véhicule, TAV : Tissu Adipeux Viscéral.

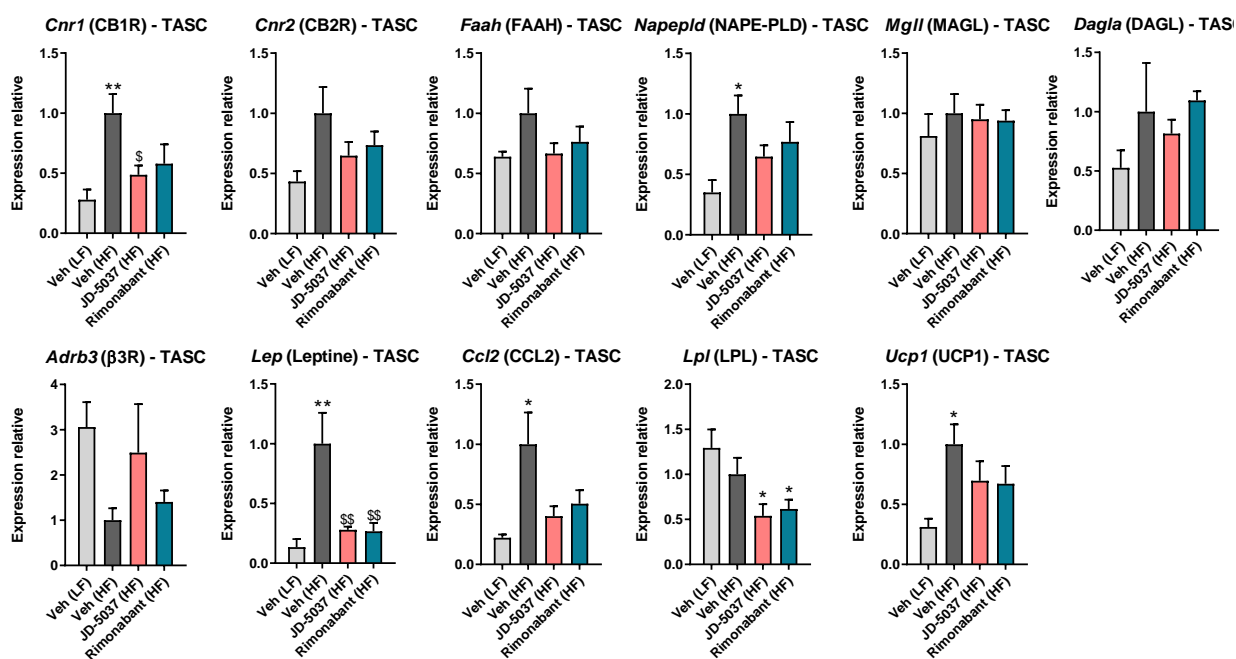
Bien que le résultat ne soit pas statistiquement significatif, l'augmentation de l'expression *Lep* est à rapprocher de l'expansion du TAV. L'expression d'*Adrb3* est très significativement diminuée dans le TAV obèse par rapport au témoin mince, en accord avec l'altération de la signalisation  $\beta$ -adrénergique rencontrée au cours de l'obésité (Collins and Surwit 2004). Une augmentation de l'expression d'*Ucp1* induite par l'obésité dans le TAV a également été décrite dans plusieurs études et interprétée comme étant une réponse adaptative de l'organisme visant à limiter la prise de poids (Bettini et al., 2019; Lim et al., 2020). Enfin, l'augmentation de l'expression de *Ccl2*, quant à elle, est caractéristique de l'état inflammatoire du TA puisque cette chimiokine est un médiateur important des processus d'infiltration de macrophages (Carson et al., 2017).

Les traitements au JD-5037 et au Rimonabant, sont à l'origine de la normalisation de l'expression d'une grande partie des marqueurs précédemment cités, notamment les marqueurs du SEC, résultats déjà observés dans la littérature pour le Rimonabant (Jbilo et al., 2005). La diminution de l'expression génique de la leptine induite par les antagonistes est caractéristique d'une amélioration du métabolisme adipocytaire (Frederich et al., 1995). De plus, la normalisation de cette expression induite par l'inactivation des CB1R a déjà été observée (Tam et al., 2012). L'obésité est aussi associée

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

à la diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique, comme déjà décrit dans la littérature (Bégin-Heick, 1996; Fève et al., 1994). Cette diminution tend à être rétablie après blocage des CB1R, ce qui témoigne d'une amélioration des capacités de mobilisation des graisses. Cette tendance est aussi retrouvée dans le cas de la chimiokine CCL2, suggérant une diminution de l'inflammation induite par l'obésité.

Le TASC présente un profil d'expression génique très proche du TAV avec une augmentation après régime hyperlipidique de l'expression génique de marqueurs du SEC (CB1R, CB2R, FAAH, NAFLD), de la leptine, de la chimiokine CCL2 et de la protéine thermogénique UCP1 (**Figure 75**). Les traitements par JD-5037 et le Rimonabant normalisent ces niveaux d'expression dans le TASC.



**Figure 75. Expression génique dans le TASC.**

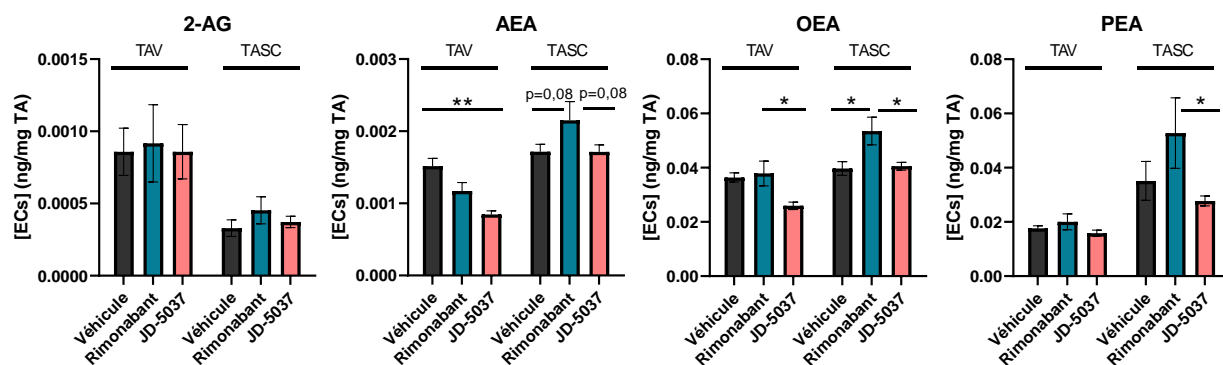
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (Low Fat – LF) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$  ; Les différences statistiques par rapport au Veh (High Fat – HF) sont symbolisées par \$  $p < 0,05$  et \$\$  $p < 0,01$ . Veh : Véhicule, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané.

Globalement, les résultats obtenus indiquent que les traitements chroniques au Rimonabant et au JD-5037 ont conduit à la diminution coordonnée de l'expression de *Cnr1*, de *Faah* et de *Napepld* dans le TAV et le TASC, renforçant encore l'idée d'un lien entre inhibition du SEC et amélioration du métabolisme du TA. Toutefois ces données ne permettent pas de savoir si les modifications observées sont la conséquence d'une action directe des antagonistes sur les CB1R du TA.

**d. Production d'ECs par le TAV et le TASC**

Étant donné que l'administration chronique des antagonistes a conduit à une perte de masse grasse conséquente et à une diminution de l'expression des principaux composants du SEC, la production d'ECs par le TAV et le TASC a été mesurée sur les trois groupes de souris obèses (Véhicule, JD-5037 et Rimonabant), à la suite des 14 jours de traitement afin d'étudier les effets à long terme.

Les valeurs obtenues représentent les quantités absolues d'ECs retrouvées dans le milieu de culture au bout d'une heure et non spécifiquement les capacités de production, puisque ces expériences ont été réalisées sans ajout d'inhibiteur des enzymes de dégradation de ces molécules. Néanmoins, nous avons démontré précédemment que la dégradation des NAEs n'était pas significative avec les explants de souris. En revanche, les valeurs concernant le 2-AG ayant été obtenues avant l'optimisation des conditions, les résultats sont donc à prendre avec précautions. Toutefois, nous avons pu observer une plus faible quantité de 2-AG dans le milieu de culture du TASC par rapport au TAV (**Figure 76**), ce qui est en accord avec l'hypothèse avancée précédemment (Résultats et Discussion **Partie II.A.3**) selon laquelle la dégradation de cet EC serait plus importante dans le TASC.



**Figure 76. Production d'ECs sur 1h par le TAV et le TASC prélevés sur des souris traitées 14 jours au JD-5037 et au Rimonabant.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ . TA : Tissu Adipeux, TAV : Tissu Adipeux Viscéral, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané.

Concernant les NAEs, les quantités d'AEA, d'OEA et de PEA ont été augmentées par le Rimonabant dans le milieu du TASC uniquement, alors que le JD-5037 n'a induit aucune variation (**Figure 76**). Cet effet inducteur du Rimonabant spécifique au TASC est en accord avec les résultats obtenus *in vitro* (**Figures 44 et 45**) qui suggéraient un effet

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

direct de la drogue sur la production des NAEs. Le JD-5037, quant à lui, a induit une diminution de la quantité d'AEA et d'OEA dans le TAV, un effet qui n'avait pas été observé *in vitro* suggérant alors un mécanisme d'action différent ou une action indirecte du JD-5037.

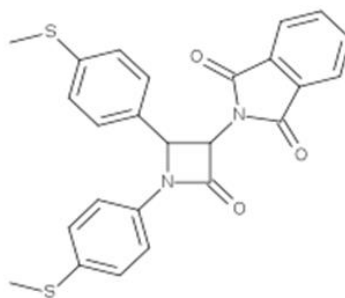
## 2. Conclusion

Les traitements chroniques oraux (gavage) par le JD-5037 à 3mg/kg et le Rimonabant à 10mg/kg ont induit une réduction de la masse corporelle ainsi qu'une amélioration globale du métabolisme glucido-lipidique qui s'accompagne, comme indiqué dans plusieurs études antérieures, de modifications marquées de l'expression de gènes clés dans différents tissus (Jourdan et al., 2010; Roger et al., 2020). L'action directe des traitements sur le TA n'est pas démontrée par nos résultats et il serait raisonnable de penser que les effets pourraient être principalement dus au blocage des CB1R présents sur d'autres organes tels que le foie, le pancréas ou les muscles. Néanmoins, il est intéressant de noter que les traitements chroniques semblent avoir modifié l'expression des enzymes de synthèse et de dégradation des ECs ainsi que leur production. La modulation des capacités sécrétoires du TA pourrait donc être à l'origine d'effets autocrines et endocrines ciblant les adipocytes, les macrophages et/ou les tissus extra-adipeux.

## B. JM-00266

JM-00266 est une molécule conçue par l'EA1155 « Chimie Médicinale et Drug Discovery » IICiMed de la Faculté de Pharmacie de Nantes et brevetée (Brevet : FR3041641A1) (**Figure 77**). Un modèle QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) établi à partir des données concernant les interactions Récepteur/Rimonabant a été utilisé pour sélectionner des molécules candidates dans une chimiothèque. Le logiciel de prédiction (SwissADME) a indiqué que la molécule JM-00266 présente une faible capacité de franchissement de la BHE.

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



**Figure 77. Structure moléculaire de JM-00266.**

Cette molécule a donc fait l'objet d'une phase de caractérisation afin de démontrer des propriétés d'antagoniste périphérique des CB1R. Les travaux publiés sur cette molécule sont présentés en **Annexe 6**. Ils présentent la méthode de synthèse de JM-00266 ainsi que ses caractéristiques pharmacocinétiques. Ils démontrent également que la molécule possède une faible capacité à franchir la BHE en comparaison au Rimonabant et qu'elle ne semble pas exercer d'effets psychotropes liés à l'activation des CB1R centraux.

Il a également été montré par la mesure des variations de concentration d'AMPC dans des cellules HEK sur-exprimant les CB1R que la molécule n'exerçait qu'une faible activité agoniste-inverse sur le récepteur. Toutefois, son caractère antagoniste a été souligné *in vivo* par sa capacité à bloquer l'action inhibitrice de l'AEA sur la motilité gastro-intestinale.

De plus, il a également été observé que la molécule JM-00266 exerçait des effets sur le métabolisme de la souris *in vivo* lors d'un traitement aigu comme notamment une amélioration de la tolérance au glucose associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Troy-Fioramonti et al., 2014).

Compte tenu des effets précédemment mis en évidence, nous avons entrepris de poursuivre la caractérisation de cette molécule dans un contexte d'obésité avec la mise en place d'une étude chronique sur modèle murin.

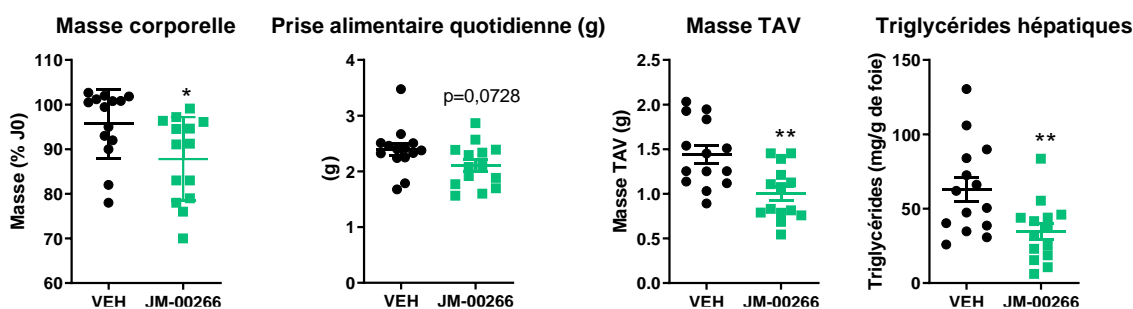
## 1. Étude chronique

### a. Méthodologie

Pour l'étude chronique des souris C57BL/6J, rendues obèses par un régime hyperlipidique, ont reçu une dose quotidienne par gavage de JM-00266 (40mg/kg) pendant 14 jours (Matériel et Méthodes, **Partie IV.B.2**). La masse corporelle et la prise alimentaire des animaux ont été suivis durant le traitement et des tests de tolérance au glucose, à l'insuline et au pyruvate ont été réalisés. Les souris ont ensuite été sacrifiées à jeun afin de collecter le sang, le TA et le foie.

### b. Evolution de la masse corporelle et paramètres plasmatiques

A la fin des 14 jours de traitement, les animaux ont présenté une réduction de leur masse corporelle ainsi qu'une légère baisse de la prise alimentaire quotidienne moyenne (**Figure 78**). Ces résultats sont associés à une baisse de la masse du TAV ainsi qu'à une diminution de la stéatose hépatique.



**Figure 78. Masse corporelle, prise alimentaire, TG hépatiques et masse du TAV.**

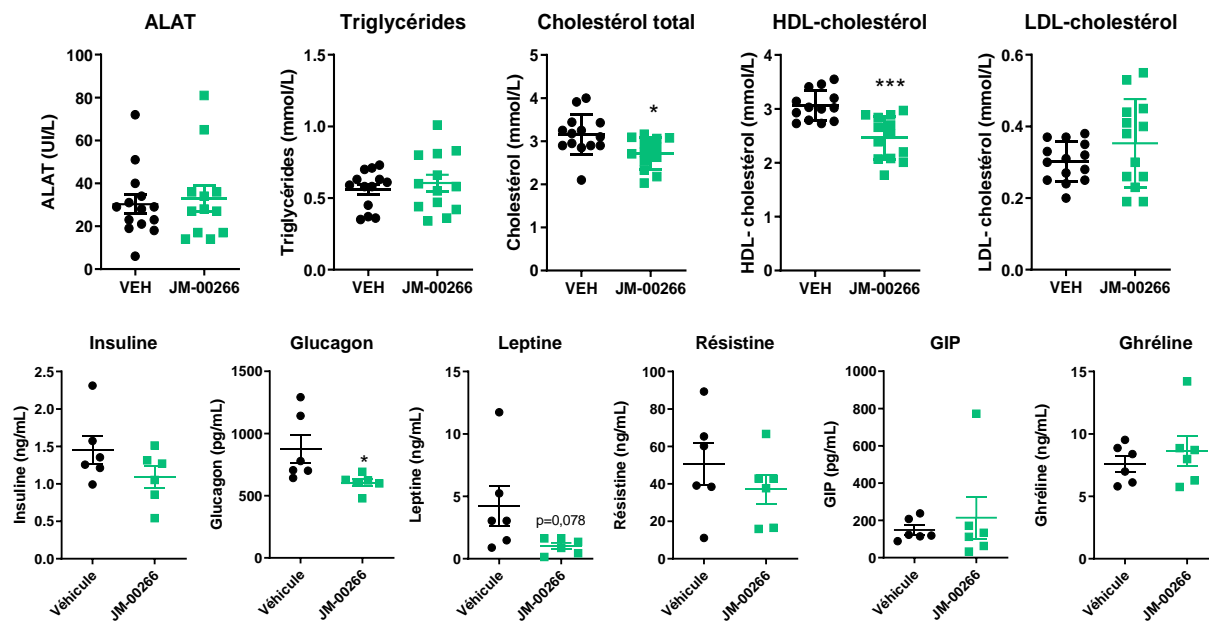
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule (Veh) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ . TAV : Tissu Adipeux Viscéral.

Parmi les paramètres plasmatiques étudiés, aucune modification de la concentration de l'enzyme hépatique Alanine AminoTransférase (ALAT) n'est observée, excluant ici tout effet toxique de la molécule (**Figure 79**). Concernant les paramètres lipidiques, une réduction de la cholestérolémie (cholestérol total et HDL-cholestérol) est principalement constatée. Par ailleurs, l'insuline plasmatique tend à diminuer, ce qui pourrait suggérer un effet du traitement sur l'homéostasie glucidique. D'ailleurs, le traitement par JM-00266



#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

provoque également une diminution du glucagon plasmatique qui est un puissant activateur de la néoglucogenèse.



**Figure 79. Paramètres plasmatiques.**

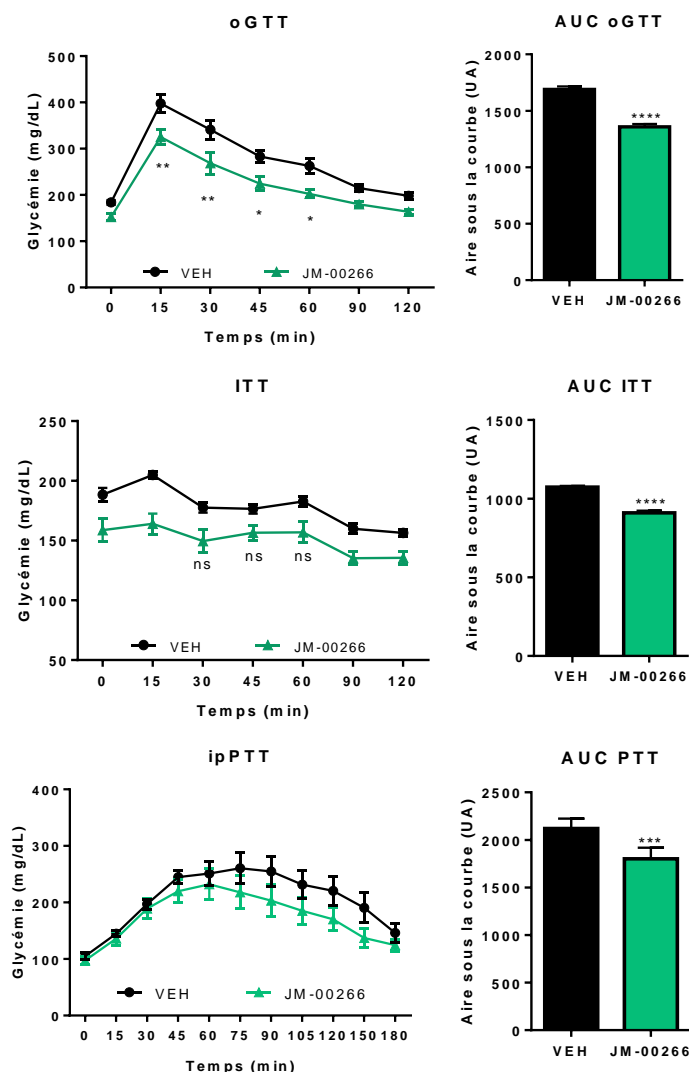
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### c. Tests de tolérance

Les tests de tolérance au glucose, à l'insuline et au pyruvate réalisés permettent de mettre en évidence la modulation du métabolisme glucidique après traitement avec JM-00266.

Le traitement chronique avec la molécule JM-00266 améliore la tolérance au glucose (**Figure 80**). Le test de tolérance à l'insuline révèle également que l'insuline exerce un effet plus puissant chez les animaux traités que chez les animaux témoins, sur la clairance du glucose plasmatique. Ces résultats suggèrent une amélioration de la tolérance au glucose qui passerait par une augmentation de la sensibilité à l'insuline. L'activité de la néoglucogenèse hépatique a aussi été explorée par le test de tolérance au pyruvate. Une néoglucogenèse moins active est alors constatée chez les animaux traités par JM-00266, en accord avec la baisse du glucagon plasmatique observée par ailleurs.

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



**Figure 80. oGTT, ITT et ipPTT.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Véhicule sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ . ipPTT : intraperitoneal Pyruvate Tolerance Test, ITT : Insulin Tolerance Test, oGTT : oral Glucose Tolerance Test.

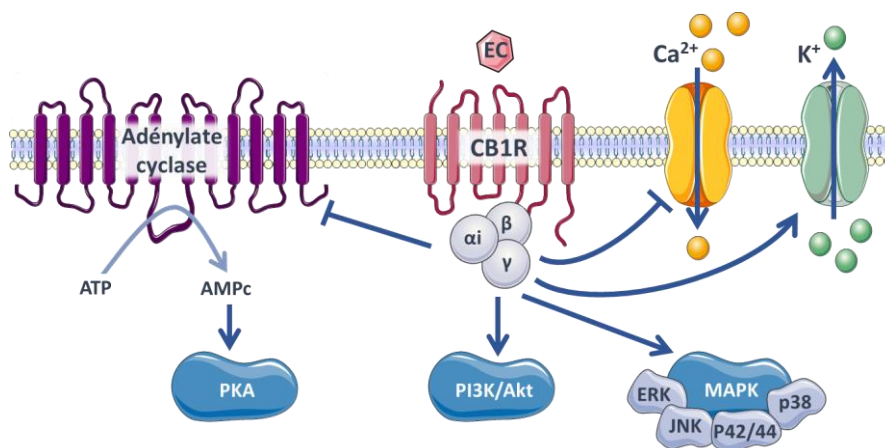
#### **d. Conclusion**

L'administration chronique de molécule JM-00266 à des souris obèses a conduit à des effets modestes sur la masse grasse, la cholestérolémie et l'homéostasie glucidique. D'autres analyses, concernant notamment l'expression génique dans le foie et le TA, non présentées ici, ont également été réalisées et n'ont pas mis en évidence de variations majeures. Compte-tenu de la dose utilisée de JM-00266 et de la durée du traitement, il est force de constater que l'efficacité de la molécule est très limitée par rapport au Rimonabant et au JD-5037. Ces effets peu marqués peuvent notamment être liés à sa faible biodisponibilité et/ou à sa faible activité antagoniste pour CB1R (**Annexe 6**). C'est

pourquoi à ce stade nous avons cherché à mettre en place de nouvelles stratégies afin d'avoir plus d'informations sur les caractéristiques pharmacologiques de la molécule JM-00266.

## 2. Étude de la phosphorylation de Erk ½ sur le modèle de HEK CB1Rm

Afin d'étudier les propriétés de JM-00266 vis-à-vis des CB1R, nous avons mis en place un essai fonctionnel consistant à mesurer le taux de phosphorylation de la protéine Erk ½ dépendant de l'activité des CB1R (**Figure 81**).



**Figure 81. Voies de signalisation dépendantes du récepteur CB1.**

Réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art.

Les agonistes des CB1R activent les MAP Kinases de type p38 et p42/p44 (ou Erk ½) (Gómez del Pulgar et al., 2000; Wartmann et al., 1995). Cette activation a été mise en évidence dans différents types cellulaires tels que les fibroblastes WI38, les cellules astrocytaires U373MG, les cellules de gliome C6 ainsi que dans les cellules surexprimant les CB1R recombinants telles que nos cellules HEK293 CB1Rm (Bouaboula, Bourrié, et al., 1995; Sánchez et al., 1998; Wartmann et al., 1995). Ces effets CB1R-dépendants s'effectuent via la voie des protéines G<sub>i/o</sub> puisqu'ils sont inhibés par le Rimonabant et la toxine pertussique. Il est donc intéressant de mesurer le taux de phosphorylation de Erk ½ comme témoin de l'activation des CB1R et de déterminer la capacité d'un antagoniste à inhiber cet effet.

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

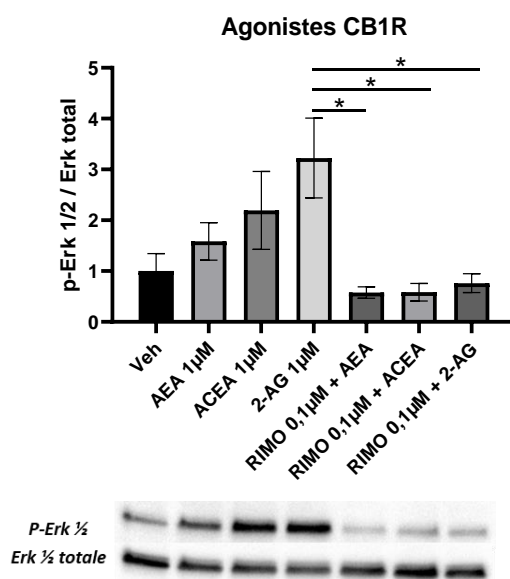
##### *Méthodologie*

Pour ce faire, nous avons mis au point les conditions de culture et de traitement de cellules HEK CB1Rm. Ces cellules épithéliales embryonnaires humaines possèdent une transfection stable des CB1R murins. Ce modèle a déjà été utilisé pour l'étude du lien entre Erk 1/2 et la désensibilisation des CB1R (Daigle et al., 2008). Les cellules sont prétraitées 30min avec les antagonistes CB1R à tester puis co-traitées 5min avec un agoniste (AEA ou ACEA) ajouté aux antagonistes. Les extraits protéiques sont ensuite collectés après lyse cellulaire et analysés par western blot (Matériel et Méthodes, **Partie III.C.2**).

##### *a. Études préliminaires*

##### *Phosphorylation de Erk 1/2 en présence d'AEA, d'ACEA et de 2-AG et effet du Rimonabant*

Une étude préliminaire a consisté à vérifier la fonctionnalité de notre approche en testant les effets activateurs de plusieurs agonistes (AEA, ACEA et 2-AG) et la capacité du Rimonabant à contrer leurs effets. Les résultats se sont avérés concluants puisque l'antagoniste a contrecarré l'activation de Erk 1/2 induite par les trois agonistes utilisés (**Figure 82**).



**Figure 82. Intensité de phosphorylation de Erk 1/2 après traitement avec les agonistes CB1R AEA, ACEA et 2-AG.**

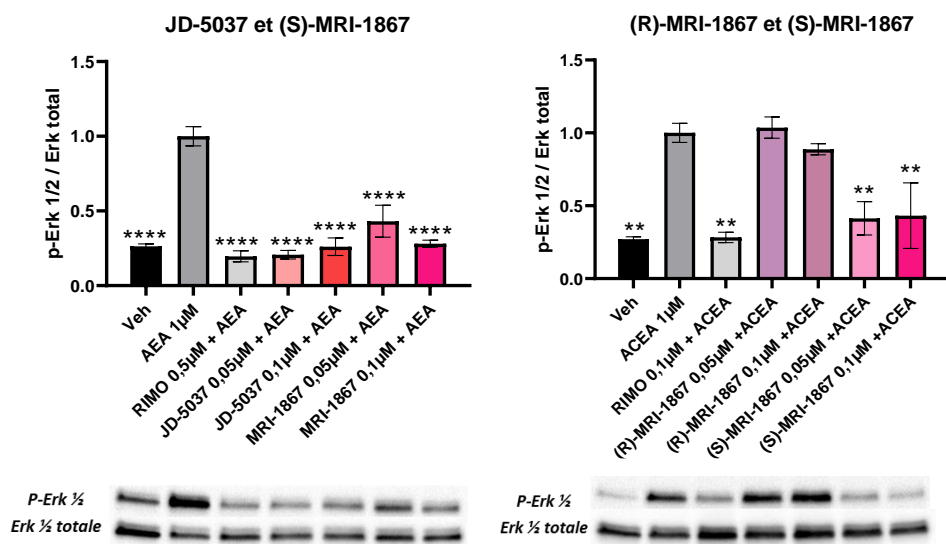
Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les différences statistiques sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ . Veh : Véhicule.

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

##### *Effet de JD-5037, (S)-MRI-1867 et (R)-MRI-1867 sur la phosphorylation de Erk 1/2*

Cette méthode a ensuite été validée en l'appliquant à deux antagonistes des CB1R à action périphérique en cours d'étude au Laboratoire dont l'activité est bien caractérisée. Il s'agit de l'antagoniste des CB1R périphériques JD-5037 (Iyer, Cinar, Coffey, et al., 2017) et de l'antagoniste dit de 3<sup>ème</sup> génération (S)-MRI-1867 (Iyer et al., 2018; Udi et al., 2020), qui combine une action de blocage des CB1R périphériques et une action inhibitrice d'iNOS. Leur activité a été comparée au Rimonabant (contrôle positif), et à l'analogue (R)-MRI-1867 qui possède uniquement l'activité iNOS et ne peut donc pas bloquer les CB1R (contrôle négatif).

JD-5037, comme attendu, contrecarre totalement la phosphorylation induite par l'AEA aux concentrations de 0,05 et 0,1µM, démontrant ainsi sa forte activité inhibitrice des CB1R (**Figure 83**). En parallèle, les tests effectués à 0,05 et 0,1µM avec (S)-MRI-1867 permettent de confirmer l'activité antagoniste CB1R de ce composé avec une inhibition de phosphorylation induite par l'ACEA.



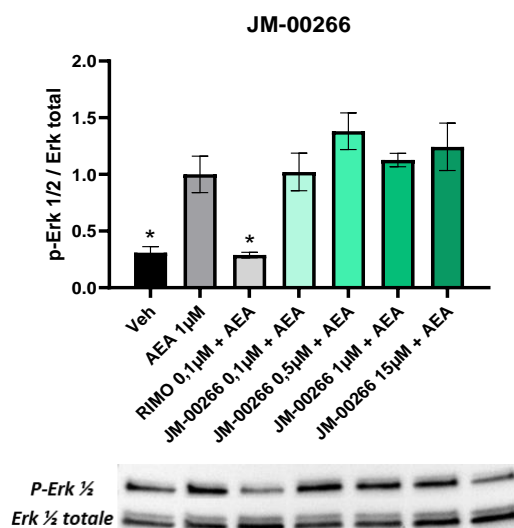
**Figure 83. Intensité de phosphorylation de Erk 1/2 après traitement avec JD-5037, (R)-MRI-1867 et (S)-MRI-1867.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport à l'AEA/ACEA 1µM sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Veh : Véhicule.

Ces tests ont aussi permis de vérifier l'absence d'activité CB1R de la forme (R) de MRI-1867. Ces résultats ont été utilisés pour alimenter les hypothèses d'une publication récente (Roger et al., 2020).

**b. Application à l'étude de JM-00266.**

Cet essai fonctionnel a ensuite été appliqué à JM-00266 dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment en utilisant de l'AEA 1µM comme agoniste activateur de la voie Erk ½. Ce dernier induit bien une augmentation de la phosphorylation de Erk ½ qui est empêchée par l'ajout de Rimonabant à 0,1µM (**Figure 84**). En revanche, l'ajout de JM-00266 à 0,1 ; 0,5 ; 1 et 15µM ne permet pas de réduire la phosphorylation induite par l'AEA. La molécule JM-00266 ne semble donc pas moduler la phosphorylation de Erk ½, remettant alors en question la fixation de cette molécule au CB1R.



**Figure 84. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec JM-00266.**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les différences statistiques par rapport à l'AEA 1µM sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ . Veh : Véhicule.

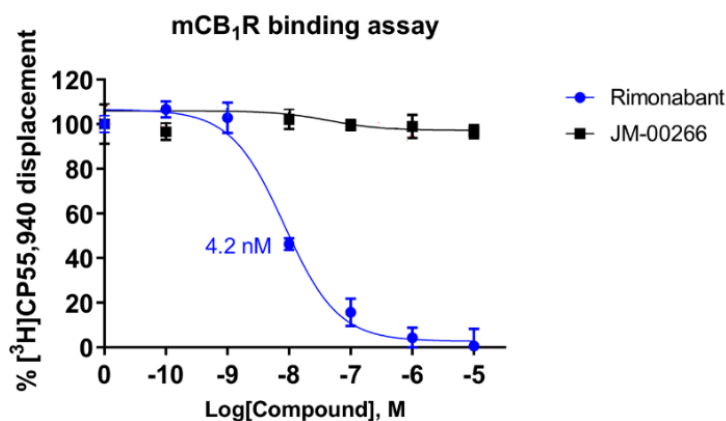
Compte-tenu de ces résultats décevants, l'étude de la molécule JM-00266 a été complétée par une analyse de la fixation au CB1R, appelé test de binding, afin de comprendre d'où proviennent les effets (certes faibles mais présents) observés *in vivo* chez la souris obèse.

**3. Étude de la fixation au récepteur CB1 : Test de binding**

Le test de binding a été réalisé en collaboration avec le Laboratory of Physiological Studies, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA, NIH de Bethesda, USA) et il repose sur l'étude du déplacement d'un composé radiomarqué  $[^3H]CP55,940$  par la molécule testée à différentes concentrations (protocole détaillé dans : Tam et al., 2012).

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

Le Rimonabant, utilisé ici comme contrôle positif de la fixation aux CB1R, déplace rapidement 100% du composé radiomarqué [<sup>3</sup>H]CP55,940 ce qui n'est pas le cas de JM-00266 qui ne démontre pas d'affinité pour ce récepteur (**Figure 85**).



**Figure 85.** Tests de fixation aux récepteurs CB1 murins du Rimonabant et de JM-00266.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

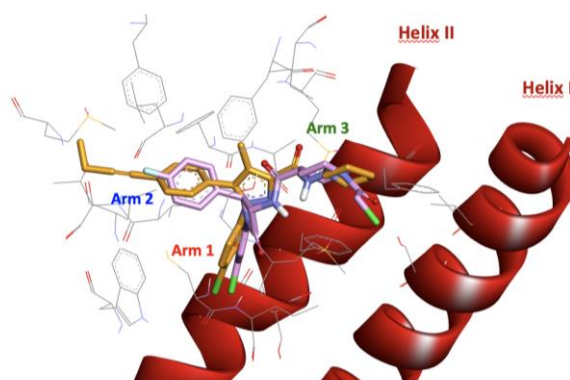
#### 4. Conclusion

Ces données suggèrent que JM-00266 ne se fixerait pas aux CB1R murins. Il semble alors raisonnable de penser que les effets mis en évidence *in vivo* après traitement aigu ou chronique avec cette molécule, pourraient résulter de sa métabolisation notamment au niveau hépatique. Il pourrait donc s'agir d'une pro-drogue. Des études sont donc actuellement menées au laboratoire avec notamment des essais de digestion de JM-00266 par des microsomes afin d'identifier de possibles métabolites actifs.

D'autre part, ce projet de mise au point d'antagonistes/agonistes inverses des CB1R s'est poursuivi en tentant d'optimiser la structure de JM-00266, en prenant en compte des éléments issus des structures de composés décrits dans la littérature tels que le TM-38837 et AM-6538 (Micale et al., 2019; Paronis et al., 2018).

## C. Caractérisation de nouvelles molécules antagonistes à action périphérique

Ce travail d'optimisation de la structure de JM-00266, en vue d'améliorer son efficacité, a conduit à la synthèse des molécules HR-0133, HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155. La modélisation moléculaire des composés et la connaissance de la structure cristallographique du CB1R ont aidé à l'étude des interactions protéine-ligand et ont permis de sélectionner les composés potentiellement intéressants. Par exemple, l'analyse de HR-0152 a indiqué que le composé se superposait très bien avec l'AM-6538 dans le modèle de co-cristallisation CB1R/AM-6538 disponible dans la banque de donnée protéique (**Figure 86**).



**Figure 86.** Superposition de la cristallisation de AM6538 (orange) avec HR-0152 (rose) dans la poche de fixation du récepteur CB1.

La méthode basée sur l'utilisation des HEK CB1Rm a ensuite été exploitée afin de cribler les nouveaux antagonistes CB1R sélectionnés en testant leur efficacité.

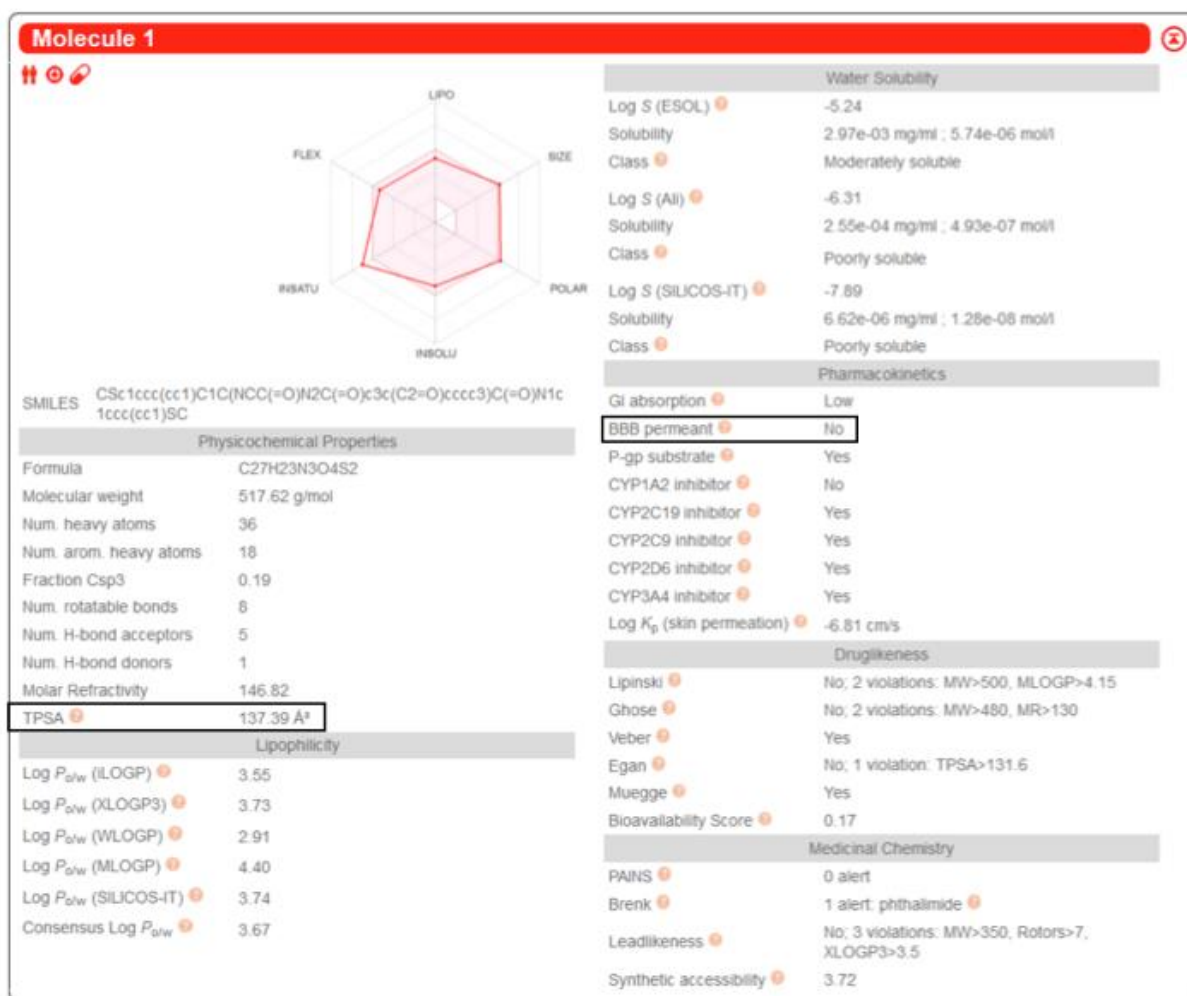
### 1. HR-0133

Les données obtenues avec le logiciel de prédiction SwissADME concernant la molécule HR-0133 ont indiqué une faible capacité de franchissement à la fois de la BHE et de la barrière intestinale. En analysant le paramètre TPSA (Topological Polar Surface Area), un marqueur de polarité de surface des molécules, les résultats montrent que ce dernier s'élève à 137,39Å contre 50,16Å pour le Rimonabant et 108,29Å pour le JM-00266. Or, les données de la littérature suggèrent qu'un passage de la BHE ne peut avoir lieu si cette



#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

valeur est supérieure à 90 faisant ainsi du HR-0133 une molécule non pénétrante et non absorbable, la rendant intéressante dans le cadre d'une étude du blocage des CB1R du tractus gastro-intestinal (**Figure 87**). Des expériences réalisées avant le début de cette thèse ont permis de confirmer ces prédictions, en montrant une absence de détection de la molécule HR-0133 au niveau plasmatique après administration à des souris par gavage (données non présentées).



**Figure 87. Données prédictives issues du logiciel SwissADME concernant HR-0133.**

Des tests préliminaires ont ensuite été réalisés pour savoir si cette molécule pouvait avoir des effets sur l'activité du SEC intestinal. En effet, il est bien établi que le SEC contrôle la motilité du tube gastrique avec notamment un effet inhibiteur CB1R-dépendant de l'AEA sur cette motilité (Lee et al., 2016). Les résultats ont indiqué que HR-0133, administré en aigu, conduisait à une stimulation de la motilité gastro-intestinale, suggérant une action sur de la drogue sur le SEC. Un antagoniste des CB1R avec une action restreinte aux récepteurs intestinaux, tel que HR-0133, pourrait donc s'avérer être un outil intéressant

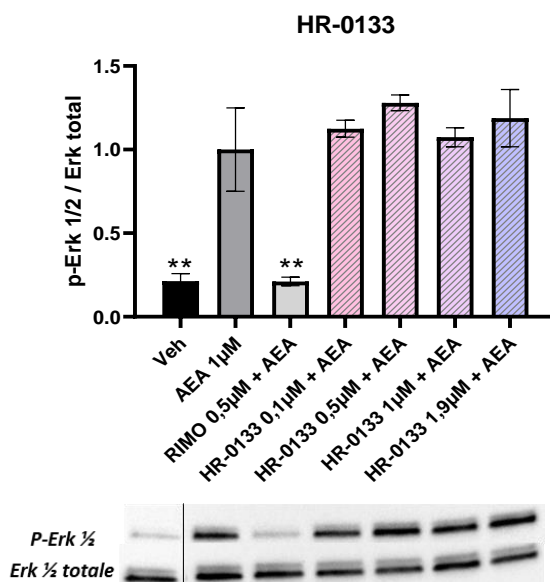
#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

pour étudier les conséquences de l'inactivation locale des CB1R de l'intestin sur le métabolisme énergétique, compte tenu du rôle clé joué par cet organe dans ce domaine. Ainsi, nous avons décidé de continuer à exploiter cette piste en étudiant, dans un premier temps, l'affinité de HR-0133 pour le récepteur par la méthode Erk ½ - HEK CB1Rm présentée précédemment.

##### a. *Phosphorylation de Erk ½ - HEK CB1Rm*

Le protocole HEK CB1Rm/Erk ½ a été utilisé afin de tester l'activité antagoniste de HR-0133 (Matériel et Méthodes, **Partie III.C.2**).

Les résultats indiquent qu'aucune modification de la phosphorylation de Erk ½ induite par 1µM d'AEA n'est observable en présence de la molécule HR-0133 aux concentrations testées (0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,9µM), suggérant une absence d'activité de la molécule (**Figure 88**). Toutefois, compte tenu des résultats précédemment obtenus *in vivo* sur la motilité intestinale, de nouveaux tests de binding ont tout de même été réalisés.



**Figure 88. Intensité de phosphorylation de Erk ½ après traitement avec HR-0133.**

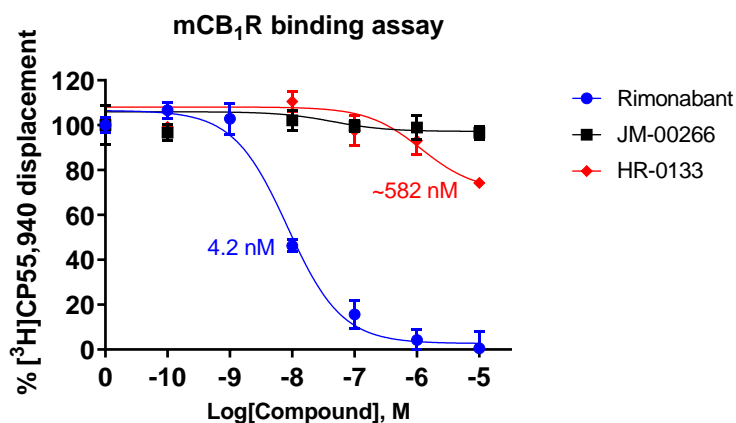
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport à l'AEA 1µM sont symbolisées par \*\*  $p < 0,01$ . Veh : Véhicule.

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

##### *b. Étude de la fixation au récepteur CB1 : Test de binding*

Comme dans le cas de la molécule JM-00266, un test de binding utilisant l'agoniste radiomarqué [3H]CP55,940 a été réalisé en collaboration avec le Laboratory of Physiological Studies, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA, NIH de Bethesda, USA) (protocole détaillé dans : Tam et al., 2012) (Matériel et Méthodes, **Partie III.C.4**).

Les données obtenues révèlent que HR-0133 ne présente qu'une faible affinité pour le CB1R murin en comparaison avec le Rimonabant (**Figure 89**). Toutefois, cette affinité étant plus importante que celle précédemment observée avec JM-00266 qui avait pourtant démontré des effets biologiques, nous avons décidé de poursuivre la caractérisation des propriétés de cette molécule en utilisant la méthode du GloSensor.



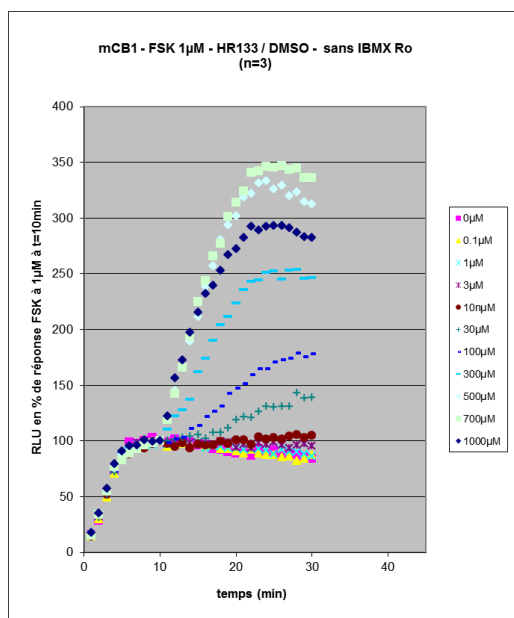
**Figure 89.** Tests de fixation aux récepteurs CB1 murins du Rimonabant et de HR-0133.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

##### *c. GloSensor*

Le CB1R couplé aux protéines  $G_{i/o}$  a la capacité d'inhiber la production d'AMPC et donc de limiter sa concentration intracellulaire (Howlett et al., 2004). L'étude de la mesure de la concentration d'AMPC intracellulaire par la méthode GloSensor peut donc nous permettre d'évaluer la capacité de HR-0133 à induire la production d'AMPC via son activité CB1R (Matériel et Méthodes, **Partie III.C.3**).

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



HR-0133 produit une augmentation dose-dépendante de la concentration en AMPc (**Figure 90**). Cet effet est inhibé en présence de toxine pertussique indiquant une activation de l'adénylate cyclase dépendant des protéines  $G_s$  couplées aux CB1R. Cette molécule répond donc bien comme un agoniste inverse vis-à-vis des CB1R.

**Figure 90. Analyse par GloSensor de la réponse à HR-0133.**

Ces résultats encourageants obtenus par la méthode GloSensor nous ont motivé à mettre en place d'une étude chronique afin d'étudier les effets à long terme sur des souris obèses de HR-0133.

#### *d. Étude chronique*

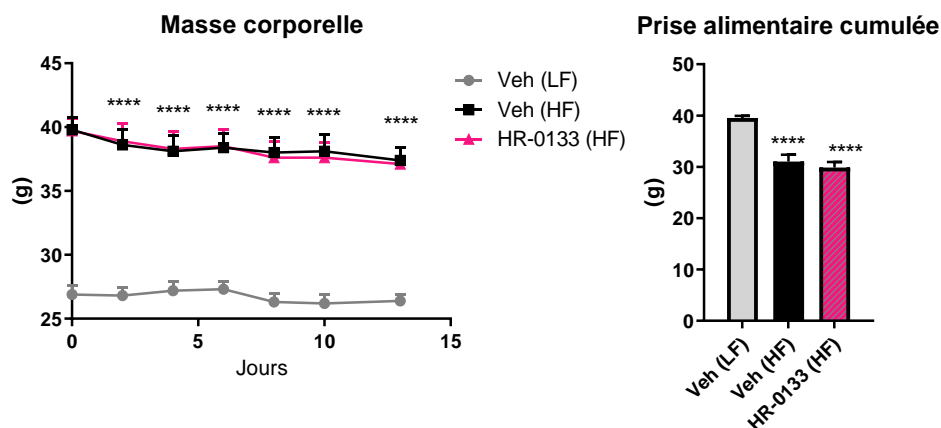
Pour cette expérience, 12 souris mâles C57BL/6J ont été rendues obèses par un régime hyperlipidique administré à volonté pendant 16 semaines pendant que 6 souris minces ont été nourries avec un régime contrôle. A la fin des 16 semaines de régime, 6 souris obèses ont été gavées quotidiennement avec HR-0133 à 10 mg/kg pendant 14 jours pendant que les autres ont reçu le véhicule dans les mêmes conditions (Matériel et Méthodes, **Partie IV.B.3**).

La masse corporelle des animaux ainsi que la prise alimentaire ont été relevés tous les deux jours. En début de traitement le poids moyen des souris minces s'élevait à 26,9 g contre 39,8 g pour les deux groupes de souris obèses. Un test de tolérance au glucose a été réalisé et les paramètres plasmatiques à jeun ont été mesurés. Étant donné que la molécule HR-0133 ne passe pas la barrière intestinale et qu'elle pourrait par conséquent exercer une action locale sur les entérocytes, nous avons analysé l'expression de certains gènes relatifs à la perméabilité intestinale et à l'inflammation au niveau du jéjunum, de

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

l'iléon et du colon. Ces résultats, qui n'ont pas mis en évidence d'effets marqués, ne seront pas présentés dans cette thèse.

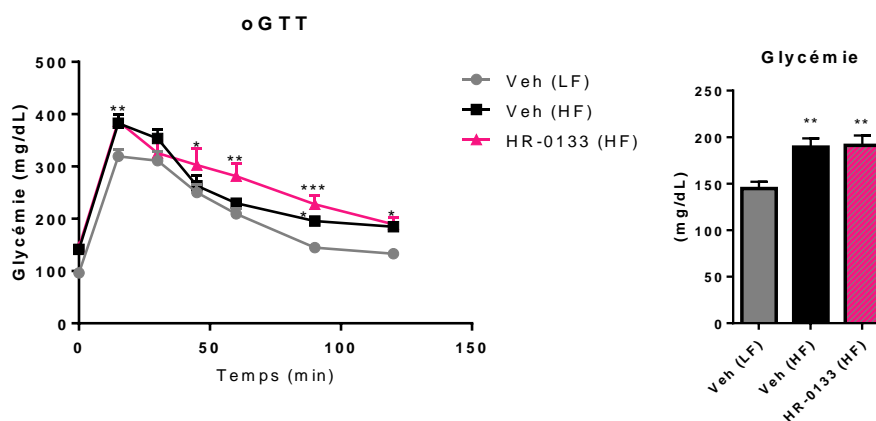
Le traitement des souris obèses avec HR-0133 n'a induit aucune modification significative ni de la masse corporelle ni de la prise alimentaire (**Figure 91**).



**Figure 91. Courbes de poids et prise alimentaire.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (LF - Low Fat) sont symbolisées par \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . HF : High Fat.

L'hyperglycémie et l'intolérance au glucose provoquées par le régime hyperlipidique ne sont pas améliorées par le traitement avec HR-0133 (**Figure 92**).

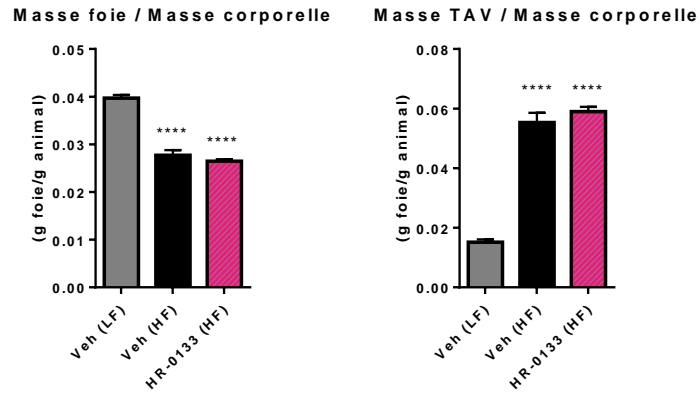


**Figure 92. oGTT et glycémie à jeun.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (LF - Low Fat) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ . oGTT : oral Glucose Tolerance Test, HF : High Fat.

Comme attendu, le régime hyperlipidique a induit de profondes modifications de la composition corporelle, conduisant à une diminution du ratio masse du foie/masse corporelle et à une augmentation du ratio masse du TAV/masse corporelle chez les souris obèses (**Figure 93**). Le gavage quotidien avec HR-0133 n'a pas modifié ces paramètres.

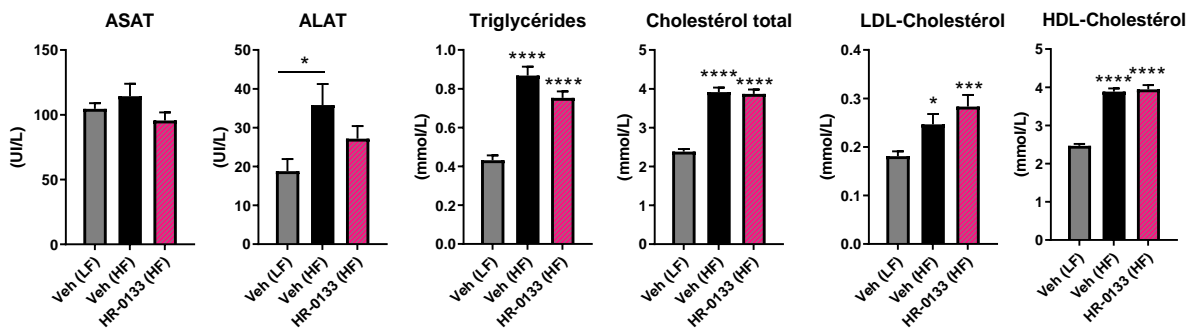
#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



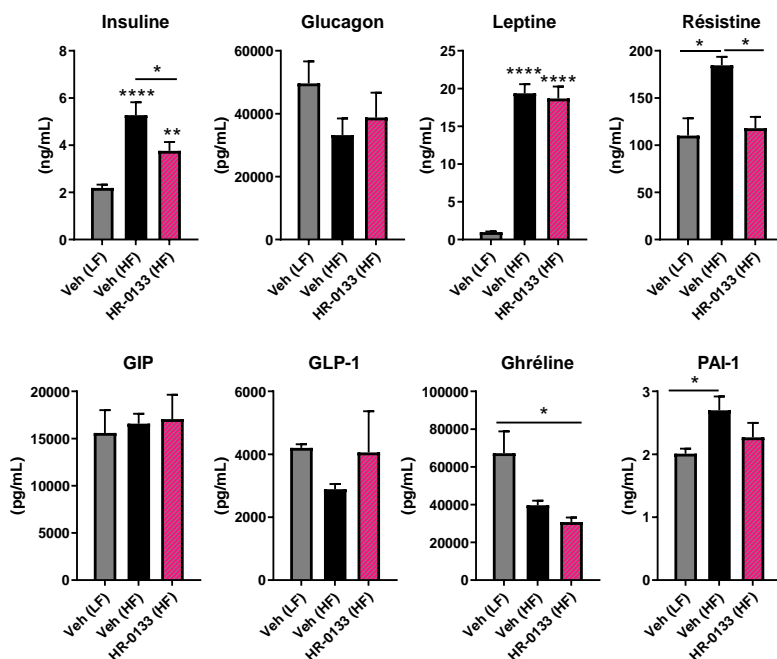
**Figure 93. Masse du foie et du TAV ramenées à la masse corporelle.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (LF - Low Fat) sont symbolisées par \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . HF : High Fat, TAV : Tissu Adipeux Viscéral.

L'analyse des paramètres plasmatiques à jeun a concerné les marqueurs de souffrance hépatique, ASAT et ALAT, ainsi que ceux relatifs à la lipémie (**Figure 94**). Dans cette étude nous avons également utilisé un kit de dosage immunologique multiplex « diabète » (BioPlex Pro mouse diabetes immunoassays, Bio-Rad) permettant le dosage simultané de plusieurs marqueurs. Les résultats montrent comme attendu que le régime hyperlipidique augmente les concentrations plasmatiques de TG, du cholestérol mais aussi de l'insuline, de la leptine, de la résistine et de PAI-1. PAI-1 est un inhibiteur majeur de la fibrinolyse utilisé comme marqueur biochimique de l'obésité et du diabète, puisque les taux circulants de PAI-1 sont corrélés à la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique, (Alessi et al., 2003; Barnard et al., 2016). En parallèle, une tendance à la diminution de la ghréline, du glucagon et de GLP-1 est observée. Parmi les nombreux effets métaboliques de GLP-1 (dont la production est diminuée au cours de l'obésité) figurent la stimulation glucose-dépendante de la sécrétion d'insuline, la diminution de la vidange gastrique et l'inhibition de la prise alimentaire (T. D. Müller et al., 2019).



#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



**Figure 94. Paramètres plasmatiques.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport au Veh (LF – Low Fat) sont symbolisées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . HF : High Fat.

En ce qui concerne les effets du traitement oral avec HR-0133, il est intéressant de noter une diminution de l'hyperinsulinémie ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques de résistine, une tendance à la diminution de PAI-1 et une tendance à l'augmentation de GLP-1 (**Figure 94**). Ces résultats suggèrent l'existence d'effets indirects bénéfiques de HR-0133 sur le métabolisme glucido-lipidique, liés à une action sur les CB1R présents au niveau de la lumière intestinale. Des analyses complémentaires concernant l'expression de gènes codants pour les CB1R, les incrétines, pour des protéines de la famille des protéines de jonctions serrées et pour des marqueurs inflammatoires au niveau du jéjunum et du colon ont été réalisées dans le cadre d'un stage de Master 2 Recherche et n'ont mis en évidence aucun effet marqué de HR-0133.

#### *e. Conclusion*

Le composé HR-0133, qui présente une faible affinité pour le CB1R (test de binding), semble néanmoins capable de stimuler la production d'AMPC (GloSensor). Le traitement chronique par gavage sur la souris obèse n'a pas mis en lumière d'effets bénéfiques francs et marqués de la molécule sur les paramètres relatifs au métabolisme glucido-lipidiques

#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1

mesuré hormis une baisse de l'insulinémie à jeun. C'est pourquoi nous avons choisi de ne pas poursuivre les investigations sur ce composé dans le cadre de cette thèse. Toutefois, la stratégie consistant à bloquer les CB1R de la lumière intestinale n'est pas abandonnée et d'autres études pourront être mises en place avec des molécules présentant une affinité plus marquée pour les CB1R.

### 2. HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155

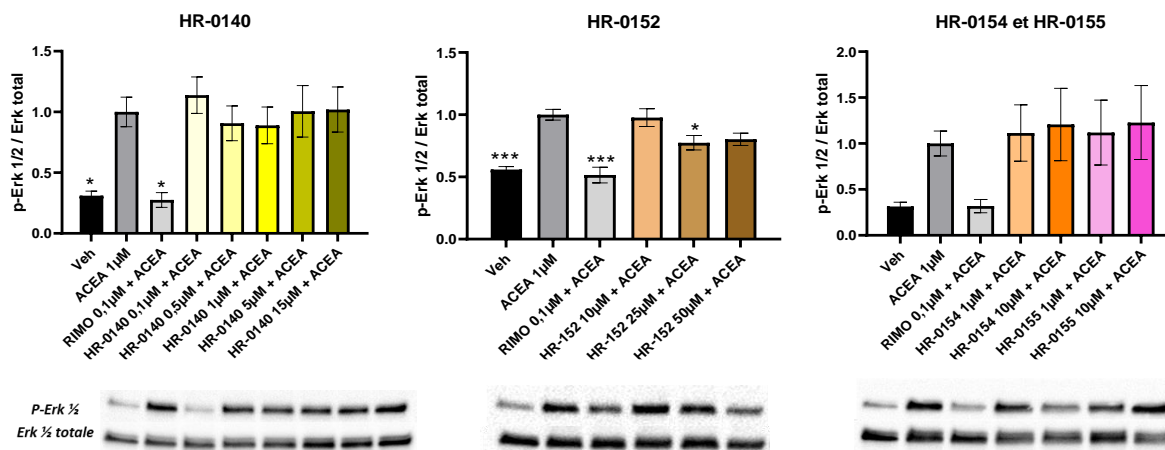
La même stratégie, consistant en une étude préliminaire de phosphorylation de Erk ½ sur les cellules HEK CB1Rm, a été utilisée pour d'autres composés. Les molécules qui ont fait l'objet de cette caractérisation (HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155) sont toutes issues de la modification de JM-00266 sur la base des travaux réalisés par Hung et collaborateurs en 2010 et ayant donné lieu au TM-38837 (Micale et al., 2019). La détermination de leur polarité ou TPSA a donné des résultats de 112,04Å pour HR-0140, 69,72Å pour HR-0152, 57,69Å pour HR-0154 et 46,33Å pour HR-0155. La valeur, supérieure à 90Å pour HR-0140, indique une très faible capacité de franchissement de la BHE. Concernant les autres composés, la TPSA inférieure à 90Å suggère une capacité de franchissement plus grande. La stratégie à mettre en place sera donc différente dans le cas où ces molécules démontrent une affinité pour CB1R, puisqu'elle nécessitera une modulation de la biodisponibilité au risque d'augmenter le passage de la BHE. La dernière possibilité sera de modifier légèrement la structure moléculaire afin de limiter cet aspect.

#### a. *Phosphorylation de Erk - HEK CB1Rm*

HR-0140, dérivé de JM-00266, n'influence pas la phosphorylation de Erk ½ induite par l'ACEA à 1µM pour chacune des concentrations testées (de 0,1 à 15µM) (**Figure 95**). HR-0152 diminue de manière restreinte la phosphorylation de Erk ½ induite par l'ACEA à 1µM pour une concentration de 25µM. Les molécules HR-0154 et HR-0155 ne permettent pas quant à elles de prévenir la phosphorylation de Erk ½ induite par l'ACEA 1µM. Ces deux molécules ne feront donc pas l'objet d'études chroniques ou de caractérisations plus poussées.



#### IV. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'antagonistes périphériques des récepteurs CB1



**Figure 95. Intensité de phosphorylation de Erk 1/2 après traitement avec HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques par rapport à l'ACEA 1µM sont symbolisées par \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **b. Conclusion**

Aucune de ces molécules ne prévient la phosphorylation de Erk 1/2 avec la même intensité que le Rimonabant. Toutefois, HR-0152 diminue significativement cette phosphorylation à la concentration de 25µM et une tendance semble se dessiner à 0,5 et 1µM pour HR-0140. Afin de ne pas passer à côté d'un éventuel effet, ces deux molécules ont fait l'objet d'une étude chronique sur souris obèse. Les résultats de ces études ne seront pas présentés ici puisqu'ils n'ont pas permis de mettre en évidence d'effets apparents des traitements par HR-0140 et HR-0152 sur le métabolisme énergétique. Ces molécules ne feront donc pas l'objet d'investigations plus poussées.

Enfin, la méthode HEK CB1Rm/Erk 1/2 constitue une méthode de criblage des antagonistes CB1R pratique et efficace. En effet, comme illustré avec les essais sur le composé JD-5037 par exemple, il apparaît important que le composé testé exerce une action inhibitrice sur la phosphorylation de Erk 1/2 pour obtenir des effets bénéfiques *in vivo* sur des souris obèses.

# Conclusion et Perspectives

---

L'ensemble de ce travail a permis de répondre à plusieurs objectifs. En premier lieu, les expériences basées sur les travaux de Muller et al., 2017 ont mis en évidence, en combinant des approches *in vivo* et *in vitro*, le rôle de l'activation du SEC sur l'activité lipolytique et ont amené l'hypothèse d'une action autocrine des ECs produits par le TA, sur les CB1R adipocytaires. Nous avons, par ailleurs, montré que leur activation pourrait alors limiter la mobilisation des graisses par la stimulation de la voie de signalisation insulinique (via PI3K/Akt).

En effet, en conditions physiologiques, les ECs sont majoritairement synthétisés localement « à la demande », leur action est autocrine et de courte durée. Toutefois, ils peuvent également être retrouvés dans la circulation où leur concentration semble refléter leur production par les tissus périphériques et en particulier le TA (Kuipers et al., 2019). Ainsi, les ECs circulants sont augmentés chez les sujets obèses et particulièrement chez les individus présentant un excès de graisse viscérale (Hillard, 2018). Puisque dans des conditions d'obésité, nous avons pu observer une surproduction d'AEA et de 2-AG par le TA, nous avons, par conséquent, émis l'hypothèse que les ECs produits par les adipocytes pourraient être à l'origine d'effets endocrines sur les organes extra-adipeux. Le blocage des CB1R périphériques apparaît donc être une option dans le contrôle des effets délétères de ces ECs.

Cependant, si le rôle bénéfique du blocage des CB1R périphériques est clairement illustré dans des études utilisant des antagonistes CB1R de 2<sup>nde</sup> génération ne franchissant pas la BHE (Cinar et al., 2020), l'origine des ECs qui activent ces récepteurs est plus discutée (Hillard, 2018).

Dans ce contexte, le protocole original que nous avons développé est une technique pertinente qui devrait nous permettre de mesurer la sécrétion des ECs et des NAEs par des explants de TA et de caractériser l'activité sécrétoire du TAV et du TASC. Ces données nous permettront de mieux appréhender le rôle des ECs produits par les différents dépôts adipeux dans le développement de l'obésité et des troubles métaboliques associés. Un des points forts de notre projet est, qu'en plus de l'étude sur animaux, nous avons déjà mis en place une collaboration avec le CHU de Dijon permettant de mesurer la sécrétion des ECs

à partir de biopsies humaines de TAV et de TASC prélevées chez des patients obèses non diabétiques.

Les premiers résultats ont indiqué que l'antagonisme des CB1R exerce des effets directs sur la production des ECs. Les mécanismes d'action restent toutefois à approfondir, d'autant que les effets observés sont variables selon le type d'antagoniste utilisé, suggérant l'implication de voies de signalisation différentes.

La suite de ce projet consiste à poursuivre la caractérisation du rôle des ECs par des mesures d'expression géniques des enzymes de synthèse et de dégradation des ECs et des mesures de la sécrétion d'adipokines, telles que l'adiponectine, la leptine ou l'IL-6. Pour ce faire, nous compléterons les études sur animal en utilisant des souris dont le récepteur CB1 a été invalidé (CB1R<sup>-/-</sup>). Quant aux études sur l'Homme, le nouveau protocole d'étude clinique (ENDOCATA – 2020 – A02388 – 31, **Annexe 5**), toujours en collaboration avec le service de Gastro-entérologie du CHU de Dijon, autorise la collecte de TAV et de TASC et permet ainsi la continuité de ce projet. La force de ce nouveau protocole réside dans le fait que nous aurons accès à du TA de patients obèses mais aussi à du TA de sujets sains et de patients obèses diabétiques.

L'ensemble de ces études devrait nous permettre d'explorer plus en détail les capacités sécrétoires du TA (ECs, adipokines, cytokines). De plus, nous pourrions également préciser l'impact du blocage des CB1R du tissu adipeux pathologique humain sur ses capacités sécrétoires.

La troisième partie de ce travail de thèse a permis de développer et d'optimiser une approche méthodologique permettant l'isolement de cellules de la FSV de souris et l'induction de leur différenciation en adipocytes. Les premiers résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de valider le protocole expérimental de collecte des cellules et d'induction de la différenciation, ainsi que son application au TA sain et pathologique. Ainsi, les premiers résultats montrent que l'ACEA et le Rimonabant ont une capacité de modulation de la différenciation adipocytaire. De façon intéressante, l'expression différentielle de certains marqueurs au temps 0 sur les cellules issues de TA sain ou pathologique, nous amène à penser qu'il y aurait un intérêt majeur à étudier les événements plus en amont, comme l'impact des ECs sur la phase correspondant à

l'engagement des précurseurs vers la forme préadipocyte. D'autre part, au vu des différences métaboliques entre le TAV et le TASC et de leur importance respective dans le développement des pathologies liées à l'obésité, il apparaît primordial de tenir compte dans nos prochaines expériences de ces différences et d'inclure à ce projet une étude comparative entre ces dépôts adipeux.

Enfin, une dernière partie, a permis d'étudier le développement et l'action de nouveaux antagonistes à travers les effets à plus long terme du blocage des CB1R du TA. Nous avons entrepris de réaliser des études chroniques sur des souris obèses traitées par des antagonistes CB1R dont l'action est limitée à la périphérie, en l'occurrence JD-5037 (Chorvat et al., 2012), JM-00266 et HR-0133. L'intérêt de ces études porte tout autant sur le potentiel thérapeutique d'antagonistes commerciaux (JD-5037) que sur le développement de nouveaux antagonistes sur la base de molécules existantes. En effet, JM-00266 et HR-0133 ont été synthétisés par l'EA1155 « Chimie Médicinale et Drug Discovery » IICiMed de la Faculté de Pharmacie de Nantes dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur Jean-Michel Robert.

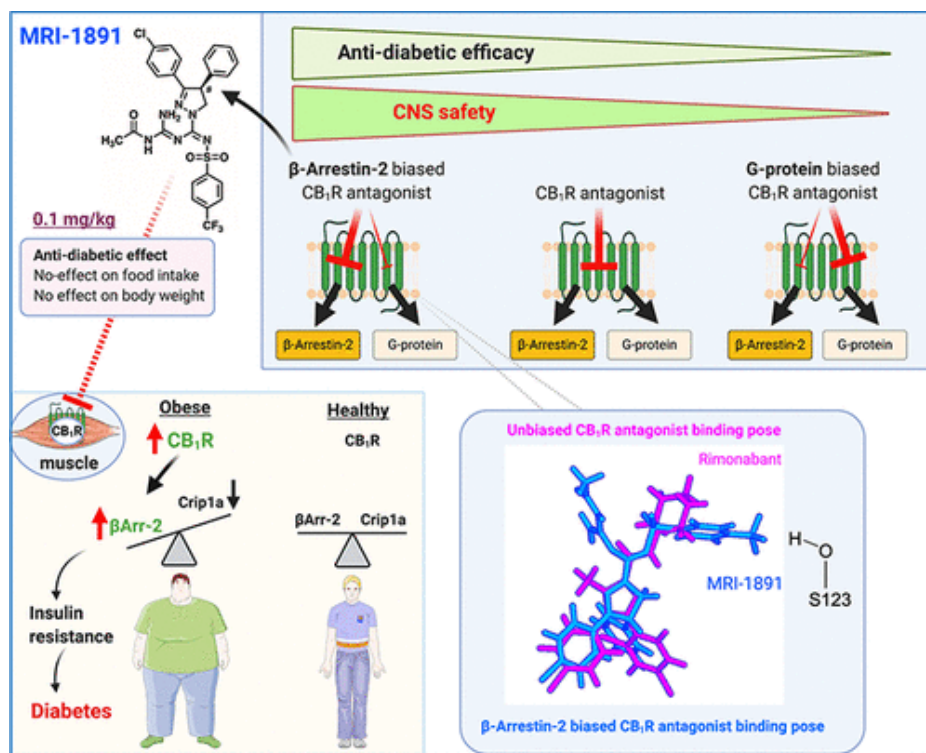
Compte tenu des effets impressionnants observés sur la masse corporelle et de nombreux paramètres associés à des troubles métaboliques lors des traitements chroniques par JD-5037, il apparaît essentiel d'optimiser le potentiel thérapeutique de ces composés et de poursuivre la conception et le développement de nouveaux antagonistes des CB1R périphériques.

Pour cela, de manière identique à la mise en place d'une technique d'étude de la production des ECs (deuxième partie), nous avons adapté une méthode permettant le criblage de nouveaux antagonistes périphériques des CB1R. Cette méthode utilise la capacité des antagonistes à inhiber la phosphorylation de la protéine Erk  $\frac{1}{2}$  sur le modèle de cellules HEK293 surexprimant les CB1R murins.

Bien que cette méthode n'ait pas donné de résultats concluants avec les composés HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155, elle continuera à être exploitée dans le cadre de nos recherches visant à améliorer l'efficacité des molécules dérivées de JM-00266 et également à caractériser de nouveaux composés appartenant à des familles chimiques différentes, telles que HR-0159 actuellement à l'étude.

Dans nos axes d'étude, nous incluons également des antagonistes de 3<sup>ème</sup> génération possédant une double cible thérapeutique et pour certains, une sélectivité pharmacocinétique ou fonctionnelle. Ces composés font partie des pistes prometteuses puisqu'ils permettent à la fois une hausse de l'efficacité et une plus grande sécurité vis-à-vis d'éventuels effets centraux. Parmi ces nouveaux antagonistes, nous pouvons citer le composé hybride MRI-1867 (ou INV-101), qui combine antagonisme des CB1R périphériques et antagonisme de la Nitric Oxide Synthase inductible (iNOS), actuellement en phase I d'essai clinique [16].

Une autre molécule présente un intérêt certain : MRI-1891 (ou INV-202), qui antagonise les CB1R périphériques avec une pharmacocinétique biaisée orientée vers la signalisation dépendante de la  $\beta$ -arrestines 2 (**Figure 96**). Ce composé est également en phase I d'essai clinique [17].



**Figure 96. Résumé schématique de l'antagoniste des CB1R biaisé MRI-1891 (Z. Liu et al., 2021).**

Les récepteurs à 7 hélices transmembranaires émettent un signal via des voies indépendantes des protéines G et  $\beta$ -arrestines. L'antagoniste périphérique des CB1R (MRI-1891) est fortement biaisé vers l'inhibition du recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 induite par CB1R par rapport à l'activation de la protéine G. MRI-1891, ce qui n'est pas le cas du Rimonabant. MRI-1891 interagit avec les résidus non polaires sur la boucle N-terminale, y compris F108, et sur l'hélice transmembranaire-1, y compris S123, une combinaison qui facilite le biais vers la  $\beta$ -arrestine 2. Ainsi, CB1R favorise la résistance à l'insuline musculaire via la signalisation  $\beta$ -arrestine 2 dépendante. Cette dernière est sélectivement diminuée par un antagoniste CB1R biaisé avec un risque réduit d'effets secondaires sur le système nerveux central.  $\beta$ Arr-2 :  $\beta$ -arrestine 2, CNS : Central Nervous System.

Chez les souris obèses, le traitement par MRI-1891 réduit la prise alimentaire et la masse corporelle sans induire d'anxiété, même à une dose élevée. De plus, la résistance à l'insuline musculaire, induite par l'obésité, est également améliorée par MRI-1891 chez les souris sauvages mais cet effet n'est pas retrouvé chez les souris  $\beta$ -arrestine 2<sup>-/-</sup> (Z. Liu et al., 2021).

Ce genre d'études démontre l'étendue des possibilités dans la synthèse de molécules ciblant les CB1R ainsi que leur intérêt majeur dans le traitement de l'obésité. Toutefois, il apparaît essentiel d'optimiser le potentiel thérapeutique des composés existants et également de poursuivre la conception, le développement et la caractérisation de nouveaux antagonistes des CB1R périphériques afin d'enrichir le spectre thérapeutique de demain dans la lutte contre l'obésité et les complications métaboliques qui lui sont associées.

# Matériel et Méthodes

---



## I. Animaux et régimes

Les expérimentations ont été réalisées dans le respect des réglementations officielles Françaises relatives à l'utilisation et à l'entretien des animaux de laboratoire (n°87848). Le comité d'éthique local en matière d'expérimentation animale a approuvé le protocole expérimental (n°13948).

Les expérimentations sur modèle animal ont été réalisées sur des souris mâles C57BL/6J de 10 à 12 semaines (JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France). Les animaux ont été hébergés individuellement selon un programme jour/nuit 12/12h dans une pièce thermorégulée à 22-23°C avec accès *ad libitum* à l'eau et à une alimentation standard (STD, A04, Safe, Augy, France – **Annexe 1**). Des souris ont également été nourries avec un régime hyperlipidique (E15742-34, 34% de lard soit 60% de l'énergie métabolisable) durant 16 semaines (Sniff, Soest, Allemagne – **Annexe 3**). A l'issue des 16 semaines, la présence d'un surpoids et d'une insulino-résistance a été contrôlée. Par ailleurs, certains animaux ont été soumis à un régime contrôle (S9259-E010, 5% de lard soit 11% de l'énergie métabolisable) du régime hyperlipidique (Sniff, Soest, Allemagne – **Annexe 2**).

## II. Réactifs

Une grande partie des réactifs et drogues, utilisés au cours des différentes expériences, proviennent de chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) à l'exception du JZL-195 (Bio-Techne, Lille, France), de l'insuline humaine (Actrapid®, Novo Nordisk, La Défense, France), du Rimonabant (SR141716, Sanofi Aventis, Paris, France), du JD-5037 (CliniSciences, Nanterre, France), de la Collagénase II et de la Dispase II (Serlabo Technologies, Vene, France). Les composés JM-00266, HR-0133, HR-0140, HR-0152, HR-0154 et HR-0155 ont été synthétisés par l'EA1155 « Chimie Médicinale et Drug Discovery » IICiMed de la Faculté de Pharmacie de Nantes dans le cadre d'une collaboration avec le Prof. Jean-Michel Robert. Les composés (*S*)- et (*R*)-MRI-1867 ont, quant à eux, été généreusement fournis par le laboratoire LPS – NIAAA (Bethesda MD, Etats-Unis).

D'autre part le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) Glutamax™ contenant 4,5 g/L de D-Glucose ainsi que l'OptiMEM, le DMEM/F12 et le Sérum de Veau Fœtal (SVF) proviennent de chez Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

### III. Expérimentations *in vitro*

Les expérimentations réalisées à partir de TA murin ont été effectuées à partir du TA péri-épididymaire, qui sera considéré comme du TAV par opposition au TASC. Chez l'Homme, les TA désignés comme TAV et TASC proviennent de l'abdomen.

#### A. Explants de tissu adipeux murin

Les souris minces (n=5) et obèses (n=6) utilisées pour ces expérimentations ont été mises à mort par dislocation cervicale afin de réaliser les prélèvements du TAV et du TASC. Les tissus ont été dissociés, à l'aide de scalpels, en morceaux d'environ 10mg qui ont été rincés, puis incubés dans un milieu de culture complet (MCC) (OptiMEM 5% BSA – Bovine Serum Albumine – sans AG, Euromedex, Souffelweyersheim, France) à raison d'environ 50mg de TA pour 1mL de MCC à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sous agitation douce.

##### 1. Production d'ECs par le TAV et le TASC de souris minces et obèses

Les TAV et TASC de souris minces et obèses, après dissociation et rinçage ont été incubés dans du MCC, en présence de l'inhibiteur des enzymes de dégradation des ECs JZL-195 à 10µM, additionné ou non de JD-5037 à 0,1µM ou de Rimonabant à 0,1µM. Toutes les drogues ont été préalablement préparées dans du DMSO. Le TAV a également été incubé dans un milieu contrôle sans JZL-195 (noté Véhicule) composé de MCC additionné de 0,02% de DMSO. 1mL de milieu d'incubation a été collecté aux temps 1h, 2h, 3h et 4h puis les ECs et NAEs contenus (2-AG, AEA, OEA et PEA) ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

## 2. Optimisation de quantification du 2-AG

### *a. Production d'ECs pendant 8h en présence d'ACEA*

Après collecte, dissociation et rinçage, du TAV de 5 souris minces a été poolé et incubé dans du MCC supplémenté avec de l'ACEA à 1 $\mu$ M. Un contrôle négatif a été réalisé avec du TAV incubé dans du MCC avec 0,01% DMSO (noté Véhicule). 1mL de milieu d'incubation a été collecté aux temps 2h, 4h, 6h et 8h puis les ECs et NAEs contenus (2-AG, AEA, OEA et PEA) ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

### *b. Production d'ECs pendant 8h en présence d'A784168*

Après collecte, dissociation et rinçage, du TAV de 4 souris minces a été incubé dans du MCC supplémenté avec de l'agoniste TRPV1 A764168 à 50nM, 500nM ou 5 $\mu$ M. Un contrôle négatif a été réalisé avec du TAV incubé dans du MCC avec 0,01% DMSO (noté Véhicule). 1mL de milieu d'incubation a été collecté aux temps 2h, 4h, 6h, 7h et 8h puis les ECs et NAEs contenus (2-AG, AEA, OEA et PEA) ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

### *c. Dégradation spontanée 2-AG pendant 4h*

Du MCC supplémenté avec 1 $\mu$ M de 2-AG a été incubé pendant 4h (n=2). 1mL de ce milieu a été collecté aux temps 1h, 2h, 3h et 4h puis le 2-AG présent a été extrait sur colonne et dosé par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

### *d. Production d'ECs pendant 4h et surcharge en 2-AG de milieu conditionné par des explants de TA*

Du TAV de 3 souris minces a été incubé, après collecte, dissociation et rinçage, dans du MCC pendant 1h, 2h, 3h ou 4h. 1mL de milieu d'incubation a été collecté à l'issue de

chacune de ces incubations. Dans les milieux d'incubation restants, 1 $\mu$ M de 2-AG a été additionné puis de nouvelles incubations de respectivement 1h, 2h, 3h et 4h ont été réalisées. 1mL de milieu d'incubation supplémenté a ensuite été collecté. Les ECs et NAEs (2-AG, AEA, OEA et PEA), contenus dans les milieux de la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> incubation, ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

### *e. Production et dégradation des ECs en présence de MJN110*

#### *i. Inhibition de dégradation pendant 2h*

Du milieu conditionné a été préparé à partir de TAV de souris minces incubé dans du MCC pendant 2h (n=1). Le TA a alors été retiré et le milieu conditionné a été surchargé avec 1 $\mu$ M de 2-AG puis incubé de nouveau 2h en présence de l'inhibiteur de MAGL MJN110 à 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M ou 100 $\mu$ M. Un contrôle négatif a été réalisé avec du TAV incubé dans du MCC avec 0,5% DMSO (noté Véhicule). 1mL de milieu d'incubation a été collecté aux temps 30min, 1h, 1h30 et 2h puis les ECs et NAEs contenus (2-AG, AEA, OEA et PEA) ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

#### *ii. Incubation pendant 2h de production*

Après collecte, dissociation et rinçage, du TAV de souris minces a été incubé dans du MCC supplémenté avec de l'inhibiteur de MAGL MJN110 à 100 $\mu$ M (n=2). Un contrôle négatif a été réalisé avec du TAV incubé dans du MCC avec 0,5% DMSO noté Véhicule. 1mL de milieu d'incubation a été collecté aux temps 30min, 1h, 1h30 et 2h puis les ECs et NAEs contenus (2-AG, AEA, OEA et PEA) ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

## B. Explants de tissu adipeux humain

Du TA viscéral et sous-cutané issu de sujets obèses (n=5 par groupe) a été collecté dans le cadre d'un protocole établi en collaboration avec le Professeur Pablo Ortega Deballon, Chef du service de chirurgie digestive du CHU de Dijon (CB1R, 2015-A01619-40, **Annexe 4**). Les sujets obèses non diabétiques inclus dans l'étude doivent être des hommes, âgés de 18 à 70 ans et possédant un IMC strictement supérieur à 30. Les critères de non-inclusion comprennent la présence d'un diabète ou de pathologies associées (cancer ou maladies inflammatoires chroniques). L'IMC moyen des sujets obèses inclus dans ces résultats est de 47 pour un âge moyen de 41ans.

Le TAV et le TASC, une fois collectés, ont été dissociés à l'aide de scalpels en morceaux d'environ 10mg qui ont été rincés, puis incubés dans un MCC (OptiMEM 5% BSA sans AG) à raison d'environ 50mg de TA pour 1mL de MCC à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sous agitation douce. Le milieu de culture a été additionné de 0,02% de DMSO pour le véhicule ou d'inhibiteur des enzymes de dégradation des ECs JZL-195 à 10µM. 1mL de milieu d'incubation a été collecté aux temps 1h, 2h, 3h et 4h puis les ECs et NAEs contenus (2-AG, AEA, OEA et PEA) ont été extraits sur colonne et dosés par spectrométrie de masse selon la méthode décrite **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

## C. Cellules HEK 293 CB1Rm

### 1. Culture des HEK CB1Rm

Des cellules HEK293 avec une transfection stable du CB1R murin (notées HEK293 CB1Rm) avec un tag HA N-terminale (#EIU005, Kerafast, Boston, Etats-Unis), ont été cultivées dans du DMEM High Glucose Glutamax™ additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et maintenues à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un incubateur saturé en humidité. Les cellules ont été repiquées en moyenne une fois par semaine et le milieu a été changé tous les deux jours.

## 2. Traitement des cellules pour étude de la phosphorylation de Erk 1/2

Après récupération des cellules adhérentes à l'aide de la trypsine, ces dernières ont été centrifugées 5min à 120g à température ambiante puis comptées sur une cellule de comptage (EVE™ Plus, Ozyme, Saint-Cyr l'école, France). Elles ont été ensuiteensemencées en plaques 6-puits coatées à la poly-L-Lysine (A-005-C, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) à raison de 200 000 cellules/puits. Après 48h, les puits ont été rincés avec de l'OptiMEM sans sérum puis les cellules ont été incubées avec de l'OptiMEM sans sérum. Après 18h, les cellules ont été pré-traitées 30 min avec des antagonistes ou antagonistes potentiels des CB1R (Rimonabant, JD-5037, (R)-MRI-1867, (S)-MRI-1867, JM-00266, HR-0133, HR-0140, HR-0152, HR-0154 ou HR-0155) ou du véhicule (DMSO 0,01%) puis co-traitées 5 min avec un agoniste (AEA ou ACEA) et les antagonistes ou du véhicule (DMSO 0,02%). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 puits sur 3 expériences indépendantes (n=3).

Les extraits protéiques sont ensuite collectés après lyse cellulaire et analysés par Western Blot (Matériel et Méthodes, **Partie VII**).

## 3. Glosensor

Le protocole utilisé pour la réalisation des tests par Glosensor est décrit en **Annexe 6**.

## 4. Test de Binding

Les tests de binding, présentés dans le cadre des études des molécules JM-00266 et HR-0133, ont été réalisés en collaboration avec le Laboratory of Physiological Studies, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA, NIH de Bethesda, Etats-Unis). Ce test repose sur l'étude du déplacement d'un composé radiomarqué [<sup>3</sup>H]CP55,940 par la molécule testée à différentes concentrations (protocole détaillé dans : Tam et al., 2012).

## D. Fraction stroma-vasculaire de souris

### 1. Isolement et mise en culture de la FSV

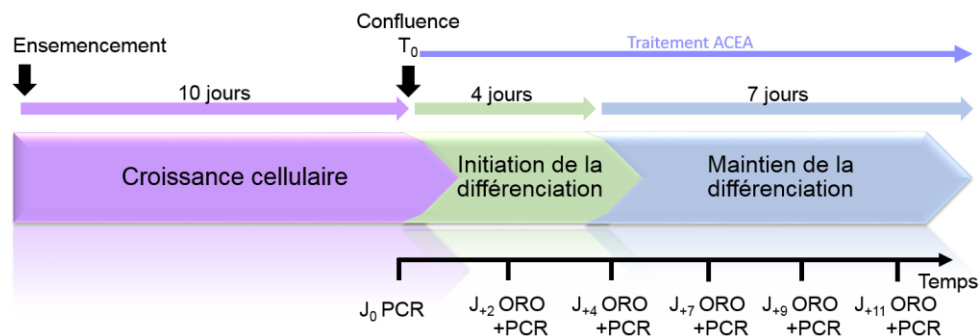
Le protocole utilisé pour l'isolement et la mise en culture des cellules de la FSV est basé sur la publication de (Aune et al., 2013). Après mise à mort par dislocation cervicale des souris (minces ou obèses), le TAV a été collecté, rincé avec du PBS et dissocié mécaniquement à l'aide de scalpels stériles (n=3 par groupe). Le tissu a été dissocié enzymatiquement 50min à 37°C dans un milieu de digestion préparé extemporanément (PBS, CaCl<sub>2</sub> 10mM, Collagénase II 1,5U/mL et Dispase II 2,4U/mL) à raison d'1g de tissu pour 5mL de milieu de digestion. Après arrêt de la digestion avec du MCC (DMEM/F12, 10% SVF, 10% P/S), l'homogénat a été centrifugé 10min à 700g 22°C. Le surnageant contenant les adipocytes matures a été retiré. Le culot brunâtre contenant la FSV a été repris dans du MCC, passé sur un tamis de 70µm et centrifugé de nouveau 10min à 700g 22°C. Le culot a ensuite été repris dans du MCC, les cellules ont été comptées (EVE™ Plus, Ozyme, Saint-Cyr l'école, France) etensemencées à raison de 130 000 cellules /puits dans des plaques 12 puits préalablement coatées au collagène (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Une heure après l'ensemencement, les cellules adhérentes sont rincées 2 fois avec du PBS sans calcium ni magnésium afin de retirer les hématies, les cellules immunitaires et d'autres contaminants puis elles sont incubées dans 2mL de MCC.

### 2. Induction de la différenciation

Le milieu de culture est changé toutes les 48h jusqu'à atteindre 100 % de confluence (10 jours après ensemencement). La différenciation en adipocytes est alors induite à l'aide d'un milieu de différenciation (MCC, insuline 5µg/mL, IBMX 0,5mM, dexaméthasone 2,5µM, indométacine 125µM, rosiglitazone 0,5mM) pendant 4 jours puis la différenciation est maintenue à l'aide d'un milieu de maintien (MCC, insuline 5µg/mL). Les milieux de différenciation et de maintien sont changés toutes les 48h.

**a. Différenciation de la FSV issue de TAV de souris minces en présence d'ACEA**

La FSV du TAV de souris minces a été isolée et mise en culture selon le protocole décrit précédemment. Une fois la confluence atteinte, les cellules ont été incubées soit avec du milieu contrôle (MCC + 0,17% DMSO), soit avec du milieu de différenciation supplémenté avec 0,01% DMSO, soit avec du milieu de différenciation supplémenté avec 1 $\mu$ M d'ACEA (**Figure 97**). Après 4 jours de différenciation, les cellules sont incubées pour les 7 jours suivants, soit avec du milieu contrôle (MCC + 0,01% DMSO), soit avec du milieu de maintien supplémenté avec 0,01%DMSO, soit avec du milieu de maintien supplémenté avec 1 $\mu$ M d'ACEA. La différenciation adipocytaire est alors suivie par coloration Oil Red O et analyse de l'expression génique à J0, J2, J4, J7, J9 et J11.



**Figure 97. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées à l'ACEA.**

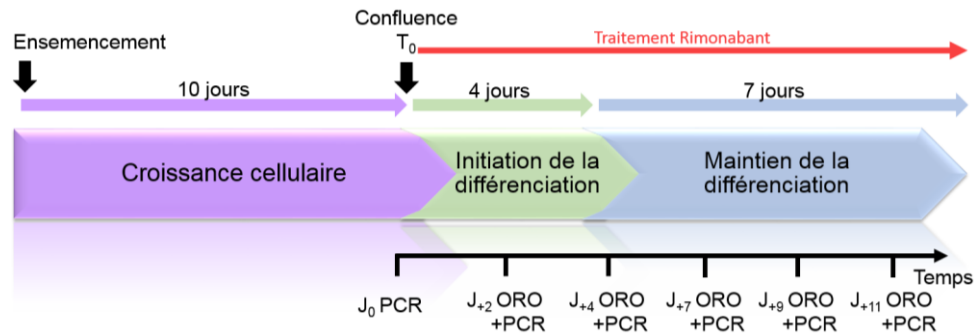
ORO : Oil Red O, PCR : Polymerase Chain Reaction.

**b. Différenciation de la FSV issue de TAV de souris obèses en présence de Rimonabant**

La FSV du TAV de souris obèses a été isolée et mise en culture selon le protocole décrit précédemment. Une fois la confluence atteinte, les cellules ont été incubées soit avec du milieu contrôle (MCC + 0,17% DMSO), soit avec du milieu de différenciation supplémenté avec 0,01% DMSO, soit avec du milieu de différenciation supplémenté avec 1 $\mu$ M de Rimonabant (**Figure 98**). Après 4 jours de différenciation, les cellules sont incubées pour les 7 jours suivants soit avec du milieu contrôle (MCC + 0,01% DMSO), soit avec du milieu de maintien supplémenté avec 0,01% DMSO, soit avec du milieu de maintien supplémenté



avec  $1\mu\text{M}$  de Rimonabant. La différenciation adipocytaire est alors suivie par coloration Oil Red O et analyse de l'expression génique à J0, J2, J4, J7, J9 et J11.



**Figure 98. Protocole d'induction et de suivi de la différenciation des cellules de la FSV traitées au Rimonabant.**

ORO : Oil Red O, PCR : Polymerase Chain Reaction.

## IV. Expérimentations animales *in vivo*

### A. Inhibition de la dégradation des ECs par JZL-195

Du JZL-195 à 20 mg/kg est injecté à des souris par voie intrapéritonéale (jeûne 6h). Après 3h les souris sont mises à mort et le TAV est collecté. Les ECs présents dans le TAV sont alors extraits et dosés par spectrométrie de masse (protocole d'extraction tissulaire décrit dans Muller et al., 2017 et se référer à la **Partie VII** du Matériel et Méthodes pour le dosage des ECs).

### B. Blocage chronique du SEC

#### 1. Gavage au Rimonabant et JD-5037

Des souris obèses, réparties en trois groupes de 12, ont été traitées quotidiennement par gavage avec du Rimonabant à 10mg/kg, du JD-5037 3mg/kg ou du Véhicule (DMSO/Tween 80/NaCl 0,9% 1/1/5). 10 souris normo-pondérées ont reçu du Véhicule. La masse corporelle des animaux a été suivie quotidiennement. Après 14 jours de traitement, la glycémie à jeun a été mesurée et les animaux ont été mis à mort. Le plasma a été collecté afin de doser les paramètres ASAT, ALAT, triglycérides, cholestérol total,

HDL- et LDL-cholestérol. Le TA brun a été pesé ainsi que le TAV et le TASC dont une partie a été collectée en vue d'en extraire l'ARN et de mesurer l'expression génique. Le restant de TAV et de TASC a permis, pour les groupes d'animaux obèses, de mesurer la production d'ECs. Pour cela, les tissus ont été dissociés à l'aide de scalpels, rincés puis incubés 1h dans du MCC (OptiMEM 1% BSA sans AG) à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. 1mL de milieu d'incubation a alors été collecté puis les ECs ont été extraits et dosés selon les méthodes décrites **Partie VII**, Matériel et Méthodes.

## 2. Gavage au JM-00266

Des souris obèses, réparties en deux groupes de 14 animaux, ont été traitées quotidiennement par gavage avec du JM-00266 à 40mg/kg ou du Véhicule (DMSO/Tween 80/NaCl 0,9% 1/1/5) pendant 14 jours avec suivi quotidien de la prise alimentaire. Au 10<sup>ème</sup>, 12<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour de traitement des tests de tolérance au glucose, à l'insuline et au pyruvate ont été réalisés. A l'issue des traitements, les animaux ont été mis à mort et la glycémie à jeun ainsi que la masse corporelle et la masse du TAV ont été mesurés. Le plasma a été collecté afin de doser les paramètres ASAT, ALAT, triglycérides, cholestérol total, HDL- et LDL-cholestérol. Sur une partie des animaux (6/groupe), des dosages d'insuline, de glucagon, de leptine, de résistine, de GIP et de ghréline ont été réalisés.

## 3. Gavage au HR-0133

Des souris obèses, réparties en deux groupes de 6 animaux, ont été traitées quotidiennement par gavage avec du HR-033 à 10mg/kg ou du Véhicule (DMSO/Tween 80/NaCl 0,9% 1/1/5). 10 souris normo-pondérées ont reçu du Véhicule. La masse corporelle des animaux et la prise alimentaire ont été suivies durant les 14 jours de traitement. Au 12<sup>ème</sup> jour de traitement, les animaux ont subi un test de tolérance au glucose. Au 14<sup>ème</sup> jour après un jeûne de 12h, le foie et le TAV des animaux ont été pesés et le plasma a été collecté en vue de réaliser le dosage des paramètres suivants : ASAT, ALAT, triglycérides, cholestérol total, HDL- et LDL-cholestérol, insuline, glucagon, leptine, résistine, GIP, GLP-1, ghréline et PAI-1.

## C. Tests de tolérance

### 1. oGTT

Après un jeûne de 6h, les souris sont pesées puis la glycémie basale est mesurée à la queue à l'aide d'un glucomètre (mylife PURA, Ypsomed, Paris, France). Les animaux reçoivent par gavage une solution de glucose à 2g/kg diluée dans du NaCl 0,9% stérile. La glycémie est mesurée aux temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes post-injection. L'évolution de la glycémie en fonction du temps est alors tracée.

### 2. ITT

Après un jeûne de 6h, les souris sont pesées puis la glycémie basale est mesurée à la queue à l'aide d'un glucomètre (mylife PURA, Ypsomed, Paris, France). Les animaux reçoivent ensuite une injection intrapéritonéale d'insuline à 0,5UI/kg diluée dans du NaCl 0,9% stérile. La glycémie est mesurée aux temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes post-injection. L'évolution de la glycémie en fonction du temps est alors tracée.

### 3. ipPTT

Après un jeûne sur la nuit, les souris sont pesées puis la glycémie basale est mesurée à la queue à l'aide d'un glucomètre (mylife PURA, Ypsomed, Paris, France). Les animaux reçoivent ensuite une injection intrapéritonéale de pyruvate à 2g/kg diluée dans du NaCl 0,9% stérile. La glycémie est mesurée aux temps 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 et 180 minutes post-injection. L'évolution de la glycémie en fonction du temps est alors tracée.

## V. Dosages colorimétriques

### A. Dosages plasmatiques

Les dosages plasmatiques des études chroniques pour les paramètres ASAT, ALAT, triglycérides, cholestérol total, HDL- et LDL-cholestérol ont été réalisés par le plateau technique de biologie (CHU Dijon). Les autres paramètres (insuline, glucagon, leptine, résistine, GIP et ghréline) ont été dosés grâce au kit Bio-Plex Pro™ Mouse Diabetes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) selon les préconisations du fournisseur.

### B. Dosages tissulaires

#### 1. Extraction et dosage des protéines du tissu adipeux

Le contenu du TA en protéines a été estimé par un dosage colorimétrique à la suite d'une extraction protéique. Pour cela, le TA collecté a été homogénéisé dans du tampon de lyse (RIPA 1X supplémenté avec 1% de cocktail inhibiteur de protéases et 1% de cocktail d'inhibiteur de phosphatases), à raison de 200µL de tampon pour 100mg de tissu, dans un broyeur à billes (Precellys 24, Ozyme, Saint-Cyr l'école, France) avec des billes (Bille silice-zirconium 1mm, Dutscher, Bernolsheim, Belgique). L'homogénat a ensuite été incubé 1h à 4°C afin de permettre la lyse des cellules puis il a été centrifugé 20min à 13000g 4°C. Le surnageant présent sous la couche de graisse a été collecté et de nouveau centrifugé 20min à 13000g 4°C. Le surnageant présent sous la couche de graisse a de nouveau été collecté. Les protéines sont dosées avec le kit BCA (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Pour cela, 10µL de solution protéique diluée au 1/5 sont additionnés à 100µL de réactif (préparé extemporanément 50:1 v/v de Réactif A/Réactif B) et incubés 30min à 37°C. La densité optique est ensuite lue à 562nm. Les concentrations ont été calculées par comparaison des densités optiques des échantillons avec les densités optiques d'une gamme standard BSA (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

## 2. Extraction et dosage des triglycérides hépatiques

Les triglycérides hépatiques ont été mesurés à l'aide d'un kit de dosage colorimétrique après extraction des lipides totaux. Le foie a été homogénéisé à l'aide d'un broyeur à billes (BioSpec Products, Bartlesville, Etats-Unis) à raison de 50mg de tissu pour 500 $\mu$ L de méthanol puis du méthanol et du méthylal ont été ajoutés afin d'obtenir un ratio méthylal/méthanol 4:1 (v/v). Après 1h d'incubation à température ambiante, les homogénats ont été centrifugés 10min à 3000g 16°C. Après collecte, une fraction du surnageant a été évaporée sous azote puis repris dans 1mL de CHCl<sub>3</sub> 2% Triton X100. Une seconde évaporation a alors été réalisée avant solubilisation des lipides dans 1mL d'eau distillée. La teneur en triglycérides du foie a ensuite été mesurée à l'aide du kit TG FS (DiaSys, Condom, France) à partir de 10 $\mu$ L de lipides totaux extraits auxquels 200 $\mu$ L de réactif sont ajoutés. La densité optique est alors lue à 500nm après 10min d'incubation à 37°C et les absorbances des échantillons sont rapportées à celles d'une gamme standard afin de déterminer leurs concentrations.

## VI. Coloration Oil Red O

La différenciation en adipocytes des cellules de la fraction stroma vasculaire a été analysée par coloration Oil Red O, permettant de visualiser en rouge les vacuoles lipidiques caractéristiques des adipocytes matures et de quantifier l'intensité de cette coloration par spectrophotométrie.

Les cellules sont tout d'abord fixées au formol pendant 15min puis lavées et incubées 5min dans de l'isopropanol à 60%. Elles sont alors colorées 20min avec la solution d'Oil Red O (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) préparée extemporanément à partir d'une solution stock à 0,5% w/v (poudre Oil Red O/isopropanol) diluée aux 2/3 dans de l'eau distillée puis filtrée à 0,45 $\mu$ m. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, les cellules sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Après observation, la fixation non spécifique du colorant est éliminée après rinçage puis la coloration est éluée avec 130 $\mu$ L/puits d'isopropanol à 100%. Après dépôt de 100 $\mu$ L/puits de cette élution dans une plaque 96 puits, la densité optique est mesurée à 492nm.

## VII. Extraction et dosage des ECs par spectrométrie de masse

Le dosage des ECs a été réalisé sur du milieu de culture dans lequel avait été incubé du TA humain ou murin. Avant l'extraction, du standard interne (anandamide deutéré – AEA-d4) a été ajouté à raison de 2ng/mL de milieu.

Les ECs sont ensuite extraits sur colonne SPE-C18 (Supelclean™ LC-18 SPE, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) sur un système d'extraction sous vide. Une fois la colonne conditionnée à l'acétonitrile 100 %, les échantillons sont acidifiés à l'acide orthophosphorique 85% puis déposés sur colonne. Cette dernière est ensuite rincée à l'Acétonitrile 40 %. Les ECs retenus dans la colonne sont alors élués à l'Acétonitrile/NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (98/2), évaporés puis repris dans 200µL de méthanol. Après une nouvelle évaporation et reprise dans 50µL de méthanol, les extraits sont injectés dans une colonne 1200 LC couplée à un spectromètre de masse 6460-QqQ MS/MS, équipé d'une source ESI (Agilent technologies, Les Ulis, France). Les composés sont séparés sur une colonne Zorbax SB-C18 2.1x50mm, 1.8µm (Agilent technologies, Les Ulis, France) (45°C, débit 0,4mL/min) avec un gradient linéaire de solvant A (0,1% acide formique/H<sub>2</sub>O) et solvant B (0,1% acide formique/CH<sub>3</sub>OH). Le protocole suivant a été utilisé : 1min avec 10% de B, 8min jusqu'à 85% de B et ensuite maintien de B à 10% pendant 4 à 5 min. L'acquisition est réalisée suivant le protocole décrit dans Muller et al., 2017 (**Tableau 8**).

**Tableau 8. Transitions énergétiques utilisées dans la quantification des ECs par spectrométrie de masse.**

<b>Composés</b>	<b>Transition</b>	<b>Caractéristiques</b>
<i>AEA-d4 (Std interne)</i>	352.2→66	frag 115V, CE 14V
<i>2-AG</i>	379.1→91	frag 120V, CE 62V
<i>AEA</i>	348.2→62	frag 120V, CE 14V
<i>OEA</i>	326.2→62	frag 115V, CE 14V
<i>PEA</i>	300.2→62	frag 124V, CE 14V

Le standard interne (AEA-d4) a permis la quantification des ECs par la méthode de la dilution isotopique. Les résultats sont exprimés en ng/g de tissu ou en ng/g de protéines.

## VIII. Extraction de protéines et Western-Blotting

Les protéines issues des cellules HEK CB1Rm ont été extraites par un tampon de lyse (50mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X100 additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1% et de phosphatases 1%) à raison de 250 $\mu$ L par puits de plaque 6 puits, après 30min d'incubation à 4°C et grattage. Les extraits ont ensuite été centrifugés 20min à 16000g 4°C et le surnageant a été collecté.

La concentration en protéines a ensuite été estimée par la méthode BCA (décrit pour le dosage des protéines du TA, Matériel et Méthodes, **Partie V.B.1**). Les chargements sur gel ont été préparés à raison de 10 $\mu$ g de protéines additionnées de tampon de charge (Tris-HCl 0,03M pH 6,8, DTT 0,05M, glycérol 8%, bleu de bromophénol 0,05%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2,5%) et dénaturées 5min à 95°C. Les protéines ont été séparées sur un gel d'acrylamide en gradient (4-20%) SDS-PAGE (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et transférées sur membrane de nitrocellulose en utilisant un appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). Après 2h de saturation des membranes dans un tampon TBS-Tween 20 0,1% BSA 5%, les membranes ont été incubées une nuit à 4°C sous agitation lente avec un anticorps primaire (dilué au 1/1000 dans un tampon TBS-Tween 20 0,1% BSA 5%). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : phospho-Erk  $\frac{1}{2}$  (Thr202/Tyr204, #4377) et Erk  $\frac{1}{2}$  forme totale (#4695). Les anticorps utilisés proviennent de chez Cell Signaling (Leiden, Pays-Bas).

Les membranes ont ensuite été lavées sous agitation rapide dans un tampon de lavage TBS-Tween 20 0,1%, puis incubées pendant 1h à température ambiante, en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase et dirigé contre les IgG de lapin (#7074, Cell Signaling, Leiden, Pays-Bas). L'anticorps secondaire est dilué au 1/5000 dans un tampon TBS-Tween 20 0,1% BSA 5%. Après lavage, les membranes ont été révélées par une méthode de chimiluminescence utilisant un substrat ECL (Clarity™, Western ECL Substrat, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) et exposées grâce à une station d'acquisition d'image (Chemi-Doc MP Imaging System, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Enfin, l'intensité des bandes a été analysée à l'aide du logiciel ImageLab.

## IX. Analyse de l'expression génique

### 1. Extraction des ARN de TA

Les ARN issus des TA murins ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes (BioSpec Products, Bartlesville, Etats-Unis) dans 1mL de Tri-Reagent (Euromedex). Après 10min à température ambiante et 10min de centrifugation à 12000g 4°C, la phase inférieure (sous la graisse) a été prélevée. Les ARN ont ensuite été extraits avec 200µL de chloroforme. Après 10min de repos à température ambiante et 15min de centrifugation à 12000g 4°C, les ARN contenus dans le surnageant ont ensuite été précipités en présence de 500µL d'isopropanol. Le culot obtenu, après 10min d'attente à température ambiante et 10min de centrifugation (12000g 4°C), a été lavé avec 1mL d'éthanol 70% puis séché avant d'être repris dans 20µL d'eau dépourvue de nucléases.

### 2. Extraction des ARN de la FSV

Afin d'extraire les ARN des cellules de la FSV, le milieu de culture a été retiré et la couche cellulaire a été rincée 2 fois avec 1mL de PBS froid. 500µL de Tri-Reagent (Euromedex) ont été ajoutés dans chaque puits et le tout a ensuite été collecté. L'extraction a été réalisée avec 100µL de chloroforme en suivant les mêmes étapes que citées précédemment dans le cadre de l'extraction des ARN du TA (**Partie IX.1**) en respectant les proportions de chaque réactif.

### 3. Réverse-transcription et qPCR

La concentration en ARN a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260nm à l'aide d'un nanophotomètre N50 (Implen, Munich, Allemagne). Le ratio des absorbances à 260 et 280nm a permis d'estimer la qualité des acides nucléiques. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été réalisée par reverse-transcription (programme dans le **Tableau 9**) à partir de 1µg d'ARN avec le kit IScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).



**Tableau 9. Programme de réverse-transcription des ARN.**

<i>Durée</i>	<i>Température</i>	<i>Etape</i>
<i>5 min</i>	25°C	Hybridation
<i>20 min</i>	46°C	Réverse-transcription
<i>1 min</i>	95°C	Inactivation

La PCR en temps réel a été réalisée suivant le programme détaillé dans le **Tableau 10**, à partir de 20ng d'ADNc synthétisés, 300nM d'un mélange d'amorces sens et anti-sens et du mix IQ<sup>TM</sup>SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

**Tableau 10. Programme de qPCR sur ADNc murin.**

<i>Durée</i>	<i>Température</i>	<i>Etape</i>	<i>Nombre de cycle</i>
<i>10 min</i>	95°C	Dénaturation	<b>1</b>
<i>15 s</i>	95°C	Dénaturation	<b>40</b>
<i>1 min</i>	58°C	Hybridation et élongation	
<i>15 s</i>	95°C	Courbe de fusion	<b>1</b>
<i>1 min</i>	60°C		
<i>+ 0,3°C</i>	60-95°C		
<i>15 s</i>	95°C		

L'analyse a été réalisée grâce au système de PCR en temps réel StepOnePlus<sup>TM</sup> (Life Technologies, Saint-Aubin, France).

Les séquences des amorces murines utilisées sont détaillées dans le **Tableau 11**. L'expression de chaque gène a été déterminée grâce à une courbe standard réalisée à partir de dilutions d'ADNc (1/5, 1/10, 1/50, 1/100) et a ensuite été normalisée par la moyenne géométrique des gènes *Atp5e*, *Actb*, *Rn18s* et *Rpl38* pour les analyses géniques des cellules de la FSV (Matériel et Méthodes, **Partie III.D.2**) et la moyenne géométrique des gènes *Atp5e*, *Actb*, *Rn18s*, *Rpl38* et *Tbp* pour les analyses géniques tissulaires après traitement chronique avec le Rimonabant et JD-5037 (Matériel et Méthodes, **Partie IV.B.1**).

**Tableau 11. Séquences des amorces sens et anti-sens murines.**

<b>Gène cible (PROTEINE)</b>	<b>Amorce sens</b>	<b>Amorce anti-sens</b>
<i>Dlk1 (PREF-1)</i>	5'-ggattcgtcgacaag-3'	5'-gcttgacagacact-3'
<i>Cebpa (CEBP<math>\alpha</math>)</i>	5'-ctccctagtgttggtggaag-3'	5'-acacgtggctccgtggttagg-3'
<i>Pparg (PPAR<math>\gamma</math>)</i>	5'-ctccaagaataccaaagtgcg-3'	5'-gccatgaggaggtagaaggt-3'
<i>Fabp4 (FABP4)</i>	5'-gaagtgggagtggtgcttg-3'	5'-atgatcatgttgggcttg-3'
<i>Cd36 (FAT/CD36)</i>	5'-aattagtagaaccgggccac-3'	5'-ccaactcccaggtacaatca-3'
<i>Ucp1 (UCP1)</i>	5'-gcttaatgactggaggtgtg-3'	5'-ctctgggcttgattctgac-3'
<i>Dio2 (DIO2)</i>	5'-gttccagccatgcaatgtcc-3'	5'-tcacactgggaattcgggg-3'
<i>Cd14 (CD14)</i>	5'-cctgaattgggagagagg-3'	5'-gcagcgtaaaacttgagg-3'
<i>Cnr1 (CB1R)</i>	5'-ccgcaaagatagcccaatg-3'	5'-aacccaccagttgaac-3'
<i>Cnr2 (CB2R)</i>	5'-caaaggaggaagtgttggt-3'	5'-tggagagatcggcttatgtg-3'
<i>Faah (FAAH)</i>	5'-ggacctgtccccttct-3'	5'-cctgctgggctgtcacata-3'
<i>Napepld (NAPE-PLD)</i>	5'-ctcgatatctgctggaaca-3'	5'-ctgaattctggcgcttctc-3'
<i>Mgl1 (MAGL)</i>	5'-cgcgaggttcttccctaa-3'	5'-aaagtcaccccgattctccg-3'
<i>Dagla (DAGL<math>\alpha</math>)</i>	5'-gctggacgaggcaaacatg-3'	5'-ctcgtgcgattcttgagg-3'
<i>Lep (Leptine)</i>	5'-ggatcaatgacattcacacag-3'	5'-aggaatgaagtccaagccagt-3'
<i>Adrb3 (Récepteur <math>\beta_3</math>)</i>	5'-agtttgagagcaggaatccagg-3'	5'-gagatggtccaagatggtgct-3'
<i>Ccl2 (CCL2)</i>	5'-ccacaaccactcaagcact-3'	5'-aggcatcacagtccgagtca-3'
<i>Lpl (LPL)</i>	5'-ctaaggaccctgaagacaca-3'	5'-tctcatacattcccgttaccgt-3'
<i>Atp5e (ATP synthase)</i>	5'-tggactcagctacatccgg-3'	5'-aactcgtcttcagggcatc-3'
<i>Actb (<math>\beta</math>-Actine)</i>	5'-aatcgtgcgtgacatcaaag-3'	5'-gaaaagagcctcagggcat-3'
<i>Rn18s (18S)</i>	5'-gtgtggggagtgaatggtg-3'	5'-gcgagacagtcaaaccacg-3'
<i>Tbp (TBP)</i>	5'-acggcacaggactactcca-3'	5'-gctgtcttgttctcttccaa-3'
<i>Rpl38 (L38)</i>	5'-catgcctcggaaaattgag-3'	5'-tcttgacagacttggcatcct-3'

## X. Analyse statistique

Les résultats ont généralement été exprimés sous la forme de moyenne  $\pm$  SEM. La significativité entre deux groupes a été déterminée par un test de Student bilatéral ou un test de Mann-Whitney. La différence significative entre les moyennes de plus de deux groupes a été déterminée par une analyse de variance ANOVA suivie d'une comparaison multiple par un test de Tuckey. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism (San Diego, USA) : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , et \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$ , \$\$\$  $p < 0,001$ , \$\$\$\$  $p < 0,0001$ .

# Bibliographie

---

- Abrass, C. K. (2004). Overview : Obesity: what does it have to do with kidney disease? *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15(11), 2768-2772. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141963.04540.3E>
- Addy, C., Wright, H., Van Laere, K., Gantz, I., Erondou, N., Musser, B. J., Lu, K., Yuan, J., Sanabria-Bohórquez, S. M., Stoch, A., Stevens, C., Fong, T. M., De Lepeleire, I., Cilissen, C., Cote, J., Rosko, K., Gendrano, I. N., Nguyen, A. M., Gumbiner, B., ... Heymsfield, S. B. (2008). The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metabolism*, 7(1), 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.012>
- Adermark, L., Talani, G., & Lovinger, D. M. (2009). Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *The European Journal of Neuroscience*, 29(1), 32-41. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06551.x>
- Ahmad, R., Sorrell, M. F., Batra, S. K., Dhawan, P., & Singh, A. B. (2017). Gut permeability and mucosal inflammation : Bad, good or context dependent. *Mucosal Immunology*, 10(2), 307-317. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.128>
- Ahn, K. H., Mahmoud, M. M., Shim, J.-Y., & Kendall, D. A. (2013). Distinct roles of  $\beta$ -arrestin 1 and  $\beta$ -arrestin 2 in ORG27569-induced biased signaling and internalization of the cannabinoid receptor 1 (CB1). *The Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9790-9800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438804>
- Ahn, K., McKinney, M. K., & Cravatt, B. F. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical Reviews*, 108(5), 1687-1707. <https://doi.org/10.1021/cr0782067>
- Alessi, M.-C., Bastelica, D., Mavri, A., Morange, P., Berthet, B., Grino, M., & Juhan-Vague, I. (2003). Plasma PAI-1 Levels Are More Strongly Related to Liver Steatosis Than to Adipose Tissue Accumulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(7), 1262-1268. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000077401.36885.BB>
- Alexander, J. P., & Cravatt, B. F. (2006). The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases. *Journal of the American Chemical Society*, 128(30), 9699-9704. <https://doi.org/10.1021/ja062999h>
- Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission : Focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*, 68(4), 247-286. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00080-1)

Alligier, M., Seyssel, K., Disse, E., & Laville, M. (2013). Le tissu adipeux: Couleur, localisation, fonctions et autres données nouvelles. *Les Mises au Point cliniques d'Endocrinologie, Nutrition et Métabolismes 2013*.

Alvheim, A. R., Malde, M. K., Osei-Hyiaman, D., Lin, Y. H., Pawlosky, R. J., Madsen, L., Kristiansen, K., Frøyland, L., & Hibbeln, J. R. (2012). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *20*(10), 1984-1994. <https://doi.org/10.1038/oby.2012.38>

Alvheim, A. R., Torstensen, B. E., Lin, Y. H., Lillefosse, H. H., Lock, E.-J., Madsen, L., Frøyland, L., Hibbeln, J. R., & Malde, M. K. (2014). Dietary linoleic acid elevates the endocannabinoids 2-AG and anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. *Lipids*, *49*(1), 59-69. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3842-y>

Alvheim, A. R., Torstensen, B. E., Lin, Y. H., Lillefosse, H. H., Lock, E.-J., Madsen, L., Hibbeln, J. R., & Malde, M. K. (2013). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-arachidonoylglycerol and anandamide in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and mice, and induces weight gain and inflammation in mice. *The British Journal of Nutrition*, *109*(8), 1508-1517. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003364>

Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloro, S. M., Yawe, J. C., Shen, Y., Czech, M. P., & Aouadi, M. (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism*, *19*(1), 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.017>

Argueta, D. A., & DiPatrizio, N. V. (2017). Peripheral endocannabinoid signaling controls hyperphagia in western diet-induced obesity. *Physiology & Behavior*, *171*, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.044>

Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *257*(1), 79-83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>

Arner, P. (1995). Impact of exercise on adipose tissue metabolism in humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *19 Suppl 4*, S18-21.

Arner, P., Kriegholm, E., Engfeldt, P., & Bolinder, J. (1990). Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *The Journal of Clinical Investigation*, *85*(3), 893-898. <https://doi.org/10.1172/JCI114516>

Aronne, L. J., Finer, N., Hollander, P. A., England, R. D., Klioze, S. S., Chew, R. D., Fountaine, R. J., Powell, C. M., & Obourn, J. D. (2011). Efficacy and safety of CP-945,598, a selective

- cannabinoid CB1 receptor antagonist, on weight loss and maintenance. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 19(7), 1404-1414. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.352>
- Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P. J., Warburton, D., Groffen, J., Gaudie, J., & Kolb, M. (2008). Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 484-495. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.016>
- Aune, U. L., Ruiz, L., & Kajimura, S. (2013). Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 73. <https://doi.org/10.3791/50191>
- Ayakannu, T., Taylor, A. H., Marczylo, T. H., & Konje, J. C. (2019). New Insights of Uterine Leiomyoma Pathogenesis: Endocannabinoid System. *Medical Science Monitor Basic Research*, 25, 76-87. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.914019>
- Ayakannu, T., Taylor, A. H., Marczylo, T. H., Maccarrone, M., & Konje, J. C. (2019). Identification of Novel Predictive Biomarkers for Endometrial Malignancies: N-Acylethanolamines. *Frontiers in Oncology*, 9, 430. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00430>
- Badimon, L., Oñate, B., & Vilahur, G. (2015). Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Revista Espanola De Cardiologia (English Ed.)*, 68(7), 599-611. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2015.02.025>
- Bajzer, M., Olivieri, M., Haas, M. K., Pfluger, P. T., Magrisso, I. J., Foster, M. T., Tschöp, M. H., Krawczewski-Carhuatanta, K. A., Cota, D., & Obici, S. (2011). Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. *Diabetologia*, 54(12), 3121-3131. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2302-6>
- Baker, C. L., & McDougall, J. J. (2004). The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. *British Journal of Pharmacology*, 142(8), 1361-1367. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705902>
- Bambace, C., Telesca, M., Zoico, E., Sepe, A., Olioso, D., Rossi, A., Corzato, F., Di Francesco, V., Mazzucco, A., Santini, F., & Zamboni, M. (2011). Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: A comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 20(5), e153-156. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2010.07.005>
- Baraille, F., Planchais, J., Dentin, R., Guilmeau, S., & Postic, C. (2015). Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 30(6), 428-437. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2015>

- Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agrò, A., & Maccarrone, M. (2005). Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 12212-12220. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411642200>
- Barnard, S. A., Pieters, M., & De Lange, Z. (2016). The contribution of different adipose tissue depots to plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. *Blood Reviews*, *30*(6), 421-429. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.05.002>
- Barnett, S. J. (2013). Surgical management of adolescent obesity. *Advances in Pediatrics*, *60*(1), 311-325. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2013.04.014>
- Bartness, T. J., Liu, Y., Shrestha, Y. B., & Ryu, V. (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *35*(4), 473-493. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.001>
- Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M. J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., & Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network*, *17*(1), 4-12.
- Batetta, B., Griinari, M., Carta, G., Murru, E., Ligresti, A., Cordeddu, L., Giordano, E., Sanna, F., Bisogno, T., Uda, S., Collu, M., Bruheim, I., Di Marzo, V., & Banni, S. (2009). Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats. *The Journal of Nutrition*, *139*(8), 1495-1501. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104844>
- Bazwinsky-Wutschke, I., Zipprich, A., & Dehghani, F. (2019). Endocannabinoid System in Hepatic Glucose Metabolism, Fatty Liver Disease, and Cirrhosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2516. <https://doi.org/10.3390/ijms20102516>
- Bégin-Heick, N. (1996). Of mice and women : The  $\beta_3$  -adrenergic receptor leptin and obesity. *Biochemistry and Cell Biology*, *74*(5), 615-622. <https://doi.org/10.1139/o96-066>
- Behl, T., Chadha, S., Sachdeva, M., Sehgal, A., Kumar, A., Dhruv, Venkatachalam, T., Hafeez, A., Aleya, L., Arora, S., Batiha, G. E.-S., Nijhawan, P., & Bungau, S. (2021). Understanding the possible role of endocannabinoid system in obesity. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *152*, 106520. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2020.106520>
- Bellocchio, L., Cervino, C., Vicennati, V., Pasquali, R., & Pagotto, U. (2008). Cannabinoid type 1 receptor : Another arrow in the adipocytes' bow. *Journal of Neuroendocrinology*, *20 Suppl 1*, 130-138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01682.x>
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5329), 1094-1097. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1094>

- Benito, C., Núñez, E., Tolón, R. M., Carrier, E. J., Rábano, A., Hillard, C. J., & Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(35), 11136-11141.
- Benito, C., Romero, J. P., Tolón, R. M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C. J., Guaza, C., & Romero, J. (2007). Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(9), 2396-2402. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4814-06.2007>
- Bennetzen, M. F., Nielsen, T. S., Paulsen, S. K., Bendix, J., Fisker, S., Jessen, N., Lund, S., Richelsen, B., & Pedersen, S. B. (2010). Reduced cannabinoid receptor 1 protein in subcutaneous adipose tissue of obese. *European Journal of Clinical Investigation*, *40*(2), 121-126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02231.x>
- Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., & Soubrié, P. (2003). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Molecular Pharmacology*, *63*(4), 908-914. <https://doi.org/10.1124/mol.63.4.908>
- Benzinou, M., Chèvre, J.-C., Ward, K. J., Lecoeur, C., Dina, C., Lobbens, S., Durand, E., Delplanque, J., Horber, F. F., Heude, B., Balkau, B., Borch-Johnsen, K., Jørgensen, T., Hansen, T., Pedersen, O., Meyre, D., & Froguel, P. (2008). Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Human Molecular Genetics*, *17*(13), 1916-1921. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn089>
- Berghuis, P., Rajnicek, A. M., Morozov, Y. M., Ross, R. A., Mulder, J., Urbán, G. M., Monory, K., Marsicano, G., Matteoli, M., Canty, A., Irving, A. J., Katona, I., Yanagawa, Y., Rakic, P., Lutz, B., Mackie, K., & Harkany, T. (2007). Hardwiring the brain: Endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5828), 1212-1216. <https://doi.org/10.1126/science.1137406>
- Bermúdez-Silva, F. J., Suárez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Muñoz, A. L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M. J., Milman, G., Mechoulam, R., Nadal, A., & Rodríguez de Fonseca, F. (2008). Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia*, *51*(3), 476-487. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0890-y>
- Berria, R., Wang, L., Richardson, D. K., Finlayson, J., Belfort, R., Pratipanawat, T., De Filippis, E. A., Kashyap, S., & Mandarino, L. J. (2006). Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *290*(3), E560-565. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00202.2005>
- Berry, R., & Rodeheffer, M. S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nature Cell Biology*, *15*(3), 302-308. <https://doi.org/10.1038/ncb2696>



- Bettini, S., Favaretto, F., Compagnin, C., Belligoli, A., Sanna, M., Fabris, R., Serra, R., Dal Prà, C., Prevedello, L., Foletto, M., Vettor, R., Milan, G., & Busetto, L. (2019). Resting Energy Expenditure, Insulin Resistance and UCP1 Expression in Human Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of Patients With Obesity. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 548. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00548>
- Billon, N., & Dani, C. (2009). Origine développementale des adipocytes. *Obésité*, *4*(3-4), 189-196. <https://doi.org/10.1007/s11690-009-0216-y>
- Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2007). Short- and long-term plasticity of the endocannabinoid system in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacological Research*, *56*(5), 428-442. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.09.002>
- Blüher, M., Engeli, S., Klötting, N., Berndt, J., Fasshauer, M., Bátkai, S., Pacher, P., Schön, M. R., Jordan, J., & Stumvoll, M. (2006). Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*, *55*(11), 3053-3060. <https://doi.org/10.2337/db06-0812>
- Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, *46*(1), 3-10.
- Boden, G., Cheung, P., Stein, T. P., Kresge, K., & Mozzoli, M. (2002). FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *283*(1), E12-19. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00429.2001>
- Bonet, M. L., Picó, C., & Palou, A. (2005). Thermogenesis and the Metabolic Syndrome. In *The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century* (p. 283-303). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-84-8174-892-5.50017-6>
- Bouaboula, M., Bianchini, L., McKenzie, F. R., Pouyssegur, J., & Casellas, P. (1999). Cannabinoid receptor CB1 activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. *FEBS Letters*, *449*(1), 61-65. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00395-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00395-6)
- Bouaboula, M., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(23), 13973-13980. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13973>
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *The Biochemical Journal*, *312* ( Pt 2), 637-641. <https://doi.org/10.1042/bj3120637>

- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Breivogel, C. S., Lambert, J. M., Gerfin, S., Huffman, J. W., & Razdan, R. K. (2008). Sensitivity to delta9-tetrahydrocannabinol is selectively enhanced in beta-arrestin2  $-/-$  mice. *Behavioural Pharmacology*, 19(4), 298-307. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328308f1e6>
- Breivogel, C. S., & Vaghela, M. S. (2015). The effects of beta-arrestin1 deletion on acute cannabinoid activity, brain cannabinoid receptors and tolerance to cannabinoids in mice. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 35(1), 98-106. <https://doi.org/10.3109/10799893.2014.1003659>
- Brown, S. M., Wager-Miller, J., & Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1576(3), 255-264. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00341-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00341-x)
- Bruun, J. M., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT) : Implication of macrophages resident in the AT. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(4), 2282-2289. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1696>
- Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V., & Amar, J. (2011). Gut microbiota and diabetes : From pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetologica*, 48(4), 257-273. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0333-6>
- Cable, J. C., Tan, G. D., Alexander, S. P. H., & O'Sullivan, S. E. (2014). The effects of obesity, diabetes and metabolic syndrome on the hydrolytic enzymes of the endocannabinoid system in animal and human adipocytes. *Lipids in Health and Disease*, 13, 43. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-43>
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Casteilla, L., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>
- Cani, P. D., Geurts, L., Matamoros, S., Plovier, H., & Duparc, T. (2014). Glucose metabolism : Focus on gut microbiota, the endocannabinoid system and beyond. *Diabetes & Metabolism*, 40(4), 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2014.02.004>
- Cani, P. D., Plovier, H., Van Hul, M., Geurts, L., Delzenne, N. M., Druart, C., & Everard, A. (2016). Endocannabinoids—At the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(3), 133-143. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.211>

- Carson, W. F., Salter-Green, S. E., Scola, M. M., Joshi, A., Gallagher, K. A., & Kunkel, S. L. (2017). Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. *Cellular immunology*, 314, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.005>
- Cascio, M. G., & Marini, P. (2015). Biosynthesis and Fate of Endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 231, 39-58. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_2)
- Castetbon, K., Vernay, M., Deschamps, V., Salanave, B., Malon, A., & Hercberg, S. (2008). Situation nutritionnelle en France selon les indicateurs d'objectif et les repères du Programme national nutrition santé (PNNS)-Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006) : Prévalences de l'obésité, de l'hypertension artérielle et des dyslipidémies. *Obésité*, 3(1), 19-26. <https://doi.org/10.1007/s11690-008-0104-x>
- Cavuto, P., McAinch, A. J., Hatzinikolas, G., Cameron-Smith, D., & Wittert, G. A. (2007). Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 267(1-2), 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.038>
- Cavuto, P., McAinch, A. J., Hatzinikolas, G., Janovská, A., Game, P., & Wittert, G. A. (2007). The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(1), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.099>
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: Going back to the future. *Journal of Lipid Research*, 53(2), 227-246. <https://doi.org/10.1194/jlr.R021089>
- Chaurasia, B., & Summers, S. A. (2015). Ceramides—Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 26(10), 538-550. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>
- Choi, Y. H., Park, S., Hockman, S., Zmuda-Trzebiatowska, E., Svennelid, F., Haluzik, M., Gavrilova, O., Ahmad, F., Pepin, L., Napolitano, M., Taira, M., Sundler, F., Stenson Holst, L., Degerman, E., & Manganiello, V. C. (2006). Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3240-3251. <https://doi.org/10.1172/JCI24867>
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
- Chorvat, R. J., Berbaum, J., Seriacki, K., & McElroy, J. F. (2012). JD-5006 and JD-5037 : Peripherally restricted (PR) cannabinoid-1 receptor blockers related to SLV-319 (Ibipinabant) as metabolic disorder therapeutics devoid of CNS liabilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(19), 6173-6180. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.004>

- Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H., & Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant : A meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)*, *370*(9600), 1706-1713. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61721-8)
- Chua, J. T., Argueta, D. A., DiPatrizio, N. V., Kovesdy, C. P., Vaziri, N. D., Kalantar-Zadeh, K., & Moradi, H. (2019). Endocannabinoid System and the Kidneys : From Renal Physiology to Injury and Disease. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *4*(1), 10-20. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0060>
- Cinar, R., Gochuico, B. R., Iyer, M. R., Jourdan, T., Yokoyama, T., Park, J. K., Coffey, N. J., Pri-Chen, H., Szanda, G., Liu, Z., Mackie, K., Gahl, W. A., & Kunos, G. (2017). Cannabinoid CB1 receptor overactivity contributes to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*, *2*(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92281>
- Cinar, R., Godlewski, G., Liu, J., Tam, J., Jourdan, T., Mukhopadhyay, B., Harvey-White, J., & Kunos, G. (2014). Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing de novo synthesis of long-chain ceramides. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *59*(1), 143-153. <https://doi.org/10.1002/hep.26606>
- Cinar, R., Iyer, M. R., & Kunos, G. (2020). The therapeutic potential of second and third generation CB1R antagonists. *Pharmacology & Therapeutics*, *208*, 107477. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107477>
- Cinar, R., Iyer, M. R., Liu, Z., Cao, Z., Jourdan, T., Erdelyi, K., Godlewski, G., Szanda, G., Liu, J., Park, J. K., Mukhopadhyay, B., Rosenberg, A. Z., Liow, J.-S., Lorenz, R. G., Pacher, P., Innis, R. B., & Kunos, G. (2016). Hybrid inhibitor of peripheral cannabinoid-1 receptors and inducible nitric oxide synthase mitigates liver fibrosis. *JCI Insight*, *1*(11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87336>
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *73*(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.04.010>
- Clarke, W. P. (2005). What's for lunch at the conformational cafeteria? *Molecular Pharmacology*, *67*(6), 1819-1821. <https://doi.org/10.1124/mol.105.013060>
- Coffer, P. J., Jin, J., & Woodgett, J. R. (1998). Protein kinase B (c-Akt) : A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical Journal*, *335* ( Pt 1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/bj3350001>
- Cohen, A. W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T. M., Wang, X. B., Iyengar, P., Brasaemle, D. L., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*, *53*(5), 1261-1270. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1261>
- Cohen, A. W., Razani, B., Wang, X. B., Combs, T. P., Williams, T. M., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. (2003). Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin

- receptor protein expression in adipose tissue. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 285(1), C222-235. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00006.2003>
- Coppack, S. W., Jensen, M. D., & Miles, J. M. (1994). In vivo regulation of lipolysis in humans. *Journal of Lipid Research*, 35(2), 177-193.
- Coppola, N., Zampino, R., Bellini, G., Stanzione, M., Capoluongo, N., Marrone, A., Macera, M., Pasquale, G., Boemio, A., Maione, S., Adinolfi, L. E., Del Giudice, E. M., Sagnelli, E., & Rossi, F. (2015). The impact of the CB2-63 polymorphism on the histological presentation of chronic hepatitis B. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(6), 609.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.021>
- Copps, K. D., & White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565-2582. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., & Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 423-431. <https://doi.org/10.1172/JCI17725>
- Côté, M., Matias, I., Lemieux, I., Petrosino, S., Alméras, N., Després, J.-P., & Di Marzo, V. (2007). Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *International Journal of Obesity (2005)*, 31(4), 692-699. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803539>
- Coutts, A. A., Irving, A. J., Mackie, K., Pertwee, R. G., & Anavi-Goffer, S. (2002). Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *The Journal of Comparative Neurology*, 448(4), 410-422. <https://doi.org/10.1002/cne.10270>
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), 83-87. <https://doi.org/10.1038/384083a0>
- Cuevas-Sierra, A., Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2019). Diet, Gut Microbiota, and Obesity : Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(suppl\_1), S17-S30. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy078>
- Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages : Induction of

diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, 53(5), 1285-1292. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1285>

Curioni, C., & André, C. (2006). Rimonabant for overweight or obesity. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4, CD006162. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006162.pub2>

Cusi, K. (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 10(4), 306-315. <https://doi.org/10.1007/s11892-010-0122-6>

Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature Medicine*, 23(7), 804-814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>

Daigle, T. L., Kearns, C. S., & Mackie, K. (2008). Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. *Neuropharmacology*, 54(1), 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.06.005>

Dalmas, E., Tordjman, J., Guerre-Millo, M., & Clément, K. (2011). [Adipose tissue, a new playground for immune cells]. *Medicine Sciences: M/S*, 27(11), 993-999. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112711016>

Dao, M., & François, H. (2021). Cannabinoid Receptor 1 Inhibition in Chronic Kidney Disease: A New Therapeutic Toolbox. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 720734. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.720734>

Dao, M., Lecru, L., Vandermeersch, S., Ferreira, M., Ferlicot, S., Posseme, K., Dürrbach, A., Hermeziu, B., Mussini, C., Chatziantoniou, C., & François, H. (2019). The cannabinoid receptor 1 is involved in renal fibrosis during chronic allograft dysfunction : Proof of concept. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(11), 7279-7288. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14570>

Day, T. A., Rakhshan, F., Deutsch, D. G., & Barker, E. L. (2001). Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Molecular Pharmacology*, 59(6), 1369-1375. <https://doi.org/10.1124/mol.59.6.1369>

Declèves, A.-E., & Sharma, K. (2010). New pharmacological treatments for improving renal outcomes in diabetes. *Nature Reviews. Nephrology*, 6(6), 371-380. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.57>

DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., & Felber, J. P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30(12), 1000-1007. <https://doi.org/10.2337/diab.30.12.1000>

Delamater, A. M., Daigre, A. L., Marchante, A. N., Pulgarón, E. R., Patiño-Fernandez, A. M., & Sanchez, J. (2017). Intrinsic Motivation in Ethnic Minority Youth with Type 1 Diabetes.

*Children's Health Care: Journal of the Association for the Care of Children's Health*, 46(3), 215-229. <https://doi.org/10.1080/02739615.2015.1124777>

D'Eon, T. M., Pierce, K. A., Roix, J. J., Tyler, A., Chen, H., & Teixeira, S. R. (2008). The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes*, 57(5), 1262-1268. <https://doi.org/10.2337/db07-1186>

de Onis, M., Blössner, M., & Borghi, E. (2010). Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(5), 1257-1264. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29786>

de Souza, C. J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D., & Burkey, B. F. (2001). Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 50(8), 1863-1871. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1863>

Després, J. P., Moorjani, S., Lupien, P. J., Tremblay, A., Nadeau, A., & Bouchard, C. (1990). Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 10(4), 497-511. <https://doi.org/10.1161/01.atv.10.4.497>

Després, J.-P., Golay, A., Sjöström, L., & Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. (2005). Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *The New England Journal of Medicine*, 353(20), 2121-2134. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044537>

Després, J.-P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121), 881-887. <https://doi.org/10.1038/nature05488>

Després, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodés-Cabau, J., Bertrand, O. F., & Poirier, P. (2008). Abdominal obesity and the metabolic syndrome: Contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(6), 1039-1049. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159228>

Després, J.-P., Ross, R., Boka, G., Alméras, N., Lemieux, I., & ADAGIO-Lipids Investigators. (2009). Effect of rimonabant on the high-triglyceride/ low-HDL-cholesterol dyslipidemia, intraabdominal adiposity, and liver fat: The ADAGIO-Lipids trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(3), 416-423. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.176362>

Deutsch, D. G., Glaser, S. T., Howell, J. M., Kunz, J. S., Puffenbarger, R. A., Hillard, C. J., & Abumrad, N. (2001). The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 6967-6973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003161200>

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain

constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), 1946-1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annual Review of Physiology*, 69, 483-510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>

Di Carlo, G., & Izzo, A. A. (2003). Cannabinoids for gastrointestinal diseases : Potential therapeutic applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12(1), 39-49. <https://doi.org/10.1517/13543784.12.1.39>

Di Marzo, V. (2008). The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51(8), 1356-1367. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1048-2>

Di Marzo, V. (2018). New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 17(9), 623-639. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.115>

Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J. A., & Kunos, G. (1999). Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), 258-267. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00631.x>

Di Marzo, V., Côté, M., Matias, I., Lemieux, I., Arsenault, B. J., Cartier, A., Piscitelli, F., Petrosino, S., Alméras, N., & Després, J.-P. (2009). Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction : Associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia*, 52(2), 213-217. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1178-6>

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691. <https://doi.org/10.1038/372686a0>

Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sugiura, T., & Kunos, G. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410(6830), 822-825. <https://doi.org/10.1038/35071088>

Di Marzo, V., Griinari, M., Carta, G., Murru, E., Ligresti, A., Cordeddu, L., Giordano, E., Bisogno, T., Collu, M., Batetta, B., Uda, S., Berge, K., & Banni, S. (2010). Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. *International Dairy Journal*, 20(4), 231-235. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.015>

Di Marzo, V., & Izzo, A. A. (2006). Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut*, 55(10), 1373-1376. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.090472>



- Di Marzo, V., & Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature Neuroscience*, 8(5), 585-589. <https://doi.org/10.1038/nn1457>
- Di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2011). Gut feelings about the endocannabinoid system. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 23(5), 391-398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01689.x>
- Dickason-Chesterfield, A. K., Kidd, S. R., Moore, S. A., Schaus, J. M., Liu, B., Nomikos, G. G., & Felder, C. C. (2006). Pharmacological characterization of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4-6), 407-423. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9072-6>
- DiPatrizio, N. V. (2016). Endocannabinoids in the Gut. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 67-77. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0001>
- DiPatrizio, N. V., Astarita, G., Schwartz, G., Li, X., & Piomelli, D. (2011). Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12904-12908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104675108>
- Djian, P., Grimaldi, P., Négrel, R., & Ailhaud, G. (1982). Adipose conversion of OB17 preadipocytes. Relationships between cell division and fat cell cluster formation. *Experimental Cell Research*, 142(2), 273-281. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(82\)90368-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(82)90368-8)
- Dolby, T. W., & Kleinsmith, L. J. (1977). Cannabinoid effects on adenylate cyclase and phosphodiesterase activities of mouse brain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(4), 934-942. <https://doi.org/10.1139/y77-125>
- Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 262-267. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80149-x](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80149-x)
- Drori, A., Permyakova, A., Hadar, R., Udi, S., Nemirovski, A., & Tam, J. (2019). Cannabinoid-1 receptor regulates mitochondrial dynamics and function in renal proximal tubular cells. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 21(1), 146-159. <https://doi.org/10.1111/dom.13497>
- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., & Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(10), 3434-3438. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3434>
- Dubern, B., Clément, K., Pelloux, V., Froguel, P., Girardet, J. P., Guy-Grand, B., & Tounian, P. (2001). Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *The Journal of Pediatrics*, 139(2), 204-209. <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.116284>

- Dugail, I., & Le Lay, S. (2013). Physiologie de la gouttelette lipidique adipocytaire. In J.-P. Bastard & B. Fève (Éds.), *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (p. 123-141). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6_9)
- Duncan, M., Davison, J. S., & Sharkey, K. A. (2005). Review article : Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22(8), 667-683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02648.x>
- Duncan, M., Mouihate, A., Mackie, K., Keenan, C. M., Buckley, N. E., Davison, J. S., Patel, K. D., Pittman, Q. J., & Sharkey, K. A. (2008). Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(1), G78-G87. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90285.2008>
- Ehren, M., & Klein, H. H. (2019). [Insulin therapy-new insulin analogues]. *Der Internist*, 60(9), 887-894. <https://doi.org/10.1007/s00108-019-0652-1>
- Elabd, C., Chiellini, C., Carmona, M., Galitzky, J., Cochet, O., Petersen, R., Pénicaud, L., Kristiansen, K., Bouloumié, A., Casteilla, L., Dani, C., Ailhaud, G., & Amri, E.-Z. (2009). Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(11), 2753-2760. <https://doi.org/10.1002/stem.200>
- Eldeeb, K., Leone-Kabler, S., & Howlett, A. C. (2016). CB1 cannabinoid receptor-mediated increases in cyclic AMP accumulation are correlated with reduced Gi/o function. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(3), 311-322. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0096>
- Engeli, S., Böhnke, J., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., Janke, J., Bátkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F. C., Sharma, A. M., & Jordan, J. (2005). Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*, 54(10), 2838-2843. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.2838>
- Engeli, S., Lehmann, A.-C., Kaminski, J., Haas, V., Janke, J., Zoerner, A. A., Luft, F. C., Tsikas, D., & Jordan, J. (2014). Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(5), E70-76. <https://doi.org/10.1002/oby.20728>
- Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 960, 1-17. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1)
- Eschwege, E., Basdevant, A., Crine, A., Moisan, C., & Charles, M.-A. (2015). Type 2 diabetes mellitus in France in 2012 : Results from the ObEpi survey. *Diabetes & Metabolism*, 41(1), 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2014.11.007>

- Esposito, G., Iuvone, T., Savani, C., Scuderi, C., De Filippis, D., Papa, M., Di Marzo, V., & Steardo, L. (2007). Opposing control of cannabinoid receptor stimulation on amyloid-beta-induced reactive gliosis : In vitro and in vivo evidence. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(3), 1144-1152. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.121566>
- Fabisiak, A., & Fichna, J. (2017). Cannabinoids as gastrointestinal anti-inflammatory drugs. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 29(3). <https://doi.org/10.1111/nmo.13038>
- Facci, L., Dal Toso, R., Romanello, S., Buriani, A., Skaper, S. D., & Leon, A. (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3376-3380. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3376>
- Fain, J. N. (2010). Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells : A review. *Mediators of Inflammation*, 2010, 513948. <https://doi.org/10.1155/2010/513948>
- Fain, J. N., & Madan, A. K. (2005). Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by explants of human visceral adipose tissue. *International Journal of Obesity (2005)*, 29(11), 1299-1307. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803032>
- Fain, J. N., Tichansky, D. S., & Madan, A. K. (2006). Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 55(8), 1113-1121. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.04.008>
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*, 4(4), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>
- Faucher, P., & Poitou, C. (2016). Physiopathologie de l'obésité. *Revue du Rhumatisme Monographies*, 83(1), 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2015.08.002>
- Feizi, A., Jafari, M.-R., Hamedivafa, F., Tabrizian, P., & Djahanguiri, B. (2008). The preventive effect of cannabinoids on reperfusion-induced ischemia of mouse kidney. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 60(4-5), 405-410. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.04.006>
- Fève, B., Elhadri, K., Quignard-Boulangé, A., & Pairault, J. (1994). Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes : A mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5677-5681. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5677>

- Fève, B., Moldes, M., El Hadri, K., Lasnier, F., & Pairault, J. (1998). La différenciation adipocytaire: Tout un programme... *médecine/sciences*, 14(8-9), 848. <https://doi.org/10.4267/10608/1156>
- Fisk, H. L., Childs, C. E., Miles, E. A., Ayres, R., Noakes, P. S., Paras-Chavez, C., Kuda, O., Kopecký, J., Antoun, E., Lillycrop, K. A., & Calder, P. C. (2021). Dysregulation of endocannabinoid concentrations in human subcutaneous adipose tissue in obesity and modulation by omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 135(1), 185-200. <https://doi.org/10.1042/CS20201060>
- Foufelle, F., & Ferré, P. (2013). Mécanisme de stockage et de synthèse des acides gras et des triglycérides dans le tissu adipeux blanc. In J.-P. Bastard & B. Fève (Éds.), *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (p. 101-122). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6_8)
- Fowler, C. J. (2006). The cannabinoid system and its pharmacological manipulation—A review, with emphasis upon the uptake and hydrolysis of anandamide. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 20(6), 549-562. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00442.x>
- François, H., Durrbach, A., Beaudreuil, S., Charpentier, B., & Lecru, L. (2016). Rôle des récepteurs cannabinoïdes au cours des maladies rénales. *Néphrologie & Thérapeutique*, 12, S115-S122. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2016.02.004>
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A. R., Ebrahim, S., ... McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5826), 889-894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, 1(12), 1311-1314. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1311>
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological Reviews*, 83(3), 1017-1066. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2003>
- Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). The colors of adipose tissue. *Gaceta de México*, 156(2), 3932. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000356>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in

obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752-1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>

Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 107-144. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206>

Galassi, A., Reynolds, K., & He, J. (2006). Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 119(10), 812-819. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.031>

Galiazzo, G., Giancola, F., Stanzani, A., Fracassi, F., Bernardini, C., Forni, M., Pietra, M., & Chiocchetti, R. (2018). Localization of cannabinoid receptors CB1, CB2, GPR55, and PPAR $\alpha$  in the canine gastrointestinal tract. *Histochemistry and Cell Biology*, 150(2), 187-205. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1684-7>

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 54-61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>

Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M. L., Gómez del Pulgar, T., Izquierdo, M., & Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine*, 6(3), 313-319. <https://doi.org/10.1038/73171>

Gamber, K. M., Macarthur, H., & Westfall, T. C. (2005). Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology*, 49(5), 646-652. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.04.017>

Garcia-Arencibia, M., Molina-Holgado, E., & Molina-Holgado, F. (2019). Effect of endocannabinoid signalling on cell fate: Life, death, differentiation and proliferation of brain cells. *British Journal of Pharmacology*, 176(10), 1361-1369. <https://doi.org/10.1111/bph.14369>

Gary-Bobo, M., Elachouri, G., Gallas, J. F., Janiak, P., Marini, P., Ravinet-Trillou, C., Chabbert, M., Crucchioli, N., Pfersdorff, C., Roque, C., Arnone, M., Croci, T., Soubrié, P., Oury-Donat, F., Maffrand, J. P., Scatton, B., Lacheretz, F., Le Fur, G., Herbert, J. M., & Bensaid, M. (2007). Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(1), 122-129. <https://doi.org/10.1002/hep.21641>

Gary-Bobo, M., Elachouri, G., Scatton, B., Le Fur, G., Oury-Donat, F., & Bensaid, M. (2006). The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3

F442A preadipocytes. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 471-478. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015040>

Gasperi, V., Fezza, F., Pasquariello, N., Bari, M., Oddi, S., Agrò, A. F., & Maccarrone, M. (2007). Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(2), 219-229. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6445-4>

Gazzerro, P., Caruso, M. G., Notarnicola, M., Misciagna, G., Guerra, V., Laezza, C., & Bifulco, M. (2007). Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *International Journal of Obesity (2005)*, 31(6), 908-912. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803510>

Ge, Q., Maury, E., Rycken, L., Gérard, J., Noël, L., Detry, R., Navez, B., & Brichard, S. M. (2013). Endocannabinoids regulate adipokine production and the immune balance of omental adipose tissue in human obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, 37(6), 874-880. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.123>

George, D. T., Herion, D. W., Jones, C. L., Phillips, M. J., Hersh, J., Hill, D., Heilig, M., Ramchandani, V. A., Geyer, C., Spero, D. E., Singley, E. D., O'Malley, S. S., Bishai, R., Rawlings, R. R., & Kunos, G. (2010). Rimonabant (SR141716) has no effect on alcohol self-administration or endocrine measures in nontreatment-seeking heavy alcohol drinkers. *Psychopharmacology*, 208(1), 37-44. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1704-3>

Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242-258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>

Glaser, S. T., Abumrad, N. A., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, K. M., & Deutsch, D. G. (2003). Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4269-4274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730816100>

Glaser, S. T., Kaczocha, M., & Deutsch, D. G. (2005). Anandamide transport: A critical review. *Life Sciences*, 77(14), 1584-1604. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.007>

Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., & Guzmán, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *The Biochemical Journal*, 347(Pt 2), 369-373. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470369>

González, S., Manzanares, J., Berrendero, F., Wenger, T., Corchero, J., Bisogno, T., Romero, J., Fuentes, J. A., Di Marzo, V., Ramos, J. A., & Fernández-Ruiz, J. (1999). Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 70(2), 137-145. <https://doi.org/10.1159/000054468>

González-Mariscal, I., Krzysik-Walker, S. M., Doyle, M. E., Liu, Q.-R., Cimbrow, R., Santa-Cruz Calvo, S., Ghosh, S., Cieśla, Ł., Moaddel, R., Carlson, O. D., Witek, R. P., O'Connell, J. F., & Egan, J. M. (2016). Human CB1 Receptor Isoforms, present in Hepatocytes and  $\beta$ -cells, are

Involved in Regulating Metabolism. *Scientific Reports*, 6, 33302. <https://doi.org/10.1038/srep33302>

González-Mariscal, I., Montoro, R. A., Doyle, M. E., Liu, Q.-R., Rouse, M., O'Connell, J. F., Santa-Cruz Calvo, S., Krzysik-Walker, S. M., Ghosh, S., Carlson, O. D., Lehrmann, E., Zhang, Y., Becker, K. G., Chia, C. W., Ghosh, P., & Egan, J. M. (2018). Absence of cannabinoid 1 receptor in beta cells protects against high-fat/high-sugar diet-induced beta cell dysfunction and inflammation in murine islets. *Diabetologia*, 61(6), 1470-1483. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4576-4>

González-Mariscal, I., Montoro, R. A., O'Connell, J. F., Kim, Y., Gonzalez-Freire, M., Liu, Q.-R., Alfaras, I., Carlson, O. D., Lehrmann, E., Zhang, Y., Becker, K. G., Hardivillé, S., Ghosh, P., & Egan, J. M. (2019). Muscle cannabinoid 1 receptor regulates Il-6 and myostatin expression, governing physical performance and whole-body metabolism. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(5), 5850-5863. <https://doi.org/10.1096/fj.201801145R>

Goodman, E., & Whitaker, R. C. (2002). A prospective study of the role of depression in the development and persistence of adolescent obesity. *Pediatrics*, 110(3), 497-504. <https://doi.org/10.1542/peds.110.3.497>

Gregg, E. W., & Shaw, J. E. (2017). Global Health Effects of Overweight and Obesity. *The New England Journal of Medicine*, 377(1), 80-81. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1706095>

Griffin, G., Wray, E. J., Tao, Q., McAllister, S. D., Rorrer, W. K., Aung, M. M., Martin, B. R., & Abood, M. E. (1999). Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: Further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *European Journal of Pharmacology*, 377(1), 117-125. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00402-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00402-1)

Grimaldi, P., Rossi, G., Catanzaro, G., & Maccarrone, M. (2009). Modulation of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase by follicle-stimulating hormone. *Vitamins and Hormones*, 81, 231-261. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)81010-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(09)81010-8)

Guilherme, A., Pedersen, D. J., Henchey, E., Henriques, F. S., Danai, L. V., Shen, Y., Yenilmez, B., Jung, D., Kim, J. K., Lodhi, I. J., Semenkovich, C. F., & Czech, M. P. (2017). Adipocyte lipid synthesis coupled to neuronal control of thermogenic programming. *Molecular Metabolism*, 6(8), 781-796. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.05.012>

Gurevich, E. V., & Gurevich, V. V. (2006). Arrestins: Ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biology*, 7(9), 236. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-236>

- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *110*(3), 465-502. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.09.008>
- Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C. X., & Smith, U. (2007). Inflamed adipose tissue : A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(11), 2276-2283. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147835>
- Guzmán, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., & Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(27), 27849-27854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404087200>
- Gyires, K., & Zádori, Z. S. (2016). Role of Cannabinoids in Gastrointestinal Mucosal Defense and Inflammation. *Current Neuropharmacology*, *14*(8), 935-951. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160303110150>
- Habayeb, O. M. H., Bell, S. C., & Konje, J. C. (2002). Endogenous cannabinoids : Metabolism and their role in reproduction. *Life Sciences*, *70*(17), 1963-1977. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)01539-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01539-9)
- Habek, N., Dobrivojević Radmilović, M., Kordić, M., Ilić, K., Grgić, S., Farkaš, V., Bagarić, R., Škokić, S., Švarc, A., & Dugandžić, A. (2020). Activation of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis is GC-C dependent. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *472*(3), 405-417. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02347-8>
- Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M. E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A. D., Sherwani, S., Wang, Z. V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U. J., Brekken, R. A., & Scherer, P. E. (2009). Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4467-4483. <https://doi.org/10.1128/MCB.00192-09>
- Hall, J. E., Crook, E. D., Jones, D. W., Wofford, M. R., & Dubbert, P. M. (2002). Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, *324*(3), 127-137. <https://doi.org/10.1097/00000441-200209000-00003>
- Han, J. H., Shin, H., Park, J.-Y., Rho, J. G., Son, D. H., Kim, K. W., Seong, J. K., Yoon, S.-H., & Kim, W. (2019). A novel peripheral cannabinoid 1 receptor antagonist, AJ5012, improves metabolic outcomes and suppresses adipose tissue inflammation in obese mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(3), 4314-4326. <https://doi.org/10.1096/fj.201801152RR>
- Han, J. H., Shin, H., Rho, J. G., Kim, J.-E., Son, D. H., Yoon, J., Lee, Y. J., Park, J.-H., Song, B. J., Choi, C.-S., Yoon, S. G., Kim, I. Y., Lee, E. K., Seong, J. K., Kim, K. W., & Kim, W. (2018). Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade mitigates adipose tissue inflammation via



- NLRP3 inflammasome in mouse models of obesity. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20(9), 2179-2189. <https://doi.org/10.1111/dom.13350>
- Han, K. H., Lim, S., Ryu, J., Lee, C.-W., Kim, Y., Kang, J.-H., Kang, S.-S., Ahn, Y. K., Park, C.-S., & Kim, J. J. (2009). CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovascular Research*, 84(3), 378-386. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp240>
- Hansen, J. B., & Kristiansen, K. (2006). Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochemical Journal*, 398(Pt 2), 153-168. <https://doi.org/10.1042/BJ20060402>
- Harkany, T., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L. A., & Mackie, K. (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(2), 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.12.004>
- Harman-Boehm, I., Blüher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klötting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., & Rudich, A. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations : Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(6), 2240-2247. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1811>
- Henderson-Redmond, A. N., Nealon, C. M., Davis, B. J., Yuill, M. B., Sepulveda, D. E., Blanton, H. L., Piscura, M. K., Zee, M. L., Haskins, C. P., Marcus, D. J., Mackie, K., Guindon, J., & Morgan, D. J. (2020). C-Jun N terminal kinase signaling pathways mediate cannabinoid tolerance in an agonist-specific manner. *Neuropharmacology*, 164, 107847. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107847>
- Higgs, H. N., & Glomset, J. A. (1994). Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), 9574-9578. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9574>
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2006). Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. *Psychoneuroendocrinology*, 31(4), 526-536. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.11.010>
- Hillard, C. J. (2018). Circulating Endocannabinoids : From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(1), 155-172. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.130>
- Hillard, C. J., Edgmond, W. S., Jarrahian, A., & Campbell, W. B. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via

facilitated diffusion. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 631-638. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020631.x>

Hillard, C. J., & Jarrahan, A. (2003). Cellular accumulation of anandamide : Consensus and controversy. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), 802-808. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705468>

Hinden, L., Udi, S., Drori, A., Gammal, A., Nemirovski, A., Hadar, R., Baraghithy, S., Permyakova, A., Geron, M., Cohen, M., Tsytkin-Kirschenschweig, S., Riahi, Y., Leibowitz, G., Nahmias, Y., Priel, A., & Tam, J. (2018). Modulation of Renal GLUT2 by the Cannabinoid-1 Receptor: Implications for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 29(2), 434-448. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017040371>

Hirsch, J., & Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 5(2), 299-311. [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(76\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(76)80023-0)

Hoareau, L., Buyse, M., Festy, F., Ravanan, P., Gonthier, M.-P., Matias, I., Petrosino, S., Tallet, F., d'Hellencourt, C. L., Cesari, M., Di Marzo, V., & Roche, R. (2009). Anti-inflammatory effect of palmitoylethanolamide on human adipocytes. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(3), 431-438. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.591>

Hohmann, U., Pelzer, M., Kleine, J., Hohmann, T., Ghadban, C., & Dehghani, F. (2019). Opposite Effects of Neuroprotective Cannabinoids, Palmitoylethanolamide, and 2-Arachidonoylglycerol on Function and Morphology of Microglia. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1180. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01180>

Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140(6), 900-917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2409-2415. <https://doi.org/10.1172/JCI117936>

Howlett, A. C. (1995). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 607-634. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.003135>

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 161-202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>

Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., & Porrino, L. J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress.

*Neuropharmacology*, 47, Suppl 1, 345-358.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.030>

Howlett, A. C., Champion, T. M., Wilken, G. H., & Mechoulam, R. (1990). Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology*, 29(2), 161-165.  
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(90\)90056-w](https://doi.org/10.1016/0028-3908(90)90056-w)

Howlett, A. C., & Fleming, R. M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular Pharmacology*, 26(3), 532-538.

Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, 33(7), 673-689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>

Hsiao, W.-C., Shia, K.-S., Wang, Y.-T., Yeh, Y.-N., Chang, C.-P., Lin, Y., Chen, P.-H., Wu, C.-H., Chao, Y.-S., & Hung, M.-S. (2015). A novel peripheral cannabinoid receptor 1 antagonist, BPR0912, reduces weight independently of food intake and modulates thermogenesis. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 17(5), 495-504. <https://doi.org/10.1111/dom.12447>

Hu, E., Liang, P., & Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10697-10703. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10697>

Hu, F. B. (2008). *Obesity epidemiology* (Oxford University Press, p. 498).

Hudak, C. S., Gulyaeva, O., Wang, Y., Park, S. min, Lee, L., Kang, C., & Sul, H. S. (2014). Pref-1 Marks Very Early Mesenchymal Precursors Required for Adipose Tissue Development and Expansion. *Cell reports*, 8(3), 678-687. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.060>

Hudak, C. S., & Sul, H. S. (2013). Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 79. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00079>

Hung, M.-S., Chang, C.-P., Li, T.-C., Yeh, T.-K., Song, J.-S., Lin, Y., Wu, C.-H., Kuo, P.-C., Amancha, P. K., Wong, Y.-C., Hsiao, W.-C., Chao, Y.-S., & Shia, K.-S. (2010). Discovery of 1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-5-(5-(2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)ethynyl)thiophen-2-yl)-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide as a potential peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonist. *ChemMedChem*, 5(9), 1439-1443. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000246>

Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 48-60. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>

Ibsen, M. S., Finlay, D. B., Patel, M., Javitch, J. A., Glass, M., & Grimsey, N. L. (2019). Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor-Mediated Arrestin Translocation : Species, Subtype,

and Agonist-Dependence. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 350. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00350>

Irving, A. J., Coutts, A. A., Harvey, J., Rae, M. G., Mackie, K., Bewick, G. S., & Pertwee, R. G. (2000). Functional expression of cell surface cannabinoid CB(1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 98(2), 253-262. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00120-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00120-2)

Irving, A. J., McDonald, N. A., & Harkany, T. (2008). CB1 Cannabinoid Receptors : Molecular Biology, Second Messenger Coupling and Polarized Trafficking in Neurons. In A. Köfalvi (Éd.), *Cannabinoids and the Brain* (p. 59-73). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74349-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74349-3_5)

Isaac, A. R., de Velasco, P. C., Fraga, K. Y. D., Tavares-do-Carmo, M. das G., Campos, R. M. P., Iannotti, F. A., Verde, R., Martins, D. B. G., Santos, T. A., Ferreira, B. K., de Mello, F. G., Di Marzo, V., Andrade-da-Costa, B. L. da S., & de Melo Reis, R. A. (2021). Maternal omega-3 intake differentially affects the endocannabinoid system in the progeny's neocortex and hippocampus : Impact on synaptic markers. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 96, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108782>

Ishac, E. J., Jiang, L., Lake, K. D., Varga, K., Abood, M. E., & Kunos, G. (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British Journal of Pharmacology*, 118(8), 2023-2028. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15639.x>

Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Ishikawa, M., Koga, M., Imai, K., Suzuki, Y., Morikawa, M., Inada, T., Watanabe, Y., Takahashi, M., Someya, T., Ujike, H., Iwata, N., Ozaki, N., Onaivi, E. S., Kunugi, H., Sasaki, T., Itokawa, M., Arai, M., ... Arinami, T. (2010). Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 67(10), 974-982. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.024>

Iyer, M. R., Cinar, R., Coffey, N. J., Chorvat, R. J., & Kunos, G. (2017). Synthesis of S-2-((S)-3-(4-chlorophenyl)-N'-((4-chlorophenyl)sulfonyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamido)-3-(methyl-d3 )butanamide-d5 , octadeuterated JD5037. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 60(10), 460-465. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3521>

Iyer, M. R., Cinar, R., Coffey, N. J., & Kunos, G. (2018). Synthesis of 13 C6 -labeled, dual-target inhibitor of cannabinoid-1 receptor (CB1 R) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3639>

Iyer, M. R., Cinar, R., Katz, A., Gao, M., Erdelyi, K., Jourdan, T., Coffey, N. J., Pacher, P., & Kunos, G. (2017). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel, Non-Brain-Penetrant, Hybrid Cannabinoid CB1R Inverse Agonist/Inducible Nitric Oxide Synthase

(iNOS) Inhibitors for the Treatment of Liver Fibrosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(3), 1126-1141. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01504>

Izzo, A. A. (2004). Cannabinoids and intestinal motility : Welcome to CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 142(8), 1201-1202. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705890>

Izzo, A. A., & Coutts, A. A. (2005). Cannabinoids and the digestive tract. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 573-598. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_19](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_19)

Izzo, A. A., Piscitelli, F., Capasso, R., Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Petrosino, S., & Di Marzo, V. (2009). Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity : Relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *British Journal of Pharmacology*, 158(2), 451-461. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00183.x>

Izzo, A. A., Piscitelli, F., Capasso, R., Marini, P., Cristino, L., Petrosino, S., & Di Marzo, V. (2010). Basal and fasting/refeeding-regulated tissue levels of endogenous PPAR-alpha ligands in Zucker rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(1), 55-62. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.186>

J. Yarwood, S., Kilgour, E., & G. Anderson, N. (1998). Cyclic AMP potentiates growth hormone-dependent differentiation of 3T3-F442A preadipocytes : Possible involvement of the transcription factor CREB. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 138(1), 41-50. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00049-5)

Jansma, J., Brinkman, F., van Hemert, S., & El Aidy, S. (2021). Targeting the endocannabinoid system with microbial interventions to improve gut integrity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 106, 110169. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110169>

Jarrahan, A., Manna, S., Edgmond, W. S., Campbell, W. B., & Hillard, C. J. (2000). Structure-activity relationships among N-arachidonyl ethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *Journal of Neurochemistry*, 74(6), 2597-2606. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742597.x>

Jbilo, O., Ravinet-Trillou, C., Arnone, M., Buisson, I., Bribes, E., Péleraux, A., Pénarier, G., Soubrié, P., Le Fur, G., Galiègue, S., & Casellas, P. (2005). The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(11), 1567-1569. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3177fje>

Jelsing, J., Galzin, A.-M., Guillot, E., Pruniaux, M.-P., Larsen, P. J., & Vrang, N. (2009). Localization and phenotypic characterization of brainstem neurons activated by rimonabant and WIN55,212-2. *Brain Research Bulletin*, 78(4), 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.10.014>

- Jenkin, K. A., O'Keefe, L., Simcocks, A. C., Briffa, J. F., Mathai, M. L., McAinch, A. J., & Hryciw, D. H. (2016). Renal effects of chronic pharmacological manipulation of CB2 receptors in rats with diet-induced obesity. *British Journal of Pharmacology*, *173*(7), 1128-1142. <https://doi.org/10.1111/bph.13056>
- Jensen, D. P., Andreasen, C. H., Andersen, M. K., Hansen, L., Eiberg, H., Borch-Johnsen, K., Jørgensen, T., Hansen, T., & Pedersen, O. (2007). The functional Pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5,801 whites. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *85*(5), 445-449. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0139-0>
- Jensen, M. D., Haymond, M. W., Gerich, J. E., Cryer, P. E., & Miles, J. M. (1987). Lipolysis during fasting. Decreased suppression by insulin and increased stimulation by epinephrine. *The Journal of Clinical Investigation*, *79*(1), 207-213. <https://doi.org/10.1172/JCI112785>
- Jeukendrup, A. E., Saris, W. H., & Wagenmakers, A. J. (1998). Fat metabolism during exercise : A review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *International Journal of Sports Medicine*, *19*(4), 231-244. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971911>
- Jing, K., Heo, J.-Y., Song, K.-S., Seo, K.-S., Park, J.-H., Kim, J.-S., Jung, Y.-J., Jo, D.-Y., Kweon, G.-R., Yoon, W.-H., Hwang, B.-D., Lim, K., & Park, J.-I. (2009). Expression regulation and function of Pref-1 during adipogenesis of human mesenchymal stem cells (MSCs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1791*(8), 816-826. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.04.010>
- Jo, S. J., Choi, W. W., Lee, E. S., Lee, J. Y., Park, H. S., Moon, D. W., Eun, H. C., & Chung, J. H. (2011). Temporary increase of PPAR- $\gamma$  and transient expression of UCP-1 in stromal vascular fraction isolated human adipocyte derived stem cells during adipogenesis. *Lipids*, *46*(6), 487-494. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3525-5>
- Johnson, D. W., Jones, G. R. D., Mathew, T. H., Ludlow, M. J., Chadban, S. J., Usherwood, T., Polkinghorne, K., Colagiuri, S., Jerums, G., Macisaac, R., Martin, H., & Australasian Proteinuria Consensus Working Group. (2012). Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria : A position statement. *The Medical Journal of Australia*, *197*(4), 224-225. <https://doi.org/10.5694/mja11.11468>
- Jorgačević, B., Vučević, D., Vesković, M., Mladenović, D., Vukićević, D., Vukićević, R. J., Todorović, V., & Radosavljević, T. (2019). The effect of cannabinoid receptor 1 blockade on adipokine and proinflammatory cytokine concentration in adipose and hepatic tissue in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *97*(2), 120-129. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0607>
- Jourdan, T., Demizieux, L., Gresti, J., Djaouti, L., Gaba, L., Vergès, B., & Degrace, P. (2012). Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid

metabolism in mice : Evidence from cultured explants. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(3), 790-799. <https://doi.org/10.1002/hep.24733>

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Vergès, B., & Degrace, P. (2010). CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 59(4), 926-934. <https://doi.org/10.2337/db09-1482>

Jourdan, T., Godlewski, G., Cinar, R., Bertola, A., Szanda, G., Liu, J., Tam, J., Han, T., Mukhopadhyay, B., Skarulis, M. C., Ju, C., Aouadi, M., Czech, M. P., & Kunos, G. (2013). Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nature Medicine*, 19(9), 1132-1140. <https://doi.org/10.1038/nm.3265>

Jourdan, T., Godlewski, G., & Kunos, G. (2016). Endocannabinoid regulation of  $\beta$ -cell functions: Implications for glycaemic control and diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 18(6), 549-557. <https://doi.org/10.1111/dom.12646>

Jourdan, T., Park, J. K., Varga, Z. V., Pálóczi, J., Coffey, N. J., Rosenberg, A. Z., Godlewski, G., Cinar, R., Mackie, K., Pacher, P., & Kunos, G. (2018). Cannabinoid-1 receptor deletion in podocytes mitigates both glomerular and tubular dysfunction in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20(3), 698-708. <https://doi.org/10.1111/dom.13150>

Jourdan, T., Szanda, G., Cinar, R., Godlewski, G., Holovac, D. J., Park, J. K., Nicoloso, S., Shen, Y., Liu, J., Rosenberg, A. Z., Liu, Z., Czech, M. P., & Kunos, G. (2017). Developmental Role of Macrophage Cannabinoid-1 Receptor Signaling in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 66(4), 994-1007. <https://doi.org/10.2337/db16-1199>

Jourdan, T., Szanda, G., Rosenberg, A. Z., Tam, J., Earley, B. J., Godlewski, G., Cinar, R., Liu, Z., Liu, J., Ju, C., Pacher, P., & Kunos, G. (2014). Overactive cannabinoid 1 receptor in podocytes drives type 2 diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50), E5420-5428. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419901111>

Juan-Picó, P., Fuentes, E., Bermúdez-Silva, F. J., Javier Díaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodríguez de Fonseca, F., & Nadal, A. (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39(2), 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.10.005>

Kaczocha, M., Azim, S., Nicholson, J., Rebecchi, M. J., Lu, Y., Feng, T., Romeiser, J. L., Reinsel, R., Rizwan, S., Shodhan, S., Volkow, N. D., & Benveniste, H. (2018). Intrathecal morphine administration reduces postoperative pain and peripheral endocannabinoid levels in total knee arthroplasty patients : A randomized clinical trial. *BMC Anesthesiology*, 18, 27. <https://doi.org/10.1186/s12871-018-0489-5>

- Kahn, C. R. (1985). The Molecular Mechanism of Insulin Action. *Annual Review of Medicine*, 36(1), 429-451. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.36.020185.002241>
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat : Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, 22(4), 546-559. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>
- Kang, L., Ayala, J. E., Lee-Young, R. S., Zhang, Z., James, F. D., Neuffer, P. D., Pozzi, A., Zutter, M. M., & Wasserman, D. H. (2011). Diet-induced muscle insulin resistance is associated with extracellular matrix remodeling and interaction with integrin alpha2beta1 in mice. *Diabetes*, 60(2), 416-426. <https://doi.org/10.2337/db10-1116>
- Kang, S., Tsai, L. T.-Y., & Rosen, E. D. (2016). Nuclear Mechanisms of Insulin Resistance. *Trends in Cell Biology*, 26(5), 341-351. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.002>
- Karaliota, S., Siafaka-Kapadai, A., Gontinou, C., Psarra, K., & Mavri-Vavayanni, M. (2009). Anandamide Increases the Differentiation of Rat Adipocytes and Causes PPAR $\gamma$  and CB1 Receptor Upregulation. *Obesity*, 17(10), 1830-1838. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.177>
- Karamanakos, S. N., Vagenas, K., Kalfarentzos, F., & Alexandrides, T. K. (2008). Weight loss, appetite suppression, and changes in fasting and postprandial ghrelin and peptide-YY levels after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy : A prospective, double blind study. *Annals of Surgery*, 247(3), 401-407. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318156f012>
- Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., Starowicz, K., Steuder, R., Schlicker, E., Cravatt, B., Mechoulam, R., Buettner, R., Werner, S., Di Marzo, V., Tüting, T., & Zimmer, A. (2007). Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5830), 1494-1497. <https://doi.org/10.1126/science.1142265>
- Katona, I., Sperlág, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), 4544-4558.
- Katona, I., Urbán, G. M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.-M., Piomelli, D., Mackie, K., & Freund, T. F. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(21), 5628-5637. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0309-06.2006>
- Ke, P., Shao, B.-Z., Xu, Z.-Q., Wei, W., Han, B.-Z., Chen, X.-W., Su, D.-F., & Liu, C. (2016). Activation of Cannabinoid Receptor 2 Ameliorates DSS-Induced Colitis through Inhibiting NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *PloS One*, 11(9), e0155076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155076>



- Kempf, K., Hector, J., Strate, T., Schwarzloh, B., Rose, B., Herder, C., Martin, S., & Algenstaedt, P. (2007). Immune-mediated activation of the endocannabinoid system in visceral adipose tissue in obesity. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 39(8), 596-600. <https://doi.org/10.1055/s-2007-984459>
- Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B. B., Bonaldo, P., Chua, S., & Scherer, P. E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis : Role of collagen VI. *Molecular and Cellular Biology*, 29(6), 1575-1591. <https://doi.org/10.1128/MCB.01300-08>
- Kim, W., Doyle, M. E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.-K., Carlson, O. D., Kim, H. S., Thomas, S., Napora, J. K., Lee, E. K., Moaddel, R., Wang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Kulkarni, R. N., & Egan, J. M. (2011). Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 60(4), 1198-1209. <https://doi.org/10.2337/db10-1550>
- Kim, W., Lao, Q., Shin, Y.-K., Carlson, O. D., Lee, E. K., Gorospe, M., Kulkarni, R. N., & Egan, J. M. (2012). Cannabinoids induce pancreatic  $\beta$ -cell death by directly inhibiting insulin receptor activation. *Science Signaling*, 5(216), ra23. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002519>
- Kim, Y., Gautam, S., Aseer, K. R., Kim, J., Chandrasekaran, P., Mazucanti, C. H., Ghosh, P., O'Connell, J. F., Doyle, M. E., Appleton, A., Lehrmann, E., Liu, Q.-R., & Egan, J. M. (2020). Hepatocyte cannabinoid 1 receptor nullification alleviates toxin-induced liver damage via NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Death & Disease*, 11(12), 1044. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03261-8>
- Kishimoto, Y., & Kano, M. (2006). Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(34), 8829-8837. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1236-06.2006>
- Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., & Kasuga, M. (1999). Insulin-Induced Phosphorylation and Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3B by the Serine-Threonine Kinase Akt. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6286-6296. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.6286>
- Klein, T. W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 400-411. <https://doi.org/10.1038/nri1602>
- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S. A., Kirkham, T. C., Garcia, E. A., Mitchell, S. E., Williams, L. M., Hawley, S. A., Hardie, D. G., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25196-25201. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500175200>

- Korner, J., Bessler, M., Cirilo, L. J., Conwell, I. M., Daud, A., Restuccia, N. L., & Wardlaw, S. L. (2005). Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *90*(1), 359-365. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1076>
- Kozak, L. P. (2011). The genetics of brown adipocyte induction in white fat depots. *Frontiers in Endocrinology*, *2*, 64. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00064>
- Krott, L. M., Piscitelli, F., Heine, M., Borrino, S., Scheja, L., Silvestri, C., Heeren, J., & Di Marzo, V. (2016). Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation. *Journal of Lipid Research*, *57*(3), 464-473. <https://doi.org/10.1194/jlr.M065227>
- Krueger, K. M., & Barbieri, J. T. (1995). The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *8*(1), 34-47. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.34>
- Kuipers, E. N., Kantae, V., Maarse, B. C. E., van den Berg, S. M., van Eenige, R., Nahon, K. J., Reifel-Miller, A., Coskun, T., de Winther, M. P. J., Lutgens, E., Kooijman, S., Harms, A. C., Hankemeier, T., van der Stelt, M., Rensen, P. C. N., & Boon, M. R. (2019). High Fat Diet Increases Circulating Endocannabinoids Accompanied by Increased Synthesis Enzymes in Adipose Tissue. *Frontiers in Physiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01913>
- Kulkarni-Narla, A., & Brown, D. R. (2000). Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell and Tissue Research*, *302*(1), 73-80. <https://doi.org/10.1007/s004410000261>
- Kunos, G. (2007). Understanding metabolic homeostasis and imbalance : What is the role of the endocannabinoid system? *The American Journal of Medicine*, *120*(9 Suppl 1), S18-24; discussion S24. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.06.007>
- Kuryłowicz, A., & Puzianowska-Kuźnicka, M. (2020). Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), E6241. <https://doi.org/10.3390/ijms21176241>
- Kusminski, C. M., Bickel, P. E., & Scherer, P. E. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *15*(9), 639-660. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.75>
- Laezza, C., Pagano, C., Navarra, G., Pastorino, O., Proto, M. C., Fiore, D., Piscopo, C., Gazzero, P., & Bifulco, M. (2020). The Endocannabinoid System : A Target for Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 747. <https://doi.org/10.3390/ijms21030747>
- Lafontan, M. (2003). Activités métaboliques et sécrétoires des adipocytes. *Pathologie Biologie*, *51*(5), 238-240. [https://doi.org/10.1016/S0369-8114\(03\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0369-8114(03)00077-4)

- Lafontan, M. (2013). Différences entre tissu adipeux sous-cutané et tissu adipeux viscéral. In J.-P. Bastard & B. Fève (Éds.), *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (p. 337-357). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6\\_23](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6_23)
- Lafontan, M., & Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(6), 276-283. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00132-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00132-9)
- Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 48(5), 275-297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>
- Lagathu, C., Bastard, J.-P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., & Caron, M. (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), 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.013>
- Langin, D. (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *Comptes Rendus Biologies*, 329(8), 598-607. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.10.008>
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., & Barak, L. S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3712-3717. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3712>
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., & Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & Metabolism*, 30(4), 294-309. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70121-0](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70121-0)
- Laslett, L. J., Alagona, P., Clark, B. A., Drozda, J. P., Saldivar, F., Wilson, S. R., Poe, C., & Hart, M. (2012). The worldwide environment of cardiovascular disease : Prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(25 Suppl), S1-49. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.002>
- Laurencikiene, J., Skurk, T., Kulyté, A., Hedén, P., Aström, G., Sjölin, E., Rydén, M., Hauner, H., & Arner, P. (2011). Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(12), E2045-2049. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1702>
- Laurent, V., Nieto, L., Valet, P., & Muller, C. (2014). Tissu adipeux et cancer—Une association à haut risque. *médecine/sciences*, 30(4), 398-404. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004013>
- Laviola, L., Perrini, S., Cignarelli, A., Natalicchio, A., Leonardini, A., De Stefano, F., Cuscito, M., De Fazio, M., Memeo, V., Neri, V., Cignarelli, M., Giorgino, R., & Giorgino, F. (2006).

Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*, 55(4), 952-961. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1414>

Le Foll, B., Gorelick, D. A., & Goldberg, S. R. (2009). The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB1 antagonists. *Psychopharmacology*, 205(1), 171-174. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1506-7>

Lecru, L., Desterke, C., Grassin-Delyle, S., Chatziantoniou, C., Vandermeersch, S., Devocelle, A., Vernochet, A., Ivanovski, N., Ledent, C., Ferlicot, S., Dalia, M., Saïd, M., Beaudreuil, S., Charpentier, B., Vazquez, A., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Durrbach, A., & François, H. (2015). Cannabinoid receptor 1 is a major mediator of renal fibrosis. *Kidney International*, 88(1), 72-84. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.63>

Lee, J. M., Pilli, S., Gebremariam, A., Keirns, C. C., Davis, M. M., Vijan, S., Freed, G. L., Herman, W. H., & Gurney, J. G. (2010). Getting heavier, younger : Trajectories of obesity over the life course. *International Journal of Obesity (2005)*, 34(4), 614-623. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.235>

Lee, Y., Jo, J., Chung, H. Y., Pothoulakis, C., & Im, E. (2016). Endocannabinoids in the gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(4), G655-G666. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00294.2015>

Ligresti, A., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiological Reviews*, 96(4), 1593-1659. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2016>

Lim, J., Park, H. S., Kim, J., Jang, Y. J., Kim, J.-H., Lee, Y., & Heo, Y. (2020). Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers. *International Journal of Obesity*, 44(3), 697-706. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-0528-4>

Little, T. J., Cvijanovic, N., DiPatrizio, N. V., Argueta, D. A., Rayner, C. K., Feinle-Bisset, C., & Young, R. L. (2018). Plasma endocannabinoid levels in lean, overweight, and obese humans : Relationships to intestinal permeability markers, inflammation, and incretin secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 315(4), E489-E495. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00355.2017>

Liu, J., Batkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Wagner, J. A., Cravatt, B. F., Gao, B., & Kunos, G. (2003). Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 45034-45039. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306062200>

Liu, J., Cinar, R., Xiong, K., Godlewski, G., Jourdan, T., Lin, Y., Ntambi, J. M., & Kunos, G. (2013). Monounsaturated fatty acids generated via stearoyl CoA desaturase-1 are

endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 18832-18837. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309469110>

Liu, J., Gao, B., Mirshahi, F., Sanyal, A. J., Khanolkar, A. D., Makriyannis, A., & Kunos, G. (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 346 Pt 3, 835-840.

Liu, J., Godlewski, G., Jourdan, T., Liu, Z., Cinar, R., Xiong, K., & Kunos, G. (2019). Cannabinoid-1 Receptor Antagonism Improves Glycemic Control and Increases Energy Expenditure Through Sirtuin-1/Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2 and 5'Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69(4), 1535-1548. <https://doi.org/10.1002/hep.30364>

Liu, J., Zhou, L., Xiong, K., Godlewski, G., Mukhopadhyay, B., Tam, J., Yin, S., Gao, P., Shan, X., Pickel, J., Bataller, R., O'Hare, J., Scherer, T., Buettner, C., & Kunos, G. (2012). Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology*, 142(5), 1218-1228.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.032>

Liu, J.-L., Segovia, I., Yuan, X.-L., & Gao, Z. (2020). Controversial Roles of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Pancreatic  $\beta$ -Cell Growth and Insulin Secretion. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 910. <https://doi.org/10.3390/ijms21030910>

Liu, Q.-R., Huang, N. S., Qu, H., O'Connell, J. F., Gonzalez-Mariscal, I., Santa-Cruz-Calvo, S., Doyle, M. E., Xi, Z.-X., Wang, Y., Onaivi, E. S., & Egan, J. M. (2019). Identification of novel mouse and rat CB1R isoforms and in silico modeling of human CB1R for peripheral cannabinoid therapeutics. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), 387-397. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0152-1>

Liu, Y. L., Connoley, I. P., Wilson, C. A., & Stock, M. J. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *International Journal of Obesity (2005)*, 29(2), 183-187. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802847>

Liu, Z., Iyer, M. R., Godlewski, G., Jourdan, T., Liu, J., Coffey, N. J., Zawatsky, C. N., Puhl, H. L., Wess, J., Meister, J., Liow, J.-S., Innis, R. B., Hassan, S. A., Lee, Y. S., Kunos, G., & Cinar, R. (2021). Functional Selectivity of a Biased Cannabinoid-1 Receptor (CB1R) Antagonist. *ACS Pharmacology & Translational Science*. <https://doi.org/10.1021/acspsci.1c00048>

Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., Powell, C., Vedantam, S., Buchkovich, M. L., Yang, J., Croteau-Chonka, D. C., Esko, T., Fall, T., Ferreira, T., Gustafsson, S., Kutalik, Z., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., ... Speliotes, E. K. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*, 518(7538), 197-206. <https://doi.org/10.1038/nature14177>

Löfgren, P., Sjölin, E., Wåhlen, K., & Hoffstedt, J. (2007). Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(4), 1555-1559. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2240>

Londos, C., Honnor, R. C., & Dhillon, G. S. (1985). cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. III. Multiple modes of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase regulators. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(28), 15139-15145.

Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>

Lowin, T., Apitz, M., Anders, S., & Straub, R. H. (2015). Anti-inflammatory effects of N-acylethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by TRPV1 and TRPA1 in a COX-2 dependent manner. *Arthritis Research & Therapy*, 17, 321. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0845-5>

Lukaszewski, M.-A. (2011). *Effets d'une dénutrition maternelle prénatale sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez la descendance mâle adulte : Focus sur l'hypothalamus et le tissu adipeux*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Effets-d%27une-d%3%A9nutrition-maternelle-pr%3%A9natale-sur-%3A-Lukaszewski/eb8f2ba49b34977ba5800e9b54fac8c2e5b1ab09>

Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175-184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>

Maccarrone, M. (2009). Endocannabinoids : Friends and foes of reproduction. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 344-354. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.07.001>

Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., Konje, J. C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A., & Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery : 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 277-296. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>

Maccarrone, M., De Petrocellis, L., Bari, M., Fezza, F., Salvati, S., Di Marzo, V., & Finazzi-Agrò, A. (2001). Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393(2), 321-328. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2500>

Maccarrone, M., Rossi, S., Bari, M., De Chiara, V., Fezza, F., Musella, A., Gasperi, V., Prosperetti, C., Bernardi, G., Finazzi-Agrò, A., Cravatt, B. F., & Centonze, D. (2008).

- Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nature Neuroscience*, *11*(2), 152-159. <https://doi.org/10.1038/nn2042>
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *168*, 299-325. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_10](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_10)
- Mahmoud Gouda, H., & Mohamed Kamel, N. R. (2013). Cannabinoid CB2 receptor gene (CNR2) polymorphism is associated with chronic childhood immune thrombocytopenia in Egypt. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, *24*(3), 247-251. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32835aba1d>
- Malenczyk, K., Keimpema, E., Piscitelli, F., Calvigioni, D., Björklund, P., Mackie, K., Di Marzo, V., Hökfelt, T. G. M., Dobrzyn, A., & Harkany, T. (2015). Fetal endocannabinoids orchestrate the organization of pancreatic islet microarchitecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(45), E6185-6194. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519040112>
- Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., & Lotersztajn, S. (2013). Cannabinoid signaling and liver therapeutics. *Journal of Hepatology*, *59*(4), 891-896. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.032>
- Marcelin, G., & Chua, S. (2010). Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Current opinion in pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.05.008>
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., & Lutz, B. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, *418*(6897), 530-534. <https://doi.org/10.1038/nature00839>
- Martínez-León, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Kong, M., Morales, P., Pérez-Martínez, S., & Díaz, E. S. (2019). Fibronectin modulates the endocannabinoid system through the cAMP/PKA pathway during human sperm capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, *86*(2), 224-238. <https://doi.org/10.1002/mrd.23097>
- Matias, I., Belluomo, I., & Cota, D. (2016). The Fat Side of the Endocannabinoid System : Role of Endocannabinoids in the Adipocyte. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *1*(1), 176-185. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0014>
- Matias, I., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2006). Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues : Regulation of their levels and control of food intake. *International Journal of Obesity (2005)*, *30 Suppl 1*, S7-S12. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803271>
- Matias, I., Carta, G., Murru, E., Petrosino, S., Banni, S., & Di Marzo, V. (2008). Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in

mouse adipocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1781(1-2), 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2007.11.001>

Matias, I., & Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.006>

Matias, I., Gatta-Cherifi, B., & Cota, D. (2012). Obesity and the Endocannabinoid System : Circulating Endocannabinoids and Obesity. *Current Obesity Reports*, 1(4), 229-235. <https://doi.org/10.1007/s13679-012-0027-6>

Matias, I., Gonthier, M.-P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., Roche, R., Maj, M., Pagotto, U., Monteleone, P., & Di Marzo, V. (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(8), 3171-3180. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2679>

Matias, I., Petrosino, S., Racioppi, A., Capasso, R., Izzo, A. A., & Di Marzo, V. (2008). Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity : Effect of high fat diets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1-2 Suppl 1), S66-78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.026>

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>

Mauriege, P., Galitzky, J., Berlan, M., & Lafontan, M. (1987). Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits : Functional consequences. *European Journal of Clinical Investigation*, 17(2), 156-165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1987.tb02395.x>

McDougle, D. R., Watson, J. E., Abdeen, A. A., Adili, R., Caputo, M. P., Krapf, J. E., Johnson, R. W., Kilian, K. A., Holinstat, M., & Das, A. (2017). Anti-inflammatory  $\omega$ -3 endocannabinoid epoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(30), E6034-E6043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610325114>

McFarland, M. J., Porter, A. C., Rakhshan, F. R., Rawat, D. S., Gibbs, R. A., & Barker, E. L. (2004). A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41991-41997. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407250200>

McNelis, J. C., & Olefsky, J. M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity*, 41(1), 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.010>

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., & Compton, D. R. (1995). Identification of an



endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83-90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d)

Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1965). A TOTAL SYNTHESIS OF DL-DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL, THE ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. *Journal of the American Chemical Society*, 87, 3273-3275. <https://doi.org/10.1021/ja01092a065>

Mechoulam, R., Hanus, L., & Friede, E. (1998). Towards cannabinoid drugs—Revisited. *Progress in Medicinal Chemistry*, 35, 199-243. [https://doi.org/10.1016/s0079-6468\(08\)70037-7](https://doi.org/10.1016/s0079-6468(08)70037-7)

Meiliana, A., & Wijaya, A. (2014). *Hypertrophic Obesity and Subcutaneous Adipose Tissue Dysfunction*. <https://doi.org/10.18585/INABJ.V6I2.33>

Mendis, S., Davis, S., & Norrving, B. (2015). Organizational update : The world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke*, 46(5), e121-122. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.008097>

Meyer, L. K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wittgrove, A. C., & Phillips, S. A. (2013). Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*, 2(4), 217-226. <https://doi.org/10.4161/adip.24953>

Micale, V., Drago, F., Noerregaard, P. K., Elling, C. E., & Wotjak, C. T. (2019). The Cannabinoid CB1 Antagonist TM38837 With Limited Penetration to the Brain Shows Reduced Fear-Promoting Effects in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 207. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00207>

Min, T., & Bain, S. C. (2021). The Role of Tirzepatide, Dual GIP and GLP-1 Receptor Agonist, in the Management of Type 2 Diabetes : The SURPASS Clinical Trials. *Diabetes Therapy: Research, Treatment and Education of Diabetes and Related Disorders*, 12(1), 143-157. <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00981-0>

Minehira, K., Bettschart, V., Vidal, H., Vega, N., Di Vetta, V., Rey, V., Schneiter, P., & Tappy, L. (2003). Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans. *Obesity Research*, 11(9), 1096-1103. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.150>

Miralpeix, C., Fosch, A., Casas, J., Baena, M., Herrero, L., Serra, D., Rodríguez-Rodríguez, R., & Casals, N. (2019). Hypothalamic endocannabinoids inversely correlate with the development of diet-induced obesity in male and female mice. *Journal of Lipid Research*, 60(7), 1260-1269. <https://doi.org/10.1194/jlr.M092742>

Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem

cells. *Circulation*, 110(3), 349-355.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0>

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1101-1111.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>

Mohsen-Kanson, T., Wdziekonski, B., Villageois, P., Hafner, A.-L., Lay, N., Martin, P., Zaragosi, L.-E., Billon, N., Plaisant, M., Peraldi, P., Ladoux, A., & Dani, C. (2013). Le développement de la cellule adipeuse. In J.-P. Bastard & B. Fève (Éds.), *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (p. 3-16). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6_1)

Moisan, C., Charles, M.-A., Crine, A., Basdevant, A., & Eschwège, E. (2013). P2071 Le diabète de type 2 en France en 2012 ; données de l'enquête ObEpi. *Diabetes & Metabolism*, 39, A85.  
[https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(13\)71981-5](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(13)71981-5)

Mølhøj, S., Hansen, H. S., Schweiger, M., Zimmermann, R., Johansen, T., & Malmjöf, K. (2010). Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 646(1-3), 38-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.006>

Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., & Guaza, C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(22), 9742-9753.

Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B., & O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387(6636), 903-908.  
<https://doi.org/10.1038/43185>

Montane, J., Cadavez, L., & Novials, A. (2014). Stress and the inflammatory process: A major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 25-34. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S37649>

Monteleone, A. M., Di Marzo, V., Monteleone, P., Dalle Grave, R., Aveta, T., Ghoch, M. E., Piscitelli, F., Volpe, U., Calugi, S., & Maj, M. (2016). Responses of peripheral endocannabinoids and endocannabinoid-related compounds to hedonic eating in obesity. *European Journal of Nutrition*, 55(4), 1799-1805. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1153-9>

- Monteleone, P., Matias, I., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Maj, M., & Di Marzo, V. (2005). Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *30*(6), 1216-1221. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300695>
- Montrose-Rafizadeh, C., Egan, J. M., & Roth, J. (1994). Incretin hormones regulate glucose-dependent insulin secretion in RIN 1046-38 cells : Mechanisms of action. *Endocrinology*, *135*(2), 589-594. <https://doi.org/10.1210/endo.135.2.8033807>
- Moore, C. A. C., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual Review of Physiology*, *69*, 451-482. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>
- Moore, S. A., Nomikos, G. G., Dickason-Chesterfield, A. K., Schober, D. A., Schaus, J. M., Ying, B.-P., Xu, Y.-C., Phebus, L., Simmons, R. M. A., Li, D., Iyengar, S., & Felder, C. C. (2005). Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(49), 17852-17857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507470102>
- Morales, P., Bruix, M., & Jiménez, M. A. (2020). Structural Insights into  $\beta$ -arrestin/CB1 Receptor Interaction : NMR and CD Studies on Model Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8111. <https://doi.org/10.3390/ijms21218111>
- Morrison, M. F., Ceesay, P., Gantz, I., Kaufman, K. D., & Lines, C. R. (2010). Randomized, controlled, double-blind trial of taranabant for smoking cessation. *Psychopharmacology*, *209*(3), 245-253. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1790-2>
- Motaghedi, R., & McGraw, T. E. (2008). The CB1 endocannabinoid system modulates adipocyte insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *16*(8), 1727-1734. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.309>
- Mouisel, E., & Langin, D. (2013). La lipolyse adipocytaire. In J.-P. Bastard & B. Fève (Éds.), *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (p. 143-160). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6_10)
- Muccioli, G. G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular Systems Biology*, *6*, 392. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.46>
- Mukhopadhyay, B., Liu, J., Osei-Hyiaman, D., Godlewski, G., Mukhopadhyay, P., Wang, L., Jeong, W.-I., Gao, B., Duyster, G., Mackie, K., Kojima, S., & Kunos, G. (2010). Transcriptional regulation of cannabinoid receptor-1 expression in the liver by retinoic acid acting via retinoic acid receptor-gamma. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(25), 19002-19011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068460>

- Mukhopadhyay, S., & Howlett, A. C. (2005). Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions. *Molecular Pharmacology*, 67(6), 2016-2024. <https://doi.org/10.1124/mol.104.003558>
- Müller, G. A., Herling, A. W., Wied, S., & Müller, T. D. (2020). CB1 Receptor-Dependent and Independent Induction of Lipolysis in Primary Rat Adipocytes by the Inverse Agonist Rimonabant (SR141716A). *Molecules*, 25(4), 896. <https://doi.org/10.3390/molecules25040896>
- Müller, T. D., Finan, B., Bloom, S. R., D'Alessio, D., Drucker, D. J., Flatt, P. R., Fritsche, A., Gribble, F., Grill, H. J., Habener, J. F., Holst, J. J., Langhans, W., Meier, J. J., Nauck, M. A., Perez-Tilve, D., Pocai, A., Reimann, F., Sandoval, D. A., Schwartz, T. W., ... Tschöp, M. H. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, 30, 72-130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>
- Müller, T. D., Reichwald, K., Wermter, A.-K., Brönner, G., Nguyen, T. T., Friedel, S., Koberwitz, K., Engeli, S., Lichtner, P., Meitinger, T., Schäfer, H., Hebebrand, J., & Hinney, A. (2007). No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (CNR1) in obesity in German children and adolescents. *Molecular Genetics and Metabolism*, 90(4), 429-434. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.01.002>
- Muller, T., Demizieux, L., Troy-Fioramonti, S., Gresti, J., Pais de Barros, J.-P., Berger, H., Vergès, B., & Degrace, P. (2017). Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 313(1), E26-E36. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00374.2016>
- Muñoz-Garach, A., Diaz-Perdigones, C., & Tinahones, F. J. (2016). Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutrición*, 63(10), 560-568. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.008>
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Murdolo, G., Kempf, K., Hammarstedt, A., Herder, C., Smith, U., & Jansson, P.-A. (2007). Insulin differentially modulates the peripheral endocannabinoid system in human subcutaneous abdominal adipose tissue from lean and obese individuals. *Journal of Endocrinological Investigation*, 30(8), RC17-21. <https://doi.org/10.1007/BF03347440>
- Nakata, M., & Yada, T. (2008). Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. *Regulatory Peptides*, 145(1-3), 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.009>

- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., ... Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013 : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, *384*(9945), 766-781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8)
- Nguyen, M. T. A., Faveyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C. K., Neels, J. G., & Olefsky, J. M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 35279-35292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200>
- Nguyen, P. T., Schmid, C. L., Raehal, K. M., Selley, D. E., Bohn, L. M., & Sim-Selley, L. J. (2012).  $\beta$ -arrestin2 regulates cannabinoid CB1 receptor signaling and adaptation in a central nervous system region-dependent manner. *Biological Psychiatry*, *71*(8), 714-724. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.027>
- Nishizawa, Y., & Bray, G. A. (1978). Ventromedial hypothalamic lesions and the mobilization of fatty acids. *The Journal of Clinical Investigation*, *61*(3), 714-721. <https://doi.org/10.1172/JCI108984>
- Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Wolski, K., Rodés-Cabau, J., Cannon, C. P., Deanfield, J. E., Després, J.-P., Kastelein, J. J. P., Steinhubl, S. R., Kapadia, S., Yasin, M., Ruzyllo, W., Gaudin, C., Job, B., Hu, B., Bhatt, D. L., Lincoff, A. M., Tuzcu, E. M., & STRADIVARIUS Investigators. (2008). Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease : The STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*, *299*(13), 1547-1560. <https://doi.org/10.1001/jama.299.13.1547>
- Nogueiras, R., Rohner-Jeanrenaud, F., Woods, S. C., & Tschöp, M. H. (2008). The Endocannabinoid System and the Control of Glucose Homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(s1), 147-151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01692.x>
- Nogueiras, R., Veyrat-Durebex, C., Suchanek, P. M., Klein, M., Tschöp, J., Caldwell, C., Woods, S. C., Wittmann, G., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., Reizes, O., Rohner-Jeanrenaud, F., & Tschöp, M. H. (2008). Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes*, *57*(11), 2977-2991. <https://doi.org/10.2337/db08-0161>
- Nogueras-Ortiz, C., & Yudowski, G. A. (2016). The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Molecular Pharmacology*, *90*(5), 620-626. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104539>

- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Flegal, K. M. (2012). Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA*, *307*(5), 483-490. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.40>
- Olshansky, S. J., Passaro, D. J., Hershow, R. C., Layden, J., Carnes, B. A., Brody, J., Hayflick, L., Butler, R. N., Allison, D. B., & Ludwig, D. S. (2005). A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *The New England Journal of Medicine*, *352*(11), 1138-1145. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr043743>
- O'Rourke, R. W., Metcalf, M. D., White, A. E., Madala, A., Winters, B. R., Maizlin, I. I., Jobe, B. A., Roberts, C. T., Slifka, M. K., & Marks, D. L. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *International Journal of Obesity (2005)*, *33*(9), 978-990. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.133>
- Ortega-Gutiérrez, S., Hawkins, E. G., Viso, A., López-Rodríguez, M. L., & Cravatt, B. F. (2004). Comparison of anandamide transport in FAAH wild-type and knockout neurons: Evidence for contributions by both FAAH and the CB1 receptor to anandamide uptake. *Biochemistry*, *43*(25), 8184-8190. <https://doi.org/10.1021/bi049395f>
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertáler, L., Wang, L., & Kunos, G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(5), 1298-1305. <https://doi.org/10.1172/JCI23057>
- Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Zhou, L., Godlewski, G., Harvey-White, J., Jeong, W., Bátkai, S., Marsicano, G., Lutz, B., Buettner, C., & Kunos, G. (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(9), 3160-3169. <https://doi.org/10.1172/JCI34827>
- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 389-462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Pacher, P., Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2020). Beyond THC and Endocannabinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *60*, 637-659. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441>
- Pacher, P., & Kunos, G. (2013). Modulating the endocannabinoid system in human health and disease—Successes and failures. *The FEBS Journal*, *280*(9), 1918-1943. <https://doi.org/10.1111/febs.12260>
- Pagano, C., Pilon, C., Calcagno, A., Urbanet, R., Rossato, M., Milan, G., Bianchi, K., Rizzuto, R., Bernante, P., Federspil, G., & Vettor, R. (2007). The endogenous cannabinoid system

stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(12), 4810-4819. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0768>

Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., & Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine Reviews*, 27(1), 73-100. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0009>

Pairault, J., & Green, H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5138-5142. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5138>

Pajvani, U. B., Hawkins, M., Combs, T. P., Rajala, M. W., Doebber, T., Berger, J. P., Wagner, J. A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A. H., Utzschneider, K. M., Kahn, S. E., Olefsky, J. M., Buchanan, T. A., & Scherer, P. E. (2004). Complex Distribution, Not Absolute Amount of Adiponectin, Correlates with Thiazolidinedione-mediated Improvement in Insulin Sensitivity\*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12152-12162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311113200>

Parker, V. E. R., Savage, D. B., O'Rahilly, S., & Semple, R. K. (2011). Mechanistic insights into insulin resistance in the genetic era. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 28(12), 1476-1486. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03463.x>

Parolaro, D., Massi, P., Rubino, T., & Monti, E. (2002). Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 66(2-3), 319-332. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0355>

Paronis, C. A., Chopda, G. R., Vemuri, K., Zakarian, A. S., Makriyannis, A., & Bergman, J. (2018). Long-Lasting In Vivo Effects of the Cannabinoid CB1 Antagonist AM6538. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 364(3), 485-493. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.245647>

Paszkiwicz, R. L., Bergman, R. N., Santos, R. S., Frank, A. P., Woolcott, O. O., Iyer, M. S., Stefanovski, D., Clegg, D. J., & Kabir, M. (2020). A Peripheral CB1R Antagonist Increases Lipolysis, Oxygen Consumption Rate, and Markers of Being in 3T3-L1 Adipocytes Similar to RIM, Suggesting that Central Effects Can Be Avoided. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), E6639. <https://doi.org/10.3390/ijms21186639>

Pataky, Z., Gasteyger, C., Ziegler, O., Rissanen, A., Hanotin, C., & Golay, A. (2013). Efficacy of rimonabant in obese patients with binge eating disorder. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 121(1), 20-26. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1329957>

Perry, R. J., Camporez, J.-P. G., Kursawe, R., Titchenell, P. M., Zhang, D., Perry, C. J., Jurczak, M. J., Abudukadier, A., Han, M. S., Zhang, X.-M., Ruan, H.-B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S. M.,

- Sul, H. S., Birnbaum, M. J., Davis, R. J., Cline, G. W., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2015). Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*, *160*(4), 745-758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012>
- Pertwee, R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *74*(2), 129-180. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(97\)82001-3](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(97)82001-3)
- Pertwee, R. G. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology*, *63*(5), 569-611. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00031-9)
- Perwitz, N., Wenzel, J., Wagner, I., Büning, J., Drenckhan, M., Zarse, K., Ristow, M., Lilienthal, W., Lehnert, H., & Klein, J. (2010). Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *12*(2), 158-166. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01133.x>
- Petersen, M. C., Madiraju, A. K., Gassaway, B. M., Marcel, M., Nasiri, A. R., Butrico, G., Marcucci, M. J., Zhang, D., Abulizi, A., Zhang, X.-M., Philbrick, W., Hubbard, S. R., Jurczak, M. J., Samuel, V. T., Rinehart, J., & Shulman, G. I. (2016). Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(11), 4361-4371. <https://doi.org/10.1172/JCI86013>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133-2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Pilitsi, E., Farr, O. M., Polyzos, S. A., Perakakis, N., Nolen-Doerr, E., Papathanasiou, A.-E., & Mantzoros, C. S. (2019). Pharmacotherapy of obesity : Available medications and drugs under investigation. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *92*, 170-192. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.010>
- Pi-Sunyer, F. X., Aronne, L. J., Heshmati, H. M., Devin, J., Rosenstock, J., & RIO-North America Study Group. (2006). Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients : RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*, *295*(7), 761-775. <https://doi.org/10.1001/jama.295.7.761>
- Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., & Bookstein, F. L. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Human Development*, *8*(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(83\)90028-2](https://doi.org/10.1016/0378-3782(83)90028-2)
- Portillo, M. P., Villaro, J. M., Torres, M. I., & Macarulla, M. T. (2000). In vivo lipolysis in adipose tissue from two anatomical locations measured by microdialysis. *Life Sciences*, *67*(4), 437-445. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00642-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00642-1)
- Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hämmerle, G., & Zechner, R. (2002). Lipoprotein lipase : The regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism.



*Current Opinion in Lipidology*, 13(5), 471-481. <https://doi.org/10.1097/00041433-200210000-00002>

Puddu, A., Sanguineti, R., Montecucco, F., & Viviani, G. L. (2014). Evidence for the Gut Microbiota Short-Chain Fatty Acids as Key Pathophysiological Molecules Improving Diabetes. *Mediators of Inflammation*, 2014, e162021. <https://doi.org/10.1155/2014/162021>

Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P., & Manzoni, O. J. (2011). Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nature Neuroscience*, 14(12), 1542-1547. <https://doi.org/10.1038/nn.2974>

Pulgarón, E. R. (2013). Childhood obesity : A review of increased risk for physical and psychological comorbidities. *Clinical Therapeutics*, 35(1), A18-32. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.12.014>

Quarta, C., & Cota, D. (2020). Anti-obesity therapy with peripheral CB1 blockers : From promise to safe(?) practice. *International Journal of Obesity (2005)*, 44(11), 2179-2193. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-0577-8>

Quarta, C., Mazza, R., Obici, S., Pasquali, R., & Pagotto, U. (2011). Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends in Molecular Medicine*, 17(9), 518-526. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.05.002>

Ralevic, V., & Kendall, D. A. (2009). Cannabinoid modulation of perivascular sympathetic and sensory neurotransmission. *Current Vascular Pharmacology*, 7(1), 15-25. <https://doi.org/10.2174/157016109787354114>

Ramírez, B. G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., & de Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids : Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(8), 1904-1913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-04.2005>

Ramkhalawon, B., Hennessy, E. J., Ménager, M., Ray, T. D., Sheedy, F. J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., Miller, G., McPherson, R., Rayner, K. J., & Moore, K. J. (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nature Medicine*, 20(4), 377-384. <https://doi.org/10.1038/nm.3467>

Ravinet Trillou, C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J.-P., & Soubrie, P. (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(2), R345-353. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00545.2002>

- Razani, B., Combs, T. P., Wang, X. B., Frank, P. G., Park, D. S., Russell, R. G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8635-8647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110970200>
- Reilly, J. J., & Kelly, J. (2011). Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood : Systematic review. *International Journal of Obesity (2005)*, 35(7), 891-898. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.222>
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K., & Lefkowitz, R. J. (2012). Molecular mechanism of  $\beta$ -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 179-197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105800>
- Reusch, J. E., Colton, L. A., & Klemm, D. J. (2000). CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 1008-1020. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.3.1008-1020.2000>
- Robinson, J. D., Cinciripini, P. M., Karam-Hage, M., Aubin, H.-J., Dale, L. C., Niaura, R., Anthenelli, R. M., & STRATUS Group. (2018). Pooled analysis of three randomized, double-blind, placebo controlled trials with rimonabant for smoking cessation. *Addiction Biology*, 23(1), 291-303. <https://doi.org/10.1111/adb.12508>
- Roche, R., Hoareau, L., Bes-Houtmann, S., Gonthier, M.-P., Laborde, C., Baron, J.-F., Haffaf, Y., Cesari, M., & Festy, F. (2006). Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 126(2), 177-187. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0127-4>
- Rodrigues, A. C., Prímola-Gomes, T. N., Peluzio, M. C. G., Hermsdorff, H. H. M., & Natali, A. J. (2021). Aerobic exercise and lipolysis : A review of the  $\beta$ -adrenergic signaling pathways in adipose tissue. *Science & Sports*, 36(1), 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2020.04.006>
- Roger, C., Buch, C., Muller, T., Leemput, J., Demizieux, L., Passilly-Degrace, P., Cinar, R., Iyer, M. R., Kunos, G., Vergès, B., Degrace, P., & Jourdan, T. (2020). Simultaneous Inhibition of Peripheral CB1R and iNOS Mitigates Obesity-Related Dyslipidemia Through Distinct Mechanisms. *Diabetes*, 69(10), 2120-2132. <https://doi.org/10.2337/db20-0078>
- Ronti, T., Lupattelli, G., & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue : An update. *Clinical Endocrinology*, 64(4), 355-365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x>
- Rosenstock, J., Hollander, P., Chevalier, S., Iranmanesh, A., & SERENADE Study Group. (2008). SERENADE : The Study Evaluating Rimonabant Efficacy in Drug-naive Diabetic

Patients: effects of monotherapy with rimonabant, the first selective CB1 receptor antagonist, on glycemic control, body weight, and lipid profile in drug-naïve type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31(11), 2169-2176. <https://doi.org/10.2337/dc08-0386>

Rossi, F., Bellini, G., Luongo, L., Manzo, I., Tolone, S., Tortora, C., Bernardo, M. E., Grandone, A., Conforti, A., Docimo, L., Nobili, B., Perrone, L., Locatelli, F., Maione, S., & Del Giudice, E. M. (2016). Cannabinoid Receptor 2 as Antiobesity Target : Inflammation, Fat Storage, and Browning Modulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(9), 3469-3478. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4381>

Rossmeisl, M., Pavlisova, J., Janovska, P., Kuda, O., Bardova, K., Hansikova, J., Svobodova, M., Oseeva, M., Veleba, J., Kopecky, J., Zacek, P., Fiserova, E., Pelikanova, T., & Kopecky, J. (2018). Differential modulation of white adipose tissue endocannabinoid levels by n-3 fatty acids in obese mice and type 2 diabetic patients. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(7), 712-725. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.03.011>

Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., & Guzmán, M. (2000). The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Molecular Pharmacology*, 58(4), 814-820. <https://doi.org/10.1124/mol.58.4.814>

Ruiz de Azua, I., Mancini, G., Srivastava, R. K., Rey, A. A., Cardinal, P., Tedesco, L., Zingaretti, C. M., Sassmann, A., Quarta, C., Schwitter, C., Conrad, A., Wettschureck, N., Vemuri, V. K., Makriyannis, A., Hartwig, J., Mendez-Lago, M., Bindila, L., Monory, K., Giordano, A., ... Lutz, B. (2017). Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(11), 4148-4162. <https://doi.org/10.1172/JCI83626>

Rydén, M., Arvidsson, E., Blomqvist, L., Perbeck, L., Dicker, A., & Arner, P. (2004). Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(1), 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.010>

Ryden, M., Dicker, A., van Harmelen, V., Hauner, H., Brunnberg, M., Perbeck, L., Lonnqvist, F., & Arner, P. (2002). Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha - mediated lipolysis in human fat cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1085-1091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109498200>

Sabio, G., & Davis, R. J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1) : Roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 490-496. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.004>

Saito, M., Matsushita, M., Yoneshiro, T., & Okamatsu-Ogura, Y. (2020). Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients : From Mice to Men. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 222. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00222>

- Saltiel, A. R., & Pessin, J. E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology*, 12(2), 65-71. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02207-3](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02207-3)
- Saltin, B., & Astrand, P. O. (1993). Free fatty acids and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5 Suppl), 752S-757S; discussion 757S-758S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.752S>
- Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Rueda, D., & Guzmán, M. (1998). Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Molecular Pharmacology*, 54(5), 834-843. <https://doi.org/10.1124/mol.54.5.834>
- Scheen, A. J. (2009). The endocannabinoid system: A promising target for the management of type 2 diabetes. *Current Protein & Peptide Science*, 10(1), 56-74. <https://doi.org/10.2174/138920309787315149>
- Scheen, A. J., Finer, N., Hollander, P., Jensen, M. D., Van Gaal, L. F., & RIO-Diabetes Study Group. (2006). Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: A randomised controlled study. *Lancet (London, England)*, 368(9548), 1660-1672. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69571-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69571-8)
- Scheen, A. J., Seutin, V., & Gaal, L. F. V. (2008). LE SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE DANS LE CERVEAU... ET AILLEURS. *Rev Med Liege*, 8.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H. F. (1995). A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26746-26749. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26746>
- Schmid, C. L., & Bohn, L. M. (2009). Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(3), 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.005>
- Schulz, P., Hryhorowicz, S., Rychter, A. M., Zawada, A., Słomski, R., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2021). What Role Does the Endocannabinoid System Play in the Pathogenesis of Obesity? *Nutrients*, 13(2), 373. <https://doi.org/10.3390/nu13020373>
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46(12), 2119-2123. <https://doi.org/10.2337/diab.46.12.2119>
- Schwimmer, J. B., Burwinkle, T. M., & Varni, J. W. (2003). Health-related quality of life of severely obese children and adolescents. *JAMA*, 289(14), 1813-1819. <https://doi.org/10.1001/jama.289.14.1813>

- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., & Galitzky, J. (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), 1345-1351.
- Sengenès, C., Lolmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., & Bouloumié, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 205(1), 114-122. <https://doi.org/10.1002/jcp.20381>
- Sengenes, C., Moro, C., Galitzky, J., Berlan, M., & Lafontan, M. (2005). [Natriuretic peptides : A new lipolytic pathway in human fat cells]. *Medecine Sciences: M/S, 21 Spec No*, 29-33.
- Shabalina, I. G., Petrovic, N., de Jong, J. M. A., Kalinovich, A. V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Reports*, 5(5), 1196-1203. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.044>
- Sharkey, K. A., & Wiley, J. W. (2016). The Role of the Endocannabinoid System in the Brain-Gut Axis. *Gastroenterology*, 151(2), 252-266. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.015>
- Sharma, M., Schlegel, M., Brown, E. J., Sansbury, B. E., Weinstock, A., Afonso, M. S., Corr, E. M., van Solingen, C., Shanley, L. C., Peled, D., Ramasamy, R., Schmidt, A. M., Spite, M., Fisher, E. A., & Moore, K. J. (2019). Netrin-1 Alters Adipose Tissue Macrophage Fate and Function in Obesity. *Immunometabolism*, 1(2), e190010. <https://doi.org/10.20900/immunometab20190010>
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2011).  $\beta$ -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), 521-533. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3015-3025. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>
- Shin, A. C., Filatova, N., Lindtner, C., Chi, T., Degann, S., Oberlin, D., & Buettner, C. (2017). Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action. *Diabetes*, 66(6), 1560-1571. <https://doi.org/10.2337/db16-1238>
- Shin, H., Han, J. H., Yoon, J., Sim, H. J., Park, T. J., Yang, S., Lee, E. K., Kulkarni, R. N., Egan, J. M., & Kim, W. (2018). Blockade of cannabinoid 1 receptor improves glucose responsiveness in pancreatic beta cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(4), 2337-2345. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13523>
- Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 171-176. <https://doi.org/10.1172/JCI10583>

- Simon, V., & Cota, D. (2017). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY : Endocannabinoids and metabolism: past, present and future. *European Journal of Endocrinology*, 176(6), R309-R324. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-1044>
- Singh, R., & Cuervo, A. M. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metabolism*, 13(5), 495-504. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.004>
- Singh, R., & Cuervo, A. M. (2012). Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 282041. <https://doi.org/10.1155/2012/282041>
- Sinha, R., Fisch, G., Teague, B., Tamborlane, W. V., Banyas, B., Allen, K., Savoye, M., Rieger, V., Taksali, S., Barbetta, G., Sherwin, R. S., & Caprio, S. (2002). Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *The New England Journal of Medicine*, 346(11), 802-810. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012578>
- Sipe, J. C., Waalen, J., Gerber, A., & Beutler, E. (2005). Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *International Journal of Obesity (2005)*, 29(7), 755-759. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802954>
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), 1023-1033. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055>
- Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., Chambers, J. K., Randall, A. D., & Davis, J. B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *British Journal of Pharmacology*, 129(2), 227-230. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703050>
- Smas, C. M., & Sul, H. S. (1996). Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 20 Suppl 3, S65-72.
- Smith, A. J., Thompson, B. R., Sanders, M. A., & Bernlohr, D. A. (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase : Regulation by fatty acids and phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32424-32432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703730200>
- Smith, C. J., & Manganiello, V. C. (1989). Role of hormone-sensitive low Km cAMP phosphodiesterase in regulation of cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. *Molecular Pharmacology*, 35(3), 381-386.
- Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. A., Yudkin, J. S., Heine, R. J., Nijpels, G., Seidell, J. C., & Hoorn study. (2004). Trunk fat and leg fat have independent and opposite associations with fasting and postload glucose levels : The Hoorn study. *Diabetes Care*, 27(2), 372-377. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.2.372>

Soeder, K. J., Snedden, S. K., Cao, W., Della Rocca, G. J., Daniel, K. W., Luttrell, L. M., & Collins, S. (1999). The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 12017-12022. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.12017>

Soethoudt, M., Grether, U., Fingerle, J., Grim, T. W., Fezza, F., de Petrocellis, L., Ullmer, C., Rothenhäusler, B., Perret, C., van Gils, N., Finlay, D., MacDonald, C., Chicca, A., Gens, M. D., Stuart, J., de Vries, H., Mastrangelo, N., Xia, L., Alachouzos, G., ... van der Stelt, M. (2017). Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nature Communications*, 8, 13958. <https://doi.org/10.1038/ncomms13958>

Solinas, G., Borén, J., & Dulloo, A. G. (2015). De novo lipogenesis in metabolic homeostasis : More friend than foe? *Molecular Metabolism*, 4(5), 367-377. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.004>

Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., & Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783-787. <https://doi.org/10.1038/nature06902>

Spoto, B., Fezza, F., Parlongo, G., Battista, N., Sgro', E., Gasperi, V., Zoccali, C., & Maccarrone, M. (2006). Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie*, 88(12), 1889-1897. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.019>

Starowicz, K. M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A. A., & Di Marzo, V. (2008). Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(3), 553-565. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.106>

Steiner, H., Bonner, T. I., Zimmer, A. M., Kitai, S. T., & Zimmer, A. (1999). Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5786-5790. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5786>

Stella, N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*, 58(9), 1017-1030. <https://doi.org/10.1002/glia.20983>

Stephens, T. W., Basinski, M., Bristow, P. K., Bue-Valleskey, J. M., Burgett, S. G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H. M., & Kriauciunas, A. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 377(6549), 530-532. <https://doi.org/10.1038/377530a0>

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818), 307-312. <https://doi.org/10.1038/35053000>

- Storr, M. A., & Sharkey, K. A. (2007). The endocannabinoid system and gut-brain signalling. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6), 575-582. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.08.008>
- Sugamura, K., Sugiyama, S., Nozaki, T., Matsuzawa, Y., Izumiya, Y., Miyata, K., Nakayama, M., Kaikita, K., Obata, T., Takeya, M., & Ogawa, H. (2009). Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation*, 119(1), 28-36. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.811992>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1), 89-97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>
- Sul, H. S. (2009). Minireview : Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. *Molecular Endocrinology*, 23(11), 1717-1725. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0160>
- Sul, H., Smas, C., Mei, B., & Zhou, L. (2000). Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity*, 24(S4), S15-S19. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801494>
- Sun, K., Park, J., Gupta, O. T., Holland, W. L., Auerbach, P., Zhang, N., Goncalves Marangoni, R., Nicoloso, S. M., Czech, M. P., Varga, J., Ploug, T., An, Z., & Scherer, P. E. (2014). Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nature Communications*, 5, 3485. <https://doi.org/10.1038/ncomms4485>
- Sun, S., Ji, Y., Kersten, S., & Qi, L. (2012). Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annual Review of Nutrition*, 32, 261-286. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150623>
- Svensson, M., Chen, P., & Hammarfjord, O. (2010). Dendritic Cell Regulation by Cannabinoid-Based Drugs. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(8), 2733-2750. <https://doi.org/10.3390/ph3082733>
- Szabo, B., Nordheim, U., & Niederhoffer, N. (2001). Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(2), 819-826.
- Szego, E., Balicco, A., Boschat, L., Oleko, A., Saoudi, A., Zeghnoun, K., & Fillol, C. (2016). L'étude Esteban : Description de l'échantillon. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 64, S175. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2016.06.009>
- Takahashi, A., & Shimazu, T. (1981). Hypothalamic regulation of lipid metabolism in the rat : Effect of hypothalamic stimulation on lipolysis. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 4(3), 195-205. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(81\)90044-8](https://doi.org/10.1016/0165-1838(81)90044-8)



- Takeuchi, K., & Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(6), E1195-1209. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90958.2008>
- Tam, J., Cinar, R., Liu, J., Godlewski, G., Wesley, D., Jourdan, T., Szanda, G., Mukhopadhyay, B., Chedester, L., Liow, J.-S., Innis, R. B., Cheng, K., Rice, K. C., Deschamps, J. R., Chorvat, R. J., McElroy, J. F., & Kunos, G. (2012). Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metabolism*, 16(2), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.002>
- Tam, J., Hinden, L., Drori, A., Udi, S., Azar, S., & Baraghithy, S. (2018). The therapeutic potential of targeting the peripheral endocannabinoid/CB1 receptor system. *European Journal of Internal Medicine*, 49, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.009>
- Tam, J., Szanda, G., Drori, A., Liu, Z., Cinar, R., Kashiwaya, Y., Reitman, M. L., & Kunos, G. (2017). Peripheral cannabinoid-1 receptor blockade restores hypothalamic leptin signaling. *Molecular Metabolism*, 6(10), 1113-1125. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.010>
- Tam, J., Vemuri, V. K., Liu, J., Batkai, S., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S. V., Pickel, J., Makriyannis, A., & Kunos, G. (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(8), 2953-2966. <https://doi.org/10.1172/JCI42551>
- Tan, S., Liu, H., Ke, B., Jiang, J., & Wu, B. (2020). The peripheral CB1 receptor antagonist JD5037 attenuates liver fibrosis via a CB1 receptor/ $\beta$ -arrestin1/Akt pathway. *British Journal of Pharmacology*, 177(12), 2830-2847. <https://doi.org/10.1111/bph.15010>
- Tang, Y., Wallace, M., Sanchez-Gurmaches, J., Hsiao, W.-Y., Li, H., Lee, P. L., Vernia, S., Metallo, C. M., & Guertin, D. A. (2016). Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. *Nature Communications*, 7, 11365. <https://doi.org/10.1038/ncomms11365>
- Tansey, J. T., Sztalryd, C., Hlavin, E. M., Kimmel, A. R., & Londos, C. (2004). The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life*, 56(7), 379-385. <https://doi.org/10.1080/15216540400009968>
- Tanti, J.-F., Ceppo, F., Jager, J., & Berthou, F. (2012). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 3, 181. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00181>
- Taylor, S. I. (1999). Deconstructing type 2 diabetes. *Cell*, 97(1), 9-12. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80709-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80709-6)

- Teixeira, D., Pestana, D., Faria, A., Calhau, C., Azevedo, I., & Monteiro, R. (2010). Modulation of adipocyte biology by  $\delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *18*(11), 2077-2085. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.100>
- Titchenell, P. M., Quinn, W. J., Lu, M., Chu, Q., Lu, W., Li, C., Chen, H., Monks, B. R., Chen, J., Rabinowitz, J. D., & Birnbaum, M. J. (2016). Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. *Cell Metabolism*, *23*(6), 1154-1166. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.022>
- Topol, E. J., Bousser, M.-G., Fox, K. A. A., Creager, M. A., Despres, J.-P., Easton, J. D., Hamm, C. W., Montalescot, G., Steg, P. G., Pearson, T. A., Cohen, E., Gaudin, C., Job, B., Murphy, J. H., Bhatt, D. L., & CRESCENDO Investigators. (2010). Rimonabant for prevention of cardiovascular events (CRESCENDO): A randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, *376*(9740), 517-523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60935-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60935-X)
- Tramèr, M. R., Carroll, D., Campbell, F. A., Reynolds, D. J., Moore, R. A., & McQuay, H. J. (2001). Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: Quantitative systematic review. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *323*(7303), 16-21. <https://doi.org/10.1136/bmj.323.7303.16>
- Tran, T. T., & Kahn, C. R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells : Role in metabolism and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, *6*(4), 195-213. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.20>
- Trayhurn, P., Bing, C., & Wood, I. S. (2006). Adipose tissue and adipokines—Energy regulation from the human perspective. *The Journal of Nutrition*, *136*(7 Suppl), 1935S-1939S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1935S>
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines : Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British Journal of Nutrition*, *92*(3), 347-355. <https://doi.org/10.1079/bjn20041213>
- Triay, J., Mundi, M., Klein, S., Toledo, F. G., Smith, S. R., Abu-Lebdeh, H., & Jensen, M. (2012). Does rimonabant independently affect free fatty acid and glucose metabolism? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(3), 819-827. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2486>
- Troy-Fioramonti, S., Demizieux, L., Gresti, J., Robert, J., Le Bon, A., Belloir, C., Vergès, B., & Degrace, P. (2014). P259 Identification de nouveaux antagonistes des récepteurs aux endocannabinoïdes à action périphérique susceptibles d'améliorer les paramètres glucido-lipidiques chez la souris obèse. *Diabetes & Metabolism*, *40*, A89. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(14\)72550-9](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(14)72550-9)
- Udi, S., Hinden, L., Ahmad, M., Drori, A., Iyer, M. R., Cinar, R., Herman-Edelstein, M., & Tam, J. (2020). Dual inhibition of cannabinoid CB1 receptor and inducible NOS attenuates

obesity-induced chronic kidney disease. *British Journal of Pharmacology*, 177(1), 110-127. <https://doi.org/10.1111/bph.14849>

Udi, S., Hinden, L., Earley, B., Drori, A., Reuveni, N., Hadar, R., Cinar, R., Nemirovski, A., & Tam, J. (2017). Proximal Tubular Cannabinoid-1 Receptor Regulates Obesity-Induced CKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 28(12), 3518-3532. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016101085>

Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., Rössner, S., & RIO-Europe Study Group. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients : 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet (London, England)*, 365(9468), 1389-1397. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66374-X)

Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thörne, A., Hoffstedt, J., Lönnqvist, F., & Arner, P. (1998). Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*, 47(6), 913-917. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.6.913>

Van Pelt, R. E., Jankowski, C. M., Gozansky, W. S., Schwartz, R. S., & Kohrt, W. M. (2005). Lower-body adiposity and metabolic protection in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(8), 4573-4578. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1764>

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 329-332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>

Van Sickle, M. D., Oland, L. D., Ho, W., Hillard, C. J., Mackie, K., Davison, J. S., & Sharkey, K. A. (2001). Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology*, 121(4), 767-774. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.28466>

Vandevoorde, S., & Fowler, C. J. (2005). Inhibition of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase by the anandamide uptake inhibitor VDM11: Evidence that VDM11 acts as an FAAH substrate. *British Journal of Pharmacology*, 145(7), 885-893. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706253>

van Eenige, R., van der Stelt, M., Rensen, P. C. N., & Kooijman, S. (2018). Regulation of Adipose Tissue Metabolism by the Endocannabinoid System. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 29(5), 326-337. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.001>

Veilleux, A., Caron-Jobin, M., Noël, S., Laberge, P. Y., & Tchernof, A. (2011). Visceral Adipocyte Hypertrophy is Associated With Dyslipidemia Independent of Body Composition and Fat Distribution in Women. *Diabetes*, 60(5), 1504-1511. <https://doi.org/10.2337/db10-1039>

- Vila, I. K., Badin, P.-M., Marques, M.-A., Monbrun, L., Lefort, C., Mir, L., Louche, K., Bourlier, V., Roussel, B., Gui, P., Grober, J., Štich, V., Rossmeislová, L., Zakaroff-Girard, A., Bouloumié, A., Viguerie, N., Moro, C., Tavernier, G., & Langin, D. (2014). Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Reports*, 7(4), 1116-1129. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.062>
- Vilches-Flores, A., Delgado-Buenrostro, N. L., Navarrete-Vázquez, G., & Villalobos-Molina, R. (2010). CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets. *Regulatory Peptides*, 163(1-3), 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.04.013>
- Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—An allostatic perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1801(3), 338-349. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.12.006>
- Vizi, E. S., Katona, I., & Freund, T. F. (2001). Evidence for presynaptic cannabinoid CB(1) receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *European Journal of Pharmacology*, 431(2), 237-244. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01413-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01413-3)
- Wadden, T. A., Tronieri, J. S., & Butryn, M. L. (2020). Lifestyle modification approaches for the treatment of obesity in adults. *The American Psychologist*, 75(2), 235-251. <https://doi.org/10.1037/amp0000517>
- Wang, H., Willershäuser, M., Karlas, A., Gorpas, D., Reber, J., Ntziachristos, V., Maurer, S., Fromme, T., Li, Y., & Klingenspor, M. (2019). A dual Ucp1 reporter mouse model for imaging and quantitation of brown and brite fat recruitment. *Molecular Metabolism*, 20, 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.11.009>
- Wang, W., & Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(11), 691-702. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.96>
- Wang, Y., Beydoun, M. A., Liang, L., Caballero, B., & Kumanyika, S. K. (2008). Will all Americans become overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(10), 2323-2330. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.351>
- Warram, J. H., Martin, B. C., Krolewski, A. S., Soeldner, J. S., & Kahn, C. R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of Internal Medicine*, 113(12), 909-915. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-12-909>
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S. H., & Davis, R. J. (1995). The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Letters*, 359(2-3), 133-136. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00027-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00027-7)

- Wasserman, H., & Inge, T. H. (2014). Bariatric surgery in obese adolescents : Opportunities and challenges. *Pediatric Annals*, *43*(9), e230-236. <https://doi.org/10.3928/00904481-20140825-10>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T. S., Tamborlane, W. V., Taksali, S. E., Yeckel, C. W., Allen, K., Lopes, M., Savoye, M., Morrison, J., Sherwin, R. S., & Caprio, S. (2004). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *The New England Journal of Medicine*, *350*(23), 2362-2374. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031049>
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T.-H., Brickey, W. J., & Ting, J. P.-Y. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology*, *12*(5), 408-415. <https://doi.org/10.1038/ni.2022>
- Williams, C. M., & Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating : Mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, *143*(3), 315-317. <https://doi.org/10.1007/s002130050953>
- Wirsen, C. (1964). ADRENERGIC INNERVATION OF ADIPOSE TISSUE EXAMINED BY FLUORESCENCE MICROSCOPY. *Nature*, *202*, 913. <https://doi.org/10.1038/202913a0>
- Wolfe, B. M., Kvach, E., & Eckel, R. H. (2016). Treatment of Obesity : Weight Loss and Bariatric Surgery. *Circulation Research*, *118*(11), 1844-1855. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307591>
- Wolfe, R. R., Peters, E. J., Klein, S., Holland, O. B., Rosenblatt, J., & Gary, H. (1987). Effect of short-term fasting on lipolytic responsiveness in normal and obese human subjects. *The American Journal of Physiology*, *252*(2 Pt 1), E189-196. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1987.252.2.E189>
- Wright, K. L., Duncan, M., & Sharkey, K. A. (2008). Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract : A regulatory system in states of inflammation. *British Journal of Pharmacology*, *153*(2), 263-270. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707486>
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, *150*(2), 366-376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1821-1830. <https://doi.org/10.1172/JCI19451>

- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B., & Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, *8*(11), 1288-1295. <https://doi.org/10.1038/nm788>
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., ... Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine*, *7*(8), 941-946. <https://doi.org/10.1038/90984>
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., & He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *293*(4), E1118-1128. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00435.2007>
- Zhang, L. L., Yan Liu, D., Ma, L. Q., Luo, Z. D., Cao, T. B., Zhong, J., Yan, Z. C., Wang, L. J., Zhao, Z. G., Zhu, S. J., Schrader, M., Thilo, F., Zhu, Z. M., & Tepel, M. (2007). Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circulation Research*, *100*(7), 1063-1070. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000262653.84850.8b>
- Zhang, X., Gao, S., Niu, J., Li, P., Deng, J., Xu, S., Wang, Z., Wang, W., Kong, D., & Li, C. (2016). Cannabinoid 2 Receptor Agonist Improves Systemic Sensitivity to Insulin in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *40*(5), 1175-1185. <https://doi.org/10.1159/000453171>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425-432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zheng, C., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Liu, K., Shou, P., Qian, F., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death & Disease*, *7*, e2167. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.54>
- Zierath, J. R., Livingston, J. N., Thörne, A., Bolinder, J., Reynisdottir, S., Lönnqvist, F., & Arner, P. (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: Relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia*, *41*(11), 1343-1354. <https://doi.org/10.1007/s001250051075>
- Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., & Bonner, T. I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(10), 5780-5785.

- Zins, M. Z. (2019). The Constances cohort. *European Journal of Public Health*, 29(Supplement\_4), ckz185.548. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckz185.548>
- Zizzari, P., He, R., Falk, S., Bellocchio, L., Allard, C., Clark, S., Lesté-Lasserre, T., Marsicano, G., Clemmensen, C., Perez-Tilve, D., Finan, B., Cota, D., & Quarta, C. (2021). CB1 and GLP-1 Receptors Cross Talk Provides New Therapies for Obesity. *Diabetes*, 70(2), 415-422. <https://doi.org/10.2337/db20-0162>
- Zlebnik, N. E., & Cheer, J. F. (2016). Drug-Induced Alterations of Endocannabinoid-Mediated Plasticity in Brain Reward Regions. *Journal of Neuroscience*, 36(40), 10230-10238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1712-16.2016>
- Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System : Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), E833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>
- Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Gokce, N., & Walsh, K. (2017). Humans and Mice Display Opposing Patterns of « Browning » Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4, 27. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00027>
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452-457. <https://doi.org/10.1038/22761>

# Références Web

---

- [1] <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=Pour%20l'adulte%2C%20l',%C3%A9gal%20ou%20sup%C3%A9rieur%20%C3%A0%2030.>
- [2] <https://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html>
- [3] <https://www.who.int/fr/news/item/11-10-2017-tenfold-increase-in-childhood-and-adolescent-obesity-in-four-decades-new-study-by-imperial-college-london-and-who>
- [4] <https://www.sraenutrition.fr/wp-content/uploads/2021/08/Enquete-epidemiologique-sur-le-suproids-et-lobesite-Odoxa-x-Obepi.pdf>
- [5] <http://www.emro.who.int/emhj-volume-25-2019/volume-25-issue-10/evaluation-du-risque-de-syndrome-metabolique-chez-les-travailleurs-postes-en-tunisie.html>
- [6] <https://www.noah-health.org/>
- [7] <https://www.proleanwellness.com/find-your-body-fat-with-idxa/>
- [8] <https://slideplayer.fr/slide/508748/>
- [9] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/liraglutide-23220.html>
- [10] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/semaglutide-25733.html>
- [11] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/orlistat-18208.html>
- [12] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/metformine-2339.html>
- [13] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/sitagliptine-22893.html>
- [14] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/vildagliptine-23071.html>
- [15] <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/saxagliptine-23234.html>
- [16] <https://www.businesswire.com/news/home/20200929005408/en/Inversago-Pharma-Initiates-Clinical-Trials-with-a-Phase-1-study-of-INV-101-the-Company%E2%80%99s-Lead-Peripheral-CB1-Blocker#.X3MsdlEGju8.linkedin>
- [17] <https://inversago.com/en/2021/inversago-pharma-initiates-a-phase-1-clinical-trial-on-inv-202-a-next-generation-peripherally-acting-cb1-blocker/>



# Annexes

---

**Annexe 1. Régime standard.**

Scientific Diets


 PRODUCT DATA SHEET  
 Release date: August 2020

## SAFE® A04

Page 1/2

**Definition**

Complete maintenance diet for rats, mice and hamsters.

**Product Purpose**

Diet for adult and maintenance animals.  
 To be used within the context of experimental protocols.  
 Does not contain alfalfa and its byproducts.



SAFE® A04

Picture indicative only

**Directions for Use****DISTRIBUTION****Period**

After weaning and adult.

**Method**

- Ad libitum or rationed according to experimental protocols.
- Remove from the packaging and place directly in the cage feeder or on the cage floor.
- Keep fresh water always available.

**DAILY CONSUMPTION**

Rats 18 to 25 g, mice 3 to 6 g, hamsters 8 to 12 g.

**STORAGE**

Store in a clean, dry and cool place, protected from light.

**SHELF-LIFE** from the date of production

Paper bag or plastic pouch = 12 months

Vacuum packed = 24 months

**Irradiation**

Possible doses: Minimum 10, 25 or 40 kilograys.

**Product Form**

PELLETS	Mean
Diameter	16.4 mm
Crushing resistance	22.7 kgf/cm <sup>2</sup>
Abrasion resistance	97.3 %
Specific mass	645 g/l
Average pellet weight	5.3 g
Average pellet length	22.6 mm

Also available powdered on demand.

**Product Presentation**

\*All SAFE® diets are available with different packaging, irradiation and with analytical data on demand.

Selected solutions of the most sold items from the SAFE® portfolio.

DIET	STANDARD PACKAGING	USUALLY AVAILABLE WITH IRRADIATION DOSE
SAFE® A04	1 x 10 kg Paper bag	
SAFE® A04 SP*	1 x 10 kg Paper bag in plastic pouch	Min. 10 kGy, Min. 25 kGy
SAFE® R04*	1 x 10 kg Paper bag, vacuum packed and boxed	Min. 10 kGy, Min. 25 kGy
SAFE® R04*	2 x 5 kg Paper bag, double vacuum packed and boxed	Min. 25 kGy
SAFE® R04*	10 x 1 kg Double vacuum packed and boxed	Min. 40 kGy
SAFE® A04C	1 x 10 kg Double paper bag, certified	
SAFE® A04C SP*	1 x 10 kg Double paper bag in plastic pouch, certified	Min. 10 kGy, Min. 25 kGy

Produced in France


 WORLDWIDE HEADQUARTERS  
 73494 Rosenberg (Germany)  
 service@safe-lab.com

 DIETS PRODUCTION SITE  
 89290 Augy (France)  
 info@safe-lab.com

[www.safe-lab.com](http://www.safe-lab.com)

**Annexe 2. Régime contrôle.**

**ssniff**  
Spezialdiäten GmbH

**Table 1. Composition of the modified Control diet with 5 % lard**

Ingredients	Product No.	U	Control - 5 % Lard
			S9259-E010
Casein		%	20.000
L-Cystine		%	0.200
Corn starch		%	37.590
Maltodextrin		%	15.000
Sucrose		%	10.000
Cellulose		%	6.000
Vitamin premix		%	1.000
Mineral & trace element premix		%	6.000
Choline Cl		%	0.200
Butylated hydroxytoluene		%	0.010
Pork lard		%	5.000
Crude protein		%	17.6
Crude fat		%	5.1
Crude fibre		%	5.0
Crude ash		%	5.4
Starch		%	36.2
Dextrins		%	14.8
Sugar		%	11.0
Energy (Atwater) <sup>1)</sup>		MJ/kg	15.4
Protein		kcal%	19
Fat		kcal%	13
Carbohydrates		kcal%	68
<b>Fatty acids</b>			
C 12:0		%	0.01
C 14:0		%	0.08
C 16:0		%	1.23
C 18:0		%	0.69
C 20:0		%	0.01
C 16:1		%	0.15
C 18:1		%	2.11
C 18:2		%	0.48
C 18:3		%	0.05

<sup>1)</sup> Physiological fuel value

## Annexe 3. Régime hyperlipidique.

**DIO – 60 kJ% fat (Lard)**

HF diet for rodents with lard (&amp; soybean oil)

ssniff

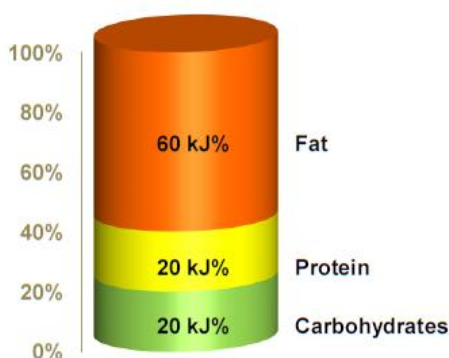
**Description**

This purified diet of the DIO series is characterized by very high fat contents (lard). It is therefore used to induce obesity and metabolic syndrome / diabetes (NIDDM) mice. The diet is also available with beef tallow as fat source (more saturated FA).

*The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water.*

**Gross Energy (GE)** 25.0 MJ/kg  
**Metabolizable Energy (ME)** <sup>1)</sup> 21.6 MJ/kg

<sup>1)</sup> = Physiological fuel value (Atwater);  
 correspond to 5,150 kcal/kg



Crude Nutrients	[%]
Crude protein (N x 6.25)	24.4
Crude fat	34.6
Crude fibre	6.0
NDF	5.2
ADF	1.9
Crude ash	5.3
Starch	0.1
Sugar	9.4
N free extracts	26.3

Minerals	[%]
Calcium	0.92
Phosphorus	0.64
Ca / P	1.44 : 1
Sodium	0.20
Magnesium	0.23
Potassium	0.97

Fatty acids	[%]
C 12:0	0.07
C 14:0	0.44
C 16:0	7.93
C 18:0	4.37
C 20:0	0.11
C 16:1	0.94
C 18:1	13.97
C 18:2	4.64
C 18:3	0.49

Amino acids	[%]
Lysine	2.02
Methionine	0.86
Cystine	0.45
Met+Cys	1.31
Threonine	1.07
Tryptophan	0.33
Arginine	0.95
Histidine	0.74
Valine	1.70
Isoleucine	1.38
Leucine	2.42
Phenylalanine	1.27
Phe+Tyr	2.56
Glycine	0.52
Glutamic acid	5.50
Aspartic acid	1.82
Proline	2.80
Serine	1.46
Alanine	0.81

Vitamins	per kg
Vitamin A	15,000 IU
Vitamin D <sub>3</sub>	1,500 IU
Vitamin E	150 mg
Vitamin K (as MNB)	20 mg
Thiamine (B <sub>1</sub> )	25 mg
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	16 mg
Pyridoxine (B <sub>6</sub> )	16 mg
Cobalamin (B <sub>12</sub> )	30 µg
Nicotinic acid	47 mg
Pantothenic acid	55 mg
Folic acid	16 mg
Biotin	300 µg
Choline	920 mg
Trace elements	per kg
Iron	168 mg
Manganese	95 mg
Zinc	65 mg
Copper	13 mg
Iodine	1.2 mg
Selenium	0.2 mg

Feed composition	%
Casein	27.700
Corn starch	—
Maltodextrin	15.600
Sucrose	8.460
Cellulose powder	6.000
L-Cystine	0.350
Vitamin premix	1.000
Mineral & trace element premix	6.000
Choline chloride (50 % choline)	0.250
Dye (blue)	0.030
Butylated hydroxytoluene	0.010
Pork lard	31.500
Soybean oil	3.100

**Main products**

E15742-30 Meal / powder  
 E15742-34 10 mm pellets  
 E15742-347 10 mm pellets, γ-irradiated 25 kGy

*Extra cholesterol addition on request (customized)*

**Production and Sale**

ssniff Spezialdiäten GmbH  
 Phone: +49-(0)2921-9658-0  
 Fax: +49-(0)2921-9658-40  
 E-Mail mail@ssniff.de  
[www.ssniff.de](http://www.ssniff.de) / [www.ssniff.com](http://www.ssniff.com)

Status: 10/2013

**Annexe 4. Synopsis du protocole d'étude humaine « CB1R » (2015-A01619-40).**

Protocole : CB1R

Version : 2

Date : 12/08/2016



ID RCB : 2015-A01619-40

Acronyme : CBR1

Utilisation de biopsies de graisse sous-cutanée abdominale pour l'étude du rôle de l'activation des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) sur le métabolisme glucido-lipidique adipocytaire

**Etude CB1R**

Version 2 du 12/08/2016

Approuvée le 22/09/2016 par le CPP Est I

Version 1.1 du 29/09/2015

Approuvée le 07/01/2016 par le CPP Est I

Catégorie de la recherche : Evaluation des soins courants

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONATEUR
<b>CHU de DIJON</b> 14 rue Gaffarel 21079 DIJON  Tel : 03-80-29	Monsieur le Professeur <b>Bruno Vergès</b> <b>CHU de DIJON Service d'Endocrinologie</b> 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.38.54 Fax : 03.80.29.35.19 bruno.verges@chu-dijon.fr

**Assurance :**

Société Hospitalière d'Assurances Mutuelles (SHAM)  
 Police n° 129.234

## Investigateurs et structure administrative de l'étude

<b>Promoteur</b>	CHU DE DIJON 14, rue Gaffarel 21079 DIJON CEDEX
<b>Responsable de la Recherche</b>	Direction de la recherche clinique et de l'innovation Madame Florence MARTEL 14, rue Gaffarel 21079 DIJON CEDEX 03.80.29.50.13
<b>Investigateur coordonnateur</b>	Monsieur le Professeur <b>Bruno Vergès</b> CHU de DIJON <b>Service d'Endocrinologie</b> 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.38.54 Fax : 03.80.29.35.19 bruno.verges@chu-dijon.fr
<b>Investigateur principal</b>	Monsieur le Professeur <b>Pablo ORTEGA DEBALLON</b> CHU de DIJON <b>Service de Chirurgie Digestive et Cancérologique</b> 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.37.47
<b>Méthodologiste / Statisticien</b>	Monsieur le Professeur <b>Bruno Vergès</b> CHU de DIJON <b>Service d'Endocrinologie</b> 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.38.54. Fax : 03.80.29.35.19 bruno.verges@chu-dijon.fr
<b>Responsable de la vigilance</b>	Madame le Docteur Camille FLECK CHU de DIJON Centre Régional de Pharmacovigilance 14 rue Gaffarel 21079 DIJON Cedex Tél : 03.80.29.54.31- Fax : 03.80.29. 37.23 vigilance.ec@chu-dijon.fr
<b>Investigateurs (médecins thésés)</b>	Liste fournie dans un document indépendant

## SYNOPSIS

Titre de l'étude	Utilisation de biopsies de graisse sous-cutanée abdominale pour l'étude du rôle de l'activation des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) sur le métabolisme glucido-lipidique adipocytaire
N° d'enregistrement	2015-A01619-40
Promoteur	Centre Hospitalier Universitaire de Dijon
Investigateurs	Coordonnateur : Pr Bruno BERGES (service d'endocrinologie) Principal : Pr Pablo ORTEGA DEBALLON (service de chirurgie digestive et cancérologique)
Rationnel	L'obésité abdominale et le diabète de type 2 sont associés à une hyperactivation du système endocannabinoïde et plusieurs études chez l'animal et chez l'Homme indiquent que les récepteurs CB1 (CB1R) périphériques du système endocannabinoïde pourraient également être impliqués dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique. Le rôle précis des récepteurs CB1R du tissu adipeux viscéral dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique demeure inconnu chez l'Homme. Il apparaît essentiel de préciser, chez l'Homme, le rôle des CB1R localisés dans les tissus périphériques et en particulier dans le tissu adipeux, dans le contrôle de l'homéostasie glucido-lipidique. En effet, si les données humaines confirment les données animales attestant d'un rôle essentiel du système endocannabinoïde périphérique dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, cela ouvrira une voie de recherche majeure dans le développement de molécules antagonistes CB1R (type rimonabant) mais à action exclusivement périphérique (ne passant pas la barrière méningée afin d'éviter les effets secondaires psychiatriques) pour le traitement de l'obésité métabolique et du diabète de type 2.
Objectifs de la recherche	<u>OBJECTIF PRINCIPAL:</u> - Déterminer les effets de l'activation du système endocannabinoïde sur le métabolisme glucido-lipidique du tissu adipeux humain viscéral et sous-cutané. <u>OBJECTIFS SECONDAIRE :</u> - Tester les effets de nouvelles molécules antagonistes des CB1R à action périphérique sur le métabolisme du tissu adipeux
Critères d'évaluation de l'étude	• <u>CRITERES D'EVALUATION PRINCIPAUX</u> 1. <b>Aucun critère d'évaluation clinique</b> puisque les traitements expérimentaux seront réalisés ex vivo sur des biopsies de tissu adipeux 2. Effets de l'activation des récepteurs CB1 du système endocannabinoïde (SEC) sur les paramètres suivants : - Activité du SEC par mesure des ARNm CB1R et dosage des endocannabinoïdes (collaboration). - Oxydation des acides gras : Catabolisme de l'acide palmitique [1-14C], mesure de la consommation d'O <sub>2</sub> (électrode de Clark). - Estérification des acides gras et lipogenèse : Uptake de l'acide palmitique [1-14C], Uptake du [14C]-glucose, activité de la FAS, analyse CPG des acides gras, activité LPL, western-blotting p-ACC, p-Akt, AMPK. - Activité lipolytique (dosage glycérol et acides gras libres) et voies de signalisation impliquées (western-blotting voies de l'AMPc et de insuline) - Production d'adipokines (dosage BioPlex et Elisa) - Régulation génique : Expression des ARNm codant pour des protéines du métabolisme glucido-lipidique, du SEC et des facteurs de transcription par RT-PCR

	<p>en temps réel.</p> <p>• <u>CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES</u>  Les mêmes que les critères principaux avec stimulation du système endocannabinoïde par nouvelles molécules antagonistes des CB1R à action périphérique (molécules élaborées en collaboration avec l'université de Nantes)</p>
Nombre de participants prévu	15 prélèvements exploitables sont prévus pour la participation à cette recherche biomédicale
Sélection des sujets	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critères d'inclusion <ul style="list-style-type: none"> <li>- homme âgé de 18 à 70 ans</li> <li>- personne ayant donné son accord oral</li> <li>- devant subir une chirurgie pour hernie (Pr P. Ortega Deballon)</li> </ul> </li> <li>• Critères de non inclusion <ul style="list-style-type: none"> <li>- personne non affiliée à un régime de sécurité sociale</li> <li>- BMI &gt; 30</li> <li>- diabète</li> <li>- pathologie associées : cancer, maladies inflammatoires chroniques</li> <li>- adulte protégé</li> </ul> </li> </ul>
Evaluation des bénéfices et des risques attendus	Etude ex-vivo sur échantillons de tissu adipeux de faible volume (quelques cm3) prélevés lors d'une intervention chirurgicale programmée. Pas de risque particulier à prévoir pour les patients.
Déroulement de l'étude	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>DESCRIPTION CHRONOLOGIQUE DE L'ETUDE</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Information de la personne participant à la recherche</li> <li>2. Recueil de son accord oral</li> <li>3. Prélèvement de tissu adipeux (chirurgie)</li> <li>4. Expérimentations in vitro</li> </ol> </li> </ul>
Collection d'échantillons biologiques	NA : utilisation des échantillons biologiques dans le cadre du projet avec destruction à la fin de cette recherche
Traitements, produits, utilisés	Non applicable
Posologie, voie d'administration et durée d'administration	Non applicable
Analyse statistique	<p><u>Justification du nombre de personnes nécessaires</u>  Même si l'ensemble des tests prévus devrait pouvoir être réalisés à partir d'un seul prélèvement (répartition du tissu adipeux prélevé en lots multiples), il paraît indispensable de répéter les expériences afin de s'affranchir des différences inter-individus. Un nombre de 15 prélèvements exploitables est suffisant pour s'affranchir de telles différences et permettra l'obtention de résultats interprétables avec une puissance statistique acceptable. La majorité des études ex-vivo réalisées sur du tissu humain sont réalisées sur des groupes de 6 à 10 personnes</p> <p><u>Tests utilisés</u>  Les moyennes des données obtenues avant puis après stimulation seront comparées par un test non paramétrique pour données appariées (T de Wilcoxon). Les différences seront considérées significatives at <math>P &lt; 0.05</math>. Logiciel utilisé : GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA.</p>
Résultats attendus et alternative	Des résultats obtenus chez la souris in vivo et in vitro à partir d'explants de tissu adipeux indiquent que l'activité lipolytique est fortement stimulée en présence d'anandamide et suggèrent que c'est l'action anti-lipolytique de l'insuline qui est



	<p>diminuée. Ainsi, ces données convergent vers une hypothèse nouvelle selon laquelle l'activation des CB1R du tissu adipeux conduit à une stimulation de la lipolyse dépendante d'une altération du signal insulinique.</p> <p>Ce projet devrait nous permettre de vérifier si l'activation du système endocannabinoïde conduit aux mêmes effets sur le tissu adipeux humain et de montrer que l'inactivation du système endocannabinoïde par le blocage des CB1R périphériques pourrait bien constituer une piste thérapeutique pour améliorer l'insulino-résistance et les dyslipidémies associées à l'obésité.</p>
Calendrier Prévisionnel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- durée de la période d'inclusion : 12 mois</li> <li>- durée totale de participation pour une personne se prêtant à la recherche : durée de l'intervention chirurgicale</li> <li>- durée totale de l'étude (inclusion + suivi éventuel) : 1 jour</li> </ul> <p>Période d'exclusion pour la personne : non Période d'exclusivité pour la personne : non</p>

## Annexe 5. Synopsis du protocole d'étude humaine « ENDOCATA » (2020-A02388-31).

Protocole : ENDOCATA

Version : 1.3

Date : 15/02/2021

## SYNOPSIS

<b>Titre de l'étude</b>	Etude translationnelle à partir de biopsies humaines de tissu adipeux abdominal pour l'étude du rôle des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) dans le contrôle de la sécrétion des endocannabinoïdes et des adipokines
<b>N° d'enregistrement</b>	2020-A02388-31
<b>Promoteur</b>	Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne
<b>Investigateur coordonnateur</b>	Pr Bruno VERGÈS (service d'endocrinologie)
<b>Investigateur principal</b>	Pr Pablo ORTEGA DEBALLON (service de chirurgie digestive et cancérologique)
<b>Méthodologiste</b>	Pr Bruno VERGÈS
<b>Rationnel</b>	<p>L'obésité abdominale et le diabète de type 2 sont associés à une hyperactivation du système endocannabinoïde. Plusieurs études chez l'animal et chez l'Homme indiquent que les taux d'endocannabinoïdes (ECs) circulant sont corrélés à la masse grasse. Ainsi, le tissu adipeux qui possède la machinerie enzymatique pour la synthèse des ECs, pourrait être le principal producteur d'ECs plasmatiques.</p> <p>Aujourd'hui, il est clairement établi que la stimulation du système endocannabinoïde, via l'activation des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) localisés dans le cerveau, conduit à une augmentation de la prise alimentaire et à une prise de poids. De plus, les CB1R périphériques présents sur des organes tels que le foie, le muscle, le tissu adipeux sont impliqués dans la mise en place des dérégulations métaboliques liées à l'obésité (stéatose, insulino-résistance, dyslipidémie).</p> <p>Ainsi les ECs produits par le tissu adipeux pourraient jouer un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie glucido-lipidique à travers leurs actions autocrines ou paracrines en activant les CB1R centraux et périphériques. C'est pourquoi, nous souhaitons :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) préciser si l'obésité, associée ou non à un diabète, conduit à une surproduction d'ECs (en précisant lesquels) par le tissu adipeux viscéral ou sous-cutané</li> <li>2) déterminer si le blocage des CB1R par de nouveaux antagonistes à action périphérique peut conduire à une réduction de la production des ECs par le tissu adipeux.</li> </ol> <p>Cette étude sera également l'occasion d'évaluer la production d'adipokines et de cytokines impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique dans les différentes conditions expérimentales.</p> <p>Ces données associées à celles obtenues en parallèle chez la souris pourraient permettre de déterminer si le tissu adipeux (viscéral et/ou sous-cutané) constitue une cible à privilégier en vue du développement de molécules bloquant les CB1R (type Rimonabant) à action exclusivement périphérique (ne passant pas la barrière méningée afin d'éviter les effets secondaires psychiatriques) pour le traitement de l'obésité métabolique et du diabète de type 2.</p> <p>C'est pour cela que nous souhaitons réaliser des prélèvements de graisse abdominale sous cutanée et viscérale chez des sujets humains devant bénéficier d'une chirurgie viscérale programmée afin de réaliser notre étude fondamentale <i>IN VITRO</i></p>
<b>Objectifs de la recherche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>OBJECTIF PRINCIPAL :</b> Déterminer si la production des endocannabinoïdes par le tissu adipeux viscéral et sous-cutané est augmentée chez le patient obèse (diabétique et non diabétique) par rapport au patient témoin.</li> <li>• <b>OBJECTIFS SECONDAIRES :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rechercher la présence de récepteurs CB1R dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané, chez le patient obèse (diabétique et non diabétique) par rapport au patient témoin.</li> <li>- Tester les effets de nouvelles molécules antagonistes des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) à action périphérique sur la production d'endocannabinoïdes par les tissus adipeux.</li> </ul> </li> </ul>

	- Evaluer la production d'adipokines et de cytokines par les tissus adipeux dans les différentes conditions expérimentales.
<b>Critères d'évaluation de l'étude</b>	<p>Aucun critère d'évaluation clinique puisque les traitements expérimentaux seront réalisés ex vivo sur des biopsies de tissu adipeux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>CRITERES D'EVALUATION PRINCIPAUX</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cinétique d'apparition des endocannabinoïdes produits par les explants de tissu adipeux viscéral dans le milieu de culture (0-12h) estimée par l'aire sous la courbe (AUC), chez les sujets obèses (diabétique et non diabétique) et chez les témoins. Le dosage sera réalisé en utilisant une technique de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS).</li> </ul> </li> <li>• <b><u>CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesure de l'expression génique des récepteurs et enzymes du système endocannabinoïde dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané par RT-PCR en temps réel, chez les sujets obèses (diabétique et non diabétique) et chez les témoins.</li> <li>- Cinétique d'apparition des endocannabinoïdes produits dans le milieu de culture (0-12h) par les explants de tissu adipeux viscéral et sous-cutané, estimée par l'aire sous la courbe (AUC), après traitement par des antagonistes CB1R, chez les sujets obèses (diabétique et non diabétique) et chez les témoins.</li> <li>- Dosages des adipokines et cytokines (dosages BioPlex et Elisa) produites par le tissu adipeux viscéral et sous-cutané (à l'état basal et après traitement par des antagonistes CB1R), chez les sujets obèses (diabétique et non diabétique) et chez les témoins.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Nombre de participants prévus</b>	<p>15 prélèvements exploitables pour 3 groupes de sujets distincts, soit 45 prélèvements exploitables au total sont prévus pour la participation à cette recherche.</p> <p><u>Répartition par groupe</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 15 témoins</li> <li>- 15 Sujets Obèses non diabétiques</li> <li>- 15 Sujets Obèses diabétiques</li> </ul>
<b>Sélection des sujets</b>	<p><b><u>Témoins</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>Critères d'inclusion</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- homme âgé de 18 à 70 ans</li> <li>- personne ayant donné son accord oral</li> <li>- devant subir une chirurgie viscérale</li> </ul> </li> <li>• <b><u>Critères de non inclusion</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- personne non affiliée à un régime de sécurité sociale</li> <li>- BMI &gt; 30</li> <li>- diabète</li> <li>- pathologie associées : cancer, maladies inflammatoires chroniques</li> <li>- adulte protégé</li> </ul> </li> </ul> <p><b><u>Sujets Obèses non diabétiques</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><u>Critères d'inclusion</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- homme âgé de 18 à 70 ans</li> <li>- BMI &gt; 30</li> <li>- personne ayant donné son accord oral</li> <li>- devant subir une chirurgie viscérale</li> </ul> </li> <li>• <b><u>Critères de non inclusion</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- personne non affiliée à un régime de sécurité sociale</li> <li>- diabète</li> <li>- pathologie associées : cancer, maladies inflammatoires chroniques,</li> <li>- adulte protégé</li> </ul> </li> </ul>

	<p><b><u>Sujets Obèses Diabétiques</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Critères d'inclusion</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- homme âgé de 18 à 70 ans</li> <li>- diabétique de type 2 non traité par Insuline ou agoniste GLP-1</li> <li>- BMI &gt; 30</li> <li>- personne ayant donné son accord oral</li> <li>- devant subir une chirurgie viscérale</li> </ul> </li> <li>• <u>Critères de non inclusion</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- personne non affiliée à un régime de sécurité sociale</li> <li>- pathologie associées : cancer, maladies inflammatoires chroniques,</li> <li>- diabète de type1</li> <li>- diabète secondaire</li> <li>- adulte protégé</li> </ul> </li> </ul>
<b>Evaluation des bénéfices et des risques attendus</b>	Etude ex-vivo sur échantillons de tissu adipeux de faible volume (quelques cm <sup>3</sup> ) prélevés lors d'une intervention chirurgicale programmée. Pas de risque particulier à prévoir pour les patients
<b>Déroulement de l'étude</b>	<p><b><u>DESCRIPTION CHRONOLOGIQUE DE L'ETUDE</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Information de la personne participant à la recherche</li> <li>2. Recueil de son accord oral</li> <li>3. Prélèvement de tissu adipeux (chirurgie)</li> <li>4. Expérimentations in vitro</li> </ol>
<b>Collection d'échantillons biologiques</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Pas de collection (utilisation des échantillons biologiques dans le cadre du projet avec destruction à la fin de cette recherche)
<b>Analyse statistique</b>	<p><b><u>Justification du nombre de personnes nécessaires</u></b></p> <p>En l'absence de données antérieures chez l'Homme, il apparaît difficile de réaliser, précisément, un calcul du nombre de sujets nécessaires pour une étude humaine. Cependant, d'après les données obtenues chez la souris, nous pouvons prévoir une différence d'Aire sous la courbe d'endocannabinoïdes produits par le tissu adipeux viscéral de 2,2 avec un écart type de 1,3. Ainsi, avec une différence de 2,2 entre chaque groupe et un écart-type de 1,3, il apparaît nécessaire d'inclure 8 patients par groupe pour un risque alpha à 5% et une Puissance de 90%. Par sécurité, nous prévoyons l'inclusion de 15 patients par groupe, ce qui devrait nous permettre d'objectiver une possible différence significative entre les 2 groupes de patients. Même si l'ensemble des tests prévus devrait pouvoir être réalisés à partir d'un seul prélèvement (répartition du tissu adipeux prélevé en lots multiples), il paraît indispensable de répéter les expériences afin de s'affranchir des différences inter-individus.</p> <p><b><u>Tests utilisés</u></b></p> <p>Les moyennes des données obtenues avant puis après stimulation seront comparées par un test non paramétrique pour données appariées (T de Wilcoxon). Les différences seront considérées significatives at P&lt;0.05. Logiciel utilisé : GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA.</p>
<b>Résultats attendus et alternative</b>	<p>Des résultats préliminaires indiquent que la production d'endocannabinoïdes par le tissu adipeux de la souris obèse est plus élevée que chez la souris contrôle. D'autre part, nous observons que le blocage des CB1R par un antagoniste est capable de normaliser cette production.</p> <p>Ce projet devrait nous permettre d'obtenir des informations importantes concernant la nature des endocannabinoïdes produits (AEA ou 2-AG) par le tissu adipeux et de préciser leur origine (tissu adipeux viscéral ou sous-cutané). De plus nous devrions démontrer que l'inactivation des CB1R du tissu adipeux conduit également chez l'Homme à une diminution de la production des endocannabinoïdes. En ce qui concerne la production des adipokines, nous nous attendons à observer une amélioration du profil sécrétoire (augmentation adiponectine et diminution facteurs pro-inflammatoires).</p> <p>Ainsi, ces données devraient nous permettre d'émettre l'hypothèse nouvelle selon laquelle le tissu adipeux hypertrophié pourrait participer aux dérégulations métaboliques liées à l'obésité</p>

	en produisant des endocannabinoïdes en excès et d'autre part de proposer l'inactivation des CB1R du tissu adipeux comme piste thérapeutique.
<b>Calendrier Prévisionnel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- durée de la période d'inclusion : 24 mois</li> <li>- durée totale de participation pour une personne se prêtant à la recherche : le temps de la chirurgie</li> <li>- durée totale de l'étude (inclusion + suivi éventuel) : 24 mois</li> </ul> Période d'exclusivité pour la personne : <input checked="" type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui Période d'exclusion pour la personne : <input checked="" type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, durée :        jours

## Annexe 6. Muller et al., Chemical Synthesis, Pharmacokinetic Properties and Biological Effects of JM-00266, a Putative Non-Brain Penetrant Cannabinoid Receptor 1 Inverse Agonist.



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

# Chemical Synthesis, Pharmacokinetic Properties and Biological Effects of JM-00266, a Putative Non-Brain Penetrant Cannabinoid Receptor 1 Inverse Agonist

Tania Muller<sup>1</sup>, Laurent Demizieux<sup>1</sup>, Stéphanie Troy-Fioramonti<sup>1</sup>, Chloé Buch<sup>1</sup>, Julia Leemput<sup>1</sup>, Christine Belloir<sup>2</sup>, Jean-Paul Pais de Barros<sup>3</sup>, Tony Jourdan<sup>1</sup>, Patricia Passilly-Degrace<sup>1</sup>, Xavier Fioramonti<sup>2,4</sup>, Anne-Marie Le Bon<sup>2</sup>, Bruno Vergès<sup>1</sup>, Jean-Michel Robert<sup>5</sup> and Pascal Degrace<sup>1,\*</sup>



**Citation:** Muller, T.; Demizieux, L.; Troy-Fioramonti, S.; Buch, C.; Leemput, J.; Belloir, C.; Pais de Barros, J.-P.; Jourdan, T.; Passilly-Degrace, P.; Fioramonti, X.; et al. Chemical Synthesis, Pharmacokinetic Properties and Biological Effects of JM-00266, a Putative Non-Brain Penetrant Cannabinoid Receptor 1 Inverse Agonist. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2923. <https://doi.org/10.3390/ijms23062923>

Academic Editor: Raffaele Capasso

Received: 26 January 2022

Accepted: 1 March 2022

Published: 8 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Equipe Physiopathologie des dyslipidémies, Unité Mixte de Recherche Université de Bourgogne Franche-Comté - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR-INSERM) 1231, F-21000 Dijon, France; tania.muller67@gmail.com (T.M.); laurent.demizieux@u-bourgogne.fr (L.D.); stephanie.fioramonti@hotmail.fr (S.T.-E.); chloejeanne.buch@gmail.com (C.B.); julia.leemput@u-bourgogne.fr (J.L.); tonyjourdan@u-bourgogne.fr (T.J.); patricia.degrace@u-bourgogne.fr (P.P.-D.); bruno.verges@u-bourgogne.fr (B.V.)
  - <sup>2</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), AgroSup Dijon, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), Université de Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; christine.belloir@inrae.fr (C.B.); xavier.fioramonti@inrae.fr (X.F.); anne-marie.le-bon@inrae.fr (A.-M.L.B.)
  - <sup>3</sup> Plateforme de Lipidomique, Unité Mixte de Recherche Université de Bourgogne Franche-Comté - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR-INSERM) 1231, F-21000 Dijon, France; jppais@u-bourgogne.fr
  - <sup>4</sup> Unité de Nutrition et Neurobiologie Intégrative (NutriNeuro), Unité Mixte de Recherche Université de Bordeaux - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (UMR-INRAE) 1286, F-33000 Bordeaux, France
  - <sup>5</sup> Unité de Recherche Cibles et Médicaments des Infections et de l'Immunité (UR115 IICiMed), Institut de Recherche en Santé 2 Nantes Université, F-44200 Nantes, France; jean-michel.robert@univ-nantes.fr
- \* Correspondence: pascal.degrace@u-bourgogne.fr

**Abstract:** Targeting cannabinoid 1 receptors (CB1R) with peripherally restricted antagonists (or inverse agonists) shows promise to improve metabolic disorders associated with obesity. In this context, we designed and synthesized JM-00266, a new CB1R blocker with limited blood–brain barrier (BBB) permeability. Pharmacokinetics were tested with SwissADME and *in vivo* in rodents after oral and intraperitoneal administration of JM-00266 in comparison with Rimonabant. *In silico* predictions indicated JM-00266 is a non-brain penetrant compound and this was confirmed by brain/plasma ratios and brain uptake index values. JM-00266 had no impact on food intake, anxiety-related behavior and body temperature suggesting an absence of central activity. cAMP assays performed in CB1R-transfected HEK293T/17 cells showed that the drug exhibited inverse agonist activity on CB1R. In addition, JM-00266 counteracted anandamide-induced gastroparesis indicating substantial peripheral activity. Acute administration of JM-00266 also improved glucose tolerance and insulin sensitivity in wild-type mice, but not in CB1R<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, the accumulation of JM-00266 in adipose tissue was associated with an increase in lipolysis. In conclusion, JM-00266 or derivatives can be predicted as a new candidate for modulating peripheral endocannabinoid activity and improving obesity-related metabolic disorders.

**Keywords:** endocannabinoid system; CB1R antagonist; Rimonabant; SWISSADME prediction; drug discovery; pharmacokinetics; obesity

## 1. Introduction

The endocannabinoid system (ECS) is comprised of cannabinoid receptors, their endogenous ligands (endocannabinoids) and proteins responsible for their synthesis and

degradation. Cannabinoid-1 receptor (CB1R) is highly expressed in the brain where it plays key roles in the control of nociception, appetite, motor activity, mood, and memory [1]. However, CB1R is also present in peripheral organs involved in the control of energy metabolism, including the liver, intestine, pancreas, muscle and adipose tissue [2]. Hence, this receptor emerged as a critical regulator of lipid metabolism, gastrointestinal motility, or cardiovascular function [3]. Evidence has also accumulated that obesity is associated with an overactivation of the ECS [4–6]. The identification of a role for ECS in the regulation of food intake and energy metabolism suggested therapeutic strategies aimed at blocking CB1R to treat obesity and related disorders. As such, Rimonabant (SR141716) was the first CB1R specific inverse agonist approved for therapeutic purposes and commercialized by Sanofi in Europe [7]. Obese and overweight patients treated with Rimonabant showed significant weight reduction and improvement of many cardio-metabolic parameters [8–10]. However, because of its psychiatric side effects, such as depression, anxiety, sleep disturbances and suicide risk, it was withdrawn from the European market in 2008, drawing into question the safety of first-generation antagonists [11,12]. Nevertheless, many studies showed that food intake reduction was not the only mechanism responsible for weight reduction in diet-induced obese mice treated with Rimonabant, thus, highlighting a role for peripheral CB1R in the regulation of energy metabolism [2,13]. Hence, the strategy consisting in targeting peripheral CB1R with no-brain-penetrant antagonists to improve metabolic disorders associated with obesity has gained growing interest [14].

Among the various second-generation antagonists, AM6545, TM38837, JD5037 and MRI-1891 (renamed INV-202) exhibited beneficial effects on body weight and metabolism in pre-clinical trials in mice and rats [15–18]. However, to date, only the antagonist TM38837 developed by 7TM Pharma and INV-202 developed by Inversago Pharma successfully completed phase I clinical trial [19,20].

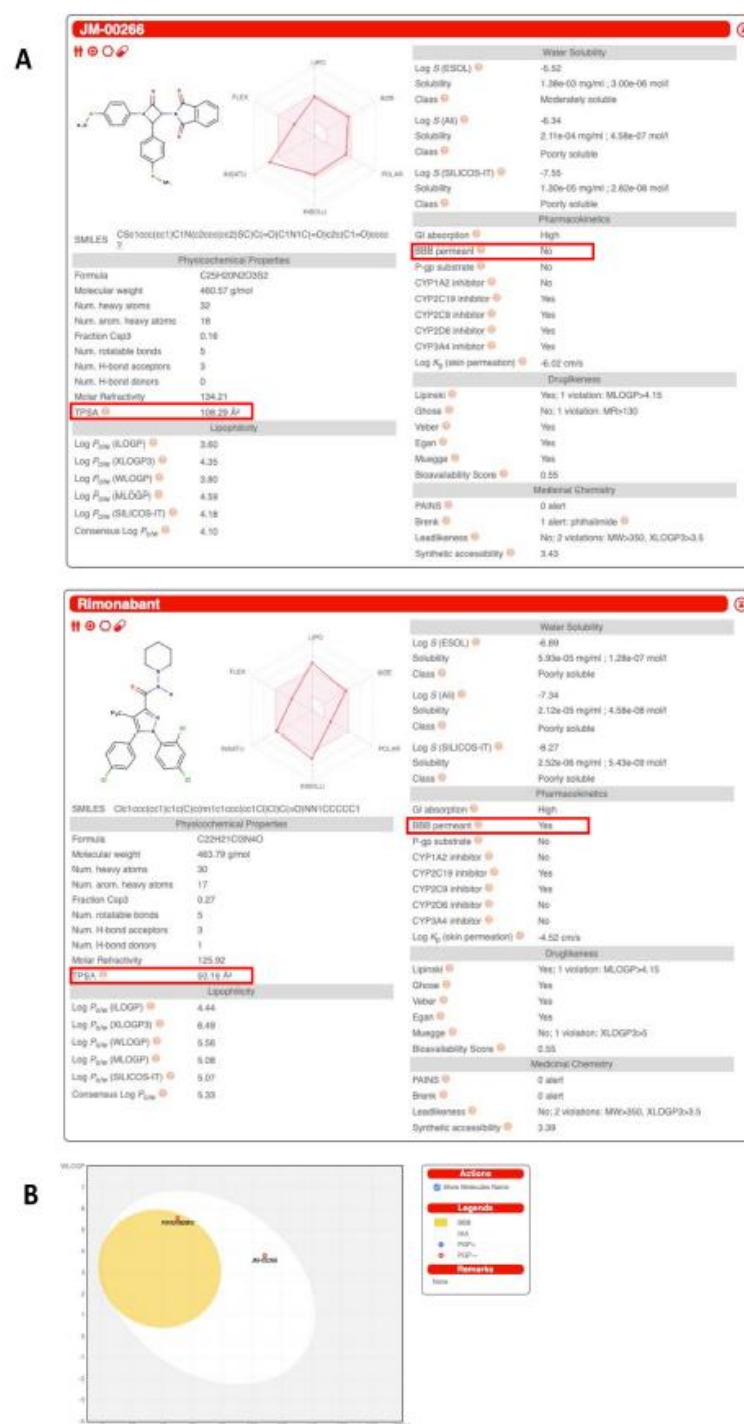
Here, we designed a new CB1R blocker, JM-00266, modifying the structure of Rimonabant to limit blood–brain barrier crossing. Pharmacokinetic studies revealed that JM-00266 exhibits CB1R inverse agonist properties and reduced brain penetration compared to Rimonabant. In addition, behavioral experiments revealed no central activity of JM-00266 suggesting that it could be a potential candidate for selectively targeting peripheral CB1R. We also showed that acute administration of this compound to mice improves glucose tolerance, insulin sensitivity and increases adipose tissue lipolysis.

## 2. Results

### 2.1. Structure, Pharmacological Properties and Bioavailability of JM-00266

#### 2.1.1. Synthesis and Structure of JM-00266 and JM-00252

JM-00266 (1,4-di-(4-méthylthiophenyl)-3-phthaloylazetid-2-one), is a compound possessing a  $\beta$ -lactam (azetid-2-one) scaffold 1,4-diaryl substituted with a protected (phthaloylated) amine function on the 3 position of the four-membered ring. Theoretically, the synthesis procedure leads to two diastereoisomers (trans and cis) but in this case, only the compound trans was obtained (Figure 1A). However, with the ring being constituted of two asymmetric carbons, the compound JM-00266 exists as the racemic of the two enantiomers (3S, 4S) and (3R, 4R). In the present work, we used the racemic form. The structure of JM-00252, synthesized as described for JM-00266 with appropriate intermediates and used as an internal standard for LC-MS/MS analysis, is presented in Supplementary Figure S1.



**Figure 1.** Structure and Swiss ADME analysis of JM-00266 in comparison with Rimonabant. (A): Chemical structures of JM-00266 and Rimonabant and results of their respective analysis using the Swiss ADME server. Boxes indicate topological polar surface area (TPSA) and potential ability to cross blood–brain barrier (BBB). (B): WLOGP (lipophilicity) vs. TPSA (apparent polarity) boiled-egg view of JM-00266 in comparison with Rimonabant.



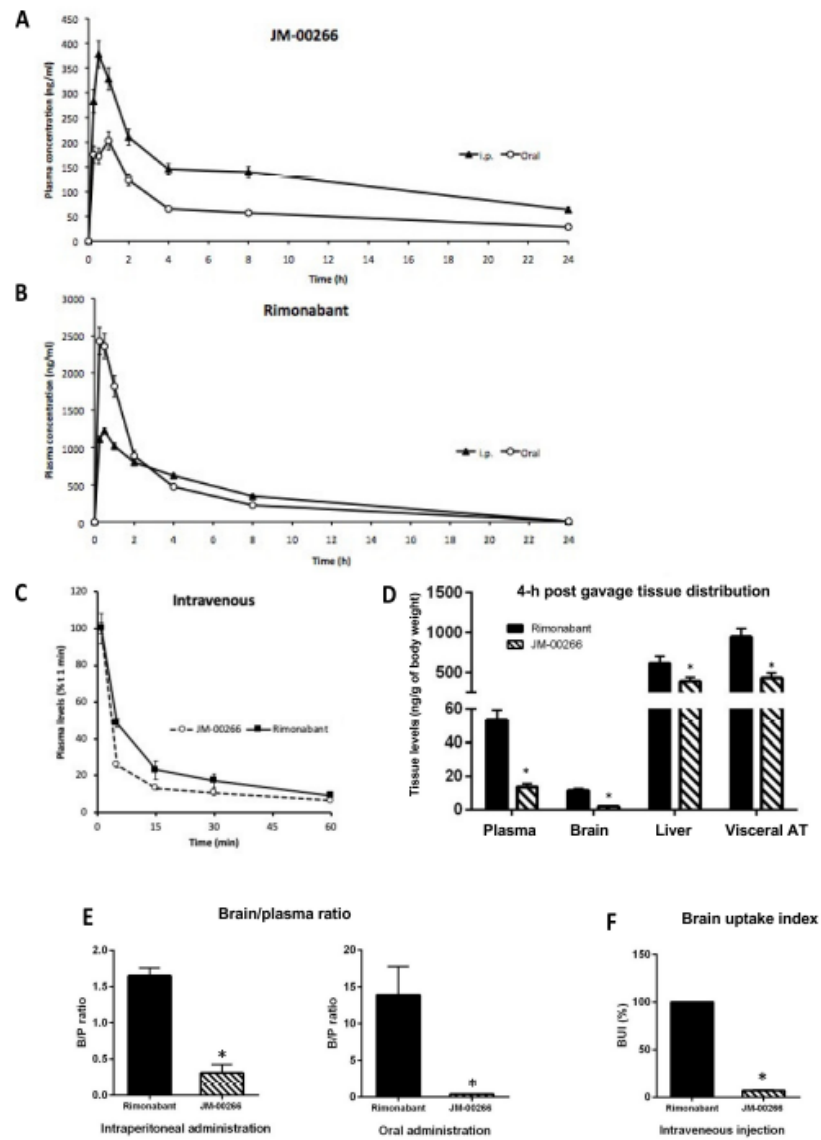
### 2.1.2. Tissue Distribution and Brain Penetration

JM-00266 was designed to display very low amphiphilic properties in order to reduce its brain permeability compared to Rimonabant used as a reference compound. Thus, Topological Polar Surface Area (TPSA) value obtained by the Swiss ADME server was far higher for JM-00266 than for Rimonabant (108.29 vs. 50.16 Å<sup>2</sup>, respectively; Figure 1A). In addition, a high gastrointestinal absorption is predicted for JM-00266 as displayed in the white region of the boiled-egg view (Figure 1B). In vivo pharmacokinetics experiments were carried out to determine JM-00266 bioavailability and transport across the BBB. We first analyzed the plasma levels of JM-00266 after oral administration of the drug dissolved in oil or after i.p. injection of a DMSO/tween solution. Drug plasma concentration reached peak levels at 30 min and 1 h after i.p. and oral dosing, respectively (Figure 2A). Interestingly, for the same dose, the maximal drug plasma concentration was higher after i.p. than oral administration ( $378 \pm 27$  vs.  $203 \pm 18$  ng·mL<sup>-1</sup>). Conversely, the same experiment repeated with Rimonabant indicated that the bioavailability of the drug was almost 2-fold higher after oral than i.p. administration (Figure 2B). Data also show that whatever the administration route, the bioavailability of Rimonabant is far higher than that of JM-00266. When administered intravenously, drug kinetic patterns indicate a slightly higher clearance for JM-00266 than Rimonabant (Figure 2C).

Then, tissue distribution of JM-00266 and Rimonabant was determined 4h after gavage of drugs prepared in oil. We first observed that both drugs preferentially accumulated in the liver and the adipose tissue whereas brain concentration remained very low (Figure 2D). While lipophilicity of JM-00266 could account for adipose tissue accumulation, the poor concentration in the brain should be considered as the first indication of its low capacity to cross BBB. It is also noteworthy that JM-00266 was recovered at lower concentrations in plasma and tissues than Rimonabant, in accordance with its lower bioavailability observed in kinetic studies.

Since JM-00266 was designed to present limited central nervous system (CNS) penetration, we determined brain/plasma ratios (B/P) and brain uptake index (BUI) of JM-00266 in comparison with Rimonabant, known to penetrate the brain. For B/P measurements, JM-00266 and Rimonabant were prepared in DMSO/tween 80 aqueous solutions in order to favor rapid appearance in blood circulation and limit variations related to prolonged exposure. Whatever the administration route (i.p. or oral), B/P was significantly lower for JM-00266 than Rimonabant (Figure 2E). It is worth noting that the administration route strongly affected the distribution of Rimonabant in the brain and plasma while that of JM-00266 was not modified.

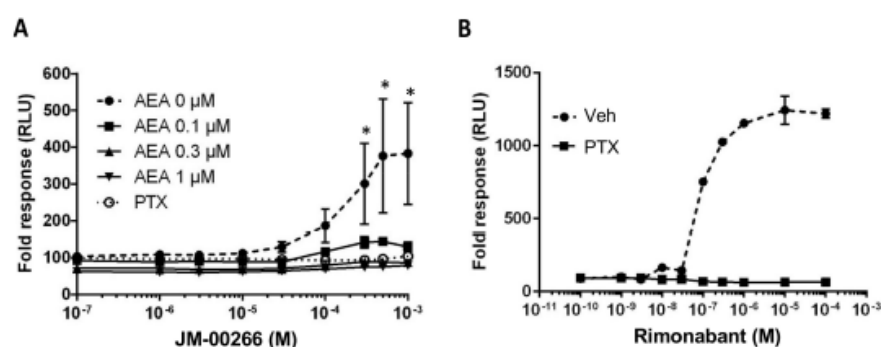
To further study BBB permeability excluding variations due to administration route and dilution of the compound in peripheral vascularization and organs, we performed a single co-injection of JM-00266 and Rimonabant in the carotid artery of rats. The BUI index for JM-00266 was calculated using the BUI of Rimonabant as a reference. The mean BUI was  $7.8\% \pm 0.6$  indicating a low ability for JM-00266 to cross BBB compared to Rimonabant (Figure 2F).



**Figure 2.** Plasma kinetic profile, tissue distribution and brain penetration of JM-00266. (A,B): JM-00266 and Rimonabant plasma appearance after intraperitoneal and oral administration ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Drugs were dissolved in DMSO/Tween 80 (4/1; v/v) and diluted with physiological saline before intraperitoneal injection. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  per group). (C): Plasma clearance of JM-00266 and Rimonabant after intravenous administration (D): JM-00266 and Rimonabant partitioning in plasma, brain, liver and visceral adipose tissue after oral administration ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Results expressed as  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  of body weight were obtained multiplying concentration in sample by total tissue mass and normalizing by body weight ( $n = 4$  per group) \*  $p < 0.05$ . (E): Brain/plasma ratio after intraperitoneal or oral administration of JM-00266 and Rimonabant ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) to mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  per group) \*  $p < 0.05$ . (F): Brain uptake index was determined in rats after intravenous co-administration of JM-00266 and Rimonabant ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  per group). \*  $p < 0.05$ . In all experiments, drugs were dissolved in DMSO/Tween 80 (4/1; v/v) and diluted in a thermostated-buffered solution for intraperitoneal and intravenous injections or dissolved in oil for oral administration.

## 2.2. cAMP Functional Assay

Activation of CB1R is known to decrease intracellular levels of cAMP by inhibiting adenylate cyclase activity primarily through  $G_{i/o}$  signaling [21]. Conversely, an inverse agonist will induce the opposite effect, thus leading to an increase in cAMP production [22]. Using HEK293T/17 cells transfected with murine CB1R, we showed that treatment with JM-00266 alone induced a dose-dependent increase in cAMP formation ( $EC_{50} = 248.6 \mu\text{M}$ ) indicating that the compound behaves as an inverse agonist for the receptor (Figure 3A). This response was lost in the presence of pertussis toxin treatment, which prevents  $G_{i/o}$  coupling to CB1R and with increasing concentrations of the CB1R agonist anandamide. However, it should be noted that cAMP level elevation was stronger with Rimonabant than JM-00266 for the same concentrations tested ( $EC_{50}$  Rimonabant =  $89.2 \text{ nM}$ ) suggesting a lower potency of JM-00266 than Rimonabant (Figure 3B).



**Figure 3.** cAMP functional assay. Effect of increasing concentrations of JM-00266 (A) or Rimonabant (B) on cAMP Glosensor luminescence in the absence or presence of anandamide (AEA; 0–1  $\mu\text{M}$ ). When used, pertussis toxin (PTX;  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was added 24 h before the cAMP assay. Intracellular cAMP levels were expressed as % variation of relative luminescence units (RLU) obtained after stimulation by forskolin ( $1 \mu\text{M}$ ) for 10 min (\*,  $p < 0.05$ ).

## 2.3. Effect of JM-00266 on Brain-Mediated Functions and Gastro-Intestinal Transit

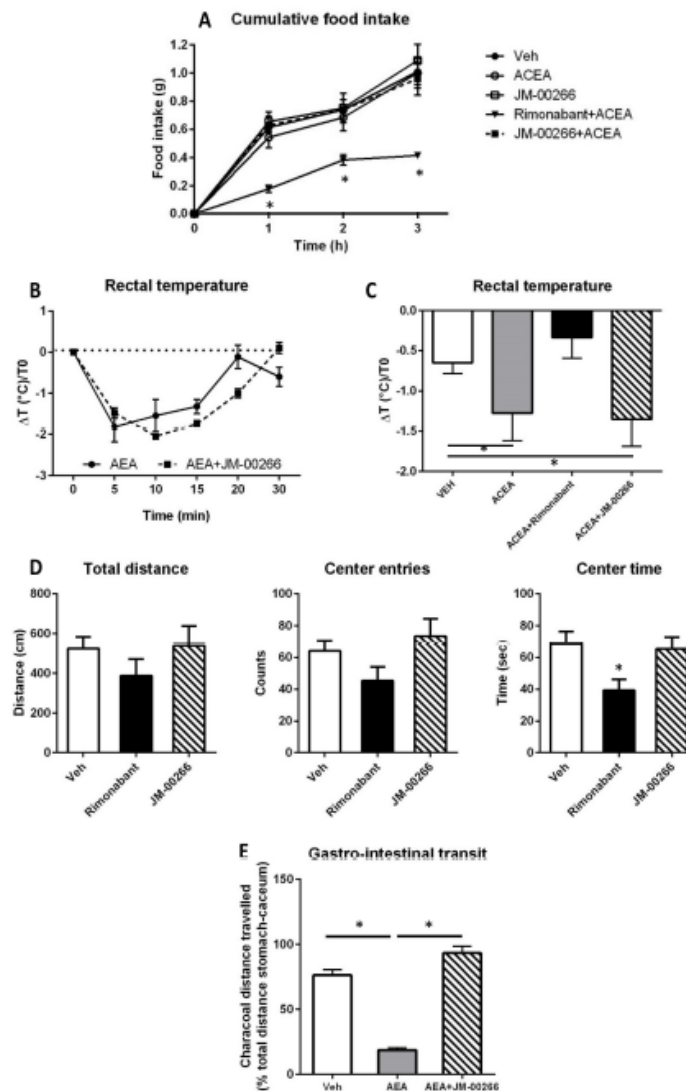
We next investigated the potential impact of JM-00266 on the brain using behavioral tests based on the ability of CB1R agonists or antagonists to induce changes in food intake, body temperature, or anxiety-like behavior [1].

### 2.3.1. Food Intake

Effects of JM-00266 and Rimonabant on feeding behavior were recorded for 3 h in animals deprived of food for 24 h and subjected to a single i.p. administration of the selective CB1R agonist ACEA. As reported previously in rats [23], acute CB1R activation had no effect on food intake in food-deprived mice (Figure 4A). In contrast, co-administration of Rimonabant with ACEA elicited a strong hypophagia that was not observed with JM-00266 (Figure 4A).

### 2.3.2. Anxiety-like Behavior

Rimonabant did not significantly alter the locomotor activity or the number of center entries, while it significantly decreased the time spent in this area. By contrast, JM-00266 did not alter these 3 parameters (Figure 4D). Taken together, these findings suggest that JM-00266, in contrast to Rimonabant, does not promote anxiety-like behavior which confirms its limited impact on the CNS.



**Figure 4.** Effect of JM-00266 on behavior, body temperature and gastrointestinal transit. (A): Cumulative 3-h food intake in 24-h food-deprived mice subjected to an intraperitoneal injection of ACEA (1 mg/kg) alone, in combination with Rimobant (10 mg·kg<sup>-1</sup>) or with JM-00266 (20 mg·kg<sup>-1</sup>). Results are expressed as mean ± SEM (*n* = 4 per group), \* *p* < 0.05. (B): Effect of AEA (10 mg·kg<sup>-1</sup>) on rectal temperature in mice treated with JM-00266 or vehicle (20 mg·kg<sup>-1</sup>). Results are expressed as mean ± SEM (*n* = 4 per group) \* *p* < 0.05. (C): Effect of ACEA on rectal temperature measured at *t* = 30 min after injection of ACEA (1 mg·kg<sup>-1</sup>) in mice treated with JM-00266 (20 mg·kg<sup>-1</sup>) 20 min earlier. Rimobant (10 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle. Results are expressed as mean ± SEM (*n* = 4 per group) \* *p* < 0.05. (D): Effect of JM-00266 and Rimobant on open field exploration. Total ambulatory distance was determined calculating total distance travelled for 10 min. Anxiety was evaluated monitoring total entries in the center of the arena and total time spent in the center on a 10-min period. Results are expressed as mean ± SEM (*n* = 5 per group). (E): Effect of JM-00266 on gastrointestinal motility. Mice were treated with JM-00266 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle 10 min before an injection of anandamide (10 mg·kg<sup>-1</sup>). Results are expressed as mean ± SEM (*n* = 3 per group) \* *p* < 0.05.

### 2.3.3. Gastro-Intestinal Transit

The current literature indicates that CB1R activation inhibits gastrointestinal motility [26,27]. In this context, we tested the capacity of JM-00266 to counteract gastroparesis induced by acute anandamide injection in mice. Our results indicated that the slowing down of gastro-intestinal transit that followed anandamide administration was abrogated by a pre-treatment with JM-00266 suggesting that this compound was indeed able to inactivate peripheral CB1R (Figure 4E).

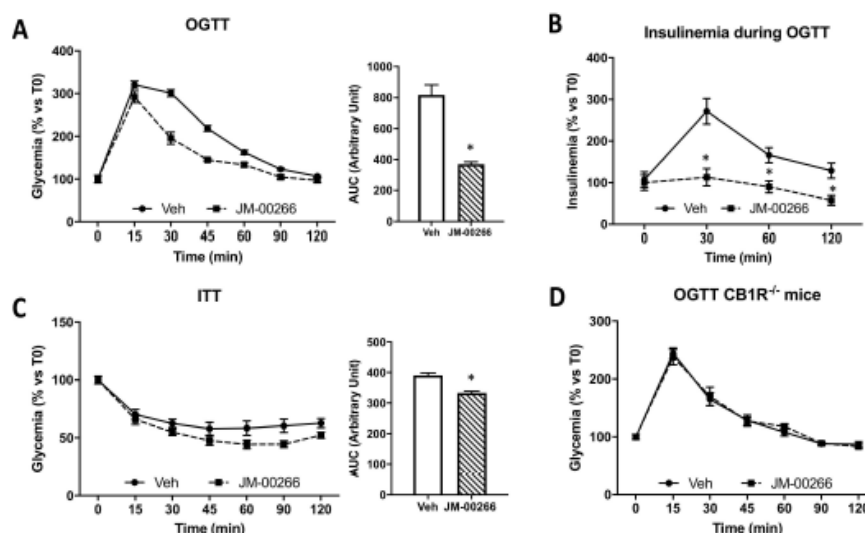
### 2.4. Metabolic Effects of JM-00266

#### 2.4.1. Glucose Tolerance

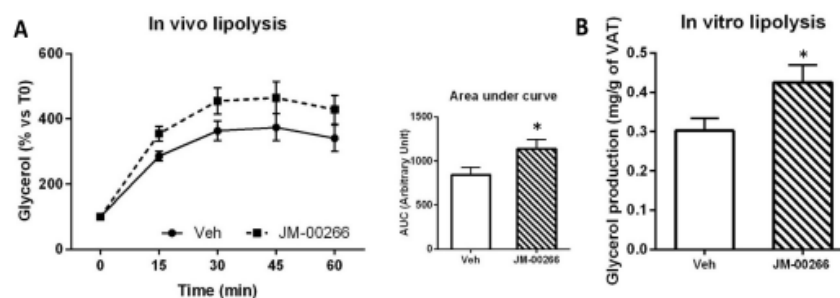
OGTT revealed that acute JM-00266 treatment improved glucose tolerance compared to vehicle treatment in wild-type mice (Figure 5A). During OGTT, plasma insulin levels of mice administered JM-00266 were lower than vehicle (Figure 5B). In parallel, during ITT, mice subjected to JM-00266 injection showed lower glycemia over time compared to vehicle treated mice, suggesting an improvement of insulin sensitivity (Figure 5C). Interestingly, JM-00266 failed to improve glucose tolerance in CB1R<sup>-/-</sup> mice, indicating a CB1R-dependent mechanism (Figure 5D).

#### 2.4.2. Adipose Tissue Lipolysis

The fact that JM-00266 accumulates in fat depots (Figure 2D) prompted us to measure the impact of the drug on adipose tissue lipolysis. Interestingly,  $\beta$ -adrenergic-induced glycerol production was increased by JM-00266 treatment compared with vehicle (Figure 6A). In addition, when lipolysis was measured in vitro, using visceral adipose tissue explants collected from mice injected with JM-00266 4 h before sacrifice, glycerol release was also higher than in the control (Figure 6B).



**Figure 5.** Effect of acute administration of JM-00266 on carbohydrate metabolism. (A): Oral glucose tolerance test (OGTT) and corresponding AUC<sub>0-2h</sub> calculations in mice injected with JM-00266 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle 10 min before glucose gavage (*n* = 10 per group). (B): Insulinemia during OGTT. (C): Insulin tolerance test (ITT) and corresponding AUC<sub>0-2h</sub> calculations in mice treated with JM-00266 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle 10 min before insulin administration (*n* = 15 per group). (D): OGTT in CB1R<sup>-/-</sup> and corresponding AUC<sub>0-2h</sub> calculations mice injected with JM-00266 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle 10 min before glucose gavage (*n* = 7 per group). Results are expressed as mean ± SEM, \* *p* < 0.05.



**Figure 6.** Effect of JM-00266 on adipose tissue lipolysis. (A): Plasma glycerol appearance and corresponding  $AUC_{0-2h}$  calculations in mice treated with JM-00266 or vehicle 4 h before i.p. injection of BRL37344 ( $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist,  $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  per group), \*  $p < 0.05$ . (B): Glycerol produced by visceral adipose tissue explants prepared from animals ( $n = 4$  per group) was injected 4 h earlier with a dose of JM-00266 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or vehicle and cultured in DMEM-HAM/F12 medium supplemented with 1% BSA for 1 h. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ .

### 3. Discussion

Accumulating evidence indicates that the inactivation of peripheral CB1R represents a promising therapeutic strategy to control obesity and related metabolic disorders. Identification of CB1R blockers devoid of psychological effects becomes a major challenge for the scientific community [14]. In this report, we describe a new compound, JM-00266, designed from the specific CB1R inverse agonist Rimonabant template incorporating polar functionality.

The CB1R is a G-protein-coupled receptor linked to different signal transduction pathways including inhibiting adenylyl cyclase activity [21]. Using a functional cAMP assay to monitor G protein-coupled receptor activity, we provide evidence that JM-00266 can indeed raise cAMP levels in HEK293 cells overexpressing CB1R indicating that this compound behaves as an inverse agonist. In addition, the fact that pertussis toxin or anandamide treatment abrogated the effect of JM-00266 on cAMP levels further suggests a CB1R-dependent action. While the  $EC_{50}$  values indicate a far less potency for JM-00266 than for Rimonabant, it is noteworthy that JM-00266 was able to fully abrogate the slowing down of gastrointestinal transit induced by anandamide supporting the existence of a substantial action of the drug on CB1R.

The bioavailability of JM-00266 was first examined by TPSA, a medicinal chemistry metric commonly estimating passive molecular transport through membranes [28]. Molecules with a TPSA  $> 120 \text{ \AA}^2$  usually poorly cross cell membranes and would generally display low oral bioavailability while molecules with TPSA  $< 70$  freely penetrate BBB and thus potentially interact with receptors in the central nervous system [29]. The high TPSA value of JM-00266 likely accounts for its weaker peripheral bioavailability compared to Rimonabant but it also predicts that JM-00266 is a low brain-penetrant compound. This was confirmed by pharmacokinetics parameters related to BBB transport, such as B/P ratio and BUI. We showed that B/P ratios for JM-00266 were always comprised between 0.3 and 0.5 whatever the administration route tested while that of Rimonabant were  $> 1$ . According to the literature, a compound with a B/P ratio greater than 0.3–0.5 is considered to have sufficient access to the central nervous system while compounds with B/P ratios greater than 1 freely cross the BBB [30]. Hence, the present results suggest that the ability of JM-00266 to access to the central nervous system is much lower than Rimonabant. The low rate of transport of JM-00266 across BBB was further supported by the weak BUI measured when the drug was directly injected into the brain (7.8% of the value of Rimonabant used as reference).

The ability of drugs to cross the BBB cannot be directly linked to their CNS activity. So, as we observed that part of JM-00266 might access the brain, we also estimated its potential central activity performing some behavioral tests commonly used to screen drugs inducing cannabinoid-mediated effects. Administration of Rimonabant at 10 mg/kg is commonly used in studies dealing with its peripheral impact on metabolism in mice [13,31–35]. In addition, this dose was shown to induce brain CB1R-dependent behavioral effects [36,37]. Accordingly, we applied a similar dose for the determination of JM-00266 pharmacokinetics parameters in comparison with Rimonabant. However, since our data analysis revealed a lower potency of JM-00266 compared to Rimonabant, we used a higher dose of JM-00266 (20 mg/kg) for behavioral and metabolic studies.

The observation that acute administration of JM-00266 did not induce hyperphagia, hypothermia, or changes in anxiety behavior while Rimonabant modified these parameters suggests that JM-00266 does not bind brain CB1R. Convergent studies indicate that activation of brain CB1R stimulates food intake [7,38,39]. Hence, it is interesting to note that JM-00266 did not modify the amount of food ingested during refeeding as Rimonabant did. In rodents, it is well characterized that activation of CB1R by administration of agonists induces hypothermia [40,41] and that this effect is dependent on central CB1R. The fact that JM-00266 was not able to counteract the decrease in core body temperature induced by ACEA as Rimonabant did, further illustrates its lack of central activity. In addition, contrary to agonists, CB1R antagonists induce anxiogenic-like effects in laboratory animals [36,42]. Previous studies report modifications of locomotor activity and anxiety-related behavior following Rimonabant administration at 10mg/kg in rodents [43,44]. In the open-field exploration test, mice treated with Rimonabant spent less time exploring the central area of the chamber compared to wild type suggesting anxiety-related behavior which was not observed with JM-00266.

Accumulating evidence indicates that peripheral CB1R blockade improves lipid and carbohydrate homeostasis acting simultaneously on several peripheral organs [3,45]. Thus, activation of hepatocyte CB1R has been shown to induce liver lipogenesis and decrease  $\beta$ -oxidation [46,47]. Conversely, CB1R blockade or hepatocyte-specific deletion protects mice fed a high fat diet from insulin resistance [48,49]. In the same way, our data showed that blockade of peripheral CB1R by JM-00266 is associated to better utilization of glucose by peripheral tissues as suggested by the results of OGTT and ITT.

As JM-00266 is markedly distributed into fat tissues, we investigated its possible role on adipocyte lipid metabolism. The current literature strongly supports the notion that obesity induces overactivation of the ECS in adipose tissue in both animals and humans [4,6,33,50,51]. Further, an increase in the endocannabinoid tone in adipose tissue is associated with a dysregulation of adipocyte metabolism, thus, promoting fat mass expansion and related disorders [52–56]. In line with this, we recently indicated that activation of ECS in adipose tissue decreased lipolysis [57,58]. Here, we interestingly observed that JM-00266 treatment potentiates  $\beta$ 3 adrenergic receptor-stimulated lipolysis in vivo suggesting this compound might improve fat mobilization targeting adipose tissue CB1R. In vitro studies also indicated that glycerol release by adipose tissue explants collected from mice previously treated with JM-00266 was greater than in control suggesting that JM-00266 could increase fatty acid mobilization in vivo after being incorporated into fat tissues.

In conclusion, despite its low bioavailability and its weak CB1R binding capacities (as described with the cAMP Glosensor functional test), JM-00266 showed marked CB1R-dependent in vivo effects. Future directions should investigate different formulations, such as the preparation of liposomes or nano-emulsions to increase solubilization and delivery efficiency. According to its low brain penetrance and to its CB1R inverse agonist properties, we further believe that the chemical structure of JM-00266 may serve as a template to design derivatives that might become of great interest as new drugs for modulating peripheral ECS tone and improving metabolic disorders associated with obesity.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemistry

The 1,4-diphenyl-3-phtaloylazetidines (*N*-phtaloyl-4,4-diaryl- $\beta$ -lactams) compounds described in this work (JM-00252 and JM-00266) were synthesized as described in [59] using a Staudinger reaction with a [2+2] ketene-imine cycloaddition leading to the formation to the *trans*- $\beta$ -lactam formation [60]. The imine compounds were obtained by condensation of appropriate benzylamines on benzaldehydes. The ketene was generated in situ by the action of trimethylamine on the activated compound resulting in the action of phenyl dichlorophosphate used as a *N*-phtaloylglycine activator.

#### 4.1.1. Synthesis of 4-Méthylthiobenzyl-4-méthylthiobenzaldimine

4-méthylthiobenzaldehyde (5.57 g, 36.6 mM) and 4-méthylthioaniline (5.0 g, 35.92 mM) were refluxed in toluene (50 mL) in the presence of anhydrous sodium sulfate for 4 h. Then, the solvent was evaporated under a vacuum. The crude solid was washed with diisopropyle oxide (2  $\times$  20 mL) and the suspension was obtained, and filtered to give 7.66 g (78%) of the imine **1**. This compound was used without further purification.

- MP °C = 143–144 (Diisopropyle oxide).
- <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2.51, s, 3H, 4-SCH<sub>3</sub>; 2.54, s, 3H, 4'-SCH<sub>3</sub>; 7.18, d, 2H, H<sup>3</sup>H<sup>5</sup>,  $J = 6.7$  Hz; 7.29, d, 2H, H<sup>2</sup>H<sup>6</sup>; 7.30, d, 2H, H<sup>3'</sup>H<sup>5'</sup>,  $J = 8.4$  Hz; 7.80, d, 2H, H<sup>2'</sup>H<sup>6'</sup>; 8.41, s, 1H, HC=N.
- SM (ESI)  $m/z$  (%): 274 [M + H]<sup>+</sup>
- IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1552.53 ( $\nu$  C=N).

#### 4.1.2. Synthesis of 1,4-Di-(4-Méthylthiophenyl)-3-Phtaloylazetidines-2-One (JM-00266)

Imine **1** (1.38 g, 5 mM), triethylamine (3 mL) and *N*-phtaloylglycine (1.128 g, 5.42 mM) were dissolved in dry dichloromethane (20 mL). The mixture was cooled to 0 °C, and phenyl dichlorophosphate (2.11 g, 10 mM) was added dropwise. Then, the mixture was stirred at room temperature for 3 h, following which the reaction medium was poured into cold water (100 mL). The organic phase was recovered, dried under anhydrous magnesium sulfate and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude residue was chromatographed under silica gel with dichloromethane as a solvent to give 1.51 g (66%) of lactame **2** (JM-00266). In this synthesis, only the *trans* diastereoisomer was obtained [61].

- C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; MP °C = 118–120 (Diethyl ether)
- <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2.44, s, 3H, CH<sub>3</sub>; 2.49, s, 3H, CH<sub>3</sub>; 5.26, d, 1H, H<sub>a</sub>; 5.33, d, 1H, H<sub>b</sub>, ( $J_{H_a H_b} = 2.4$  Hz); 7.18, d, 2 aromH, ( $J = 8.4$  Hz); 7.25–7.30, m, 4 aromH; 7.78, m, 2H, H<sup>4''</sup>-H<sup>5''</sup>; 7.88, m, 2H, H<sup>3''</sup>-H<sup>6''</sup>.
- <sup>13</sup>C-RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 16.45 (CH<sub>3</sub>); 16.50 (CH<sub>3</sub>); 60.99 (Cb); 62.77 (Ca); 118.15 (2C); 123.85 (C<sup>3''</sup>-C<sup>6''</sup>); 126.63 (2C); 127.00 (2C); 127.91 (2C); 131.65 (C<sup>2''</sup>-C<sup>7''</sup>); 132.10 (C1); 134.14 (C<sup>4</sup>-C<sup>1'</sup>); 134.61 (C<sup>4''</sup>-C<sup>5''</sup>); 140.11 (C<sup>4'</sup>); 161.75 (C<sup>1''</sup>-C<sup>8''</sup>); 166.65 (Cc).
- SM (ESI)  $m/z$  (%): 461.6 [M + H]<sup>+</sup>
- IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3064 ( $\nu$  aromCH); 2974, 2922, 2835 ( $\nu$  aliphCH); 1759, 1714 ( $\nu$  C=O).

#### 4.1.3. Synthesis of 1-(Trifluorométhylphenyl)-4-(4-Méthylthiophenyl)-3-Phtaloylazetidines-2-One (JM-00252)

This compound was synthesized according to the previously described procedure, with suitable starting materials. Compound JM-00252 was obtained with a good yield (72%).

- C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; Mr = 482,48; MP °C = 140 (Diethyl ether).
- <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ : 2.49, s, 3H; 5.38, d, 1H,  $J = 2.6$  Hz; 5.31, d, 1H,  $J = 2.6$  Hz; 7.28–7.33, m, 4 aromH; 7.43, d, 2 aromH,  $J = 8.6$  Hz; 7.54, d, 2 aromH,  $J = 8.6$  Hz; 7.76–7.79, m, 4 aromH;
- SM (ESI)  $m/z$  (%): 483.5 [M + H]<sup>+</sup>
- IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1730, 1778 ( $\nu$  CO); 2924–2974 ( $\nu$  aliphC-H); 3070 ( $\nu$  aromC-H).



#### 4.2. Drugs

Arachidonyl ethanolamide (anandamide, AEA) and Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate (ACEA) were supplied by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France), Rimonabant (SR141716) was purchased from Sanofi Aventis (Paris, France). All compounds were stored at  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 100% DMSO/Tween 80 (4/1; *v/v*) and diluted with physiological saline before intraperitoneal (i.p.) and intravenous injections. When administered orally, drugs were directly dissolved in olive oil except for brain/plasma ratios (B/P) experiments.

#### 4.3. cAMP Assay

GloSensor™ cAMP assay designed by Promega (Charbonnières-les-Bains, France) was used to monitor activation of CB1R. HEK293T/17 cells obtained from the American Type Cell Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France) were seeded at 30,000 cells per well on poly-D-lysine coated 96-well plates (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). They were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Waltham, MA, USA) containing 2 mM glutamax and 10% fetal bovine serum. Twenty-four hours later, cells were transiently co-transfected with 50 ng per well of pcDNA3-mouse CB1R (plasmid #13391 supplied by Addgene, Cambridge, MA, USA) which was a gift from Mary E. Abood (California Pacific Medical Center Research Institute, San Francisco, California) and pGlo™-22F cAMP plasmid-luciferase (100 ng per well) allowing these cells to produce light proportionally to intracellular CB1R-dependent cAMP level. Transfection was performed using the Fugene®HD transfection reagent (Promega) for 24 h according to the manufacturer's instructions. Mock transfections were performed with the empty vector pcDNA3. Twenty-four hours after transfection, cells were equilibrated for 2 h with a CO<sub>2</sub>-independent medium (Gibco®, Life Technologies, Courtabœuf, France) supplemented with the GloSensor™ cAMP reagent before adding tested compounds. When a steady-state basal signal was obtained, cells were incubated for 10 min with 1 μM forskolin (Sigma) at room temperature to enhance the intracellular basal cAMP level. Then increasing concentrations of JM-00266 (0.1 μM to 1 mM) were added in the reaction medium in the presence or absence of anandamide (0.1 μM to 1 μM) and luminescence was measured for 20 min with a Victor 3V plate reader (Perkin Elmer, Courtabœuf, France). Rimonabant and anandamide were used as positive controls. When GloSensor™ cAMP assays were carried out in the presence of  $0.1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pertussis toxin (Sigma), this compound was added in the incubation medium 24 h before incubation with forskolin. All assays were performed in duplicate and each experiment was repeated three times. Results were expressed as the percentage of forskolin-stimulated luciferase activity. The EC<sub>50</sub> values were generated using the Sigma Plot software.

#### 4.4. Animals and Diets

Ten- to twelve-week-old C57BL/6J male mice (JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France), 10–12 week-old global CB1R<sup>-/-</sup> mice (generous gift from Dr. James Pickel, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) and 250–300 g male Wistar rats (JanvierLabs) were housed individually on a 12/12 h light/dark schedule at 22–23 °C with ad libitum access to water and to a standard diet (STD; AO4; UAR, Epinay-sur-Orge, France).

#### 4.5. Pharmacokinetic Experiments

For determination of plasma absorption profile and tissue distribution, wild type mice were given an i.p. or orally dose of JM-00266 and/or Rimonabant via gavage ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). At 1, 2, 4 and 8 h post-administration, animals were killed by cervical dislocation and blood was collected from the vena cava into tubes containing heparin and centrifuged immediately at  $6500\times g$  for 10 min at 4 °C. For determination of tissue distribution, brain, liver and adipose tissue were collected 4 h post-gavage. Plasma and tissue samples were directly extracted for further analysis by Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

#### 4.6. Quantitation of JM-00266 and Rimonabant by LC-MS/MS

Tissues were homogenized with a mini-bead beater (BioSpec Products, Bartlesville, OK) in 10 volumes of acetonitrile containing 15 ng of internal standard, JM-00252. Blood samples were centrifuged at  $6500\times g$  during 10 min  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 5  $\mu\text{L}$  of plasma were diluted in 10 volumes of acetonitrile containing 15 ng of internal standard. Then, each homogenate of tissue or plasma was centrifuged for 10 min at  $6500\times g$  and the supernatant was recovered and carefully transferred to new glass tubes. Finally, the extract was injected into a 1200 LC system coupled to a 6460-QqQ MS/MS system equipped with a JetStream ESI source (Agilent technologies, Les Ulis, France). Separation was achieved on a Poroshell 120 EC-C8 2.1 mm  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  column (Agilent technologies) at a flow rate of 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with a linear gradient of (solvent A) water containing 1 mM ammonium formate and 0.2% formic acid and (solvent B) methanol containing 1 mM ammonium formate and 0.2% formic acid and as follows: 50% B for 1 min, up to 100% B in 4 min, and then maintained at 100% for 2 min. The acquisition was performed in positive Single Reaction Monitoring (SRM) mode (source temperature:  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nebulizer gas flow rate was 10  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 15 psi, sheath gas flow 7  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , temperature  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ , capillary 4000 V, nozzle 1500 V). Transitions used were JM-00266 461.1 $\rightarrow$ 337.1 (frag 116 V, CE 13 V), JM-00252 483.1 $\rightarrow$ 359.1 (frag 118 V, CE 13 V) and Rimonabant 463 $\rightarrow$ 363 (frag 118 V, CE 35 V). Rimonabant and JM-00266 were semi-quantitated by calculating their relative response to JM-00252, used as an internal standard. Results are expressed as  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  for tissues and  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for plasma.

#### 4.7. Brain Penetration

ADME (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) predictions for JM-00266 and Rimonabant were performed using the Online Server Swiss-ADME [62]. The physicochemical parameter "Topological Polar Surface Area" (TPSA) was used to predict the blood-brain barrier (BBB) permeability of the two compounds.

Brain/plasma ratios (B/P) were determined as previously described [30]. Briefly, wild type mice were subjected to an i.p. or oral administration of JM-00266 and/or Rimonabant ( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and were killed by cervical dislocation at maximal absorption time point previously determined by pharmacokinetics experiments. Blood and brain were collected and directly extracted for further analysis by LC-MS/MS.

The brain uptake index (BUI), a reference method used to determine brain penetration was determined in rats as previously described [30]. Rats were subjected to carotid perfusion for 1 min with an equal quantity of JM-00266 and Rimonabant (1.5 mg) solubilized in DMSO/Tween 80 and diluted in a thermostated buffered solution (1.28 mM NaCl, 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 4.2 mM KCl, 2.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$  et 0.9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM D-Glucose). The heart ventricles were severed before starting perfusion to avoid blood recirculation in the periphery. After 1 min, rats were killed and the brain was removed and directly extracted for further analysis by LC-MS/MS. BUI was calculated using Rimonabant as a reference compound as it is known to easily penetrate the BBB.

#### 4.8. Body Temperature Measurement

Mice rectal temperature was assessed using a VT4810 controller (Vertex Technology Corp., New Taipei City, Taiwan) adapted with a mouse rectal probe. In the first experiment, the impact of anandamide ( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) on body temperature was recorded during 30 min on animals injected either 20 min earlier with vehicle or JM-00266 ( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). In a second experiment, mice were injected either with the vehicle, Rimonabant ( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or JM-00266 ( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 20 min before receiving the selective CB1R agonist ACEA ( $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and rectal temperature was recorded 30 min later.

#### 4.9. Behavioral Tests

For food intake experiments, mice were food-deprived for 24 h before being submitted to an i.p. injection of ACEA ( $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Twenty minutes later, mice were injected with

either vehicle, Rimonabant ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or JM-00266 ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and given free access to a pre-weighed amount of standard chow. Cumulative food intake was measured every hour over a period of 3 h from refeeding.

Anxiety-related behavior was assessed using the open field test (OF; Mouse Open Field Arena ENV-510; Med Associates Inc., Fairfax, VT, USA). Thirty min after an i.p. injection ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) of Rimonabant, JM-00266 or vehicle, animals were allowed for a 10 min free exploration in the plexiglass test chamber ( $43 \text{ cm} \times 43 \text{ cm}$ ) equipped with infrared photocell beams allowing horizontal activity tracking (total ambulatory distance, time and number of entries in the center) using the Activity Monitor software (SOF-811; Med associates Inc.). The two regions were defined by grid lines that divided each box into the center and periphery, with each of the four lines being 11 cm from each wall.

#### 4.10. Gastro-Intestinal Transit

Short-term effects of JM-00266 on gastro-intestinal transit were tested as an indicator of peripheral CB1R activity. Transit was measured by administering a non-absorbed marker (10% charcoal suspension in 5% gum arabic) as previously described [27].

#### 4.11. Oral Glucose and Insulin Tolerance Tests

To test acute effects of JM-00266 on glucose metabolism and their specificity to CB1R, C57BL/6 wild type mice and  $\text{CB1R}^{-/-}$  mice fasted for 6 h were subjected to an oral glucose tolerance test (OGTT,  $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  glucose) and to an insulin tolerance test (ITT) using  $0.5 \text{ UI}\cdot\text{kg}^{-1}$  insulin (Actrapid, Novo Nordisk, La Défense, France) 10 min after i.p. injection of JM-00266 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or vehicle. For both tests, glycemia was monitored during 120 min post-injection with a My Life Pura TM glucose meter (Ypsomed, Paris, France) directly on a blood drop from the tail. Corresponding  $\text{AUC}_{0-2 \text{ h}}$  were calculated.

#### 4.12. Lipolysis Experiments

In vivo experiments. Overnight-fasted mice were injected i.p. with JM-00266 ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or vehicle. Four hours later, mice were injected i.p. with the specific  $\beta 3$ -adrenergic receptor agonist, BRL37344 ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Blood samples ( $\sim 25 \mu\text{L}$ ) were collected from tails in tubes containing EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at times 0, 15, 30, 45 and 60 min after BRL37344 injection to measure plasma glycerol appearance using a colorimetric assay (glycerol FS, DiaSys, Condom, France).

In vitro experiments. Overnight-fasted mice were injected i.p. with JM-00266 ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or vehicle. Four hours later, mice were anesthetized with pentobarbital ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and epididymal adipose tissue was collected, rinsed in a warm medium (DMEM-HAM/F12) supplemented with 1% BSA, and dissected into  $\sim 10 \text{ mg}$  pieces. Then, 5–6 explants were incubated in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at  $37^\circ\text{C}$  under slight agitation in 1 mL of the same medium. Free glycerol in the culture medium was determined after 1 h of incubation using a colorimetric assay (glycerol FS, DiaSys).

#### 4.13. Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed statistically with GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) using 2-way ANOVA followed by the Tukey posthoc test or using the Student's t-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 5. Patents

The structure of JM-00266 was claimed in the United States and international patents US20180265498 and PCT/EP2016/072735. Preparation of 1,4-bis(4-methylphenyl)-3-phtaloylazetid-2-ones and derivatives thereof useful for the treatment of diseases associated with hyperactivity of the endocannabinoid system. Robert, J.; Troy-Fioramonti, S.; Demizieux, L.; Degrace, P.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23062923/s1>.

**Author Contributions:** P.D., L.D., T.M., C.B. (Chloé Buch) and S.T.-F. participated in research design, conducted experiments and data analysis; J.-M.R. performed chemical synthesis. J.-P.P.d.B. supervised LC-MS/MS analysis; X.F. supervised behavioral tests; C.B. (Christine Belloir), A.-M.L.B., J.L. and P.P.-D. performed cell culture and cAMP assays; P.D., L.D., T.M., S.T.-F., P.P.-D., T.J. and B.V. wrote or contributed to the writing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by funds from the Société Francophone du Diabète (SFD), a grant from the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021 (LipSTIC LabEx) and funds from SATT Ouest Valorisation and Welience SATT Grand Est with reference DV2468 ANTA CBR.

**Institutional Review Board Statement:** Official French regulations for the use and care of laboratory animals were followed throughout the experimental period. The experimental protocol was approved by the local ethics committee (CE2A, Dijon, France) for animal experimentation (APAFIS 14404; 2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank Hélène Choubley from Lipidomic Analytical Platform of INSERM UMR1231 for excellent technical assistance in the LC-MS/MS analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Mechoulam, R.; Parker, L.A. The endocannabinoid system and the brain. *Annu. Rev. Psychol.* **2013**, *64*, 21–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mazier, W.; Saucisse, N.; Gatta-Cherifi, B.; Cota, D. The endocannabinoid system: Pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 524–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maccarrone, M.; Bab, I.; Biro, T.; Cabral, G.A.; Dey, S.K.; Di Marzo, V.; Konje, J.C.; Kunos, G.; Mechoulam, R.; Pacher, P.; et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 277–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bluher, M.; Engeli, S.; Kloting, N.; Berndt, J.; Fasshauer, M.; Batkai, S.; Pacher, P.; Schon, M.R.; Jordan, J.; Stumvoll, M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* **2006**, *55*, 3053–3060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Di Marzo, V.; Goparaju, S.K.; Wang, L.; Liu, J.; Batkai, S.; Jarai, Z.; Fezza, F.; Miura, G.I.; Palmiter, R.D.; Sugiura, T.; et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **2001**, *410*, 822–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Engeli, S.; Bohnke, J.; Feldpausch, M.; Gozzelniak, K.; Janke, J.; Batkai, S.; Pacher, P.; Harvey-White, J.; Luft, F.C.; Shamma, A.M.; et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* **2005**, *54*, 2838–2843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Heaulme, M.; Alonso, R.; Shire, D.; Congy, C.; Soubrie, P.; Breliere, J.C.; Le Fur, G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* **1995**, *56*, 1941–1947. [[CrossRef](#)]
- Christensen, R.; Kristensen, P.K.; Bartels, E.M.; Bliddal, H.; Astrup, A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: A meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **2007**, *370*, 1706–1713. [[CrossRef](#)]
- Despres, J.P.; Golay, A.; Sjostrom, L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2121–2134. [[CrossRef](#)]
- Van Gaal, L.F.; Rissanen, A.M.; Scheen, A.J.; Ziegler, O.; Rossner, S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* **2005**, *365*, 1389–1397. [[CrossRef](#)]
- Jones, D. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 961–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Richey, J.M.; Woolcott, O. Re-visiting the endocannabinoid system and its therapeutic potential in obesity and associated diseases. *Curr. Diabetes Rep.* **2017**, *17*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ravinet Trillou, C.; Arnore, M.; Delgorge, C.; Gonalons, N.; Keane, P.; Maffrand, J.P.; Soubrie, P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2003**, *284*, R345–R353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cinar, R.; Iyer, M.R.; Kunos, G. The therapeutic potential of second and third generation CB1R antagonists. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *208*, 107477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Jourdan, T.; Godlewski, G.; Cinar, R.; Bertola, A.; Szanda, G.; Liu, J.; Tam, J.; Han, T.; Mukhopadhyay, B.; Skarulis, M.C.; et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1132–1140. [[CrossRef](#)]
16. Tam, J.; Vemuri, V.K.; Liu, J.; BÅtkai, S.n.; Mukhopadhyay, B.; Godlewski, G.; Osei-Hyiaman, D.; Ohnuma, S.; Ambudkar, S.V.; Pickel, J.; et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2953–2966. [[CrossRef](#)]
17. Liu, Z.; Iyer, M.R.; Godlewski, G.; Jourdan, T.; Liu, J.; Coffey, N.J.; Zawatsky, C.N.; Puhl, H.L.; Wess, J.; Meister, J.; et al. Functional selectivity of a biased cannabinoid-1 receptor (CB1R) antagonist. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4*, 1175–1187. [[CrossRef](#)]
18. Mical, V.; Drago, F.; Noerregaard, P.K.; Elling, C.E.; Wotjak, C.T. The cannabinoid CB1 antagonist TM38837 with limited penetrance to the brain shows reduced fear-promoting effects in mice. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 207. [[CrossRef](#)]
19. DiMarzo, V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 623–639. [[CrossRef](#)]
20. Klumpers, L.E.; Fridberg, M.; de Kam, M.L.; Little, P.B.; Jensen, N.O.; Kleinloog, H.D.; Elling, C.E.; van Gerven, J.M. Peripheral selectivity of the novel cannabinoid receptor antagonist TM38837 in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *76*, 846–857. [[CrossRef](#)]
21. Howlett, A.C.; Fleming, R.M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* **1984**, *26*, 532–538. [[PubMed](#)]
22. Janero, D.R.; Makriyannis, A. Cannabinoid receptor antagonists: Pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2009**, *14*, 43–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Williams, C.M.; Rogers, P.J.; Kirkham, T.C. Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol. Behav.* **1998**, *65*, 343–346. [[CrossRef](#)]
24. Garami, A.; Pakai, E.; Oliveira, D.L.; Steiner, A.A.; Warner, S.P.; Almeida, M.C.; Lesnikov, V.A.; Gavva, N.R.; Romanovsky, A.A. Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: Thermoeffector dysbalance with hyperkinesis. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 1721–1733. [[CrossRef](#)]
25. Steiner, A.A.; Molchanova, A.Y.; Dogan, M.D.; Patel, S.; Petervari, E.; Balasko, M.; Wanner, S.P.; Eales, J.; Oliveira, D.L.; Gavva, N.R.; et al. The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2415–2431. [[CrossRef](#)]
26. Carai, M.A.; Colombo, G.; Gessa, G.L.; Yalamanchili, R.; Basavarajappa, B.S.; Hungund, B.L. Investigation on the relationship between cannabinoid CB1 and opioid receptors in gastrointestinal motility in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 1043–1050. [[CrossRef](#)]
27. Troy-Fioramonti, S.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Muller, T.; Verges, B.; Degrace, P. Acute activation of cannabinoid receptors by anandamide reduces gastrointestinal motility and improves postprandial glycemia in mice. *Diabetes* **2015**, *64*, 808–818. [[CrossRef](#)]
28. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714–3717. [[CrossRef](#)]
29. Kelder, J.; Grootenhuys, P.D.; Bayada, D.M.; Delbressine, L.P.; Ploemen, J.P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1514–1519. [[CrossRef](#)]
30. Mensch, J.; Oyarzabal, J.; Mackie, C.; Augustijns, P. In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 4429–4468. [[CrossRef](#)]
31. Gary-Bobo, M.; Elachouri, G.; Gallas, J.F.; Janiak, P.; Marini, P.; Ravinet-Trillou, C.; Chabbert, M.; Crucchioli, N.; Pfersdorff, C.; Roque, C.; et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* **2007**, *46*, 122–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jbilo, O.; Ravinet-Trillou, C.; Azone, M.; Buisson, I.; Bribes, E.; Peleraux, A.; Penarier, G.; Soubrie, P.; Le Fur, G.; Galiegue, S.; et al. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1567–1569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jourdan, T.; Djaouti, L.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Verges, B.; Degrace, P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* **2010**, *59*, 926–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nogueiras, R.; Veyrat-Durebex, C.; Suchanek, P.M.; Klein, M.; Tschop, J.; Caldwell, C.; Woods, S.C.; Wittmann, G.; Watanabe, M.; Liposits, Z.; et al. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes* **2008**, *57*, 2977–2991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Son, M.H.; Kim, H.D.; Chae, Y.N.; Kim, M.K.; Shin, C.Y.; Ahn, G.J.; Choi, S.H.; Yang, E.K.; Park, K.J.; Chae, H.W.; et al. Peripherally acting CB1-receptor antagonist: The relative importance of central and peripheral CB1 receptors in adiposity control. *Int. J. Obes.* **2010**, *34*, 547–556. [[CrossRef](#)]
36. Patel, S.; Hillard, C.J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: Further evidence for anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 304–311. [[CrossRef](#)]
37. Wiley, J.L.; Burston, J.J.; Leggett, D.C.; Alekseeva, O.O.; Razdan, R.K.; Mahadevan, A.; Martin, B.R. CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 293–300. [[CrossRef](#)]

38. Burns, H.D.; Van Laere, K.; Sanabria-Bohorquez, S.; Hamill, T.G.; Bormans, G.; Eng, W.S.; Gibson, R.; Ryan, C.; Connolly, B.; Patel, S.; et al. [18F]MK-9470, a positron emission tomography (PET) tracer for in vivo human PET brain imaging of the cannabinoid-1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9800–9805. [\[CrossRef\]](#)
39. Fong, T.M.; Guan, X.M.; Marsh, D.J.; Shen, C.P.; Stribling, D.S.; Rosko, K.M.; Lao, J.; Yu, H.; Feng, Y.; Xiao, J.C.; et al. Antiobesity efficacy of a novel cannabinoid-1 receptor inverse agonist, N-[(1S,2S)-3-(4-chlorophenyl)-2-(3-cyanophenyl)-1-methylpropyl]-2-methyl-2-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]propanamide (MK-0364), in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 1013–1022. [\[CrossRef\]](#)
40. Freeman, A.S.; Martin, B.R. Interactions between phencyclidine and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice following smoke exposure. *Life Sci.* **1983**, *32*, 1081–1089. [\[CrossRef\]](#)
41. Wiley, J.L.; Martin, B.R. Cannabinoid pharmacology: Implications for additional cannabinoid receptor subtypes. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *121*, 57–63. [\[CrossRef\]](#)
42. Navarro, M.; Hernandez, E.; Munoz, R.M.; del Arco, I.; Villanua, M.A.; Carrera, M.R.; Rodriguez de Fonseca, F. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* **1997**, *8*, 491–496. [\[CrossRef\]](#)
43. Gamble-George, J.C.; Conger, J.R.; Hartley, N.D.; Gupta, P.; Sumislawski, J.J.; Patel, S. Dissociable effects of CB1 receptor blockade on anxiety-like and consummatory behaviors in the novelty-induced hypophagia test in mice. *Psychopharmacology* **2013**, *228*, 401–409. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Marinho, E.A.; Oliveira-Lima, A.J.; Santos, R.; Hollais, A.W.; Baldaia, M.A.; Wuo-Silva, R.; Yokoyama, T.S.; Takatsu-Coleman, A.L.; Patti, C.L.; Longo, B.M.; et al. Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2015**, *58*, 22–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Tam, J.; Hinder, L.; Drori, A.; Udi, S.; Azar, S.; Baraghithy, S. The therapeutic potential of targeting the peripheral endocannabinoid/CB1 receptor system. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *49*, 23–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Jourdan, T.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Djaouti, L.; Gaba, L.; Verges, B.; Degrace, P. Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: Evidence from cultured explants. *Hepatol. Res.* **2012**, *42*, 790–799. [\[CrossRef\]](#)
47. Osei-Hyiaman, D.; Liu, J.; Zhou, L.; Godlewski, G.; Harvey-White, J.; Jeong, W.I.; Batkai, S.; Marsicano, G.; Lutz, B.; Buettner, C.; et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 3160–3169. [\[CrossRef\]](#)
48. Liu, J.; Zhou, L.; Xiong, K.; Godlewski, G.; Mukhopadhyay, B.; Tam, J.; Yin, S.; Gao, P.; Shan, X.; Pickel, J.; et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1218–1228.e1. [\[CrossRef\]](#)
49. Tam, J.; Cinar, R.; Liu, J.; Godlewski, G.; Wesley, D.; Jourdan, T.; Szanda, G.; Mukhopadhyay, B.; Chedester, L.; Liow, J.S.; et al. Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 167–179. [\[CrossRef\]](#)
50. Matias, I.; Gonther, M.P.; Orlando, P.; Martiadis, V.; De Petrocellis, L.; Cervino, C.; Petrosino, S.; Hoareau, L.; Festy, F.; Pasquali, R.; et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 3171–3180. [\[CrossRef\]](#)
51. Ruiz de Azua, I.; Mancini, G.; Srivastava, R.K.; Rey, A.A.; Cardinal, P.; Tedesco, L.; Zingaretti, C.M.; Sassmann, A.; Quarta, C.; Schwitter, C.; et al. Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 4148–4162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Cota, D.; Genghini, S.; Pasquali, R.; Pagotto, U. Antagonizing the cannabinoid receptor type 1: A dual way to fight obesity. *J. Endocrinol. Invest.* **2003**, *26*, 1041–1044. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Gasperi, V.; Fezza, F.; Pasquariello, N.; Bari, M.; Oddi, S.; Agro, A.F.; Maccarrone, M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 219–229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Osei-Hyiaman, D.; DePetrillo, M.; Pacher, P.; Liu, J.; Radaeva, S.; Batkai, S.; Harvey-White, J.; Mackie, K.; Offertaler, L.; Wang, L.; et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1298–1305. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Pagano, C.; Pilon, C.; Calcagno, A.; Urbanet, R.; Rossato, M.; Milan, G.; Bianchi, K.; Rizzuto, R.; Bemante, P.; Federspil, G.; et al. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 4810–4819. [\[CrossRef\]](#)
56. Vettor, R.; Pagano, C. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *23*, 51–63. [\[CrossRef\]](#)
57. Buch, C.; Muller, T.; Leemput, J.; Passilly-Degrace, P.; Ortega-Deballon, P.; Pais de Barros, J.P.; Verges, B.; Jourdan, T.; Demizieux, L.; Degrace, P. Endocannabinoids produced by white adipose tissue modulate lipolysis in lean but not in obese rodent and human. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 716431. [\[CrossRef\]](#)
58. Muller, T.; Demizieux, L.; Troy-Fioramonti, S.; Gresti, J.; Pais de Barros, J.P.; Berger, H.; Verges, B.; Degrace, P. Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2017**, *313*, E26–E36. [\[CrossRef\]](#)

59. Robert, J.; Troy-Fioramonti, S.; Demizieux, L.; Degrace, P. Preparation of 1,4-bis(4-Methylphenyl)-3-Phtaloylazetid-2-Ones and Derivatives Thereof Useful for the Treatment of Diseases Associated with Hyperactivity of the Endocannabinoid System. U.S. Patent US20180265498, 2018.
60. Palomo, C.; Aizpurua, J.M.; Ganboa, I.; Oiarbide, M. From beta-lactams to alpha- and beta-amino acid derived peptides. *Amino Acids* **1999**, *16*, 321–343. [[CrossRef](#)]
61. Jiao, L.; Liang, Y.; Xu, J. Origin of the relative stereoselectivity of the beta-lactam formation in the Staudinger reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6060–6069. [[CrossRef](#)]
62. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Liste des publications et présentations



## Publications

---

Muller T., Demizieux L., Troy-Fioramonti S., **Buch C.**, Leemput J., Belloir C., Pais de Barros JP., Jourdan T., Passilly-Degrace P., Fioramonti X., Le Bon AM., Vergès B., Robert JM. and Degrace P. (2022) *Chemical synthesis, pharmacokinetic properties and biological effects of JM-00266, a putative non-brain penetrant cannabinoid receptor 1 inverse agonist*. Int J Mol Sci

**Buch C.**, Muller T., Leemput J., Passilly-Degrace P., Ortega-Deballon P., Pais de Barros JP., Vergès B., Jourdan T., Demizieux L. and Degrace P. (2021) *Endocannabinoids produced by white adipose tissue modulate lipolysis in lean but not in obese rodent and human*. Front Endocrinol

Roger C., **Buch C.**, Muller T., Leemput J., Demizieux L., Passilly-Degrace P., Cinar R., Iyer MR., Kunos G., Vergès B., Degrace P. and Jourdan T. (2020) *Simultaneous Inhibition of Peripheral CB1R and iNOS Mitigates Obesity-Related Dyslipidemia Through Distinct Mechanisms*. Diabetes. 17:db200078

Guillot A., **Buch C.** and Jourdan T. (2020) *Kupffer Cell and Monocyte-Derived Macrophage Identification by Immunofluorescence on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Mouse Liver Sections. Kupffer Cells: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. vol. 2164

Bourgeois T., Jalil A., Thomas C., Magnani C., Le Guern N., Gautier T., Pais De Barros JP., Bergas V., Choubley H., Mazzeo L., Menegaut L., Lebrun L., Van Dongen K., Xolin M., Jourdan T., **Buch C.**, Labbé J., Saas P., Lagrost L., Masson D., Grober J. (2020) *Deletion of lysophosphatidylcholine acyltransferase3 in myeloid cells worsens hepatic steatosis after a high fat diet*. J Lipid Res. jlr.RA120000737

Casanova V., Henderson Sousa F., Shakamuri P., Svoboda P., **Buch C.**, D'Acremont M., Christophorou MA., Pohl J., Stevens C. and Barlow PG. (2020) *Citrullination Alters the Antiviral and Immunomodulatory Activities of the Human Cathelicidin LL-37 During Rhinovirus Infection*. Front. Immunol

## Communications orales

---

- **Juin 2021 - ICRS 2021 (International Cannabinoid Research Society),**  
Congrès virtuel

Buch C., Muller T., Leemput J., Passilly-Degrace P., Ortega-Deballon P., Pais de Barros JP., Vergès B., Jourdan T., Demizieux L. and Degrace P. *Cannabinoid-1 receptors (CB1R) modulate white adipose tissue lipolysis in lean but not in obese rodent and human.*

- **Juin 2021 - Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France**

Buch C., Muller T., Leemput J., Passilly-Degrace P., Ortega-Deballon P., Pais de Barros JP., Vergès B., Jourdan T., Demizieux L. and Degrace P. *Cannabinoid-1 receptors (CB1R) modulate white adipose tissue lipolysis in lean but not in obese rodent and human.*

## Communications affichées commentées – Poster

---

- **Novembre 2019 - Copenhagen Bioscience Conference, Copenhague, Danemark**

Buch C., Muller T., Demizieux L., Troy-Fioramonti S., Jourdan T., Passilly-Degrace P., Leemput J., Robert JM. and Degrace P. *Peripheral cannabinoid receptor (CB1R) blockade with JM-00266 improves carbohydrate and lipid metabolism in obese mice.*

## **Rôle du système endocannabinoïde périphérique dans l'apparition des désordres métaboliques liés à l'obésité : Implication des endocannabinoïdes produits par le tissu adipeux.**

**Mots clés :** *Obésité, Système Endocannabinoïde, Tissu Adipeux, Métabolisme glucido-lipidique*

L'obésité est une pathologie dont la fréquence est en constante augmentation. Elle correspond à un excès de tissu adipeux (TA) dont les fonctions peuvent être altérées. Parmi les dérégulations métaboliques, il peut exister une hyperactivation du système endocannabinoïde (SEC). Ce système, composé de récepteurs aux cannabinoïdes (CB1R et CB2R), de leurs ligands endogènes (EndoCannabinoïdes - ECs) et des enzymes impliquées dans leur biosynthèse et leur dégradation, est présent dans le système nerveux central ainsi que dans divers tissus périphériques. Le blocage des CB1R par le Rimonabant, premier antagoniste commercialisé en 2006, s'est révélé être une approche thérapeutique efficace en réduisant la prise alimentaire, la masse corporelle et en améliorant significativement les paramètres métaboliques. Néanmoins, les troubles psychiatriques sévères associés, consécutifs aux effets centraux, ont valu à ce composé d'être retiré du marché 2 ans plus tard. Depuis, l'utilisation d'antagonistes ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique a permis de démontrer que l'inactivation des CB1R périphériques était suffisante pour diminuer le risque cardio-métabolique chez la souris obèse. Compte tenu du rôle central joué par le TA dans l'étiologie des pathologies associées à l'obésité, il apparaît important de préciser la relation existante entre le SEC et le métabolisme adipocytaire.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont pour objectifs de préciser le rôle des ECs sur l'activité lipolytique adipocytaire, d'évaluer les capacités sécrétoires des différents dépôts de TA et d'étudier l'impact d'agonistes et d'antagonistes des CB1R sur l'adipogenèse. Une dernière partie, est consacrée à la caractérisation de l'activité biologique de nouveaux antagonistes des CB1R.

Tout d'abord, l'étude des conséquences de la modulation du SEC sur l'activité lipolytique a permis de démontrer que l'activation des CB1R, en stimulant la voie de signalisation PI3K/Akt, conduit à une diminution de la lipolyse. Les résultats suggèrent également que les ECs produits par le TA, pourraient alimenter le pool d'ECs circulants et être à l'origine d'effets exocrines néfastes. L'étude de la production des ECs *in vitro*, par des explants de TA viscéral et sous-cutané chez la souris et chez l'Homme obèses, a confirmé la modification des capacités sécrétoires en ECs. Ces résultats préliminaires valident une approche méthodologique originale qui nous permet d'envisager une exploration plus poussée des mécanismes de la production des ECs. Par ailleurs, le rôle des ECs sur la différenciation de cellules souches issues de la fraction stroma-vasculaire de TA sain et pathologique de souris a été étudié. Des essais préliminaires ont permis de suggérer l'existence d'un lien entre différenciation adipocytaire et activité des CB1R.

Enfin, les études de caractérisation de nouveaux antagonistes des CB1R ont démontré des effets intéressants des molécules JM-00266 et HR-0133 sur la masse corporelle et le métabolisme glucido-lipidique. Toutefois, l'optimisation, le développement et la caractérisation de ces nouveaux types d'antagonistes à des fins thérapeutiques apparaît essentiel dans la lutte contre l'obésité et ses complications.

## **Role of the peripheral endocannabinoid system in the obesity-linked metabolic disorders genesis : Involvement of adipose tissue derived endocannabinoids.**

**Keywords :** *Obesity, Endocannabinoid system, Adipose tissue, Lipid and carbohydrate metabolism*

Obesity is a pathology characterized by an excess of adipose tissue (AT) whose functions may be altered. Interestingly, strong evidence suggests that metabolic dysregulations linked to obesity is associated with an hyperactivation of the endocannabinoid system (ECS) in several organs including AT. This system, composed of cannabinoid receptors (CB1R and CB2R), their endogenous ligands (EndoCannabinoids - ECs) and their biosynthetic and degrading enzymes, is expressed both in the central nervous system and in various peripheral tissues. CB1R blockade with Rimonabant, the first antagonist marketed in 2006, has proven to be an effective therapeutic approach by reducing food intake, body mass and by significantly improving metabolic parameters. However, the associated severe centrally-mediated psychiatric disorders led to its market withdrawal 2 years later. Since then, the use of antagonists that do not cross the blood-brain barrier has demonstrated that inactivation of peripheral CB1R is sufficient to reduce the cardiometabolic risk in obese mice. Considering the central role played by AT in the etiology of obesity-associated pathologies, it appears important to clarify the existing relationship between ECS and adipocyte metabolism.

In this context, these thesis objectives were to clarify the role of ECs on adipocyte lipolytic activity, to evaluate the secretory abilities of the different AT deposits and to study the impact of CB1R agonists and antagonists on adipogenesis. A last part is devoted to the characterization of the biological activity of new CB1R antagonists.

First of all, studying the consequences of the ECS modulation on lipolytic activity allowed us to demonstrate that the activation of CB1R, by stimulating the PI3K/Akt signaling pathway, leads to a decrease in lipolysis. The results also suggest that AT-derived ECs could be the source of circulating ECs and be responsible for harmful exocrine effects. Studying ECs production *in vitro*, using visceral and subcutaneous AT explants from both obese mice and humans, confirmed the alteration of ECs secretory abilities. These preliminary results validated an original methodological approach that allows us to further explore the mechanisms of ECs production. In addition, the role of ECs on stem cells differentiation from the stroma-vascular fraction of healthy and pathological mice AT has been studied. Preliminary data are suggesting a link between adipocyte differentiation and CB1R activity.

Finally, characterization studies of new CB1R antagonists have demonstrated interesting effects of the compounds JM-00266 and HR-0133 on body mass as well as on lipid and carbohydrate metabolism. Nonetheless, the optimization, development, and characterization of these new types of antagonists for therapeutic purposes is still incomplete and appears essential in the fight against obesity and obesity-associated disorders.