



**HAL**  
open science

# Impact du système endocannabinoïdien sur la physiologie de l'obésité: effets de l'antagonisme des récepteurs CB1 sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris obèse

Tony Jourdan

► **To cite this version:**

Tony Jourdan. Impact du système endocannabinoïdien sur la physiologie de l'obésité: effets de l'antagonisme des récepteurs CB1 sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris obèse. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS031 . tel-00589358

**HAL Id: tel-00589358**

**<https://theses.hal.science/tel-00589358>**

Submitted on 28 Apr 2011

**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.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**  
*Ecole doctorale E2S-UFR Sciences vie*

**THESE**  
*En vue d'obtenir le grade de*  
*Docteur de l'Université de Bourgogne*  
*Discipline : Sciences vie*

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 18 novembre 2010

Par

**Tony Jourdan**

**Impact du système endocannabinoïdien sur la physiopathologie de l'obésité :  
Effets de l'antagonisme des récepteurs CB1 sur le métabolisme  
glucido-lipidique de la souris obèse.**

**Jury :**

**Sophie Lotersztajn** DR INSERM U955, Créteil

Rapporteur

**Karine Clément** PUPH INSERM U872, Paris

Rapporteur

**Jean-Paul Pégorier** DR CNRS U8104

Examineur

**Bruno Vergès** Pr-MD INSERM U866, Dijon

Examineur

**Laurent Lagrost** DR INSERM U866, Dijon

Examineur

**Pascal Degrace** Pr UB-INSERM U866, Dijon

Directeur de thèse

Unité INSERM U866 « Lipides, nutrition, cancer » ; équipe 7 « Physiopathologie des dyslipidémies » ;  
Faculté des Sciences Gabriel, 6Bd Gabriel, 21000 Dijon (France)

***“Science sans conscience n’est que ruine de l’âme”  
François Rabelais “Pantagruel”, XVIème siècle***

## **Remerciements**

Tout d'abord, je ne pourrais pas commencer les remerciements sans évoquer la personne qui m'a proposé le sujet de thèse et qui m'a encadré pendant ces trois années, le professeur Pascal Degrace. Je tiens à le remercier pour la grande disponibilité et générosité dont il a fait preuve pendant ces 3 années, pour avoir partagé, d'expérience en expérience, les satisfactions et parfois les inquiétudes qu'elles ont suscitées. Je salue également son ouverture d'esprit et sa bonne humeur qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail. Son enthousiasme pour la recherche m'a fortement encouragé, sa persévérance et sa rigueur ont pour moi valeur d'exemple. Je tiens ici à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement, madame Sophie Lotersztajn et madame Karine Clément pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse malgré leur charge de travail que je sais extrêmement lourde. Merci pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail, pour le temps qu'elles y ont consacré et pour leurs remarques constructives. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Mr Laurent Lagrost, Mr Jean-Paul Pégorier et Mr Bruno Vergès.

Je remercie Sanofi Aventis et le Conseil Régional de Bourgogne pour avoir honoré le financement des 3 années de recherche malgré les difficultés rencontrées par le Rimonabant.

A tous les membres du laboratoire et plus particulièrement :

Bruno Vergès, responsable de l'équipe « physiopathologie des dyslipidémies » pour m'avoir donné l'occasion de travailler au sein de son équipe, pour ses conseils lors des diverses réflexions que nous avons eues sur mes travaux de doctorat.

Laurent Demizieux, maître de conférences au laboratoire, merci pour ses conseils, sa disponibilité, son aide et ses remarques toujours pertinentes.

Joseph Gresti, ingénieur de recherche, incomparable orateur et d'une disponibilité incroyable. Un grand merci pour son aide précieuse, ses conseils techniques ainsi que les âpres discussions scientifiques ou non que nous avons pu avoir !

Je n'oublie pas le professeur Pierre Clouet qui dirigeait l'équipe lors de mon arrivée et qui profite maintenant d'une retraite bien méritée ; merci de m'avoir donné l'opportunité de réellement découvrir le monde passionnant de la recherche en physiologie.

Merci également aux Pr Laurence Perségol et Dr Patricia Degrace pour m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement, j'ai vraiment adoré ça et souhaite continuer si l'avenir me le permet.

Je remercie mes collègues de bureau, Arnaud (Dr Bernard), Cécile et Mélaine pour avoir partagé ces 4 années depuis le M2 et Louiza pour avoir partagé la même paillasse, les mêmes moments de doutes et de satisfactions, je te remercie pour ta gentillesse et les parties de franche rigolade lors des longues manips.

Une pensée pour tous mes collègues et amis de l'experimentarium, en particulier Dany, Gérôme, Anne Laure, Manu, Stéphanie et Julie. Un grand merci à toute l'équipe, Lionel et Candice en tête. J'ai adoré ces 3 années avec vous et longue vie à l'expe.

Une pensée pour Mme Bôle-Richard, professeur extraordinaire qui m'a transmis sa passion pour la physiologie et le métabolisme.

Je ne sais pas si je dois remercier mes amis pour avoir fréquemment tenté de me détourner de la paillasse pour aller boire un verre (surtout toi mon Titi) ou simplement s'amuser mais surtout ne changez rien ! A tous, je vous adresse mes plus profonds remerciements et vous assure de toute mon affection.

Enfin, rien de tout cela n'aurait été possible sans la présence et l'amour de mes parents, de mon petit frère Florian, du reste de ma famille et surtout de Sofia mon rayon de soleil quotidien qui a tant bien que mal supporté mes crises d'humeur massacrantes au cours de la période de rédaction. Je vous remercie de votre soutien à toute épreuve sans lequel je n'aurais sûrement pas pu aller au bout de cette aventure.

Pour terminer, une pensée très spéciale pour Romain parti bien trop tôt rejoindre les anges. Merci d'avoir veillé sur moi depuis le paradis. Tu me manques et je te dédie affectueusement cette thèse.

## Résumé

Le système endocannabinoïdien (SEC) est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques comme la régulation du métabolisme énergétique. Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que l'obésité était associée à une suractivation du SEC et en particulier des récepteurs CB1 (CB1R) centraux. De plus, l'inactivation des CB1R par des antagonistes spécifiques comme le Rimonabant (SR141716) conduit à une amélioration des paramètres métaboliques chez le sujet obèse. Cependant, l'inactivation des CB1R périphériques pourrait également contribuer à l'amélioration de ces paramètres et c'est cette dernière notion que nous avons cherché à approfondir. Pour cela, nous avons testé les effets du SR141716, sur des souris obèses afin d'établir des relations entre l'activité du SEC et le statut lipidique en étudiant plus particulièrement la régulation du métabolisme dans deux tissus clés, le foie et le tissu adipeux (TA). Des souris préalablement rendues obèses via un régime alimentaire enrichi en sucre et en graisse ont été traitées 6 semaines par SR141716 et le traitement a conduit à une perte de poids associée à une normalisation des paramètres plasmatiques, ainsi qu'à une résorption de la stéatose hépatique. L'hypothèse majeure de cette étude est que la réversion de la stéatose serait associée à un effet bénéfique du traitement sur le métabolisme du TA viscéral et qu'il y aurait donc des effets directs du SR141716 sur les tissus périphériques. Par conséquent, les effets de l'antagonisme des CB1R périphériques sur le métabolisme lipidique ont ensuite été étudiés *in vitro*. Pour cela, nous avons tout d'abord développé un modèle d'explants de foie en culture traités avec SR141716. Dans ce modèle, le blocage des CB1R hépatiques est associé à une diminution de leur expression génique et dans certaines conditions à une augmentation des capacités  $\beta$ -oxydatives. Enfin, afin d'étudier l'impact du SEC sur le métabolisme adipocytaire, nous avons mis au point un modèle d'explants de TA en culture en distinguant le TA viscéral du sous-cutané. Des résultats préliminaires semblent indiquer que le blocage des CB1R limite la lipolyse dans le TA viscéral. En conclusion, ces travaux de thèse démontrent que les CB1R périphériques constituent une cible thérapeutique très prometteuse pour le traitement de l'obésité et des désordres associés.

**Mots clés :** système endocannabinoïdien, endocannabinoïde, SR141716, anandamide, stéatose, adiponectine, CB1R, CB2R, foie, tissu adipeux, métabolisme glucido-lipidique.

## Abstract

The endocannabinoid system (ECS) is involved in many biological functions such as regulation of energy metabolism. Recently, several studies have shown an association between obesity and ECS overactivity. In addition, specific CB1R antagonists such as Rimonabant (SR141716) improved metabolic parameters in obese patients essentially through inactivation of central CB1R. However, peripheral CB1R inactivation could also contribute to the improvement of these parameters and it is this notion that we have studied. To this purpose, we tested the effects of SR141716 on obese mice in order to establish relationships between the ECS activity and lipid metabolism by looking more specifically to its regulation in two key tissues, the liver and the adipose tissue (AT). Obese mice previously fed with a high sucrose high fat diet were treated six weeks by SR141716 and this treatment induced weight loss associated with a normalization of plasmatic parameters and a reduction of hepatic steatosis. The major hypothesis of this study is that steatosis reversion was associated with a beneficial effect of treatment on visceral AT metabolism and that SR141716 would have direct effects on peripheral tissues. Therefore, these effects of CB1R antagonism on peripheral lipid metabolism have been studied *in vitro*. In this way, we first developed a model of liver explants in culture treated with SR141716. In this model, CB1R antagonism in the liver was associated with a decrease in CB1 gene expression and in certain conditions with an increased in  $\beta$ -oxidative capacity. Finally, in order to study the impact of the ECS on adipocyte metabolism, we developed a model of cultured AT explants distinguishing visceral and subcutaneous AT. Preliminary results suggested that CB1R antagonism limits lipolysis in visceral AT. In conclusion, this work showed that peripheral CB1R are a very promising therapeutic target for treating obesity and related disorders.

**Key words:** endocannabinoid system, endocannabinoid, SR141716, anandamide, steatosis, adiponectin, CB1R, CB2R, liver, adipose tissue, carbohydrate and lipid metabolism.

## Abréviations

**2-AG:** 2-Arachidonoyl-Glycérol

**ACC:** AcétylCoA Carboxylase

**AEA:** Anandamide

**AFSSAPS:** Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

**AG:** Acides Gras

**AGL:** Acides Gras Libres

**AGNE:** Acides Gras Non Estérifiés

**AMPK:** AMP-activated protein kinase

**ApoA:** Apolipoprotéine A

**ApoB:** Apolipoprotéine B

**BHE:** Barrière Hémato-Encéphalique

**CB:** CannaBinoïdes

**CB1R:** Récepteurs au CannaBinoïdes 1

**CB2R:** Récepteurs au CannaBinoïdes 2

**ChREBP:** Carbohydrate Responsive Element Binding Protein

**CPT-1:** Carnitine palmitoyltransferase I

**DAG:** DiAcyl Glycérol

**DAGL:** DiAcyl Glycérol Lipase

**EC:** EndoCannabinoïdes

**FAAH:** Fatty acid amide hydrolase

**FAS:** Fatty Acid Synthase

**FAT/CD36:** Fatty Acid Transporter/ Cluster of Differentiation 36

**FDA:** Food and Drug Administration

**G6P:** Glucose-6-Phosphatase

**GLCK:** Glucokinase

**GLP-1:** Glucagon like peptide-1

**HbA-1c:** Hémoglobine Glyquée

**HDL:** High Density lipoprotein

**HDL-CE:** High Density Lipoprotein Cholesteryl Ester

**HL:** Hepatic Lipase

**HMB:** Hypothalamus MédioBasal

**HMG-CoA red:** 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA reductase

**HSHF:** High Sucrose High Fat

**IL:** Interleukine

**IMC:** Indice de Masse Corporelle

**IRS:** Insulin Receptor Substrate

**JNK:** c-Jun-N-Terminal Kinase

**LHS:** Lipase Hormono S1ensible

**LPL:** LipoProtéine Lipase

**LRP:** LDL Receptor Related Protein,

**MAGL:** MonoAcylGlyceride Lipase

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase

**MCP-1:** Monocyte Chemotactic Protein-1

**MTT:** bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

**NAPE-PLD:** N-Acyl PhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D

**NFκB:** Nuclear factor-κB

**ObEpi :** enquête nationale sur la prévalence de l'obésité et du surpoids en France

**OEA :** OleoylEthanolAmide

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**PEA:** PalmitoylEthanolAmide  
**PEPCK:** PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase  
**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase  
**PKA:** Protéine Kinase A  
**PKB:** Protéine Kinase B  
**PLA ½:** Phospholipase A1, A2  
**PLD:** PhosphoLipase D  
**PPAR:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
**RIO:** Rimonabant In Obesity  
**SCD-1:** StéaroylCoA Désaturase 1  
**SEC:** Système EndoCannabinoïdien  
**SNC:** Système Nerveux Central  
**SR-B1:** Scavenger Receptor de classe B de type I  
**SREBP:** Sterol Regulatory Element Binding Proteins  
**TA:** Tissu Adipeux  
**TG:** Triglycérides  
**TNF-α:** Tumor Necrosis Factor-α  
**VLDL:** Very Low Density Lipoproteins  
**Δ9-THC:** Δ9-TétraHydroCannabinol

<i>INTRODUCTION</i> .....	6
<i>I. Obésité, diabète et insulino-résistance</i> .....	7
1. L'obésité .....	7
1.1. Définition clinique de l'obésité .....	7
1.2. Prévalence et évolution de la pandémie de l'obésité dans le monde .....	7
1.3. Types d'obésité et leurs facteurs de développement .....	9
2. Le diabète de type 2 .....	10
3. Insuline et insulino-résistance .....	12
3.1. Insuline .....	12
3.2. Insulino-résistance .....	13
4. L'adiponectine .....	17
4.1. Action sur le métabolisme glucidique .....	18
4.2. Action sur le métabolisme lipidique .....	18
4.3. Autres rôles de l'adiponectine .....	19
<i>II. Le système endocannabinoïdien</i> .....	20
1. Historique .....	20
2. Les cannabinoïdes et leurs récepteurs .....	21
2.1. Les cannabinoïdes et endocannabinoïdes .....	22
2.1.1. Ligands exogènes naturels .....	22
2.1.2. Ligands endogènes .....	22
2.1.3. Ligands synthétiques .....	22
2.2. Synthèse et dégradation des EC .....	23
2.2.1. Mécanisme de synthèse de l'anandamide .....	24
2.2.2 Mécanisme de synthèse du 2-arachidonoyl glycérol .....	24
2.2.3 Mécanismes de dégradation des EC .....	26
2.3. Les récepteurs aux EC .....	26

2.3.1. Les récepteurs CB1 et CB2.....	26
2.3.2. Les récepteurs aux cannabinoïdes non-CB1/2.....	28
2.3.2.1 Le récepteur vanilloïde.....	28
2.3.2.2. Le récepteur putatif de l'abnormal cannabidiol.....	28
2.3.2.3. Le récepteur GPR55.....	29
2.3.2.4. Le récepteur hippocampal des cannabinoïdes non-CB1.....	29
2.3.2.5. Le récepteur CB2-like.....	29
2.4. Signalisation intracellulaire des récepteurs cannabinoïdes.....	30
2.4.1. Inhibition de l'adénylate cyclase.....	30
2.3.2. Activation de la voie des MAP kinases.....	32
3. Rôle du <i>SEC</i> dans la modulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle.....	32
3.1 SEC et régulation centrale de la prise alimentaire.....	33
3.1.1 Effets centraux du SEC sur la prise alimentaire.....	33
3.1.2. Relations entre SEC et leptine.....	35
3.2 <i>SEC</i> et régulation du métabolisme adipocytaire.....	36
3.2.1. EC et métabolisme énergétique des adipocytes.....	37
3.2.1.1. EC et lipogenèse.....	38
3.2.1.2. EC et lipolyse.....	39
3.2.1.3. EC et catabolisme/activité mitochondrial.....	39
3.2.1.4. Différenciation adipocytaire.....	40
3.2.1.5. Conclusion.....	43
3.2.2. EC et adipokines.....	43
3.2.3. Effets spécifiques du SEC dans les TA viscéral et sous-cutané.....	44
4. Foie et SEC.....	46
4.1. SEC et stéatopathie métabolique.....	46
4.1.1. Mécanismes à l'origine de la stéatose hépatique.....	47

4.1.2. Régulation de la stéatogénèse hépatocytaire par le SEC.....	49
4.1.3. Stéatopathie d'origine alcoolique .....	51
4.2. Cannabinoïdes et fibrogénèse hépatique .....	52
4.3. Cannabinoïdes et hypertension portale.....	54
5. Le SEC dans les autres tissus .....	55
5.1. Le pancréas .....	55
5.2. Le tractus gastro-intestinal.....	56
5.3. Muscle squelettique .....	57
6. Autres fonctions du SEC .....	58
7. Rimonabant et modulation pharmacologique du SEC .....	58
7.1. La modulation pharmacologique du système EC peut s'effectuer à plusieurs niveaux.....	59
7.2. Le Rimonabant.....	59
<i>Problématique</i> .....	62
<i>Résultats</i> .....	65
<i>Chapitre I : Approche in vivo : Etude des effets de l'antagonisme des CB1R chez la souris obèse.....</i>	<i>66</i>
1. Paramètres morphologiques et sériques .....	66
2. Métabolisme hépatique .....	67
2.1. Paramètres biochimiques.....	67
2.2. Régulation génique.....	69
2.3. Discussion .....	71
3. Métabolisme adipocytaire.....	73
3.1. Paramètres biochimiques.....	73
3.2. Régulation génique.....	74
3.3. Discussion .....	75
4. Conclusion .....	79
<i>Chapitre II : Approche in vitro : Etude des effets du blocage du SEC sur le métabolisme des lipides et des glucides dans le foie. ....</i>	<i>89</i>

1. Paramètres relatifs à l'oxydation des acides gras.....	91
1.1. Approche 1: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain.....	91
1.2. Approche 2: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain traités ou non avec de l'anandamide.....	93
1.3 Approche 3: Effets d'un traitement par AEA et SR141716 sur des explants de foie de souris HSHF. ....	94
1.4. Discussion .....	94
2. Paramètres relatifs à la lipogenèse et au captage du HDL-CE. ....	96
2.1 Approche 1: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain.....	97
2.2. Approche 2: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sains traités ou non avec de l'anandamide.....	99
2.3. Discussion .....	101
3. Paramètres relatifs au contrôle du métabolisme glucidique. ....	103
3.1 Approche 1: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain.....	103
3.2. Discussion .....	103
4. Mise en évidence d'adaptations métaboliques par oxygraphie. ....	105
5. Conclusion .....	107
<i>Chapitre III : Approche in vitro : Impact de l'antagonisme des CB1R sur le métabolisme des lipides et des glucides dans des explants de TA viscéral et sous-cutané.....</i>	<i>109</i>
1. Mise au point du modèle .....	109
2. Effets sur la lipolyse.....	111
3. Effets de la stimulation ou du blocage des CB1R adipocytaires sur l'expression génique. ....	114
4. Perspectives.....	117
<i>Chapitre IV : Conclusion générale, quel avenir pour les EC? .....</i>	<i>118</i>
<i>Matériel et méthodes.....</i>	<i>123</i>
1. Traitement des animaux.....	124
2. Explants de foie .....	125
2.1. Mise au point du protocole expérimental sur des explants de foie.....	126
2.1.1 Mesure de l'intégrité des ARNs.....	126

2.1.2. Mesure de la respiration cellulaire par oxygraphie .....	127
2.2. Préparation des explants de foie et description du dispositif expérimental .....	127
2.3. Caractérisation de l'état nutritionnel des explants au cours des 21h d'incubations.....	128
3. Explants de TA .....	129
4. Dosages colorimétriques .....	130
4.1 Dosages plasmatiques .....	130
4.2. Dosages dans les tissus.....	130
5. Oxydation des acides gras .....	130
6. Uptake des HDL .....	131
6.1. Isolement des HDL.....	131
6.2. Radio-marquage des HDL.....	132
6.3. Mesure de l'uptake des HDL .....	132
7. Malonyl-CoA .....	132
8. Mesure de la consommation d'oxygène par des explants de foie traités au SR141716 .....	133
9. Glycogène .....	133
10. Détermination de l'activité LPL .....	134
11. Lipolyse basale et stimulée.....	134
12. Western blotting .....	135
13. Expression génique.....	135
14. Statistiques .....	137
<i>Bibliographie</i> .....	<i>138</i>
<i>Annexes</i> .....	<i>165</i>

# *INTRODUCTION*

## I. Obésité, diabètes et insulino-résistance

### 1. L'obésité

#### 1.1. Définition clinique de l'obésité

L'obésité correspond à un excès de poids dû à une inflation des réserves énergétiques. En pratique clinique comme en épidémiologie, l'obésité est définie à partir de l'indice de masse corporelle (IMC). L'IMC est calculé selon la formule suivante :  $\text{masse (en Kg)}/\text{taille}^2$  (en mètres). Le surpoids est atteint lorsque l'IMC se situe entre 25 et 29,9 et on parle d'obésité avec un IMC supérieur ou égal à 30 (Kopelman, 2000). L'obésité a été reconnue comme une maladie en 1997 par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Cette organisation définit « *le surpoids et l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé* ». Sa prévention est un problème de santé publique dans les pays développés. Elle peut avoir des répercussions importantes sur la santé de l'individu. Cette maladie multifactorielle est considérée aujourd'hui par abus de langage comme une pandémie, bien qu'il ne s'agisse pas d'une maladie infectieuse.

#### 1.2. Prévalence et évolution de la pandémie de l'obésité dans le monde

Quelle que soit la définition qu'on lui donne, l'obésité est une maladie déroutante et mal comprise. Toutes les formes d'obésité résultent d'un déséquilibre des mécanismes de régulation du bilan énergétique. Au cours des dernières décennies, la prévalence de l'obésité dans nos sociétés a fortement augmenté, et cette augmentation s'accélère au niveau mondial. Ainsi, aux Etats-Unis, le nombre de personnes obèses a progressé de 61 % en 9 ans entre 1991 et 2000 (Mokdad *et al.*, 2001). En 2002, 27 % des américains étaient obèses (Yanovski and Yanovski, 2002). D'après les estimations mondiales de l'OMS, il y avait en 2005 environ 1,6 milliard d'adultes (âgés de plus de 15 ans), au moins 20 millions d'enfants de moins de cinq ans en surpoids (IMC > 25) et au moins 400 millions d'adultes obèses (IMC > 30) (OMS, 2005). L'OMS estime que d'ici 2015, environ 2,3 milliards d'adultes seront en surpoids et plus de 700 millions seront obèses. Ce phénomène d'obésité est plus répandu dans les pays développés mais le nombre d'obèses dans certaines zones urbaines de pays en voie de développement (Namibie, Turquie, Mexique, Pérou...) atteint d'ores et déjà 10 à 15 % de la population (Martorell *et al.*, 2000). En France également, la prévalence de l'obésité augmente: la part de personnes obèses dans la population adulte est passée de 8,5 % en 1997 à 14,5% en 2009, soit 6,5 millions de personnes supplémentaires, selon les résultats de l'enquête d'ObEpi-Roche 2009. Il s'agit de la 5ème

édition de l'enquête nationale sur la prévalence de l'obésité et du surpoids en France, réalisée tous les trois ans depuis 1997, avec la même méthodologie et coordonnée depuis ses débuts par le Dr Marie-Aline Charles, épidémiologiste à l'INSERM et le Pr Arnaud Basdevant, nutritionniste à l'hôpital Pitié-Salpêtrière, à Paris.

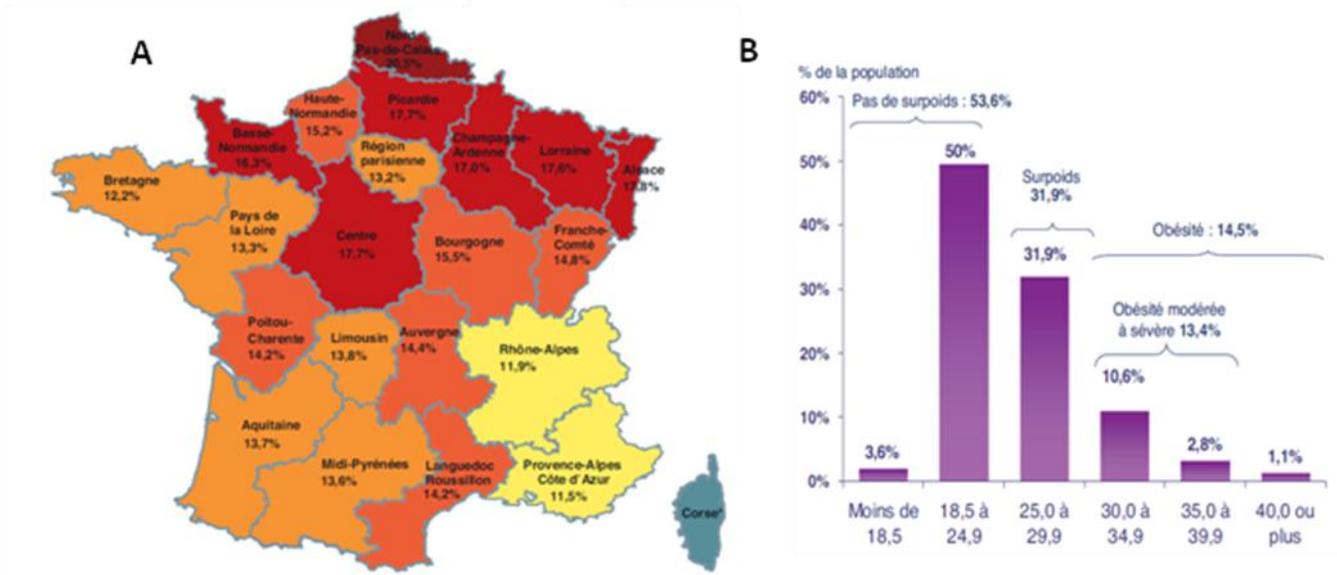


Figure 1 : A) prévalence de l'obésité en France en 2009 et B) répartition de la population française en fonction de leur IMC en 2009 (ObEpi, 2010). Dans la figure A, la coloration rouge correspond aux régions où la proportion d'obèses est supérieure à 16%, la coloration « saumon » correspond à une proportion d'obèses comprise entre 14 et 16%. La coloration orange quant à elle correspond à des régions comprenant entre 12 et 14% d'obèses tandis que les régions en jaune ne contiennent moins de 12% d'obèses dans la population. Enfin, la Corse est représentée en vert car l'échantillon étudié est très faible, l'évolution de la prévalence dans cette région n'est donc pas précisée.

Les grandes conclusions d'ObEpi 2009 remettent l'accent sur l'urgence d'une meilleure compréhension des multiples facteurs régissant la prise de poids afin d'arriver à une prévention plus efficace. En effet, Les Français ont grossi en moyenne de 900 g par rapport à 2006, de 1,3 kg par rapport à 2003, de 2,3 kg par rapport à 2000 et de 3,1 kg par rapport à 1997. La prévalence de l'obésité massive est passée de 0,3 % de la population en 1997 à 1,1 % en 2009. De plus, l'augmentation 2006-2009 la plus importante touche les 25-34 ans (+19,5 %) et de génération en génération, on devient obèse de plus en plus tôt. Plus parlant encore, la part des Français ne souffrant pas de surpoids est passée de 61,7 % en 1997 à 53,6 % en 2009 et la prévalence de l'obésité augmente dans toutes les catégories professionnelles et dans toutes les tailles d'agglomérations tout en restant inversement proportionnelle au niveau d'instruction et de revenus du foyer (ObEpi, 2010).

### **1.3. Types d'obésité et leurs facteurs de développement**

Dans les années 50, différents types d'obésité ont été décrits. Plus précisément, des personnes présentant une obésité de type abdominal ont plus de risque de développer les pathologies connexes à l'obésité que les personnes ayant une obésité de type gynoïde et de nombreuses études ont depuis accentué cette notion.

L'obésité est une maladie dite multifactorielle et parmi ces différents facteurs, le rôle de l'hérédité est bien connu. Plusieurs gènes responsables ont été identifiés et ces derniers interviennent essentiellement sur la production de leptine par les adipocytes ainsi que sur son action (Bluher and Mantzoros, 2009; Farooqi and O'Rahilly, 2009; Farooqi and O'Rahilly, 2008; Prieur *et al.*, 2008).

Cette protéine agit au niveau du SNC sur le contrôle de l'appétit et de la dépense énergétique. L'obésité commune est sans doute une maladie polygénique résultant de l'action de multiples gènes et de facteurs environnementaux. Plusieurs études menées chez des jumeaux monozygotes ont indiqué que les facteurs génétiques représentent une part substantielle des variations dans l'adiposité humaine (Allison *et al.*, 1996; Price and Gottesman, 1991). Cependant, en présence d'une prédisposition génétique à l'obésité, la sévérité de la maladie serait largement déterminée par le style et la qualité de vie. Pour la première fois dans l'histoire de l'humanité, une grande proportion des humains peuvent s'alimenter à suffisance, voire se suralimenter ou s'alimenter sans tenir compte de leurs besoins. Ces constatations ne s'appliquent certes pas à tout le monde mais le sort des obèses est encore plus préoccupant de part la mise en jeu de système périphérique ayant une action sur les mécanismes de stockage. On trouve entre autre une plus grande production de récepteurs  $\alpha$  adrénergiques (facilitant l'accumulation des graisses) (Rozen *et al.*, 1984) ou encore une plus grande sécrétion de ghréline au niveau de l'estomac (qui stimule l'appétit juste avant de manger) (Otto *et al.*, 2005). Enfin, on retrouve également une forte élévation de la sécrétion de neuropeptide Y par l'hypothalamus qui en plus d'augmenter l'apport alimentaire, augmente également la proportion de l'énergie stockée sous forme de graisse (Hanson and Dallman, 1995).

A l'heure actuelle, une baisse des apports énergétiques journaliers est constatée, cependant, ces apports restent toutefois largement supérieurs aux dépenses énergétiques journalières. C'est ce dernier élément qui reste un facteur d'obésité. La qualité de vie est également un facteur important puisque l'on note une augmentation plus importante de la prévalence de cette maladie

dans les catégories sociales les moins aisées. L'obésité n'est donc pas une condition homogène et la distribution régionale du TA est importante dans la compréhension des actions de l'obésité dans les multiples perturbations des métabolismes glucidique et lipidique (Bouchard *et al.*, 1993). L'obésité préfigure parmi les pathologies du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique correspond à l'association, chez un individu, d'au moins trois critères pathologiques dont une élévation du tour de taille, une insulino-résistance, une hyperglycémie, une dyslipidémie ou une pression artérielle élevée (NCEP, 2001; WHO, 1999). L'obésité est donc fréquemment associée à d'autres troubles telles que l'insulino-résistance et le diabète de type 2 ou encore de nombreuses pathologies hépatiques comme le développement de stéatose, de fibrose et cirrhose. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons tout particulièrement aux perturbations métaboliques conduisant au développement d'une stéatose. Ces phénomènes participent à l'augmentation des risques cardio-vasculaires tout comme l'hypercholestérolémie, ou encore l'hypertension. Le diabète de type 2 a atteint des proportions épidémiques dans le monde et l'on estime que 4,4 % de la population mondiale seront touchés dans les 30 années à venir (Wild *et al.*, 2004). Les fondements de cette augmentation spectaculaire du taux de diabète de type 2 n'ont pas encore été totalement élucidés, mais il est volontiers reconnu que la surcharge alimentaire et la sédentarité ainsi que des facteurs génétiques jouent un rôle clé dans ce phénomène. Il a également été montré que l'instauration d'une insulino-résistance dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie précède le développement du diabète de type 2 (Guilherme *et al.*, 2008).

## **2. Le diabète de type 2**

On regroupait autrefois sous le terme de diabète tous les états pathologiques aigus ou chroniques en rapport avec un trouble de la régulation de la glycémie. Actuellement, on a renoncé à donner une définition du diabète et il est plus judicieux de le décrire via ses symptômes et ses complications. *"En l'absence de traitement, le diabète sucré se reconnaît par l'élévation chronique de la concentration de glucose dans le sang. Celle-ci s'accompagne parfois des symptômes suivants: soif intense, diurèse importante, perte de poids et troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel"*. La plupart du temps, les symptômes sont beaucoup moins sévères et il n'y a pas de troubles de la conscience. Il existe plusieurs types de diabètes, les diabètes de type 1, 1 ½ et 2. Cependant, il est cliniquement admis qu'une personne est diabétique si sa glycémie à jeun est supérieure à 1,26g/litre lors de deux mesures successives à deux reprises ou encore supérieure à 2g/litre deux heures après une prise orale de 75g de glucose.

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune qui se caractérise, en plus d'une hyperglycémie, par une hypo-insulinémie due à une destruction de la plus grande partie des cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline. Le diabète de type 1  $\frac{1}{2}$  est un diabète de type 2 présentant des caractères cliniques mais surtout immunologiques le reliant au type 1. Enfin, le diabète de type 2 est une maladie d'installation tardive, dont les signes cliniques ne sont pas clairement définis. Il peut souvent être révélé par une de ses complications, plus que par l'affection originelle : l'installation de l'hyperglycémie chronique caractérisant ce diabète, une insulino-résistance des tissus périphériques (particulièrement au niveau musculaire squelettique), une insulinopénie liée à une ou à des perturbations de l'insulino-sécrétion ou encore une synthèse hépatique de glucose exagérée. Toutefois, ce diabète semble majoritairement être la résultante d'une insulino-résistance associée à une insulinopénie, mais une physiopathologie unique ne saurait expliquer cette maladie hétérogène. Lorsque le fonctionnement des cellules  $\beta$  du pancréas est normal, une hyperinsulinémie compensatrice se met alors en place et permet une homéostasie glucidique normale. Cela correspond à l'état prédiabétique et la transition vers le diabète de type 2 se caractérise alors par une diminution de cette insulinosécrétion compensatrice et par une augmentation de la production hépatique de glucose. La prévalence du diabète de type 2 est en constante augmentation dans le monde entier, approximativement 150 millions des personnes étaient atteints en 2000 et ce nombre pourrait atteindre 300 millions en 2025. Chez les personnes de 75 ans et plus, la prévalence du diabète s'élève à 23 %. Cette dernière est cependant sous-estimée car seulement 50 % des individus diabétiques sont diagnostiqués (Dunstan *et al.*, 2002). L'émergence du diabète de type 2 est déterminée par des facteurs environnementaux et par une prédisposition génétique. En effet, le mode de vie « à l'occidental » (régimes hypercaloriques, consommation excessive de sucres simples, de lipides et/ou carence en fibres, activité physique insuffisante...) favorise le diabète. Les dysfonctions de la sécrétion de l'insuline entraînant une insulinopénie ont probablement une origine génétique, mais des facteurs aggravant interviennent: il s'agit notamment, de l'accumulation de triglycérides (TG) dans le pancréas suite à l'augmentation chronique des concentrations d'acides gras libres (AGL) et de TG dans le plasma, des phénomènes de lipotoxicité. De même, l'hyperglycémie chronique entraîne un phénomène de glucotoxicité sur les cellules  $\beta$  du pancréas, participant ainsi à la diminution de l'insulinosécrétion (Racah *et al.*, 1999).

### 3. Insuline et insulino-résistance

#### 3.1. Insuline

L'insuline est une protéine, de poids moléculaire 60 000, composée de 51 acides aminés, avec une chaîne A (21 acides aminés) et une chaîne B (30 acides aminés) reliées par 2 ponts disulfures (Hodgkin, 1969). L'insuline est synthétisée sous forme de pro-insuline (86 acides aminés), scindée dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans en insuline et Peptide-C par une action combinée de protéases de type trypsine et de type carboxypeptidase B. L'insuline est ensuite sécrétée dans l'espace extracellulaire en réponse à une élévation du taux du glucose dans le sang. L'insuline est une hormone hypoglycémisante qui possède une activité anabolique lui conférant un rôle majeur dans la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques. Elle exerce également des effets sur la croissance, la différenciation cellulaire et l'homéostasie du potassium. Ces effets, qui dépendent de la liaison de l'insuline à son récepteur membranaire spécifique, s'expriment en priorité sur ses trois tissus cibles : le foie, le muscle et le TA. Le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine tétramérique, formée de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires et de deux sous-unités  $\beta$  transmembranaires contenant un domaine tyrosine kinase. Les différentes sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures, ce qui fait de ce récepteur un membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). La liaison à l'insuline est assurée par la sous-unité  $\alpha$  et par la partie extracellulaire des sous-unités  $\beta$ , qui contiennent des sites de liaison de haute et de basse affinité pour l'insuline. La liaison de l'insuline à son récepteur induit des modifications conformationnelles des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , qui permettent l'accès au site catalytique et la *trans*-phosphorylation des résidus tyrosines des sous-unités  $\beta$  (Hubbard, 1997). La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'activation du récepteur et la stimulation par l'insuline induit également la phosphorylation des tyrosines d'un certain nombre de protéines intracellulaires dont IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*). D'autres substrats ayant la même structure ont été identifiés. L'ensemble de ces structures forme la famille des IRS. Les deux principaux représentants, IRS1 et IRS2, jouent des rôles complémentaires dans la signalisation de l'insuline (White, 2002). La stimulation du récepteur de l'insuline est à l'origine de l'activation de deux grandes voies de signalisation : la voie des MAP kinases et la voie de la PI-3 kinase, qui conduisent de manière respective schématiquement aux effets mitogéniques et métaboliques de l'hormone (figure 2).

### 3.2. Insulino-résistance

Bien qu'aucun doute n'existe sur le fait que l'insulino-résistance soit un facteur de risque du diabète de type 2 et de l'intolérance glucidique, une relation entre la résistance à l'insuline et les autres facteurs de risque cardio-vasculaires n'est pas unanimement acceptée. Cependant, l'insulino-résistance apparaît comme l'une des principales causes du syndrome métabolique (Bastard *et al.*, 2001). L'insulino-résistance est favorisée par le développement de l'obésité qui semble voir ses effets délétères augmentés avec ce phénomène. De plus, même si cette insulino-résistance est associée à un plus grand risque de développer une maladie cardiovasculaire, il est toutefois difficile de la dissocier des autres facteurs et d'affirmer avec certitude qu'elle constitue *per se* un facteur de risque indépendant (Ferrannini, 2006; Haffner, 1999). De manière générale, il n'y a pas d'argument formel permettant d'affirmer que l'insulino-résistance, plus que l'obésité, constitue la cause primaire de l'ensemble de symptômes regroupés sous le terme de syndrome métabolique (Groop, 2000).

L'insulino-résistance est donc un état se caractérisant par une réponse biologique diminuée des tissus périphériques à la sécrétion d'insuline. Bien que les effets de l'insuline sur les cellules cibles soient multiples, le terme d'insulino-résistance se réfère presque exclusivement à l'effet de l'insuline sur le maintien de l'homéostasie du glucose. La sensibilité à l'insuline peut être réduite dans de multiples conditions physiologiques (puberté, grossesse, vieillissement ...), sous l'influence de traitements médicaux (Del Prato, 1999) ou en présence de pathologies (obésité, diabète, syndrome métabolique). L'insulino-résistance précède souvent le diabète de type 2 et ces derniers sont liés à des phénomènes inflammatoires caractérisés par une production anormale d'adipokines et par l'activation de voies de signalisations pro-inflammatoires, se traduisant par une induction de marqueurs plasmatiques de l'inflammation.

D'ailleurs, plusieurs arguments suggèrent l'existence d'une inflammation à bas bruit au cours de l'obésité, avec une élévation des concentrations plasmatiques de nombreux marqueurs de l'inflammation (Das, 2002b; Das, 2002a; Engstrom *et al.*, 2003a; Engstrom *et al.*, 2003b; Luc *et al.*, 2003; Mosca, 2002).

Le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) est surexprimé dans le TA de différents modèles animaux d'obésité (Hotamisligil *et al.*, 1993) et est considéré comme une des molécules faisant le lien entre inflammation et obésité. En effet, le TNF- $\alpha$  recombinant altère la sensibilité à l'insuline de cellules ou d'organismes entiers, et les souris déficientes en TNF- $\alpha$  ou en récepteurs du TNF- $\alpha$

présentent une sensibilité accrue à l'insuline par rapport aux animaux témoins (Hotamisligil *et al.*, 1993; Uysal *et al.*, 1997). La surexpression de TNF- $\alpha$  par le TA des modèles animaux d'obésité contribue ainsi très vraisemblablement à l'insulino-résistance.

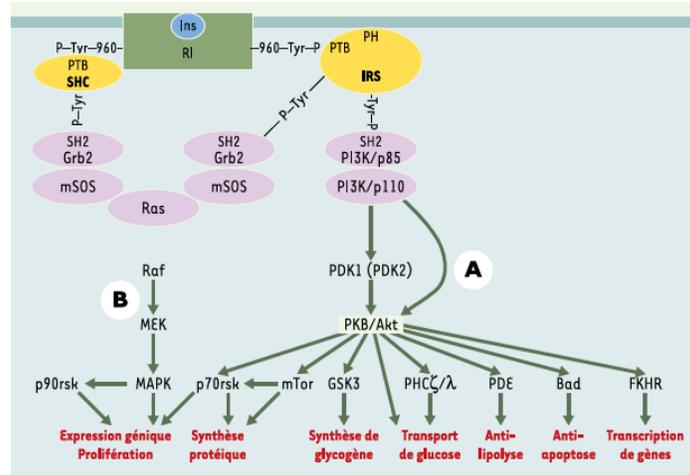


Figure 2. Principales voies de signalisation activées par l'insuline: voies PI3 kinase et MAP kinase (Capeau, 2003). Les protéines IRS (insulin receptor substrate) (en jaune) se positionnent au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique par leur domaine PH (domaine d'homologie avec la pleckstrine) qui reconnaît probablement des phospholipides membranaires. Elles positionnent ainsi leur domaine PTB (phosphotyrosine binding), adjacent au domaine PH, en face de la tyrosine 960 du récepteur de l'insuline (RI) (en vert), et se fixent au RI sur la tyrosine 960 phosphorylée par l'intermédiaire de leur domaine PTB. IRS2 va en outre interagir avec le domaine tyrosine-kinase du RI. La moitié carboxy-terminale des protéines IRS se trouve alors à proximité du domaine tyrosine kinase du récepteur, qui phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques sur les IRS. Les protéines IRS ainsi phosphorylées sont à leur tour reconnues par les domaines SH2 (src homology 2) de protéines relais (en violet), les principales étant la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase, les protéines adaptatrices Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) et CrkII, la tyrosine-kinase Fyn et la phosphotyrosine phosphatase SHP2 (SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2). A. La PI3 kinase est l'une des protéines importantes activées par cette liaison des IRS1 et 2; elle phosphoryle en position 3 les phosphoinositides membranaires, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la protéine kinase B (PKB)/Akt ou la PDK1/2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2). La PKB activée par phosphorylation va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone. La phosphorylation de la glycogène synthase 3 kinase (GSK3)-f3 favorise la synthèse de glycogène. Celle de la kinase p70rsk et du facteur 4E-BP1(4E binding protein 1), via la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin), participe à l'action de l'insuline sur la synthèse protéique en augmentant le niveau général de traduction. La voie PI3 kinase/PKB intervient également dans le contrôle négatif de l'expression génique: en phosphorylant les facteurs de transcription de la famille Forkhead, tels que FKHR, elle permet leur rétention dans le cytosol et les empêche d'activer, au niveau nucléaire, leurs gènes cibles tels que celui de l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxy-kinase. Toujours par la voie PKB, l'insuline exerce un effet anti-apoptotique en phosphorylant et inhibant le facteur pro-apoptotique Bad (Le Roith and Zick, 2001; White, 2002). B. Au départ du récepteur de l'insuline, deux voies aboutissent à l'activation de la voie MAP kinase: via les protéines IRS, la liaison de l'adaptateur Grb2 sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (son of sevenless) qui active la petite protéine G Ras dans la membrane plasmique en stimulant l'échange du GDP contre le GTP. Ras active la kinase Raf, qui phosphoryle alors et active la MAP kinase kinase (MEK) responsable de l'activation par phosphorylation des deux MAP kinases, ERK1 et 2 (extracellular signal-regulated kinase). Celles-ci vont activer la kinase p90rsk impliquée dans la synthèse protéique et vont entrer dans le noyau afin de phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels que p62TCF impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Une deuxième possibilité de mise en route de la voie MAP kinase (à gauche sur la figure) part du récepteur de l'insuline qui recrute sur la tyrosine 960 les protéines adaptatrices de la famille SHC (src homologous and collagen protein) (en jaune), elles-mêmes reconnues par la protéine Grb2 activant la voie Ras.

Deux facteurs transcriptionnels majeurs de l'inflammation, NFκB et AP-1 (*Activating Protein-1*) et leurs enzymes partenaires-clés, respectivement l'IKK (*IκB kinase*) et JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*), ont également été particulièrement étudiés. Un mécanisme largement évoqué est que ces cytokines inflammatoires altèrent la signalisation insulinique par une phosphorylation inactivatrice des résidus sérine/thréonine des IRS. L'implication de ces voies de l'inflammation est également très fortement suggérée par l'effet protecteur de certains composés anti-inflammatoires vis-à-vis de l'insulino-résistance associée à l'obésité. Ainsi l'aspirine est capable d'inhiber les voies IKK et JNK (Gao *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 1998), ainsi que d'autres sérine/thréonine kinases impliquées dans l'insulino-résistance induite par TNF-α. En outre, grâce à ses propriétés antioxydantes, l'aspirine réduit l'activation de NFκB et AP-1 en réponse au stress oxydant (Gao *et al.*, 2003). D'autres médicaments aux propriétés antidiabétiques tels que les thiazolidinediones et les statines possèdent également des propriétés anti-inflammatoires bien documentées. A travers leurs propriétés d'agoniste PPARs, les thiazolidinediones possèdent une action insulino-sensibilisante, qui est peut-être en partie en rapport avec leur capacité à réduire la production de TNF-α dans l'adipocyte ou les effets de cette cytokine dans plusieurs tissus (Moller and Berger, 2003), et à l'inverse à induire l'expression de l'adiponectine. Les statines sont, quant à elles, capables de moduler les fonctions endothéliales et de migration leucocytaire trans-endothéliale, d'inhiber la libération de cytokines pro-inflammatoires, et d'interférer directement sur la voie du NFκB (Weitz-Schmidt, 2002). L'inflammation chronique du TA blanc, caractérisée par une infiltration macrophagique, peut également contribuer à l'insulino-résistance quand celle-ci est associée à l'obésité (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). La présence d'un excès de macrophages pourrait correspondre à la cause et/ou la conséquence de l'état d'inflammation chronique associé à l'obésité (Wellen and Hotamisligil, 2003; Wellen and Hotamisligil, 2005). Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de cette infiltration macrophagique en cas d'excès de développement du TA restent très peu connus. Bien qu'il ait été suggéré que des précurseurs adipocytaires puissent être à l'origine des macrophages présents dans le TA (Charriere *et al.*, 2003; Cousin *et al.*, 2003), on sait désormais que ces derniers proviennent très majoritairement de cellules dérivées de la moelle osseuse (Weisberg *et al.*, 2003). L'adipocyte ainsi que les cellules de la fraction stroma vasculaire sont également capable de synthétiser et de sécréter un très grand nombre de chemokines dont le MCP-1 (*monocyte chemokine chemottractant protein-1*), un facteur

de recrutement des monocytes circulants, qui est surproduit en situation d'obésité (Christiansen *et al.*, 2005).

En outre, l'insulino-résistance induite par les acides gras est, elle aussi, associée à l'activation de la voie pro-inflammatoire IKK/NFκB, entraînant l'expression de cytokines comme le TNFα et IL-6 (Boden *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2006). De plus, les acides gras sont incriminés à plusieurs niveaux dans le développement de l'IR/hyperinsulinémie. Des études sur des hépatocytes isolés de rats ont d'ailleurs montré que de faibles concentrations d'acides gras étaient capables de diminuer la liaison de l'insuline à son récepteur ainsi que sa dégradation (Lefebvre, 2003). Les acides gras, ou leurs métabolites, sont également capables de contrecarrer la cascade de signalisation de l'insuline directement dans le muscle, le foie et le TA et ce, en aval du récepteur. Ils activent une cascade de sérine/thréonine kinases conduisant à la phosphorylation des IRS sur des résidus sérines et thréonines. La phosphorylation de ces résidus perturbe la phosphorylation des résidus tyrosines et l'activation de la PI3K. Cela altère le reste de la cascade de signalisation avec en conséquence, entre autres, une diminution de la translocation de transporteurs du glucose (Sato *et al.*, 2005; Shulman, 2000).

Parallèlement aux acides gras et au syndrome de stockage ectopique des graisses, d'autres mécanismes tels que le stress oxydatif peuvent également contribuer à l'insulino-résistance. En effet, certains acides gras augmentent les espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) notamment par des réactions de peroxydation. Les mécanismes biochimiques de l'insulino-résistance induite par le stress oxydatif sont peu connus mais semblent inclure des modifications de l'expression de certains gènes, en particuliers ceux impliqués dans les mécanismes d'inflammation (NFκB,...) ou encore dans le métabolisme glucido-lipidique (Evans *et al.*, 2003). Des changements de l'expression d'iNOS ont ainsi été impliqués dans l'insulino-résistance (Perreault and Marette, 2001).

Enfin, l'adiponectine, une adipokine fortement impliquée dans les mécanismes de lutte contre l'insulino-résistance pourrait également agir en diminuant la réponse inflammatoire induite par le TNF-α, puisque des études réalisées *in vitro* ont montré qu'en réponse à un traitement par l'adiponectine, les macrophages perdaient une partie de leur activité macrophagique et voyaient leur production de TNF-α diminuée (Ouchi *et al.*, 2000). Il semble que de nombreuses propriétés anti-inflammatoires de l'adiponectine résultent des effets anti-TNF-α, ce qui expliquerait en partie

son rôle protecteur dans l'athérosclérose. En revanche, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 diminuent l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes humains (Bruun *et al.*, 2003).

#### 4. L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine fortement exprimée dans le TA. Elle est connue sous plusieurs noms [ACRP30 (*Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa*) ou adipoQ] chez la souris et [GBP28 (*Gelatin-Binding Protein 28*) ou APM1 (*AdiPose Most abundant gene transcript 1*)] chez l'homme (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Elle est composée de 4 domaines : une séquence de signal sur la région amine terminale suivie d'une région variable sans spécificité, d'un domaine collagène et d'un domaine globulaire carboxyle terminal. Le domaine C-terminal est doté de l'essentiel de l'activité biologique de l'hormone (Kadowaki and Yamauchi, 2005). L'adiponectine se retrouve dans le plasma sous diverses formes moléculaires : une forme monomérique de 30kDa et une forme multimérique. Parmi les multimères, il est nécessaire de distinguer les hexamères (190 kDa) et les formes de haut poids moléculaire (> 300 kDa). Ces structures sont toutes retrouvées dans le plasma et plusieurs études démontrent que la majorité de l'adiponectine circulante se retrouve sous forme de complexes de haut poids moléculaire (>80%) (Halperin *et al.*, 2005; Pajvani *et al.*, 2003; Trujillo and Scherer, 2005). En revanche, les rôles physiologiques et les facteurs de régulation de ces formes circulantes sont encore méconnus (Lafontan and Viguerie, 2006).

Les récepteurs de l'adiponectine, adipoR1 et adipoR2 ont été clonés récemment (Yamauchi *et al.*, 2003a). AdipoR1 a une expression ubiquiste, avec une prédominance musculaire, alors qu'adipoR2 est préférentiellement exprimé dans le foie. L'importance physiologique de ces récepteurs et les voies de signalisation du message adiponectine sont encore à déterminer. Cependant, sa concentration circulante, qui représente 0,01% des protéines plasmatiques, est de l'ordre de 5 à 30 mg/L chez des sujets minces (Arita *et al.*, 1999), alors que celle en leptine n'est que de 2 à 8  $\mu$ g/L (Oral *et al.*, 2002). Le niveau d'expression de ses ARNm est différent selon la localisation du tissu et est plus faible dans le TA viscéral que dans le tissu sous-cutané (Lihn *et al.*, 2004). Contrairement aux autres adipokines, elle possède plusieurs particularités qui font son originalité : (1) les concentrations circulantes d'adiponectine sont diminuées chez les patients obèses insulino-résistants, chez les patients diabétiques de type 2 et chez les sujets présentant une maladie coronaire; (2) il existe une relation étroite entre l'adiponectinémie et la sensibilité à l'insuline et une relation inverse entre l'adiponectinémie et le degré d'obésité chez l'homme, qui

touche plus particulièrement la graisse viscérale; (3) les mécanismes d'action de l'adiponectine en font une molécule qui jouerait un rôle protecteur contre l'athérosclérose et l'insulino-résistance. Au final, l'adiponectine exercerait des effets insulino-sensibilisateurs dans le muscle, le foie et le TA via une régulation fine du métabolisme glucidique et lipidique.

#### **4.1. Action sur le métabolisme glucidique**

Les effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine semblent principalement être dus à des mécanismes moléculaires liés à une augmentation de la captation de glucose par les tissus périphériques et à une diminution de la néoglucogenèse via l'activation de l'AMPK (Barth *et al.*, 2002). Dans les hépatocytes, l'adiponectine potentialise l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de glucose par une diminution de l'expression d'enzymes impliqués dans la néoglucogenèse (PEPCK et G6P) de deux enzymes essentielles de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6P) (Kadowaki and Yamauchi, 2005) entraînant ainsi une réduction de la glycémie (Berg *et al.*, 2001; Combs *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2002). L'adiponectine modifie également la cascade de signalisation de l'insuline *in vivo* en potentialisant la phosphorylation des résidus tyrosines, du récepteur à l'insuline, d'IRS-1 et de la protéine kinase B (PKB) (Yamauchi *et al.*, 2001). Dans les adipocytes, l'adiponectine stimule le captage de glucose en stimulant la translocation des transporteurs du glucose à la surface membranaire des cellules (Maeda *et al.*, 2002; Tomas *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2002).

#### **4.2. Action sur le métabolisme lipidique**

La  $\beta$ -oxydation des AG dans le muscle et dans le foie peut être modulée via les effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine (Fruebis *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003). La diminution du malonyl-CoA intracellulaire aurait alors pour conséquences une réduction de la lipogenèse associée à une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Cette stimulation de l'oxydation des AG conduit à une diminution du contenu en TG dans les tissus, entraînant ainsi une amélioration de la signalisation insulinique. Dans le foie, cette diminution de TG pourrait également résulter d'un captage moins important des lipides plasmatiques (Fruebis *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003). Les mécanismes cellulaires de la stimulation de la  $\beta$ -oxydation des AG par l'adiponectine impliquent une activation de l'AMPK au niveau du muscle squelettique et du foie chez le rongeur (Tomas *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2002). Une fois activée, l'AMPK

phosphoryle l'ACC entraînant son inactivation avec, pour conséquence, une réduction des concentrations intracellulaires en malonyl-CoA. La répression allostérique du malonyl-CoA sur la carnitine palmitoyl transférase (CPT-1) est ainsi théoriquement levée, favorisant le transfert des AG à longues chaînes dans les mitochondries, siège de leur oxydation (Tomas *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2002). L'AMPK joue également un rôle au niveau adipocytaire, en effet, celle-ci entraîne une inhibition de la synthèse du cholestérol via une action sur la régulation des HMG réductases et de la lipase hormono sensible (LHS) (Kemp *et al.*, 2003; Musi, 2006). De plus, la stimulation de l'oxydation des AG par l'adiponectine est en partie PPAR- $\alpha$  dépendante dans le muscle et dans le foie (Yamauchi *et al.*, 2003b). Cette stimulation de la  $\beta$ -oxydation musculaire est également la conséquence du changement d'expression de gènes cibles de PPAR- $\alpha$ , comme FATCD36/FATP-1 (fatty acid transporter-1) ou encore de l'acylCoA oxydase, enzyme clé de la  $\beta$ -oxydation (Yamauchi *et al.*, 2001).

#### **4.3. Autres rôles de l'adiponectine**

Outre ses effets sur la sensibilité à l'insuline, l'adiponectine exercerait un effet protecteur vasculaire, en agissant très précocement dans le processus d'athérogenèse, en intervenant dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires (Ouchi *et al.*, 1999), la transformation des macrophages en cellules spumeuses (Ouchi *et al.*, 2001), et en modulant la prolifération des cellules musculaires lisses (Arita *et al.*, 2002). De plus, l'adiponectine pourrait agir en diminuant la réponse inflammatoire induite par le TNF- $\alpha$ , puisque des études réalisées *in vitro* ont montré qu'en réponse à un traitement par l'adiponectine, les macrophages perdaient une partie de leur activité macrophagique et voyaient leur production de TNF- $\alpha$  diminuée (Ouchi *et al.*, 2000). Il semble que de nombreuses propriétés anti-inflammatoires de l'adiponectine résultent des effets anti-TNF- $\alpha$ , ce qui expliquerait en partie son rôle protecteur dans l'athérosclérose. En revanche, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 diminuent l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes humains (Bruun *et al.*, 2003). L'adiponectine semble donc être une cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre l'obésité. Actuellement, les traitements de l'obésité et des pathologies associées s'appuient sur des stratégies variées comme l'utilisation de divers régimes alimentaires, le maintien d'une activité physique suffisante ou encore des médicaments. Ce dernier point est délicat au vu du nombre de causes possibles pouvant conduire au développement de l'obésité. En effet, peu de composés pharmaceutiques

s'avèrent véritablement efficaces. Parmi ceux là, nous pouvons trouver la Sibutramine (Meridia) qui est un inhibiteur de la recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline ou encore l'Orlistat (Xenical) qui est un inhibiteur de la lipase gastro-intestinale. Une nouvelle stratégie pharmacologique vise à étudier les effets du système endocannabinoïdien (SEC). Ce système physiologique récemment découvert joue un rôle important dans la régulation de l'apport alimentaire, le stockage et le métabolisme des graisses et du glucose. Ainsi, l'hyperactivité de ce système est associée à l'obésité et à des troubles métaboliques tels qu'une diminution des taux plasmatiques d'adiponectine (Whitehead *et al.*, 2006).

## II. Le système endocannabinoïdien

### 1. Historique

L'intérêt du SEC dans l'obésité vient des observations faites depuis des millénaires qui rapportent une augmentation de la prise alimentaire chez les consommateurs de cannabis. Les vertus de la plante *Cannabis sativa* sont connues depuis des siècles ; son utilisation dans la pharmacopée chinoise remontant à plus de 2000 ans avant J.-C. Ainsi, le cannabis a été recommandé au fil des siècles dans plusieurs usages, par exemple pour le traitement de la douleur, de l'asthme, de la dysenterie, des nausées et des vomissements ainsi que dans des cas de spasmes et de convulsions. Dans certaines sociétés, comme en Inde, le cannabis fut également utilisé comme traitement de l'inappétence. Au XIX<sup>e</sup> siècle, des médecins rapportaient que les consommateurs de cannabis mangeaient plus (Abel, 1975). Cependant, au début du XX<sup>e</sup> siècle, son emploi a été proscrit de la médecine occidentale. L'un des premiers protocoles pour vérifier l'hypothèse d'une action du cannabis sur l'appétit fut conduit chez des soldats en 1933. Ceux ayant consommé de la marijuana décrivaient une sensation de faim et mangeaient plus que les contrôles (Siler *et al.*, 1933). Depuis l'identification du principal constituant psychoactif du cannabis, le delta-9-tétrahydrocannabinol ( $\Delta$ -9-THC) en 1964 (Gaoni and Mechoulam, 1964), la chimie des cannabinoïdes a subi un essor fulgurant et permis l'identification de deux types de récepteurs cannabinoïdes, d'un système cannabinoïdien endogène (ou endocannabinoïdien) et de la mise en évidence du rôle essentiel de ce système dans la modulation neuronale (tableau 1). De nombreuses études portant sur l'utilisation des cannabinoïdes en clinique ont suscité un intérêt marqué dans le domaine médical et les recherches sur le sujet ne cessent de réaliser d'énormes

progrès au niveau de la compréhension du système cannabinoïde et de ses applications thérapeutiques possibles.

Tableau 1 : Bref historique du SEC.

ANNEE	DECOUVERTE
1964	Identification du $\Delta^9$ -THC (Gaoni and Mechoulam, 1964)
1988	Identification des récepteurs à hautes affinités CB dans le cerveau (Devane <i>et al.</i> , 1988)
1990/1991	Clonage des récepteurs CB1 du rat (Matsuda <i>et al.</i> , 1990) et de l'homme (Gerard <i>et al.</i> , 1991)
1992	Identification du premier endocannabinoïde: l'anandamide (Devane <i>et al.</i> , 1992)
1993	Clonage des récepteurs CB2 périphériques (Munro <i>et al.</i> , 1993)
1994	Développement du 1er antagoniste aux récepteurs CB1: le Rimonabant (Rinaldi-Carmona <i>et al.</i> , 1994)
1995	Deuxième endocannabinoïde identifié: 2-arachidonoyl-glycérol (Mechoulam <i>et al.</i> , 1995)
1996	Identification d'une enzyme spécifique de dégradation de l'anandamide: FAAH (Cravatt <i>et al.</i> , 1996)
1998	Le Rimonabant permet une diminution de masse corporelle (Colombo <i>et al.</i> , 1998)
1999	Génération du modèle murin CB1-/- (Ledent <i>et al.</i> , 1999)
2003-2006	Découverte des effets métaboliques périphériques du système ECD (Engeli and Jordan, 2006)
2004	Les endocannabinoïdes ont un rôle de neurotransmetteur (Di Marzo <i>et al.</i> , 2004)
2004	Identification de l'enzyme de synthèse de l'anandamide: NAPE-FLD (Okamoto <i>et al.</i> , 2004)
2005/2006	Publication des résultats de l'étude RIO, description de l'activation de ce système chez l'obèse (Engeli and Jordan, 2006)

$\Delta^9$ -THC = delta9-transstérahydrocannabinol, CB = cannabinoïde, FAAH = fatty acid amine hydrolase, NAPE-FLD = N-acylphosphatidyléthanolamine phospholipase D, RIO = Rimonabant in obesity.

## 2. Les cannabinoïdes et leurs récepteurs

Depuis l'identification en 1964 du principal constituant psychoactif du cannabis, le  $\Delta^9$ -THC, de plusieurs autres cannabinoïdes naturels (cannabinol, cannabidiol, cannabigérol, etc.) et avec un intérêt grandissant pour ce système, des études ont permis de mettre en évidence les dérivés actifs de la marijuana, leurs récepteurs principaux ainsi que des ligands endogènes.

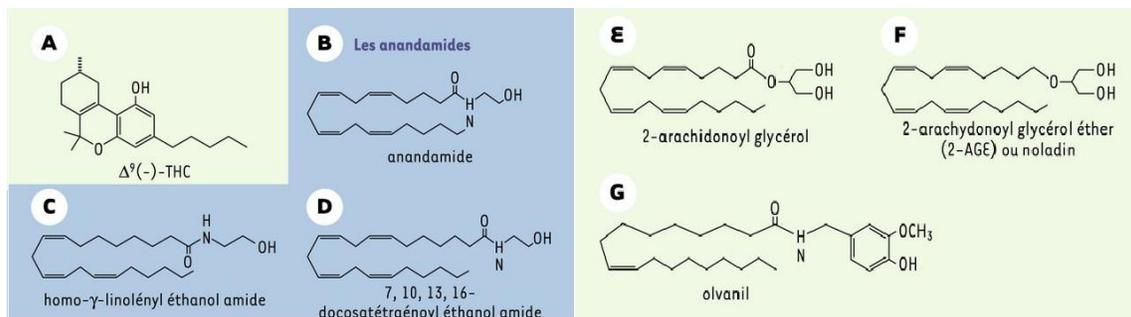


Figure 3 : Structures chimiques des principaux cannabinoïdes (Venance *et al.*, 2004). Cannabinoïde exogène naturel :  $\Delta^9$ (-)-THC (A), des endocannabinoïdes (EC): anandamide (AEA) (B), homo- $\gamma$ -linolényl éthanol amide (C), docosatétraénoyl éthanol amide (D), 2-arachidonoyl glycérol (2-AG) (E) et 2-arachidonoyl glycérol éther (F), ainsi que de l'olvanil (G), agoniste des récepteurs vanilloïdes VR1.

## 2.1. Les cannabinoïdes et endocannabinoïdes

Les ligands cannabinoïdes peuvent être classés en trois familles : Les ligands exogènes naturels, les ligands endogènes et les ligands synthétiques (figure 3).

### 2.1.1. Ligands exogènes naturels

Il s'agit de tous les composés produits par la plante *Cannabis sativa* qui sont capables de se lier à un récepteur cannabinoïde et d'activer les voies de signalisation couplées à ce récepteur. On en compte plus de 60, dont le plus abondant et le plus actif est le  $\Delta^9$ -transtétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC). D'autres, moins abondants, sont représentés par le  $\Delta^8$ -THC (actif), ainsi que le cannabinol et le cannabidiol (beaucoup moins actifs) (Gaoni and Mechoulam, 1964; Pertwee, 1999).

### 2.1.2. Ligands endogènes

Une molécule endogène capable d'activer un récepteur cannabinoïde (CBR) est appelée endocannabinoïde (EC). Les deux principaux EC sont l'anandamide (AEA), un agoniste des CB1R (Devane *et al.*, 1992b), et le 2-arachidonoyl glycérol (2-AG), un agoniste des CB1R et CB2R (Mechoulam *et al.*, 1995). Ces composés, de structure lipidique, ont une demi-vie très courte et sont catabolisés par une enzyme, la FAAH (fatty acid aminohydrolase). Ces ligands sont produits massivement à la suite d'une augmentation de calcium intracellulaire dans différents tissus, en particulier dans le SNC, où ils vont moduler la libération de neurotransmetteurs. Les EC ne sont pas des neurotransmetteurs; leur synthèse et leur métabolisme leur suggèrent plutôt un rôle de neuromodulateurs puisqu'ils sont synthétisés «à la demande» et qu'ils ne sont pas stockés dans des vésicules synaptiques du fait de leur nature lipidique. De plus, les EC agissent de façon rétrograde au niveau synaptique pour inhiber la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA, la glycine, la noradrénaline, la sérotonine, l'acétylcholine et de nombreux neuropeptides (Venance *et al.*, 2004). Le cycle de vie des EC (synthèse, sécrétion, action sur leurs récepteurs et hydrolyse) est résumé dans la figure 4 ; diverses stratégies de modulation de leur activité y sont également indiquées.

### 2.1.3. Ligands synthétiques

Parmi ces molécules modifiées chimiquement, on trouve principalement trois familles de composés présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Présentation des 3 principales familles chimiques ayant une activité de liaison aux récepteurs aux cannabinoïdes.

		Ligands synthétiques	action
<b>cannabinoïdes dits " classiques"</b>		HU-210	agoniste CB1R et CB2R
<b>dérivant du <math>\Delta^9</math>-THC</b>		CP-55940	agoniste CB1R et CB2R
<b>Amylolkylindoles</b>		WIN-55212-2	agoniste CB1R et CB2R
<b>Dérivés pyrazols</b>	Diarylpyrazoles	SR141716A SR1414528 MK 0364	antagoniste CB1R antagoniste CB2R antagoniste CB1R
	Arylpyrazoles	AM251 AM881	antagoniste CB1R antagoniste CB1R
	substitus benzofuranes	AM630 LY 320135	antagoniste CB2R antagoniste CB1R

HU-210 (Devane *et al.*, 1992a), CP-55940 crée par le groupe pharmaceutique Pfizer in 1974, WIN-55940 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994; Showalter *et al.*, 1996), SR141716A (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994), SR144528 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998), MK 0364 (Fong *et al.*, 2007), AM 251 (Gatley *et al.*, 1996), AM281 (Lan *et al.*, 1999), AM630 (Ross *et al.*, 2002), LY320135 (Felder *et al.*, 1998).

La plupart des antagonistes des CB1R, en plus de bloquer la liaison récepteur-ligand, conduit à des effets biologiques inverses de ceux déclenchés par les agonistes du CB1R, c'est pourquoi ils sont qualifiés d'agonistes inverses. Deux hypothèses peuvent expliquer ces effets : (1) ces récepteurs sont constitutivement activés par une production endogène de cannabinoïdes et (2) les récepteurs sont constitutivement actifs en l'absence de ligand. Il est difficile de trancher entre ces deux hypothèses et notamment d'exclure une production endogène de cannabinoïdes dans le système étudié. Cependant, l'activité constitutive du CB1R a pu clairement être démontrée dans les cellules CHO surexprimant le CB1R dans lesquelles le SR141716A stimule la production d'AMPc alors que ces cellules ne produisent pas d'EC (Bouaboula *et al.*, 1997).

## 2.2. Synthèse et dégradation des EC

Les EC les mieux caractérisés sont donc l'AEA formé à partir de dérivés de phospholipides membranaires dérivant de l'acide arachidonique et le 2-AG qui dérive des TG. Ces composés de structure lipidique sont produits localement et ont une  $\frac{1}{2}$  vie très courte (Di Marzo *et al.*, 2005). Les voies conduisant à leur synthèse et leur dégradation sont représentées dans la figure 4. La synthèse des EC est plus ou moins élevée en fonction du

besoin. Contrairement à de nombreux neurotransmetteurs, les EC ne sont pas stockés dans des vésicules mais plutôt synthétisés à la demande en réponse à une stimulation aiguë. Cette réponse passe par un accroissement en  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui initie la synthèse et le relargage des EC. La production et la dégradation des EC sont des phénomènes très rapides (Engeli *et al.*, 2005).

### **2.2.1. Mécanisme de synthèse de l'anandamide**

L'AEA est constitué d'acide arachidonique liée à de l'éthanolamine par une liaison amide. Il est synthétisé en deux étapes : (1) le précurseur de l'anandamide ; la N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine est produite par l'action de la N-acyltransférase qui catalyse le transfert intermoléculaire de l'acide arachidonique sur l'éthanolamine de la phosphatidyl-éthanolamine (Cadas *et al.*, 1997). La N-acyltransférase est régulée par deux seconds messagers : le calcium et l'AMPc (Cadas *et al.*, 1997). (2) Le clivage de la N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine par une phospholipase D spécifique (N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D ; NAPE-PLD) libère l'AEA et un acide phosphorique par un mécanisme calcium dépendant (Piomelli *et al.*, 1999). Les concentrations d'AEA dans le cerveau sont comparables à celles d'autres neurotransmetteurs et les concentrations les plus fortes sont retrouvées dans les zones où l'expression du CB1R est la plus importante, l'hippocampe, le cervelet ou encore le cortex (Di Marzo *et al.*, 1994; Felder *et al.*, 1996). L'AEA possède une plus forte affinité pour le CB1R ( $K_i$  e61: 543nM) que pour le CB2R ( $K_i$  e279: 1940nM) (Lopez-Moreno *et al.*, 2008).

### **2.2.2 Mécanisme de synthèse du 2-arachidonoyl glycérol**

Le 2-AG est un monoacylglycérol constitué d'acide arachidonique lié au carbone 2 d'un glycérol par une liaison ester. Il est à l'intersection de nombreuses voies du métabolisme lipidique, rendant difficile l'identification de ses voies de synthèse. Toutefois, deux voies ont été identifiées (Piomelli, 2003) : (1) un phosphatidylinositol est clivé en 1,2-diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (Stella *et al.*, 1997). Le DAG est ensuite hydrolysé par la DAG lipase afin de libérer le 2-AG (Farooqui *et al.*, 1989). (2) un phosphatidylinositol est clivé par la PLA1 (Higgs and Glomset, 1994) afin de produire du 2-arachidonoyl-lysophospholipide, qui à son tour est hydrolysé par la lyso-PLC en 2-AG. La formation du 2-AG est déclenchée par la stimulation de l'activité neuronale ou en réponse à l'activation de certains récepteurs (notamment ceux de l'acétylcholine) (Higgs and Glomset, 1994).

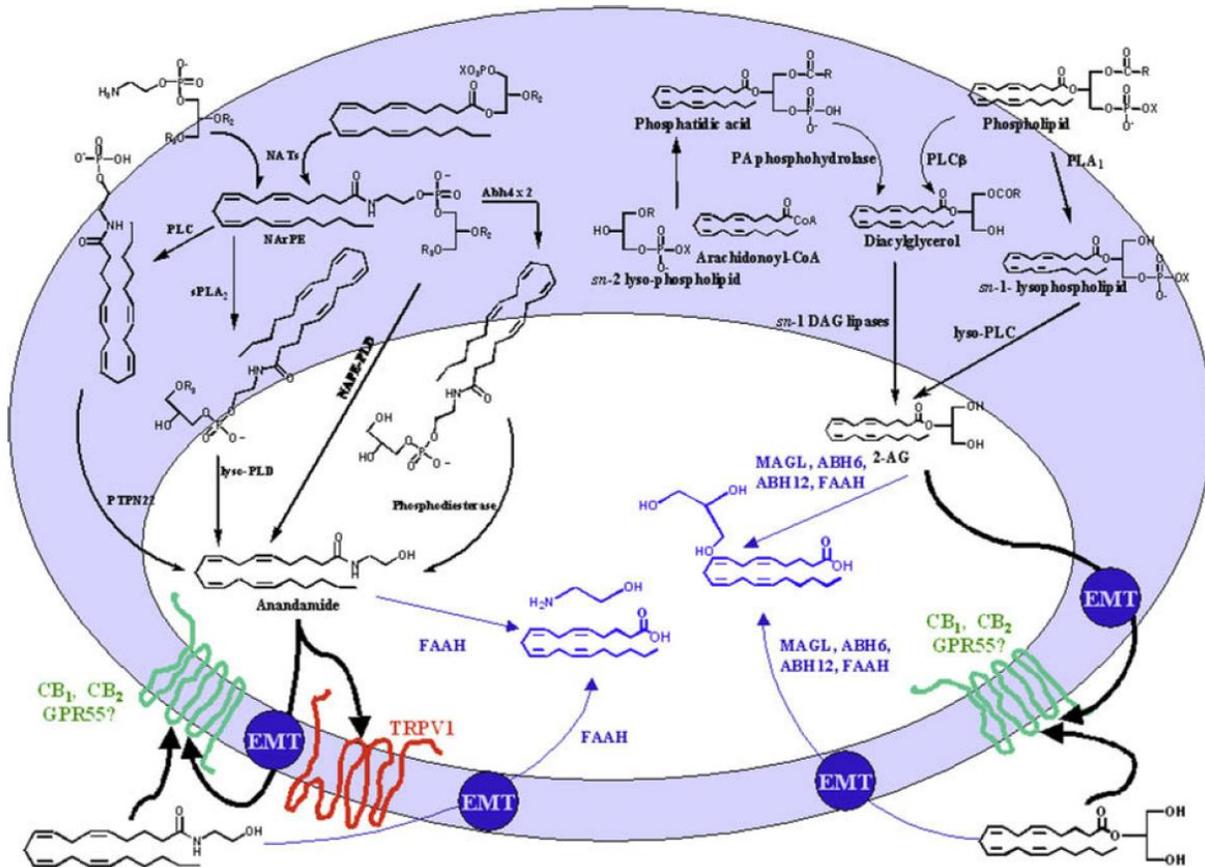


Figure 4. Biosynthèse, activation et inactivation des deux EC les plus connus, l'AEA et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (De Petrocellis and Di Marzo, 2009). Différentes voies peuvent exister à la fois pour la formation et le catabolisme de l'AEA et du 2-AG. Le premier provient d'un précurseur phospholipidique, N-arachidonoyl-phosphatidyl-éthanolamine (NArPE), formé à partir de la N-arachidoylation de phosphatidylethanolamine via l'action de N-acyltransférases (NAT). NArPE se transforme en AEA via quatre voies alternatives possibles. La plus directe est catalysée par une N-acyl-phosphatidyléthanolamine sélectives de la phosphodiesterase (NAPE-PLD). Le 2-AG quant à lui, est produit presque exclusivement par l'hydrolyse de diacylglycérols (DAG) via des DAG lipases a et b sn-1-sélectives (DAGLs). Après une réabsorption cellulaire par un mécanisme restant à élucidé (EMT), l'AEA est métabolisé par la FAAH et le 2-AG via plusieurs monoacylglycérol-lipases (MAGLs) même si ce dernier peut également être dégradé par la FAAH. Les deux EC activent les CB1R et CB2R avec une affinité différente (l'AEA ayant l'affinité la plus forte pour les 2 récepteurs) et une efficacité différente (le 2-AG possédant l'efficacité la plus élevée dans les deux cas). L'AEA peut également activer les récepteurs TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type-1) et interagir avec plusieurs autres cibles moléculaires, alors que les deux composés semblent capables d'interagir avec GPR55, une protéine G couplée à un récepteur orphelin. Abh4,6,12 : ab-hydrolases4,6,12; PLD : phospholipase D; PLA1/2 : phospholipase A1/A2; PTPN22 : protein tyrosine phosphatase N22. Les voies de biosynthèse sont représentées en noir et celles de dégradation en bleu.

Dans le cerveau, le 2-AG est un intermédiaire important pour de nombreuses voies biochimiques et est présent à des concentrations 200 fois supérieures à l'AEA (Piomelli, 2003). Le 2-AG se lie avec une affinité comparable aux récepteurs CB1 et CB2 (Ki e400- 1400) (Lopez-Moreno *et al.*, 2008).

### 2.2.3 Mécanismes de dégradation des EC

La dégradation des endocannabinoïdes implique une étape de recapture dans le cytosol et une hydrolyse par des sérines hydrolases spécifiques. Les mécanismes de recapture des endocannabinoïdes dans le cytosol sont encore méconnus et très controversés. Plusieurs équipes ont avancé l'hypothèse de la présence d'un transporteur sur la base de critères biochimiques et pharmacologiques (Hillard *et al.*, 1997; Piomelli, 2003; Ronesi *et al.*, 2004). Une fois dans le cytosol les EC sont alors métabolisés par des sérines hydrolases intracellulaires spécifiques: la fatty acid amide hydrolase (FAAH) pour l'AEA (Cravatt *et al.*, 1996) et la monoacylglycérol lipase (MAGL) pour le 2-AG (Dinh *et al.*, 2002). Toutefois, il a été récemment montré que la FAAH pouvait également hydrolyser le 2-AG (Blankman *et al.*, 2007; Di Marzo, 2008b).

## 2.3. Les récepteurs aux EC

### 2.3.1. Les récepteurs CB1 et CB2

Les EC se lient à des récepteurs couplés à des protéines G. Ces récepteurs sont notés CB1R et CB2R (Figure 5). Le gène codant pour le CB1R (ou récepteur central) a été cloné par Matsuda *et al* en 1990 puis 3 ans plus tard, Munro *et al* ont cloné le gène codant pour un autre récepteur nommée CB2 (ou récepteur périphérique) (Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993).

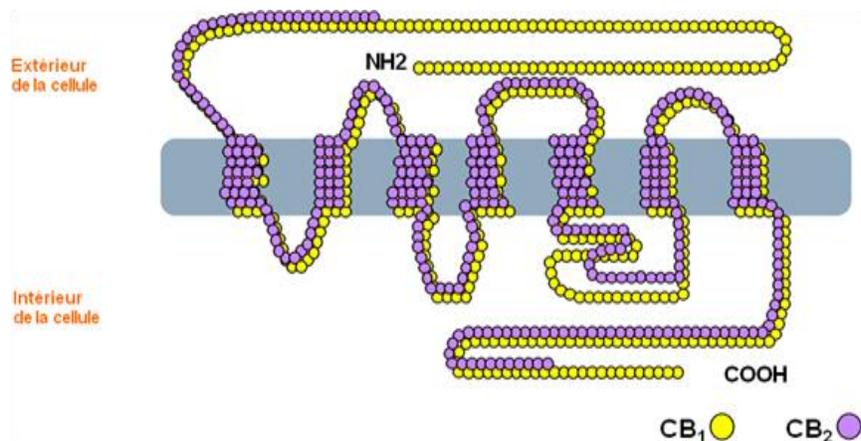


Figure 5 : Structure moléculaire des CB1R et CB2R (droits réservés).

La localisation et les principaux sites d'action des récepteurs aux cannabinoïdes sont représentés en figure 6. CB1R est le plus représenté dans le SNC des mammifères et est trouvé dans de nombreuses régions du cerveau (bulbe olfactif, cortex, hypothalamus, noyau accumbens, etc). Les CB1R sont principalement localisés au niveau du SNC, et également le long des voies de la douleur (neurones afférents primaires et moelle épinière) (Agarwal *et al.*, 2007; Lever and Rice,

2007). Ils sont également présents dans de nombreux tissus périphériques comme le tractus gastro-intestinal, le foie, les muscles squelettiques, le TA, les os et l'utérus (Engeli and Jordan, 2006).

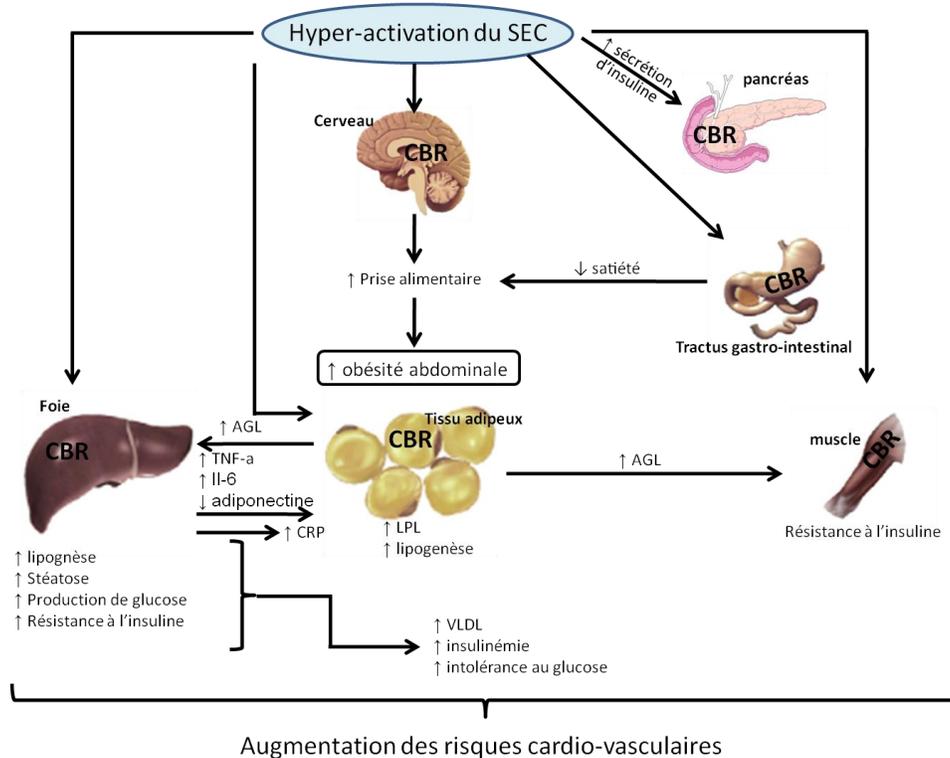


Figure 6 : Contribution de l'hyperactivité du système endocannabinoïdien aux anomalies métaboliques associées à l'obésité viscérale. Le SEC agit essentiellement au niveau du cerveau, du tissu adipeux, du foie, du tractus gastro-intestinal, du pancréas et des muscles squelettiques. Ces différents effets seront développés en détails dans ce chapitre. Adapté de (Despres *et al.*, 2006).

Ce récepteur est essentiellement localisé sur les cellules endothéliales. Chez l'Homme et le rongeur, l'expression du CB1R est plus élevée dans les adipocytes que dans toutes les autres cellules périphériques (Bensaid *et al.*, 2003; Cota *et al.*, 2003). L'expression des CB2R, quant à elle, semble restreinte aux tissus périphériques occupant des fonctions immunitaires, bien que ces récepteurs aient été également décelés dans les adipocytes humains (Engeli and Jordan, 2006), dans le cerveau, les ganglions de la racine dorsale, la moelle épinière, les neurones sensitifs, la microglie et les tissus périphériques (Jhaveri *et al.*, 2007). Le rôle de CB2 dans la biologie de l'adipocyte ainsi que les régulations métaboliques reste peu connu à ce jour.

Du fait de cette distribution, le CB1R est plutôt associé aux effets psychotropes des cannabinoïdes et CB2 aux effets immunomodulateurs. Il a été montré que l'AEA est également capable, à forte dose (10  $\mu$ M), de se lier à un récepteur de type canal calcique, le récepteur

vanilloïde (Di Marzo *et al.*, 1998; Howlett and Mukhopadhyay, 2000; Smart *et al.*, 2000; Zygmunt *et al.*, 1999).

### **2.3.2. Les récepteurs aux cannabinoïdes non-CB1/2**

La mise au point d'antagonistes des CB1R et CB2R ainsi que de modèle de souris invalidées pour les gènes de ces récepteurs a permis de mettre en évidence certains effets biologiques des cannabinoïdes indépendants de leurs récepteurs classiques.

#### 2.3.2.1 Le récepteur vanilloïde

C'est le récepteur de la capsaïcine, composé exogène responsable de la sensation de chaleur procurée par le piment (Szallasi and Blumberg, 1999). C'est un récepteur canal cation non-sélectif nommé TRPV1 ou VR1 (Caterina *et al.*, 1997) s'ouvrant sous l'effet d'un stimulus thermique supérieur à 48°C. Ce récepteur est particulièrement abondant dans les neurones sensoriels mais est exprimé également dans certaines autres zones du cerveau (Mezey *et al.*, 2000). L'AEA est un agoniste du récepteur vanilloïde. En effet, ce dernier provoque certains effets caractéristiques de l'activation de ce récepteur comme la stimulation de l'apoptose de cellules de lymphome et de neuroblastome (Maccarrone *et al.*, 2000), ou encore la vasodilatation des artérioles endothélium-indépendant (Zygmunt *et al.*, 1999). Tous ces effets sont bloqués par un antagoniste sélectif du récepteur VR1, la capsazépine.

#### 2.3.2.2. Le récepteur putatif de l'abnormal cannabidiol

En 1999, Wagner et al ont décrit des effets vasodilatateurs de l'AEA et du R-méthanandamide sur des artères mésentériques isolées (Wagner *et al.*, 1999). Ces effets sont reproduits en utilisant de l'abnormal cannabidiol, qui ne se lie pas aux CB1R et CB2R, tandis que ni les agonistes synthétiques, ni le  $\Delta^9$ THC ne peuvent reproduire ces effets (Jarai *et al.*, 1999; Wagner et al., 1999). Cependant, l'antagoniste CB1R SR141716A bloque les effets de l'AEA, du R-méthanandamide et de l'abnormal cannabidiol sur l'endothélium vasculaire (Chaytor *et al.*, 1999; Jarai *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999) et ce blocage n'est pas retrouvé avec un autre antagoniste des CB1R, l'AM251 (Ho and Hiley, 2003; White *et al.*, 2001). Ces données suggèrent l'existence de sites de liaison de l'AEA et du R-méthanandamide sur des récepteurs distincts des CB1R et CB2R.

#### 2.3.2.3. Le récepteur GPR55

Le récepteur GPR55 (Ryberg *et al.*, 2007) a longtemps été considéré comme un récepteur couplé à une protéine G orpheline. On sait maintenant qu'il est capable de lier plusieurs composés dont le CP55940 (cannabinoïde synthétique aminoalkylindol), le cannabidiol, l'AEA et la virodhamine ainsi que l'abnormal cannabidiol. Ce récepteur possède une faible homologie de séquence avec les CB1R et CB2R et est différent du récepteur de l'abnormal cannabidiol car les effets vasodilatateurs de l'abnormal cannabidiol non induits par les CB1R sont conservés chez les souris GPR55<sup>-/-</sup> (Johns *et al.*, 2007; Maccarrone *et al.*, 2000). Le récepteur GPR55 est préférentiellement exprimé dans les glandes surrénales, l'intestin, et le cerveau mais dans de moindres proportions que le CB1R (Ryberg *et al.*, 2007). GPR55 semble jouer un rôle dans les neuropathies car des souris GPR55<sup>-/-</sup> sont résistantes à la douleur via un mécanisme impliquant une augmentation des cytokines anti-inflammatoires (Staton *et al.*, 2008).

#### 2.3.2.4. Le récepteur hippocampal des cannabinoïdes non-CB1

Le CB1R est impliqué dans l'inhibition du courant exciteur post-synaptique induite par le glutamate (Stella *et al.*, 1997). Cependant, Hajos *et al.* ont montré que WIN55212-2 pouvait inhiber le courant exciteur post-synaptique provoqué par une stimulation monosynaptique sur des neurones de l'hippocampe de souris sauvages, mais également de souris CB1<sup>-/-</sup> (Hajos *et al.*, 2001). Cet effet est sensible à la toxine pertussique, au SR141716A mais non sensible à l'AM251 (Hajos and Freund, 2002). Cela suggère l'existence d'un récepteur couplé aux protéines Gi/0 autre que CB1R et sensible au SR141716A. Il a tout d'abord été envisagé que ce récepteur soit similaire au récepteur de l'abnormal cannabidiol. Néanmoins sa sensibilité au WIN55212-2 (et l'absence de sensibilité du récepteur de l'abnormal cannabidiol à ce ligand) démontre que ces deux récepteurs putatifs sont bien distincts.

#### 2.3.2.5. Le récepteur CB2-like

Le palmitoylethanolamide est un amide d'AG ne se liant ni au CB1R ni au CB2R (Felder *et al.*, 1995). Cependant, il exerce un effet antinociceptif bloqué par le SR144528 (Calignano *et al.*, 1998) et potentialise la migration de la microglie de façon toxine pertussique sensible (Franklin and Stella, 2003). Ces résultats suggèrent l'existence d'un récepteur couplé à Gi/0 appelé CB2 «like» en raison de sa sensibilité au SR144528, antagoniste des CB2R.

## **2.4. Signalisation intracellulaire des récepteurs cannabinoïdes**

La majorité des effets biologiques décrits pour les cannabinoïdes sont induits par un couplage à la protéine G de type Gi/Go, sensible à la toxine pertussique. Il semble que les CB1R puisse se coupler aux deux types de protéines Gi et Go, alors que CB2 se couplerait préférentiellement à Go (Glass and Northup, 1999). Cette différence de couplage pourrait expliquer la variation d'efficacité du  $\Delta^9$ -THC (cannabinoïde principal du cannabis) à activer ces CB1R et CB2R. En effet, bien que le  $\Delta^9$ -THC se lie avec la même affinité aux deux récepteurs, il active les CB1R mais pas, ou seulement de façon partielle, les CB2R (Bayewitch *et al.*, 1996). Les CB1R et CB2R peuvent avoir une activité basale constitutive en l'absence de ligand agoniste. Dans ce cas, les antagonistes SR141716 et SR144528 qui bloquent cette activité constitutive se comportent comme des agonistes inverses (Bouaboula *et al.*, 1999; Bouaboula *et al.*, 1997; Glass and Northup, 1999).

L'activation des récepteurs cannabinoïdes agit principalement sur trois grandes voies de signalisation intracellulaires auxquelles ils sont couplés : l'adénylate cyclase, la voie des MAP (mitogen-activated protein)-kinases et certains canaux ioniques (action spécifique *via* les CB1R) (figure 6). À travers ce couplage Gi/Go, l'activation des CB1R ou CB2R induit simultanément un signal inhibiteur et un signal activateur, dont les prévalences respectives dépendent du type cellulaire.

### **2.4.1. Inhibition de l'adénylate cyclase**

L'adénylate cyclase est l'enzyme responsable de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), l'un des principaux seconds messagers intracellulaires.

L'inhibition est réversible, dose-dépendante et médiée par une protéine G (Gi/o) (Howlett and Fleming, 1984; Howlett *et al.*, 1986) ; la baisse d'AMPc dans la cellule entraîne une inhibition de la protéine kinase A (PKA) et l'augmentation des protéines phosphorylées en tyrosine, comme la protéine kinase FAK (focal adhesion kinase) (Derkinderen *et al.*, 1996). Il a également été montré que les CB1R pouvaient être couplés à la protéine Gs : on observe alors une augmentation du taux d'AMPc et donc une activation de la PKA. Ce couplage des CB1R à Gs n'est visible que dans le cas où la protéine Gi est inhibée (par la toxine pertussique). Les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase par une protéine G de type Gi/o. Des différences quantitatives suggèrent qu'il existe des variations d'efficacité de couplage suivant les récepteurs cannabinoïdes dans les différentes régions du cerveau (Piomelli, 2003).

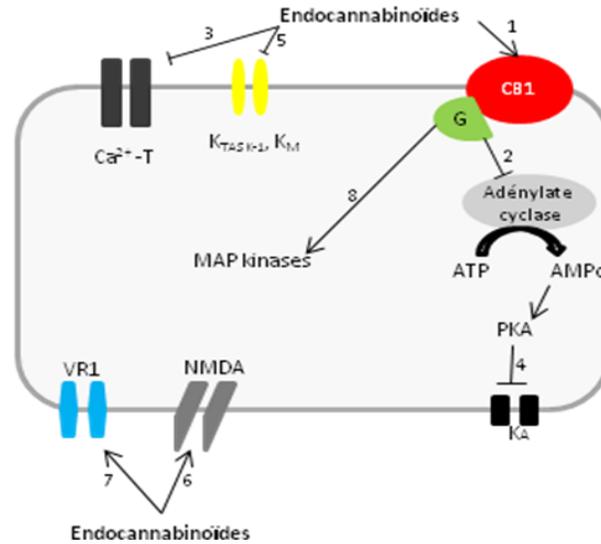


Figure 7 : Principales voies de transduction du signal modifiées après action des EC via les CB1R, VR1 ou par action directe (Venance et al., 2004). L'activation des CB1R et CB2R par les EC (1) conduit à une inhibition de l'activité cyclasique (2). Cet effet est inhibé par un traitement par la toxine pertussique, révélant ainsi l'intervention d'une protéine G de type Gi/o dans le couplage récepteur-enzyme (Ameri, 1999; McAllister and Glass, 2002). L'AEA et le 2-AG sont des agonistes entiers de l'inhibition de l'adénylate cyclase via les CB1R. En revanche, seul le 2-AG est agoniste entier au niveau du CB2. Dans certaines conditions, l'activation du CB1R (et pas le CB2R) conduit à une production d'AMPc via une protéine de type G<sub>s</sub>. Dans ce cas, l'AEA devient un agoniste partiel des CB1R, contrairement au 2-AG qui reste agoniste entier. L'activation du CB1R provoque également une inhibition directe des canaux de type T (Chemin et al., 2001)(3) par le biais d'une protéine Gi/o mais indépendante de l'activité cyclasique. L'activation des CB1R diminue la sensibilité au potentiel de membrane des canaux potassiques de type A (K<sub>A</sub>) (4), via une protéine Gi/o et de façon dépendante de l'inhibition de la voie adénylate cyclase/protéine kinase A (PKA) (Ameri, 1999; McAllister and Glass, 2002). De plus, les EC inhibent deux autres types de canaux potassiques: des canaux de fuite sensibles aux protons (TASK-1) et les canaux de type M (K<sub>M</sub>) (Maingret et al., 2001; Schweitzer, 2000) (5). L'AEA a un double effet, inhibiteur et stimulateur, sur les récepteurs du glutamate de type NMDA (M-méthyl-D-aspartate) (Ameri, 1999; McAllister and Glass, 2002). L'inhibition est une conséquence indirecte de l'inhibition des conductances Ca<sup>2+</sup> de type P/Q après activation du CB1, tandis que l'activation résulte d'un effet direct des EC sur le récepteur NMDA (6), conduisant à une augmentation de l'influx calcique à travers le canal. L'activation par les EC de la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) (Ameri, 1999; McAllister and Glass, 2002) (8) déclenche une cascade aboutissant in fine à l'activation de facteurs de transcription multiples, tels que krox 24, c-fos ou c-jun. Deux autres MAP kinases sont activées par les EC lors de stress cellulaires: p38-MAPK et c-jun-N-terminal kinase (JNK). L'activation de JNK conduit à une apoptose cellulaire, alors que celle de p38-MAPK a des effets neuroprotecteurs, ainsi qu'anti-proliférateurs au niveau de cellules tumorales (Galve-Roperh et al., 2000; Guzman et al., 2002). Seule l'AEA, parmi les EC, active le récepteur vanilloïde de type 1 (VR1) (12), un canal cationique non sélectif de la famille des canaux TRP (transient receptor potential) impliqués dans les phénomènes de détection de stimulus nocicepteurs et dans la transduction de l'hyperalgésie inflammatoire et thermique. Les affinités de couplage des CB1R et CB2R aux protéines G ne sont pas équivalentes: si les deux types de récepteurs possèdent une très forte affinité pour G<sub>i</sub>, celle du CB1 pour G<sub>o</sub> est 10 fois supérieure à celle du CB2. Cela peut expliquer l'absence, ou la faiblesse, d'interaction du CB2 avec les canaux ioniques, contrairement au CB1R qui est capable de moduler l'activité de nombreux canaux.

L'inhibition de l'adénylate cyclase induite par les récepteurs cannabinoïdes n'est pas médiée par d'autres récepteurs, non cannabinoïdes, connus pour être couplés négativement à l'adénylate cyclase par des protéines G, comme par exemple les récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques, M4-muscariniques,  $\delta$ -opioïdes (Howlett and Fleming, 1984; Pacheco *et al.*, 1993). Ainsi, l'addition

d'autres agonistes (opioïdes, GABAA, muscariniques, dopaminergiques) n'entraîne pas d'effet additif sur l'inhibition de l'adénylate cyclase. Cependant, si les récepteurs cannabinoïdes activent leurs propres pools de protéines G, ils partagent avec d'autres récepteurs couplés à ces protéines le même effecteur commun: l'adénylate cyclase (Childers and Deadwyler, 1996). En effet, les effets conjoints des agonistes GABAB et cannabinoïdes sont additifs dans le cas de l'activité GTPasique dans les cellules des grains du cervelet (Pacheco *et al.*, 1993).

### **2.3.2. Activation de la voie des MAP kinases**

Les MAP kinases jouent un rôle clef dans les processus de différenciation morphologique et de survie neuronale (Fukunaga and Miyamoto, 1998). Plusieurs membres de la famille des MAP kinases sont abondamment présents dans le cerveau et sont activés lors d'événements physiologiques ou pathologiques (ischémie, épilepsie). Les cannabinoïdes sont capables d'activer la voie des MAP kinases telles que ERK1/2 (*extracellular signal-related protein kinase*), impliquées dans la régulation de l'expression de gènes et de la synthèse protéique ; cet effet est indépendant de l'inhibition de la production d'AMPc (Bouaboula *et al.*, 1995).

En conclusion, on observe que les récepteurs cannabinoïdes induisent une signalisation cellulaire complexe. Si l'inhibition de l'adénylate cyclase et des canaux ioniques prédomine dans les cellules du SNC, c'est l'activation des cascades kinases (MAPK) qui est sollicitée par les cannabinoïdes dans les cellules immunitaires et tumorales.

## **3. Rôle du SEC dans la modulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle**

Les phytocannabinoïdes et les EC sont capable de stimuler la prise alimentaire par l'intermédiaire de CB1R centraux, chez l'homme et le rongeur (Matias and Di Marzo, 2007; Pagotto *et al.*, 2006; Jamshidi and Taylor, 2001; Williams and Kirkham, 1999). Cet effet orexigène s'inscrit dans un réseau complexe d'interactions avec les peptides régulant l'appétit. Le SEC central est activé au cours de l'obésité expérimentale et contribue à l'hyperphagie observée dans cette situation. Les taux d'EC dans l'hypothalamus augmentent avec le jeûne et diminuent très rapidement après un repas (Kirkham *et al.*, 2002). De plus, Les EC régulent la sécrétion de la ghréline (hormone naturelle isolée de l'estomac de certains mammifères dont l'Homme, ayant pour principal effet la stimulation de l'appétit), ce qui suggère que les EC interviennent à plusieurs niveaux de la régulation de la prise alimentaire (Harrold and Williams, 2003). Inversement, des souris déficientes en CB1R (CB1<sup>-/-</sup>) sont résistantes à un régime hyper-lipidique (Ravinet Trillou *et al.*,

2004) et présentent 24% de masse corporelle et 60% de masse grasse en moins que des souris sauvages. Le même type d'effets sur la prise alimentaire et la masse corporelle est observé chez l'Homme et l'animal suite à un traitement pharmacologique par un antagoniste aux CB1R (SR141716) (Jbilo *et al.*, 2005; Pi-Sunyer *et al.*, 2006; Ravinet Trillou *et al.*, 2003; Van Gaal *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que, chez des souris obèses, SR141716 (antagoniste spécifique des CB1R) n'entraîne une diminution de la prise alimentaire que durant la première semaine. Pourtant, la perte de poids se prolonge pendant les 5 semaines restantes malgré une normalisation de la prise alimentaire (Jbilo *et al.*, 2005; Ravinet Trillou *et al.*, 2003). Chez la souris obèse, l'administration de SR141716 provoque une hypophagie transitoire qui ne peut expliquer complètement la perte de poids prolongée induite par la molécule (Matias and Di Marzo, 2007; Pagotto *et al.*, 2006) suggérant que la perte de poids n'est pas exclusivement consécutive à une diminution de la prise alimentaire et l'hypothèse d'une augmentation de la dépense énergétique a été avancée en observant une augmentation de la consommation basale d'oxygène (+37%) chez des souris obèses traitées par le Rimonabant (Liu *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que le SEC est associé à des régulations métaboliques indépendantes de la prise alimentaire. Ces effets métaboliques pourraient être la conséquence de l'activation de récepteurs aux EC périphériques qui, même s'ils sont beaucoup moins bien représentés que dans le cerveau, sont présents dans les adipocytes, le foie, les muscles squelettiques et les cellules  $\beta$  du pancréas (Engeli and Jordan, 2006).

### **3.1 SEC et régulation centrale de la prise alimentaire**

#### **3.1.1 Effets centraux du SEC sur la prise alimentaire**

En 1971, une première étude sérieuse sur l'effet de la marijuana sur la prise alimentaire a été effectuée. Des jeunes volontaires sains à jeun ou nourris ont consommé des quantités standardisées de cannabis et dans les deux conditions, une tendance à l'augmentation de la consommation alimentaire a été décrite après ingestion de marijuana par rapport au placebo. Cependant, cette tendance n'est significative que pour les sujets à l'état nourri (Hollister, 1971). Quelques années plus tard, une autre étude consistant à faire varier la quantité de  $\Delta^9$ -THC dans les cigarettes des sujets a révélé un effet différent de ce composé sur l'appétit. Des doses élevées ont en premier lieu provoqué une diminution de la prise alimentaire suivie d'une augmentation subséquente, alors que des doses plus faibles ont entraîné une stimulation de l'appétit (Abel, 1971). D'autres expériences ont également permis de démontrer que la consommation chronique

de marijuana augmente significativement la ration calorique quotidienne moyenne chez l'homme (Foltin *et al.*, 1986; Greenberg *et al.*, 1976). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la stimulation de la prise alimentaire induite par les cannabinoïdes, les modèles animaux ont alors représenté un outil idéal. Ainsi, en 1965, une étude a montré une augmentation de la prise alimentaire chez le rat après administration de cannabis (10 mg/kg, une injection intrapéritonéale) au cours de la première heure post-injection (Carlini and Kramer, 1965). Toutefois, les données obtenues à partir d'animaux sont encore incomplètes et pas toujours simples à interpréter (Kirkham and Williams, 2001). Le développement de composés spécifiques en mesure d'avoir une action d'antagonisme des CB1R a ensuite donné une nouvelle impulsion à l'étude de la régulation du comportement alimentaire par les cannabinoïdes. L'utilisation de ces molécules a fortement suggéré que les effets hyperphagiques induits par le  $\Delta^9$ -THC passaient par l'activation des CB1R. Des études ont alors montré que l'injection intrapéritonéale de l'antagoniste des CB1R SR141716 est en mesure de réduire considérablement la consommation d'alcool ou de saccharose ainsi que la sensation de soif chez des rats (Arnone *et al.*, 1997; Freedland *et al.*, 2001; Gallate and McGregor, 1999). De plus, SR141716 réduit de façon sélective la consommation de produits sucrés chez le moustiqué (Simiand *et al.*, 1998). Le rôle des EC dans la stimulation de la prise alimentaire a également été suggéré par une étude montrant que l'AEA, via l'activation des CB1R, est capable d'induire la sur-alimentation chez des rats déjà nourris (Williams and Kirkham, 1999). De manière intéressante, le degré d'hyperphagie induit par l'AEA est plus modeste que celui induit par le  $\Delta^9$ -THC, mais les effets persistent plus longtemps. De plus, même à très faible dose (0,001 mg / kg), l'AEA semble exercer un effet stimulant sur l'appétit (Hao *et al.*, 2000). Les CB1R et les EC étant présents à des niveaux élevés dans l'hypothalamus, les effets exercés par les EC sur la prise alimentaire sont clairement liés à leur action directe sur cette région du cerveau très impliquée dans la régulation de l'appétit et de la prise alimentaire (Gonzalez *et al.*, 1999). Une démonstration très convaincante concernant les effets stimulants des EC sur la prise alimentaire a été effectuée par Di Marzo *et al* qui a montré qu'une injection de leptine chez la souris normale et la souris ob/ob réduit les quantités d'AEA et de 2-AG dans l'hypothalamus et qu'une signalisation défectueuse de la leptine est associée à des niveaux élevés d'EC hypothalamiques suggérant une diminution du phénomène de satiété et une augmentation de la prise alimentaire (Di Marzo *et al.*, 2001b). En plus d'exercer un effet sur la prise alimentaire par le biais des systèmes régulateurs de stress et de récompense (Fride *et al.*,

2005; Hill and Gorzalka, 2006; Kirkham *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005), le SEC participe à la régulation de l'appétit et de la digestion. En effet, le SEC agit sur la sécrétion d'hormones dont la leptine (anorexigénique) (Di Marzo *et al.*, 2001b) et la ghréline (orexigénique) (Tucci *et al.*, 2004). De plus, des études ont révélé la présence de CB1R et, plus récemment, de CB2R dans le rhombencéphale (partie inférieure du cerveau où l'on trouve de petites structures comme l'area postrema, le noyau du tractus solitaire et le noyau moteur dorsal du nerf vague qui forment le complexe vagal dorsal) d'où sont contrôlés les nausées, les vomissements (Hornby and Prouty, 2004; Partosoedarso *et al.*, 2003; Van Sickle *et al.*, 2003), la motilité gastrique (Krowicki *et al.*, 1999) et la sécrétion d'acides gastriques (Hornby and Prouty, 2004). D'autre part, l'activation des CB1R présents aux extrémités des nerfs sensitifs intestinaux et en périphérie du nerf vague influence l'activité intestinale (Hornby and Prouty, 2004; Partosoedarso *et al.*, 2003). Il est également intéressant de noter que la présence de CB1R et CB2R a été détectée dans la salive de rats et que l'activation de ces récepteurs est capable d'entraîner une réduction de la sécrétion salivaire (Prestifilippo *et al.*, 2006). Une étude récente rapporte que la prise alimentaire et la prévalence de l'obésité augmente avec l'âge chez des souris dont le gène codant pour le CB2R a été invalidé (Agudo *et al.*, 2010). L'ensemble de ces données démontre que les récepteurs CB jouent un rôle dans la régulation de la digestion, et ce dès la première étape du processus digestif.

### **3.1.2. Relations entre SEC et leptine**

Dans des conditions physiologiques et afin de lutter contre une accumulation excessive de graisse dans les tissus adipeux, le SEC est soumis à une régulation hormonale concernant l'ensemble du corps ainsi qu'à une régulation locale (à travers des actions autocrines et paracrines) afin de limiter sa suractivation. Ces dernières années, les relations entre l'action centrale ou périphérique de la leptine et le degré d'activation du SEC ont été particulièrement étudiées. Il est maintenant admis que l'obésité est entre autre caractérisée par une résistance à la leptine et une augmentation des taux d'EC. Les groupes de Di Marzo et Kunos ont été les premiers à mettre en évidence un lien entre la leptine, hormone issue du TA qui pénètre dans le cerveau afin de réguler négativement la prise alimentaire, et le SEC (Mechoulam and Fride, 2001). Ainsi, une injection de leptine à des rats, conduit à une baisse de la concentration en EC, AEA et 2-AG dans qui, eux, stimulent l'appétit et la prise de nourriture l'hypothalamus (Di Marzo *et al.*, 2001b). De plus, une altération du système leptinique par des mutations spécifiques chez des rats et des souris

obèses s'accompagne de taux élevés d'EC associée à une consommation excessive de nourriture (Di Marzo *et al.*, 2001b). Par ailleurs, il est maintenant bien connu que la leptine accroît l'activité de l'enzyme de dégradation des EC, la FAAH, en stimulant l'expression du gène FAAH au niveau du promoteur (Maccarrone *et al.*, 2003), ce qui pourrait expliquer le mécanisme sous-jacent de l'équilibre négatif entre leptine et EC.

En plus de diminuer fortement les taux d'EC dans l'hypothalamus (Di Marzo *et al.*, 2001b), il a été démontré que la leptine pouvait également les diminuer dans les adipocytes matures (Matias *et al.*, 2006). En effet, les quantités d'AEA sont significativement diminuées dans le TA épigonadal et péri-rénal de rats ayant reçu une injection de leptine dans l'hypothalamus médiobasal (HMB) par rapport aux rats témoins. Ces variations de concentration d'EC dans le TA blanc sont dépendantes d'une voie de signalisation STAT3-indépendante, comme le prouve l'utilisation d'un modèle animal transgénique chez qui seule la voie de signalisation STAT3 indépendante est fonctionnelle (Buettner *et al.*, 2006). L'expression de la FAAH, principale enzyme du métabolisme de l'AEA, est induite dans le TA par une injection HMB de leptine. Ainsi, l'induction de l'expression de la FAAH pourrait être l'un des mécanismes par lequel la leptine entraîne une diminution des taux d'EC dans le TA blanc (Buettner *et al.*, 2008; Buettner *et al.*, 2006). D'autre part, la leptine injectée en HMB perd sa capacité à influencer sur le métabolisme du TA blanc lorsque les taux d'EC sont maintenus pharmacologiquement en activant la voie de signalisation des CB1R avec l'agoniste des CB1R WIN-55212-2 chez des rats Sprague Dawley. Ces données montrent clairement que la quantité d'EC en périphérie est sous le contrôle de la voie de signalisation de la leptine centrale et que le système nerveux sympathique joue un rôle majeur dans le contrôle du SEC dans le TA blanc. Plus récemment, la réduction de l'AEA induite par une injection de leptine en HMB a été associée à une diminution de la lipogénèse via une réduction de l'activation des PPAR- $\gamma$  et de l'expression de SREBP-1c dans le TA blanc (Buettner *et al.*, 2008).

### **3.2 SEC et régulation du métabolisme adipocytaire**

Suite à la découverte de l'implication des EC dans la régulation hypothalamique de la prise alimentaire, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont suggéré un effet direct des cannabinoïdes endogènes sur le TA ainsi que sur la fonction des adipocytes (Bensaid *et al.*, 2003; Cota *et al.*, 2003; Hildebrandt *et al.*, 2003; Matias *et al.*, 2006). La présence de CB1R a été démontrée dans des tissus adipeux animaux (Bensaid *et al.*, 2003; Bluher *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2003) et tous les

composants du SEC (CB1R et CB2R, AEA et 2-AG, enzymes de synthèse et de dégradation) sont présents dans les cellules adipeuses humaines (Roche *et al.*, 2006; Spoto *et al.*, 2006). CB1 n'est pas présent dans les préadipocytes, mais il est rapidement exprimé dans les cellules graisseuses au cours de la différenciation. Cela a été démontré à la fois dans des adipocytes primaires humains, des cellules primaires de rongeurs et des lignées cellulaires (Bensaid *et al.*, 2003; Roche *et al.*, 2006; Spoto *et al.*, 2006). L'expression du CB2R dans les adipocytes matures est controversée. Certains auteurs ont constaté une expression de CB2 dans les adipocytes différenciés, tandis que d'autres n'ont pas détecté d'expression significative de ce récepteur (Hildebrandt *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 2006). CB2 est également exprimé à de faibles niveaux dans des biopsies de tissus adipeux, ce qui suggère que les cellules pré-adipeuses, les macrophages infiltrés, ou encore des cellules vasculaires peuvent être la source de l'ARNm codant pour CB2 dans le TA (Pagano *et al.*, 2007). Outre les récepteurs cannabinoïdes, les cellules graisseuses et les tissus adipeux expriment également l'intégralité de la machinerie enzymatique permettant de produire et de dégrader localement les EC (Bluher *et al.*, 2006; Matias *et al.*, 2006; Pagano *et al.*, 2007). En accord avec ces données, plusieurs études suggèrent que les EC sont impliqués dans la régulation périphérique de la prise en charge des lipides par le TA (Cota *et al.*, 2003; Di Marzo *et al.*, 2001b; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Annuzzi *et al.*, 2010)

### **3.2.1. EC et métabolisme énergétique des adipocytes.**

Certains arguments suggèrent que ce système est en permanence activé non seulement chez les animaux obèses, mais aussi chez l'homme obèse, où les concentrations d'EC dans la circulation et la graisse sont plus élevées que chez le sujet de poids normal (Di Marzo and Matias, 2005). En réalité, les adipocytes humains ou de rongeurs produisent et sécrètent des EC y compris le 2-AG, l'AEA, et d'autres composés cannabimimétiques (Engeli *et al.*, 2005; Gonthier *et al.*, 2007). Des souris pour lesquelles le gène codant pour le CB1R a été muté (CB1<sup>-/-</sup>) sont maigres (Cota *et al.*, 2003) et résistantes à un régime obésogène (riche en sucres et en graisses). Si l'on considère l'ensemble de l'organisme, cette perte de masse corporelle suggère que l'inactivation du SEC est associée à une augmentation des dépenses énergétiques correspondant à une capacité oxydative plus importante des différents tissus, en particulier du TA brun, des muscles squelettiques et du foie. En revanche, si on ne considère que le TA blanc, cette faible masse corporelle pourrait s'expliquer par une implication plus ou moins importante du

SEC dans au moins trois voies différentes : une augmentation de la lipolyse, une diminution de la lipogénèse, ou encore une augmentation de l'oxydation des acides gras par les cellules adipeuses.

#### 3.2.1.1. EC et lipogénèse

Le stockage des TG dans les cellules adipeuses et l'expansion du TA nécessite un approvisionnement adéquat en acides gras et en glucose. L'apport en AG est principalement généré par la lipoprotéine lipase (LPL) grâce à son action lipasique sur les VLDL et des chylomicrons, des lipoprotéines très riche en TG. De plus, la translocation insulino-dépendante du transporteur de glucose GLUT4 et le transport de glucose sont des éléments essentiels à la production d' $\alpha$ -glycérophosphate (intermédiaire de la glycolyse) nécessaires à l'assemblage des TG. Ces deux voies sont sous le contrôle de l'insuline. Par conséquent une sensibilité adéquate à l'insuline est une condition indispensable à l'acheminement de ces différents carburants aux cellules graisseuses (Bluher *et al.*, 2002).

L'activation des CB1R augmente l'activité lipoprotéine lipase dans les adipocytes primaires de souris (Cota *et al.*, 2003), ce qui permettrait d'accroître le flux des AGL vers les adipocytes pour la synthèse des TG. Le rôle des EC et des CB1R dans l'accumulation de lipides neutres dans les cellules adipeuses a été confirmée par Matias *et al.*, qui ont montré que le traitement de cellules 3T3-F442A avec le HU210, un puissant agoniste des CB1R augmente l'accumulation intracellulaire de gouttelettes lipidiques (Matias *et al.*, 2006). Une activation de la lipogénèse et une inhibition de l'oxydation des acides gras consécutives à une diminution de l'activité AMPK pourraient également favoriser l'accumulation de lipides. Kola *et al.* ont d'ailleurs montré que l'AEA et la ghréline ont un effet inhibiteur sur l'activité AMPK des TA sous-cutané et viscéral (Kola *et al.*, 2005), ce qui peut également en partie expliquer l'augmentation de la teneur en graisse des différents TA.

L'activation des CB1R semble également favoriser l'entrée du glucose dans les cellules graisseuses. En effet, dans des adipocytes primaires humains, l'activation des CB1R stimule le captage du glucose (Gasperi *et al.*, 2007; Pagano *et al.*, 2007), et cet effet est en partie dû à la translocation du transporteur de glucose GLUT4 depuis le compartiment intracellulaire vers la membrane plasmique (Pagano *et al.*, 2007). En outre, la captation du glucose par les cellules adipeuses stimulée par les EC est, au moins en partie, due au même mécanisme moléculaire que celui induit par l'insuline et impliquant l'activation de la PI3-kinase. En effet, l'inhibition de cette enzyme par la Wortmannin bloque complètement l'effet de l'activation des CB1R sur l'absorption

du glucose (Pagano *et al.*, 2007). L'entrée du glucose dans les cellules graisseuses est également induite par une augmentation du calcium intracellulaire provenant de l'environnement extracellulaire (Pagano *et al.*, 2007). Lors d'expériences menées avec du milieu sans calcium ou contenant de l'éthylène glycol tétra-acétique, un chélateur du calcium, l'activation des CB1R n'entraîne ni translocation de GLUT4 ni captation du glucose. L'ampleur de l'effet des EC sur la captation du glucose serait comparable à 40-50% à celui de l'insuline. Toutefois, l'importance physiologique de ce mécanisme reste encore à déterminer même s'il est probable que l'effet insulino-mimétique des EC dans les cellules adipeuses soit non négligeable quant à l'accumulation de TG et la différenciation des préadipocytes. Les études *in vivo* avec SR141716 ont apporté de nouveaux arguments quant à cette hypothèse. En effet, l'antagonisme des CB1R n'aggrave pas l'insulino-résistance chez les patients obèses, et au contraire, stimule la sensibilité à l'insuline à la suite de la perte de poids, de la réduction de la masse du TA et, éventuellement, de la taille des cellules adipeuses (Despres *et al.*, 2005).

#### 3.2.1.2. EC et lipolyse

Plusieurs études indiquent que le blocage des CB1R entraîne une augmentation de la lipolyse *in vivo*. Herling *et al* ont observé une augmentation immédiate des AGL après l'injection d'une dose unique de SR141716 chez des rats à l'état postprandial, suggérant un effet pharmacologique propre du Rimonabant pour induire la lipolyse, et non pas un effet « secondaire » dû à une diminution de la prise alimentaire ou à des changements post-absorption. A l'inverse, un traitement à long terme par SR141716 conduit à une diminution des taux d'AGL et une perte de masse grasse. Il est à noter que l'analyse du TA par microarray a suggéré que la réduction de la masse adipeuse induite par SR141716 était le résultat d'une lipolyse accrue et d'une induction des enzymes de la  $\beta$ -oxydation et du cycle de Krebs. Au final, ces données indiquent clairement que le SEC a un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique du TA et que le blocage de ce système pourrait avoir un impact important sur ces paramètres (Jbilo *et al.*, 2005).

#### 3.2.1.3. EC et catabolisme/activité mitochondrial

Il a récemment été démontré que l'invalidation génétique et pharmacologique des CB1R entraîne une augmentation de la biogenèse mitochondriale des adipocytes blanc (Tedesco *et al.*, 2008). Un traitement des adipocytes avec SR141716 augmente l'expression des gènes de la biogenèse mitochondriale, notamment PGC-1 $\alpha$  et TFAM (Ravinet Trillou *et al.*, 2003), suggérant que le blocus spécifique des CB1R pourrait contrecarrer les effets inhibiteurs sur la biogenèse et la

fonction mitochondriale des EC observés dans des cultures de cellules adipocytaires (Handschin and Spiegelman, 2006; Wilson-Fritch *et al.*, 2004). En effet, il a été observé que les cannabinoïdes, y compris  $\Delta^9$ -THC, inhibent les enzymes de la chaîne respiratoire dans le cerveau, le foie, le muscle squelettique et le cœur avec pour conséquence de réduire les taux de consommation d'oxygène chez les rongeurs (Bartova and Birmingham, 1976). Des données suggèrent fortement que les agonistes des CB1R pourraient réguler à la baisse la biogenèse mitochondriale-eNOS dépendantes dans les adipocytes blancs (Tedesco *et al.*, 2008). Des niveaux élevés d'oxyde nitrique (NO) stimulent la biogenèse mitochondriale dans un certain nombre de lignées de cellules *via* une voie de signalisation dépendante d'une guanylate-cyclase soluble permettant d'activer PGC-1 $\alpha$ , un puissant régulateur du contenu mitochondrial (Nisoli *et al.*, 2003; Nisoli *et al.*, 2005). L'expression des NOS endothéliales ainsi que la biogenèse mitochondriale sont augmentées dans le TA blanc de souris CB1<sup>-/-</sup>. Ces effets, liés à la réduction de l'adiposité et de la masse corporelle sont encore plus évidents chez les souris soumises à un régime alimentaire riche en graisses. Ces résultats et bien d'autres suggèrent que cette cascade de signalisation représente un mécanisme généralisé par lequel les tissus des mammifères réguleraient leur contenu mitochondrial en réponse à l'exercice, à l'exposition au froid et à la restriction alimentaire. Par conséquent, il est possible qu'un système très étendu comme le système eNOS-NO-cGMP soit affecté ou interagisse avec un autre système largement répandu, tel que le SEC et conduise à des changements dans la masse et la fonction mitochondriale conduisant à des modifications importantes du métabolisme adipocytaire (Bogacka *et al.*, 2005a; Bogacka *et al.*, 2005b; Wilson-Fritch *et al.*, 2004).

#### 3.2.1.4. Différenciation adipocytaire

Les EC et les niveaux d'expression des CB1R augmentent au cours de la différenciation adipocytaire (Bensaid *et al.*, 2003; Gasperi *et al.*, 2007; Matias *et al.*, 2006). De plus, la stimulation des CB1R conduit à une différenciation plus rapide de préadipocytes (Matias *et al.*, 2006). Il est probable que les EC, dont la structure chimique est dérivée de l'acide arachidonique, puissent agir non seulement à travers les CB1R et CB2R mais également via le récepteur orphelin GPR55, le récepteur vanilloïde de type 1 et par les PPARs dont l'implication est résumée par la figure 8.

L'interaction entre les EC et les PPARs pourrait induire de nombreux effets biologiques, y compris sur le métabolisme lipidique ou le comportement alimentaire (O'Sullivan, 2007).

Plusieurs cannabinoïdes naturels ou synthétiques (AEA, 2-AG, WIN-55212-2, éther noladine et virodhamine) peuvent se lier à PPAR- $\alpha$  à des concentrations physiologiques, tandis que l'acide ajulémiq, l'AEA, 2-AG, le HU210 et le  $\Delta^9$ THC se lient à PPAR- $\gamma$  (Matias *et al.*, 2006; Bouaboula *et al.*, 2005; Kozak *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2005; Rockwell *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Ces données expérimentales suggèrent que la liaison aux PPARs est commune à de nombreux cannabinoïdes et peut être d'une grande importance physiologique car ils se lient aux PPARs à des concentrations qui sont dans la même gamme que celle indiquée pour les AG (Kliwer *et al.*, 1997). La stimulation de préadipocytes humains avec le WIN-55212-2 augmente l'expression de l'ARNm de PPAR- $\gamma$  seulement dans les premiers stades de la différenciation. Le Rimonabant inhibe l'induction de PPAR- $\gamma$  par le WIN-55212-2, ce qui indique que cet effet est dépendant des CB1R. De manière intéressante, le WIN-55212-2 est sans effet sur des adipocytes totalement différenciés (Pagano *et al.*, 2007).

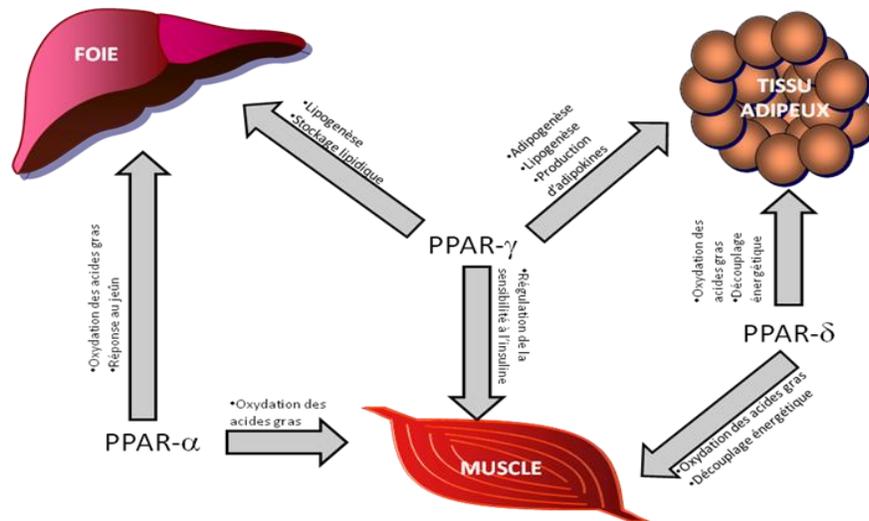


Figure 8 : Représentation schématique des effets biologiques des PPARs. Les PPARs forment une famille de récepteurs nucléaires agissant comme des facteurs de transcription. Cette famille comprend différentes isoformes (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  et PPAR- $\delta$ ) qui interagissent avec les récepteurs X rétinoides et un certain nombre de protéines. En se liant à RXR pour former des hétérodimères se liant à des éléments de réponse de l'ADN, les PPARs conduisent à l'activation ou la répression des gènes cibles (O'Sullivan, 2007). La régulation des gènes cibles de PPAR est impliquée dans l'homéostasie énergétique, la différenciation des cellules adipeuses et dans l'inflammation (Ferre, 2004; Stienstra *et al.*, 2007). PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique. En effet, PPAR- $\alpha$  est principalement exprimé dans le foie, le cœur et le muscle squelettique, où il contrôle le catabolisme des acides gras. En fait, des ligands de PPAR- $\alpha$  tels que les fibrates sont utilisés en clinique pour traiter une hypertriglycéridémie. PPAR- $\gamma$  est quant à lui exprimé en trois variantes. L'isoforme la plus courante pour l'homéostasie énergétique est PPAR- $\gamma$ 2 qui est exprimée dans le TA. Son activation induit la différenciation des cellules adipeuses, l'accumulation de lipides et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Ferre, 2004; Stienstra *et al.*, 2007). Des ligands de PPAR- $\gamma$  comme la rosiglitazone ou la pioglitazone sont utilisés pour le traitement clinique de la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2. Les PPARs sont également présents dans le cerveau et sont activés par des ligands naturels ou synthétiques ayant des structures chimiques différentes. Parmi les ligands naturels des PPARs, on trouve les acides gras et les eicosanoïdes qui se lient à des concentrations nanomolaires.

En plus des effets des EC sur PPAR- $\gamma$ , une relation inverse entre PPAR- $\gamma$  et le SEC a été mise en évidence. Lorsque de la différenciation d'adipocytes humains est stimulée par la rosiglitazone (agoniste PPAR- $\gamma$  puissant), on observe une réduction de l'expression de l'ARNm du CB1R et une stimulation de la FAAH. En accord avec cela, le traitement de cellules 3T3-F442A avec de la ciglitazone induit une diminution de la concentration locale en 2-AG, suggérant une régulation croisée entre ces deux systèmes au cours de l'adipogenèse (Pagano *et al.*, 2007). Ainsi, il est raisonnable de penser que les cannabinoïdes endogènes coopèrent avec PPAR- $\gamma$  afin de contrôler les stades précoces de la différenciation des cellules adipeuses. Un rétrocontrôle négatif entre PPAR- $\gamma$  et les cannabinoïdes endogènes permettrait ensuite de contrôler les dépôts de lipides.

Une interprétation possible de la régulation réciproque entre PPAR- $\gamma$  et les CB1R serait que l'activation des EC précède et stimule l'activation de PPAR- $\gamma$  tandis que l'inhibition des CB1R suite à l'activation de PPAR- $\gamma$  pourrait empêcher l'expansion excessive de graisse.

Le rôle des PPARs dans la modulation de l'activité du SEC est illustré par l'utilisation des acyléthanolamides, des molécules structurellement proches des EC peuvent se lier et activer les PPARs sans pour autant activer les CB1R. L'oleoylethanolamide (OEA) se lie et augmente l'activité transcriptionnelle de PPAR- $\alpha$  (Bouaboula *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2003; Kliewer *et al.*, 1997; Kozak *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2005; Rockwell *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). L'OEA inhibe la prise alimentaire et la prise de masse corporelle chez la souris tout en stimulant la lipolyse. Tous ces effets ne sont pas retrouvés chez la souris KO pour PPAR- $\alpha$  (Fu *et al.*, 2003). De plus, l'OEA augmente fortement l'expression des gènes cibles de PPAR- $\alpha$  et réduit le taux de cholestérol chez les souris et les rats obèses (Guzman *et al.*, 2004). De la même manière, le palmitoylethanolamide (PEA) est capable d'activer PPAR- $\alpha$  (Fu *et al.*, 2003; LoVerme *et al.*, 2006). PPAR- $\delta$  a également été suspecté d'être un régulateur métabolique (Barish *et al.*, 2006) Il existe actuellement peu d'informations sur les effets des cannabinoïdes sur ce récepteur nucléaire. Les données de Yan et al suggèrent que le SEC et PPAR- $\delta$  pourraient être liés (Yan *et al.*, 2007). Une alimentation riche en graisse augmente l'expression des CB1R et réduit celle de PPAR- $\delta$ , tandis que l'exercice physique exerce des effets opposés sur ces deux récepteurs. De plus, l'extinction du gène de PPAR- $\delta$  par des ARN interférents augmente l'expression des CB1R, tandis qu'une surexpression de PPAR- $\delta$  la réduit de façon significative.

#### 3.2.1.5. Conclusion

En conclusion, il apparaît que la suractivation du SEC contribue à la stimulation de la différenciation adipocytaire, de la prise en charge des lipides circulants, de la lipogenèse, et à une amplification de la sensibilité à l'insuline associée à une augmentation du captage du glucose et de son utilisation. De plus, cet état d'activation est associé à une inhibition de la biogenèse mitochondriale-eNOS dépendante. Tous ces effets sont favorables à l'accumulation de graisses dans les adipocytes. Le blocage du CB1R dans le TA pourrait inverser ces processus et provoquer une diminution de l'adiposité.

#### 3.2.2. EC et adipokines

Au cours de la dernière décennie, le TA a acquis le statut de glande endocrine, synthétisant et sécrétant un grand nombre de molécules de natures peptidiques ou non peptidiques regroupées sous le terme d'adipocytokines ou adipokines du fait de leur analogie structurelle avec les cytokines (Juge-Aubry *et al.*, 2005; Wajchenberg, 2000). Ces adipokines regroupent les hormones et autres protéines secrétés par les cellules de la fraction stroma-vasculaire et par les adipocytes parmi lesquelles on trouve entre autres, la leptine, l'adiponectine, la résistine et le TNF- $\alpha$ . Ces adipokines sont impliquées essentiellement dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, dans l'insulino-résistance et l'inflammation.

Concernant l'adiponectine dont les propriétés biologiques ont été évoquées précédemment, plusieurs études réalisées sur des cultures cellulaires ou des rongeurs suggèrent que l'activation des CB1R par des ligands naturels et synthétiques diminue son expression et sa libération, tandis qu'un traitement avec un antagoniste (SR141716) produit l'effet inverse (Matias *et al.*, 2006; Spoto *et al.*, 2006). En outre, l'analyse statistique des données issues de l'étude Rimonabant In Obesity (RIO) a permis de mettre en évidence une corrélation entre la concentration d'adiponectine circulante et la perte de poids chez les patients obèses traités. Toutefois, des auteurs suggèrent qu'en plus de stimuler la production d'adiponectine en diminuant la masse grasse, le Rimonabant exerce un effet direct sur l'expression de l'adiponectine dans les tissus adipeux (Despres *et al.*, 2005). Cette hypothèse sur le rôle direct des EC ou du SEC périphérique dans la régulation de l'adiponectine est encore controversée. Une autre étude menée *in vivo* chez le rat a d'ailleurs indiqué que l'augmentation de l'expression de l'adiponectine observée après un traitement de 14 jours avec du Rimonabant est due à la seule réduction de l'apport alimentaire et de la masse corporelle (Liu *et al.*, 2005). De plus, Lofgren *et al* ont rapporté que, dans une

cohorte de 92 sujets minces et obèses, il n'y avait pas d'association entre l'expression des ARNm des CB1R dans le TA et l'expression ou la quantité circulante d'adiponectine (Lofgren *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été signalé qu'aussi bien l'agoniste WIN-55212-2, que l'antagoniste Rimonabant n'entraînent pas d'effets significatifs sur l'expression de l'adiponectine et de la leptine des adipocytes primaires humains (Pagano *et al.*, 2007). Cependant, puisque la dérégulation du SEC en matière d'obésité est principalement tissu spécifique (Pagano *et al.*, 2007), la possibilité d'avoir une régulation différente pour ces adipokines par ce système biologique dans les adipocytes viscéraux versus sous-cutanés ne peut être exclue et reste à étudier. Des expériences supplémentaires intégrant des paramètres différents sont nécessaires pour clarifier pleinement le rôle des EC concernant le profil d'expression des adipokines dans les TA, et les études futures devraient s'intéresser à la contribution relative de l'inhibition hypothalamique de la prise alimentaire et des mécanismes périphériques dans le TA, le foie et les muscles sur l'amélioration des paramètres métaboliques obtenue par blocage du CB1R.

### ***3.2.3. Effets spécifiques du SEC dans les TA viscéral et sous-cutané***

Il est aujourd'hui bien admis que le TA viscéral et le TA sous-cutané jouent des rôles différents dans la physiologie de l'obésité. Toutefois, les mécanismes biochimiques et moléculaires (y compris ceux impliquant le SEC) mis en jeu lors de l'expansion de ces tissus au cours de l'obésité ou lors d'une réduction de la masse grasse sont encore mal définis.

Dans des conditions de résistance à la leptine, comme dans l'obésité et le diabète de type 2, l'action inhibitrice de la leptine est largement réduite, non seulement au niveau du SNC, mais également au niveau périphérique, en particulier dans le TA. En complément, l'insuline semble influencer les quantités d'EC, en exerçant une régulation négative sur leur synthèse et en stimulant leur dégradation dans des cellules 3T3L1 (D'Eon *et al.*, 2008) et dans des cellules adipeuses sous-cutanées humaines.

Une étude récente a rapporté une dérégulation des taux d'EC dans le TA sous-cutané de patients sains, obèses non diabétiques et à la fois obèses et diabétiques. Dans le cas des patients présentant une résistance à l'insuline et une hyperleptinémie, les quantités d'AEA augmentent de façon dramatique tandis que la concentration en 2-AG diminue fortement, pouvant refléter des rôles et actions différentes de ces 2 composés dans ce TA, renforçant l'hypothèse d'une régulation différente entre le TA viscéral et sous-cutané (Annuzzi *et al.*, 2010). Il est donc envisageable que la présence d'une résistance à l'insuline puisse être antérieure à l'augmentation des taux d'EC des

tissus. Toutefois, l'administration d'un régime obésogène riche en graisse chez la souris n'entraîne pas d'activation homogène du SEC dans les différents TA avec une production accrue de ces substances dans le TA périépididymaire et une production plus faible dans le TA inguinal (D'Eon *et al.*, 2008; Matias *et al.*, 2006; Starowicz *et al.*, 2008). Il existe également des études démontrant que les quantités circulantes de l'AEA et/ ou du 2-AG sont augmentées chez la femme obèse (Engeli *et al.*, 2005; Monteleone *et al.*, 2005), en association avec une augmentation des concentrations en 2-AG dans le TA viscéral sans que celle-ci soit retrouvée dans le TA sous-cutané (Matias *et al.*, 2006). De plus, l'expression des gènes codant pour les CB1R et des enzymes de synthèse des EC est élevée dans le TA abdominal de sujets obèses (Pagano *et al.*, 2007) et une corrélation existe entre les concentrations plasmatiques de 2-AG et le degré d'expansion de la masse grasse viscérale (Bluher *et al.*, 2006; Cote *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données suggère une nouvelle fois le rôle crucial de l'activation du SEC dans le tissu adipeux viscéral au cours de la physiopathologie de l'obésité et de ses complications (Di Marzo, 2008a; Pagano *et al.*, 2008). Par ailleurs, Poussin *et al* ont montré chez des souris nourries avec un régime riche en matières grasses pendant 6 mois puis traités avec SR141716 ou un placebo pendant 24 jours que l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides et des stéroïdes ainsi que dans le catabolisme glucidique a été diminuée dans le TA viscéral des animaux indépendamment de la masse corporelle pendant que l'expression de ces gènes était régulée différemment dans le TA sous-cutané. Dans cette étude, les deux TA présentent d'étonnantes différences dans leur régulation génique en réponse à un régime alimentaire riche en graisse et à un traitement par SR141716 (Poussin *et al.*, 2008).

Le remodelage du cytosquelette des adipocytes, les interactions entre les intégrines et les protéines de la matrice extracellulaire ainsi que l'angiogenèse sont des événements clé pour le développement du tissu adipeux. Ce processus de remodelage se produit différemment dans les deux TA. En effet, alors qu'il existe une corrélation entre l'expansion des cellules adipeuses et l'expression des gènes codant pour les intégrines et les protéines du cytosquelette dans le TA viscéral, ce n'est pas le cas dans le TA sous-cutané où l'expression de la plupart des ces gènes est augmentée, même lorsque les adipocytes sont de petite taille (Poussin *et al.*, 2008). De même, l'expression de C/EBPalpha, d'AP2 et de l'adiponectine est plus élevée dans les adipocytes sous-cutanés que dans les adipocytes viscéraux issus de TA de personnes non diabétiques. En revanche, les adipocytes viscéraux sécrètent trois fois plus d'adiponectine et captent trois fois

plus de glucose que les adipocytes sous-cutanés. La phosphorylation des récepteurs de l'insuline, des protéines IRS et Akt est plus rapide avec une tendance à diminuer plus rapidement dans les adipocytes viscéraux que dans les adipocytes sous-cutanés (Perrini *et al.*, 2008). Un défi intéressant pour la recherche future sera donc de déterminer si les (pré)-adipocytes de ces deux tissus présentent des interactions différentes avec leur environnement stromal et/ou s'ils proviennent de précurseurs distincts avec des capacités différentes à répondre à un régime riche en graisse.

#### **4. Foie et SEC**

Les premiers travaux sur les effets hépatiques des cannabinoïdes sont relativement récents, principalement à cause du faible niveau d'expression des CB1R et CB2R dans le foie sain (Julien *et al.*, 2005; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). En effet, bien que les hépatocytes et les cellules du parenchyme hépatique soient tous deux capables de produire des EC, l'expression physiologique des CB1R et CB2R dans le foie adulte est très faible, voire nulle (Mallat and Lotersztajn, 2008). Cependant, de nombreuses études ont montré que le SEC hépatique est activé au cours de maladies hépatiques chroniques (Batkai *et al.*, 2001; Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2004; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). Le SEC est donc impliqué dans la pathogenèse de la stéatose hépatique, de l'hépatite, de la fibrose, et dans les complications de la cirrhose, telles que l'hypertension portale, le syndrome de l'appareil circulatoire hyperdynamique ou encore la cardiomyopathie cirrhotique. Enfin, le SEC influe sur les mécanismes responsables des lésions cellulaires et la réponse inflammatoire au cours des lésions hépatiques aiguës, telles que l'ischémie-reperfusion (Caraceni *et al.*, 2008; Kunos and Osei-Hyiaman, 2008; Mallat and Lotersztajn, 2008; Pacher and Gao, 2008; Siegmund and Schwabe, 2008). Ainsi, les molécules ciblant les CB1R et CB2R représentent des agents thérapeutiques potentiels intéressants pour le traitement des maladies du foie.

##### **4.1. SEC et stéatopathie métabolique**

La stéatose est définie comme étant la condition dans laquelle les graisses (essentiellement des TG) représentent plus de 5% de la masse du foie (Hoyumpa *et al.*, 1975; Kleiner *et al.*, 2005). La prévalence de la stéatose est de l'ordre de 15 à 25 % dans la population générale (Browning and Horton, 2004), et de 60 %, en moyenne, chez les patients obèses, cette valeur atteignant 100% chez les patients diabétiques (Angulo and Lindor, 2002). Bien que la stéatose ait longtemps été considérée comme une transformation inoffensive, il existe maintenant un

consensus général considérant son évolution potentielle en une forme sévère de maladie du foie. En effet, l'accumulation de graisse favorise le stress oxydatif et des réactions inflammatoires entraînant des lésions cellulaires et des dépôts de tissu fibreux dans le foie. Selon la taille de ces dépôts lipidiques dans la cellule hépatique, on distingue deux types de stéatoses: la stéatose macrovésiculaire et la stéatose microvésiculaire (Brunt, 2001). La stéatose hépatique non alcoolique est une caractéristique hépatique du syndrome métabolique et représente la cause la plus fréquente d'une élévation des transaminases sériques dans les pays occidentaux. Les manifestations cliniques de la gamme de stéatoses hépatiques non alcooliques vont de la simple stéatose à la stéatohépatite non alcoolique (NASH), qui est définie par l'association d'une stéatose, d'une inflammation du foie et d'une fibrose, en comportant un risque de 20% de progression vers la cirrhose et le cancer du foie dans les 20 ans (Bedogni *et al.*, 2005; Ong and Younossi, 2007; Browning and Horton, 2004). De très nombreuses données indiquent aujourd'hui que les cannabinoïdes interviennent dans la genèse de la stéatose en interférant avec la prise alimentaire, le métabolisme glucido-lipidique périphérique et la lipogenèse hépatique (Bensaid *et al.*, 2003; Cota *et al.*, 2003; Matias and Di Marzo, 2007; Pagotto *et al.*, 2006; Ravinet Trillou *et al.*, 2004).

#### **4.1.1. Mécanismes à l'origine de la stéatose hépatique**

La stéatose correspond à une accumulation de TG dans les hépatocytes qui peut avoir lieu soit parce que les quantités d'AG intracellulaires augmentent soit parce que la sécrétion des TG est réduite. La stéatose hépatique peut donc résulter de l'altération de plusieurs voies métaboliques : une diminution de la  $\beta$ -oxydation des AG, une stimulation de la lipogenèse de novo, une diminution de la sécrétion de lipoprotéines ou encore une captation accrue des lipides plasmatiques provenant du TA et des lipoprotéines.

Ainsi, une anomalie génétique ou l'inhibition pharmacologique d'enzymes impliquées dans les processus de transport des AGLC dans la mitochondrie conduit à l'induction d'un déficit  $\beta$ -oxydatif associé à une stéatose hépatique de type microvésiculaire (Fromenty and Pessayre, 1995). Dans le cas de l'hypobétalipoprotéïnémie familiale (Schonfeld *et al.*, 2003) ou lors de traitements par des agents pharmacologiques inhibant la protéine MTP (microsomal triglyceride transfer protein) qui transfère les TG hépatiques vers l'apoB afin de permettre la synthèse de VLDL (Cuchel *et al.*, 2007), c'est la sécrétion hépatique des VLDL qui est altérée et associée à une augmentation de la quantité de TG hépatiques.

Les mécanismes qui conduisent à la formation d'une stéatose de type NASH semblent impliquer la combinaison de plusieurs facteurs (Figure 9). Ainsi, chez les sujets obèses et insulino-résistants, on assiste à une augmentation du flux d'AGL provenant de la mobilisation des graisses du tissu adipeux. En effet, en cas de résistance à l'insuline, les adipocytes libèrent des AGL en excès à l'état nourri alors que dans des circonstances normales la lipolyse devrait être inhibée. De plus, l'hydrolyse des TG circulant semble également augmentée dans ces conditions ce qui accentue le flux d'AGL dans le foie (Pardina *et al.*, 2009; Westerbacka *et al.*, 2007).

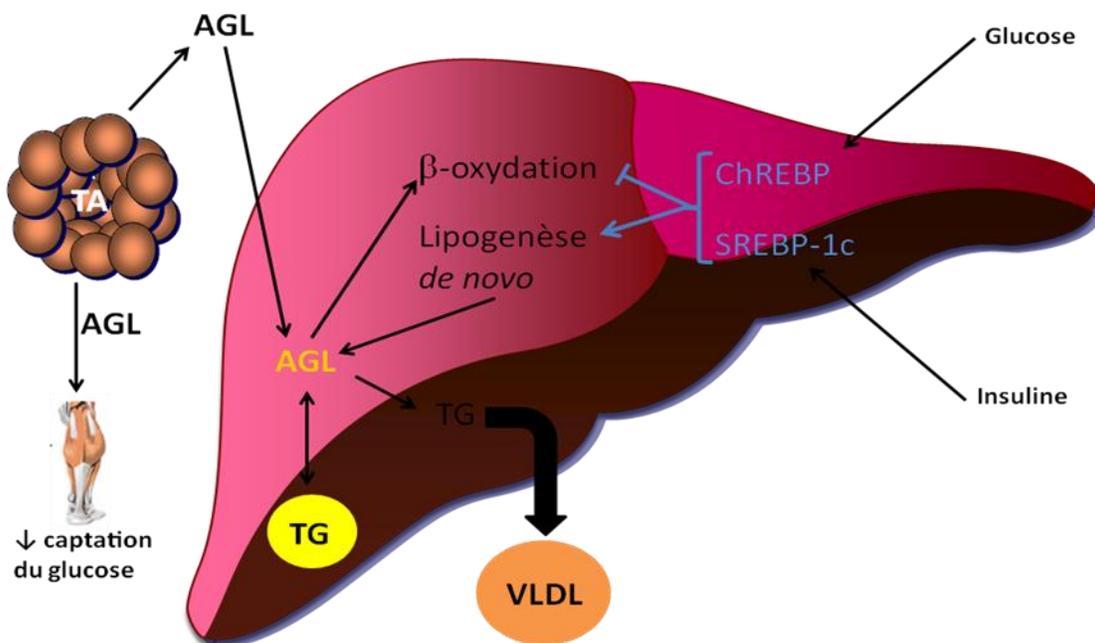


Figure 9 : Étapes métaboliques conduisant au développement de la stéatose hépatique (adapté de (Fabbrini *et al.*, 2010)). Lors du développement de la stéatose hépatique, les lipides qui s'accumulent dans le foie sont majoritairement des triglycérides (TG). En raison de l'état de résistance à l'insuline caractéristique du patient obèse pré-diabétique, la lipolyse au niveau du tissu adipeux n'est plus efficacement inhibée par l'insuline et des concentrations importantes d'acides gras libres (AGL) sont libérées dans la circulation sanguine. Ces AGL sont captés par le foie. En parallèle, et de manière paradoxale, la synthèse *de novo* d'acides gras par la voie de la lipogénèse est stimulée par l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie via l'activation des facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c. La combinaison de l'augmentation de la voie de la lipogénèse et de la diminution de la voie de la β-oxydation des acides gras conduit au développement de la stéatose hépatique. Les TG hépatiques sont stockés dans des gouttelettes lipidiques ou sécrétés dans le sang sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL). L'accumulation excessive des concentrations de TG hépatiques exacerbe le phénotype de résistance à l'insuline dans le foie, conduisant à l'augmentation de la production hépatique de glucose. Au niveau du muscle squelettique, les concentrations élevées d'AGL conduisent à une résistance à l'insuline et à une diminution de l'utilisation de glucose dans ce tissu.

Parallèlement, l'état hyperinsulinémique stimule la lipogénèse, inhibe la β-oxydation et la sécrétion des VLDL. Ainsi, dans le contexte de la résistance à l'insuline, les AG provenant de

la circulation et de la lipogenèse hépatique *de novo* sont préférentiellement estérifiés et stockés sous forme de TG. Le processus de sécrétion au sein des VLDL qui constitue un habituellement un excellent moyen pour limiter la quantité de TG hépatiques est inhibé du fait d'une réduction de l'activité MTP (Avramoglu *et al.*, 2006; Kamagate *et al.*, 2008). L'augmentation de la synthèse *de novo* des AG est un facteur particulièrement important dans le cas d'une insulino-résistance. Les mécanismes concernent les voies de la glycolyse et de la lipogenèse dont les activités sont étroitement contrôlées. Les enzymes impliquées dans ces voies (glucokinase et L-pyruvate kinase pour la glycolyse ; Acétyl-CoA carboxylase et fatty acid synthase pour la lipogenèse) sont régulées en partie au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription comme SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein) et ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein) qui induisent la lipogenèse suite à leur activation respectivement par le glucose et par l'insuline (Robichon *et al.*, 2008). Ainsi, en cas d'hyperinsulinémie et de diabète, l'hyperglycémie active ChREBP tandis que l'hyperinsulinémie induit SREBP-1c et l'action simultanée et synergique de ces 2 facteurs de transcription conduit à l'activation transcriptionnelle des gènes de la lipogenèse (ACC, FAS) (Assimacopoulos-Jeannet *et al.*, 1995; Dentin *et al.*, 2006).

#### **4.1.2. Régulation de la stéatogenèse hépatocytaire par le SEC**

Une alimentation riche en graisse augmente les niveaux hépatiques d'AEA et le degré d'expression des CB1R, ainsi que le niveau basal de la lipogenèse *de novo*. En effet, l'activation des CB1R chez des souris sauvages stimule la lipogenèse *de novo* dans le foie via l'induction du facteur de transcription lipogénique SREBP-1c et de ses enzymes cibles, l'ACC1 et la FAS (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Ces effets sont atténués par un blocage pharmacologique ou génétique des CB1R (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que les récepteurs hépatiques CB1 sont impliqués dans le développement de la stéatose, de l'hypertriglycéridémie et d'autres anomalies métaboliques induites par l'alimentation. D'importants résultats ont été obtenus chez les souris CB1<sup>-/-</sup>, et contrairement à ce qui se produit chez les animaux sauvages, les souris CB1<sup>-/-</sup> soumises à un régime alimentaire riche en graisse ne développent pas de stéatose (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Le rôle spécifique du CB1R hépatique a été récemment évalué dans un modèle de souris avec un knockout pour les CB1R restreint au foie (LCB1<sup>-/-</sup>) (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008). Les souris LCB1<sup>-/-</sup> nourries avec un régime riche en graisse développent un degré d'obésité similaire au souris sauvages, mais présentent une stéatose, une hyperglycémie, une

dyslipidémie et une résistance à l'insuline et à la leptine moins importante que les souris sauvages soumises au même régime alimentaire. L'augmentation de la lipogénèse hépatique *de novo* et la diminution de l'activité CPT-1 induites par le régime obésogène chez les souris sauvages ne sont retrouvées ni chez les souris CB1<sup>-/-</sup> ni LCB1<sup>-/-</sup> (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'activation des CB1R hépatiques contribue aux mécanismes d'installation de la stéatose induite par l'alimentation avec les conséquences qui en résultent sur le métabolisme. De plus, il a récemment été montré que l'hypothalamus exerce certaines influences sur le métabolisme du glucose dans le foie à travers des circuits spécifiques (Pocai *et al.*, 2005). Ainsi, lors d'injection de leptine dans le SNC, on observe des modifications dans la production hépatique de glucose (Buettner *et al.*, 2006) et dans le métabolisme lipidique du foie (Asilmaz *et al.*, 2004), sans doute via un influx nerveux vers le foie. Il est donc raisonnable de penser qu'un traitement chronique par le Rimonabant puisse également exercer des effets de nature nerveuse sur le métabolisme lipidique hépatique et participer ainsi à l'amélioration du statut lipidique.

Enfin, bien que leur rôle ne soit pas encore bien établi, les CB2R pourraient également contribuer à la pathogénèse de la stéato-hépatite d'origine non alcoolique. En effet, les CB2R sont exprimés de façon prédominante par les cellules immunitaires et par les cellules hématopoïétiques (Pacher *et al.*, 2006) et il apparaît que leur expression hépatique est stimulée chez les patients présentant des maladies du foie (Mendez-Sanchez *et al.*, 2007). Dans une autre étude récente, Deveaux et al ont étudié le rôle des CB2R dans le développement de stéatose chez la souris soumise à un régime obésogène (Deveaux *et al.*, 2009). Dans ces travaux, 15 semaines de régime obésogène induit une stéatose sévère chez des souris sauvages. En revanche, des souris CB2<sup>-/-</sup> soumises au même traitement ne développe pas ou peu de stéatose hépatique. Conformément à ces résultats, l'administration d'un agoniste CB2 (JWH-133) renforce l'accumulation de TG dans le foie des souris sauvages nourries avec un régime riche en graisses pendant 6 semaines et est sans effets sur les animaux KO. Une étude récente montre que CB1R et CB2R stimule de manière dose dépendante le degré de stéatose dans des hépatocytes traité à l'acide oléique. Dans ce modèle, l'expression génique des CB1 et CB2R a été réprimée en présence d'une stéatose, et le traitement avec un agoniste des CB2R entraînent une augmentation de l'expression de CB1R. De la même façon, l'expression génique de la CPT-1 a été significativement surexprimée tandis que SREBP-1c, la FAS et la LCAT ont été réprimés chez

ces hépatocytes humains immortalisés et stéatosés. Le traitement de ces cellules par des agonistes des récepteurs cannabinoïdes tels que l'ACEA et AM1241 ont partiellement réverser ces effets, à l'exception de SREBP-1c. De manière intéressante, l'agonisme des CB2R, mais pas des CB1R, a entraîné la diminution de l'expression de l'apolipoprotéine B. Il ressort de cette étude que CB2R participe également à la régulation du métabolisme des lipides dans les hépatocytes (De Gottardi *et al.*, 2010). Pris ensemble, ces résultats indiquent que le CB2R aurait un rôle de médiateur pour l'activation des mécanismes entraînant une stéatose d'origine alimentaire.

#### **4.1.3. Stéatopathie d'origine alcoolique**

L'alcoolisme est une des causes majeures de maladies hépatiques dans le monde, et la consommation d'alcool peut conduire à une stéatose hépatique, une stéatohépatite ou à une cirrhose et ses complications (Reuben, 2008). Chez des patients alcooliques, les dépôts de graisse dans le foie sont principalement liés à une augmentation de la lipogenèse associée à une oxydation insuffisante des acides gras (Reuben, 2008). Jeong *et al* ont récemment montré que la production de 2-AG, mais pas celle d'AEA est induite dans les cellules étoilées activées du foie (également appelée cellules de Ito ou cellules stellaires) de souris consommant de l'éthanol. De plus, le 2-AG stimule l'expression des gènes de la lipogenèse tels que SREBP-1c et FAS, et par conséquent favorise les dépôts graisseux dans les hépatocytes voisins en se liant aux autres CB1R via une action paracrine (Jeong *et al.*, 2008). Plusieurs éléments sont en faveur de ce mécanisme : Premièrement, des souris sauvages traitées au Rimonabant ou des souris CB1<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'induction de stéatose par la consommation d'éthanol. Deuxièmement, les souris LCB<sup>-/-</sup> ne présentent ni stéatose ni induction de gènes lipogéniques et troisièmement, lors d'une consommation d'éthanol, la production de 2-AG se fait sélectivement dans les cellules hépatiques étoilées et pas dans d'autres populations de cellules hépatiques (Jeong *et al.*, 2008). La mise en évidence de cette voie de signalisation dépendante des CB1R représente une grande avancée dans la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à l'induction de la stéatose d'origine alcoolique d'autant plus que récemment, Mukhopadhyay *et al*, ont montré que l'incubation des hépatocytes avec de l'acide rétinoïque ou un agoniste de son récepteur stimule les expressions génique et protéique du CB1R. Le 2-AG participe à la stimulation des CB1R par un mécanisme lié à l'acide rétinoïque. En effet, cet effet n'existe plus dans des hépatocytes de souris dépourvues en rétinaldéhyde déshydrogénase 1, l'enzyme catalysant la production de d'acide rétinoïque à partir de rétinaldéhyde (Mukhopadhyay *et al.*, 2010). Ces études montrent encore

une fois que le CB1R est fortement impliquée dans le contrôle du métabolisme des graisses hépatiques par les EC et ouvre la possibilité de nouvelles interventions thérapeutiques.

#### **4.2. Cannabinoïdes et fibrogénèse hépatique**

La fibrogenèse hépatique correspond à un processus dynamique de cicatrisation exagérée associant à la fois une augmentation de synthèse et une faillite des mécanismes de dégradation de la matrice extracellulaire. Les cellules étoilées du foie et les fibroblastes portaux jouent un rôle prépondérant dans ce double mécanisme. En effet, au cours des hépatopathies chroniques, ces cellules acquièrent un phénotype myofibroblastique, prolifèrent, s'accumulent dans le foie, et synthétisent les principaux composants de la fibrose ainsi que les molécules bloquant sa dégradation (Lotersztajn *et al.*, 2005). Un certain nombre de facteurs, dont les hépatites virales, l'abus d'alcool, et les stéato-hépatites d'origine non alcoolique peuvent induire des lésions hépatiques chroniques ainsi que de l'inflammation, activant ainsi la fibrogenèse. La persistance chronique de stimuli de la fibrogénèse induit une augmentation des dépôts de la matrice extracellulaire par les myofibroblastes hépatiques qui remplacent progressivement les hépatocytes et perturbe l'architecture hépatique normale, conduisant finalement à une cirrhose et, ensuite, à l'apparition de complications liées à l'insuffisance hépatique ainsi qu'à l'hypertension portale (Rockey, 2006). Au cours de la cirrhose, il existe une surproduction d'AEA hépatique et il a récemment été observé que l'expression des CB1R et CB2R est très augmentée, particulièrement dans les cellules fibrogéniques (myofibroblastes hépatiques) responsables de la synthèse des composants de la fibrose (Julien *et al.*, 2005; Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). Ces résultats ont conduit à une évaluation du rôle du système cannabinoïde dans la fibrogenèse, selon une double approche expérimentale et clinique.

Des études réalisées sur des modèles animaux de maladie chronique du foie ainsi que des observations cliniques indiquent que le SEC interagit avec des voies de signalisation complexes qui activent les cellules fibrogéniques et contribuent à l'accumulation de la matrice extracellulaire dans le foie (Siegmund and Schwabe, 2008). De plus, l'expression des CB1R et CB2R est nettement stimulée dans la cirrhose humaine et principalement dans l'endothélium vasculaire et les myofibroblastes hépatiques situés dans les septa fibreux (Julien *et al.*, 2005; Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). Des données récentes suggèrent que la modulation pharmacologique du SEC serait non seulement en mesure de prévenir l'installation de la fibrose (Julien *et al.*, 2005; Teixeira-

Clerc *et al.*, 2006) mais pourrait également entraîner une régression de la fibrose, même en cas de cirrhose avancée (Domenicali *et al.*, 2008; Munoz-Luque *et al.*, 2008).

L'inactivation des CB1R et CB2R par des approches génétiques et/ou pharmacologiques a fourni d'importantes informations sur la régulation des réponses pro- et anti-fibrogéniques dans le foie en fonction des quantités d'EC (Julien *et al.*, 2005; Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). Suite à une induction de lésions hépatiques par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), ou le thioacétamide, ou encore par ligature des canaux biliaires, les animaux CB1<sup>-/-</sup> ainsi que ceux traités avec SR141716 présentent une diminution significative des dépôts de tissu fibreux par rapport aux animaux contrôles (Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). La réduction de la fibrose chez des souris CB1<sup>-/-</sup> est associée à une diminution marquée de la production de cytokines profibrogéniques tels que le TGFβ-1 (Siegmond *et al.*, 2005) et du nombre de cellules musculaires lisses α-actine positives (Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). Une diminution d'environ 30% des surfaces fibreuses a également été observée chez des rats avec une cirrhose induite par CCl<sub>4</sub> et recevant du Rimonabant à 10 mg/kg/jour pendant 14 jours (Domenicali *et al.*, 2008).

Le rôle des CB2R est particulièrement mis en évidence dans une étude utilisant des souris CB2<sup>-/-</sup> (Julien *et al.*, 2005). Ces animaux présentent une augmentation significative de la fibrose après une exposition au CCl<sub>4</sub> par rapport aux souris sauvages. De plus, l'arrêt de la croissance et de l'apoptose induit par le Δ9-THC dans des myofibroblastes hépatiques humains isolés semble être dépendant du CB2R, étant donné que ce phénomène est bloqué par le SR144528 (antagoniste des CB2R) et reproduit par l'agoniste des CB2R JWH-015 (Julien *et al.*, 2005). Des rats avec une cirrhose induite par CCl<sub>4</sub> et souffrant d'une ascite chyleuse (accumulation de liquides riche en TG dans la cavité péritonéale) présentent également une diminution de la surface fibreuse après traitement pendant 9 jours avec l'agoniste du CB2R JWH-133, (Munoz-Luque *et al.*, 2008). Cette constatation est associée à une diminution du nombre de cellules étoilées activées et de cellules inflammatoires dans le foie et à une augmentation de l'apoptose dans les cellules non parenchymateuses situées le long des septa fibreux (Munoz-Luque *et al.*, 2008). Des données récentes indiquent que l'agonisme des CB2R permet de réduire l'étendue de l'atteinte hépatique dans des modèles de lésions aiguës induites ischémie-reperfusion ou par l'administration de concanavaline-A (Batkai *et al.*, 2007; Hegde *et al.*, 2008). Teixeira-Clerc *et al.*, ont confirmé et démontré que l'activation des CB2R est impliqué dans la diminution des lésions hépatiques et

favorisent la régénération du foie suite à une atteinte aiguë, via différents mécanismes paracrines impliquant des myofibroblastes hépatiques (Teixeira-Clerc *et al.*, 2010).

Les mécanismes moléculaires associés aux activités pro- et anti-fibrogéniques du SEC sont encore mal définis. En plus de moduler la mort et la prolifération des cellules fibrogéniques dans le foie, les EC pourraient également influencer la réponse inflammatoire qui initie et maintient l'activation des cellules fibrogéniques du foie via les propriétés anti-inflammatoires des récepteurs (Siegmund and Schwabe, 2008). Des études récentes réalisées *in vitro* ont démontré que l'AEA induit la nécrose tandis que le 2-AG provoque l'apoptose des cellules hépatiques étoilées activées *via* une production accrue d'espèces réactives à l'oxygène. Cependant, ces effets semblent être indépendants de l'interaction avec les CB1R et CB2R (Siegmund *et al.*, 2007; Siegmund *et al.*, 2005).

Au regard de ces données, il apparaît que la stimulation des CB1R et CB2R entraîne des effets opposés. En effet, l'activation du CB1R favorise la fibrogenèse, alors que l'agoniste des CB2R déclenche des réponses anti-fibrogénique dans le foie. Toutefois, le signal pro-fibrogénique du CB1R semble l'emporter sur le signal anti-fibrogénique du CB2R.

#### **4.3. Cannabinoïdes et hypertension portale**

Un effet hypotenseur pour l'AEA, dépendant des CB1R, a été décrit dans de nombreux modèles de choc hémorragique, endotoxinémique ou cardiogénique, ainsi que dans différents modèles d'hypertension artérielle (Pacher *et al.*, 2006). Dans le cas du foie cirrhotique, on assiste à l'installation d'une hypertension portale qui semble provenir d'une part d'une augmentation de la résistance intra-hépatique liée aux remaniements architecturaux ainsi qu'à une vasoconstriction excessive des veinules portes et des capillaires sinusoides, et d'autre part à une vasodilatation artérielle, en particulier splanchnique, consécutive à une surproduction périphérique de molécules vasodilatatrices (Mallat, 1998). Il a été suggéré qu'une activation du système cannabinoïde pouvait participer à la vasodilatation systémique provoquée par la cirrhose (Batkai *et al.*, 2001). De plus, les CB1R sont induits dans les cellules endothéliales d'artères mésentériques et la concentration monocyttaire d'AEA est plus élevée chez les malades cirrhotiques que chez des sujets sains (Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2004). Enfin, des données récentes indiquent que l'AEA provoque une vasodilatation sélective des artérioles mésentériques sans modifier la vasomotricité des artérioles périphériques (Domenicali *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats indique que

l'AEA a un effet vasodilatateur mésentérique marqué, dépendant des CB1R, qui favorise le développement de l'hypertension portale.

## 5. Le SEC dans les autres tissus

### 5.1. Le pancréas

C'est en 1986 que Laychock *et al* ont pour la première fois suggéré un rôle pour les cannabinoïdes dans la modulation de la sécrétion de l'insuline (Laychock *et al.*, 1986). Il est à noter que cette première étude a été réalisée avant le clonage des CB1R, lorsque les mécanismes d'action des cannabinoïdes n'étaient pas encore connus. Les différentes études mettent en évidence deux conclusions principales:

(1) Le SEC est présent dans le pancréas endocrine chez les rongeurs et l'Homme. En 2006, Juan-Pico *et al* ont détecté l'expression génique des CB1R et CB2R dans les îlots de Langerhans de souris, avec les CB1R principalement exprimés par les cellules  $\alpha$  et les CB2R exprimés à la fois par les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  (Juan-Pico *et al.*, 2006). De plus, Matias *et al.*, a montré en utilisant une lignée cellulaire d'insulinome de rat que toute la machinerie nécessaire à synthétiser et à dégrader l'AEA et le 2-AG est présente dans ce type cellulaire (Matias *et al.*, 2006). En 2008, Nakata et Yada ont démontré par PCR quantitative et par immunohistochimie que les CB1R mais pas les CB2R sont présents dans les îlots de souris (Nakata and Yada, 2008). En 2007, Bermudez-Silva *et al* ont détecté l'expression protéique des CB1R et CB2R dans les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  des îlots de rat, avec une expression plus intense de CB1R dans les cellules  $\alpha$  (Bermudez-Silva *et al.*, 2007). En 2008, le groupe du Professeur Di Marzo a publié une étude confirmant la localisation des récepteurs CB du pancréas (Starowicz *et al.*, 2008). En outre, les auteurs ont également précisé la distribution cellulaire des deux enzymes de biosynthèse et de dégradation dans les îlots de Langerhans de souris. Ainsi, les enzymes de synthèse, NAPE-PLD et DAGL- $\alpha$ , ont été détectées dans les cellules  $\alpha$ , tandis que les enzymes de dégradation FAAH et MAGL sont limitées aux cellules  $\beta$ . Des CB1R ont été localisés dans une petite sous-population de cellules  $\beta$ , alors que presque toutes les cellules  $\alpha$  expriment ce récepteur. Le CB2R quant à lui, semble restreint aux cellules  $\delta$ , et n'apparaît pas exprimé dans les cellules  $\alpha$  ou  $\beta$  du pancréas humain (Bermudez-Silva *et al.*, 2008). Cependant, le rapport de Tharp *et al* contredit les études précédentes car il indique une expression de la protéine CB1R seulement dans les cellules  $\delta$ , mais pas dans les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  du rat, de la souris et de l'Homme (Tharp *et al.*, 2008). Les auteurs n'ont trouvé

aucune différence spécifique à l'espèce et n'ont signalé aucune expression génique du CB2R dans les îlots de rongeurs ou de l'Homme, à l'exception d'une marque diffuse dans les tissus périvasculaires et acineux. Il n'y a donc ni consensus permettant d'affirmer la présence de CB1R et CB2R au niveau des cellules  $\beta$  et encore d'affirmer que les agonistes de ces récepteurs puissent agir sur la sécrétion insulinaire. Récemment, Li *et al.*, ont montré dans la lignée cellulaire Min6 (amas hétérogène de cellules endocrines dont les cellules  $\beta$ ) que la diacylglycérol lipase et les CB1R et CB2R sont exprimés dans ces cellules et que leur activation est fortement corrélée à une élévation de la sécrétion insulinaire (Li *et al.*, 2010).

(2) Les récepteurs aux cannabinoïdes ont la capacité de moduler les échanges calciques induits par le glucose et, par conséquent, la sécrétion d'insuline (Juan-Pico *et al.*, 2006; Matias *et al.*, 2006). Ces résultats fournissent une base anatomique et physiologique pour expliquer, au moins partiellement, les avantages métaboliques du blocage des CB1R chez les patients obèses diabétiques. Après examen de tous ces résultats et en les plaçant dans le contexte de la physiologie des EC, le SEC du pancréas peut être proposé comme un modulateur important de la physiologie des îlots en contribuant à l'homéostasie énergétique via son effet sur la signalisation calcique, la sécrétion de glucagon et la sécrétion d'insuline. Compte tenu de ce rôle potentiel, le traitement par un antagoniste des CB1R pourrait aider à maintenir une masse fonctionnelle de cellules  $\beta$ , en évitant la progression vers une dépendance d'insuline comme au stade final d'un diabète de type 2.

## **5.2. Le tractus gastro-intestinal**

Les CB1R sont situés dans la partie inférieure du sphincter de l'oesophage (Hornby and Prouty, 2004). Il a été montré que les ligands  $\Delta^9$ -THC et WIN-55212-2 ont la capacité d'inhiber le relâchement de ce muscle chez des furets et des chiens en activant les récepteurs aux cannabinoïdes, empêchant ainsi le reflux gastro-oesophagien acide (Lehmann *et al.*, 2002; Partosoedarso *et al.*, 2003). Ceci suggère que les médicaments à base de cannabinoïdes pourraient constituer des traitements efficaces contre le reflux gastro-oesophagien acide.

Les CB1R sont également présents tout le long du tractus gastro-intestinal (Coutts and Izzo, 2004; Pertwee, 2001), bien que leur concentration la plus forte se situe au niveau du côlon et de l'estomac (Adami *et al.*, 2002; Casu *et al.*, 2003). Quelques-uns des CB1R ont été découverts dans les mêmes cellules nerveuses que celles qui sécrètent les hormones responsables de

l'appétit et de la digestion, à savoir les peptides vaso-intestinaux et les neuropeptides Y (Coutts *et al.*, 2002), laissant sous-entendre que les EC s'associeraient à ces hormones pour réguler le tractus gastro-intestinal (Al-Massadi *et al.*, 2010). Ainsi l'omniprésence du SEC dans l'appareil digestif étaye la thèse selon laquelle les EC et leurs récepteurs jouent un rôle considérable dans de nombreuses fonctions clé de la digestion. Des tests ont d'ailleurs mis en évidence l'impact du SEC sur l'activité sécrétoire et la motilité de l'intestin (Coutts and Izzo, 2004) : il empêche l'inhibition de la vidange gastrique (Landi *et al.*, 2002), de la motilité intestinale et du transit des aliments dans les intestins (Izzo *et al.*, 2001; Izzo *et al.*, 2000; Manara *et al.*, 2002). Des études complémentaires réalisées sur un modèle animal de colite ont démontré que le SEC jouait aussi un rôle protecteur du système gastro-intestinal contre les inflammations (Massa *et al.*, 2004).

Le fait que les CB2R puissent intervenir en plus du système immunitaire, dans l'activité gastro-intestinale n'a été admis de manière générale que tout récemment. Suite à un précédent rapport sur les effets de l'agoniste sélectif des CB2, le HU-308, sur la défécation chez les souris (Hanus *et al.*, 2001), une série de contre analyses niant le rôle des CB2R dans les fonctions gastro-intestinales (Coutts and Izzo, 2004; Izzo, 2004; Pertwee, 2001) a vu le jour. Néanmoins, la présence de CB2R dans l'estomac (Adami *et al.*, 2002) et dans les intestins (Mathison *et al.*, 2004) est à présent avérée.

Certaines études ont révélé la présence d'EC, d'enzymes de dégradation et de transporteurs de capture (Di Carlo and Izzo, 2003; Izzo *et al.*, 2001) dans le tractus gastro-intestinal ; par ailleurs, on y trouve une concentration en EC bien plus élevée que dans le cerveau (Izzo *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002a; Pinto *et al.*, 2002b). Ce fut la découverte de l'inhibition de la défécation chez des souris induite par l'AEA qui, pour la première fois, a révélé l'influence des EC sur le fonctionnement des intestins (Fride, 1995). De plus, il s'avère que la flore intestinale a un impact non négligeable sur l'action du SEC en modulant son activité concernant la perméabilité intestinale et l'adipogenèse (Muccioli *et al.*, 2010). Le SEC apparaît donc comme un élément capital du tractus GI et joue très probablement un rôle majeur dans la digestion.

### **5.3. Muscle squelettique**

Le muscle squelettique est un site important de l'oxydation des lipides et du glucose, qui représente jusqu'à 30% de la dépense énergétique basale (Zurlo *et al.*, 1990). Les CB1R, CB2R et TRPV1 sont exprimés dans le muscle squelettique chez l'Homme et chez le rongeur (Cavuoto *et*

*al.*, 2007). Les rôles respectifs de ces récepteurs dans la signalisation des effets des cannabinoïdes dans le muscle squelettique restent à élucider. L'expression des CB1R dans le muscle squelettique est stimulée chez les souris soumises à un régime obésogène (Pagotto *et al.*, 2006). Il a également été rapporté que les CB1R sont surexprimés avec des niveaux élevés en EC dans les muscles de souris insulino-résistantes à la suite d'un régime riche en graisses (Matias *et al.*, 2008; Pagotto *et al.*, 2006) et réprimés dans un modèle *in vitro* de muscle squelettique de rats insulino-résistant (Lindborg *et al.*, 2010).

. De plus, Le Rimonabant entraîne une augmentation de la captation du glucose ainsi que de la consommation d'oxygène par des muscles soléaires isolés de souris Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup> (Liu *et al.*, 2005). En outre, l'inactivation génétique des CB2R chez des souris améliore la captation du glucose par le muscle squelettique (Agudo *et al.*, 2010). L'antagoniste sélectif des CB1R AM251 stimule l'expression de l'ARNm AMPK $\alpha$  dans des myotubes de muscle squelettique isolés de patients obèses (Cavuoto *et al.*, 2007). En opposition avec les effets décrits pour les bloqueurs des CB1R, les cannabinoïdes semblent ne pas exercer d'effets quelconque sur l'expression de l'ARNm de l'AMPK dans le muscle squelettique de rats sains (Kola *et al.*, 2005) ou de sujets sains ou obèses (Cavuoto *et al.*, 2007). La raison de cette apparente anomalie n'est pas claire d'autant plus que dans les myocytes cardiaques, qui dépendent de l'oxydation des acides gras comme source d'énergie dans des conditions basales, les EC stimulent bien l'expression et l'activité fonctionnelle de l'AMPK (Kola *et al.*, 2005). Les EC pourraient également réguler la contraction des muscles squelettiques (Newman *et al.*, 2007). En effet, chez des petits lézards (*Anolis carelinensis*), les EC réduisent la contraction des muscles par un mécanisme CB1-dépendant au niveau de la jonction neuromusculaire du muscle ceratomandibularis (Newman *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données suggère donc que la suractivation du SEC dans le muscle squelettique peut être associée à une résistance locale à l'insuline.

## **6. Autres fonctions du SEC**

Du fait d'une très large distribution tissulaire des CB1R et CB2R, le SEC intervient dans la régulation de nombreuses fonctions et dans des processus physiopathologiques très variés. Par exemple, des agonistes du CB1R comme le Marinol® sont utilisés en clinique pour leurs effets antiémétiques et orexigènes chez les patients atteints de SIDA ou sous chimiothérapies. L'utilisation d'agonistes des CB1R et surtout CB2R pourrait également être intéressant dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (Izzo, 2004; Izzo and Coutts, 2005; Izzo

*et al.*, 2001; Izzo *et al.*, 2009) tandis que des antagonistes du récepteur CB1 pourraient bloquer le développement de la fibrose (Teixeira-Clerc *et al.*, 2006). De même, plusieurs études suggèrent un rôle non négligeable du CB2R dans certaines pathologies telles que l'ostéoporose (Idris and Ralston, 2010; Idris *et al.*, 2009; Karsak *et al.*, 2009), l'athérosclérose (Mach *et al.*, 2008; Mach and Steffens, 2008) ou encore l'asthme (Giannini *et al.*, 2008). Le récepteur CB2 serait également très impliqué dans certaines pathologies neurodégénératives tels que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Rivers and Ashton, 2010). En fonction des pathologies, ce CB2R posséderait des propriétés pro ou anti-inflammatoires et il apparaît que l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes de ce récepteur possède un fort potentiel thérapeutique dans des domaines où les patients n'ont souvent que peu de choix dans le traitement. Cependant, il apparaît que l'utilisation prolongée de ces molécules engendre de graves effets indésirables (Di Marzo, 2008a).

## **7. Rimonabant et modulation pharmacologique du SEC**

### **7.1. La modulation pharmacologique du système EC peut s'effectuer à plusieurs niveaux**

La régulation de l'activité du SEC peut concerner différentes étapes allant de la synthèse à la dégradation des EC. Il est possible de distinguer 6 étapes qui sont représentées dans la figure 10.

### **7.2. Le Rimonabant**

Le Rimonabant, également connu sous le nom SR141716, a été décrit en 1994 par Rinaldi-Carmona *et al.* comme étant le premier composé bloquant spécifiquement les CB1R (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Après administration, 99% du SR141716 est lié à des protéines plasmatiques. Il est métabolisé par le cytochrome P450 dans le foie et presque totalement expulsé dans les fèces. Il peut interagir avec d'autres médicaments métabolisés par le cytochrome P450, en particulier ceux transformés par les isoformes CYP 2A6, 2C9, 2C19 et 3A4 (Ducobu and Sternon, 2005). Certains inhibiteurs du CYP3A4, comme le kétoconazole, conduisent à une augmentation des taux sanguins de SR141716, tandis qu'un inducteur de CYP3A4 entraîne une diminution des concentrations plasmatiques et par conséquent une perte d'efficacité de SR141716 (Wierzbicki, 2006). SR141716 a tout d'abord été commercialisé par la firme Sanofi-Aventis sous la marque Acomplia comme médicament anti-obésité après l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché européen en 2007.

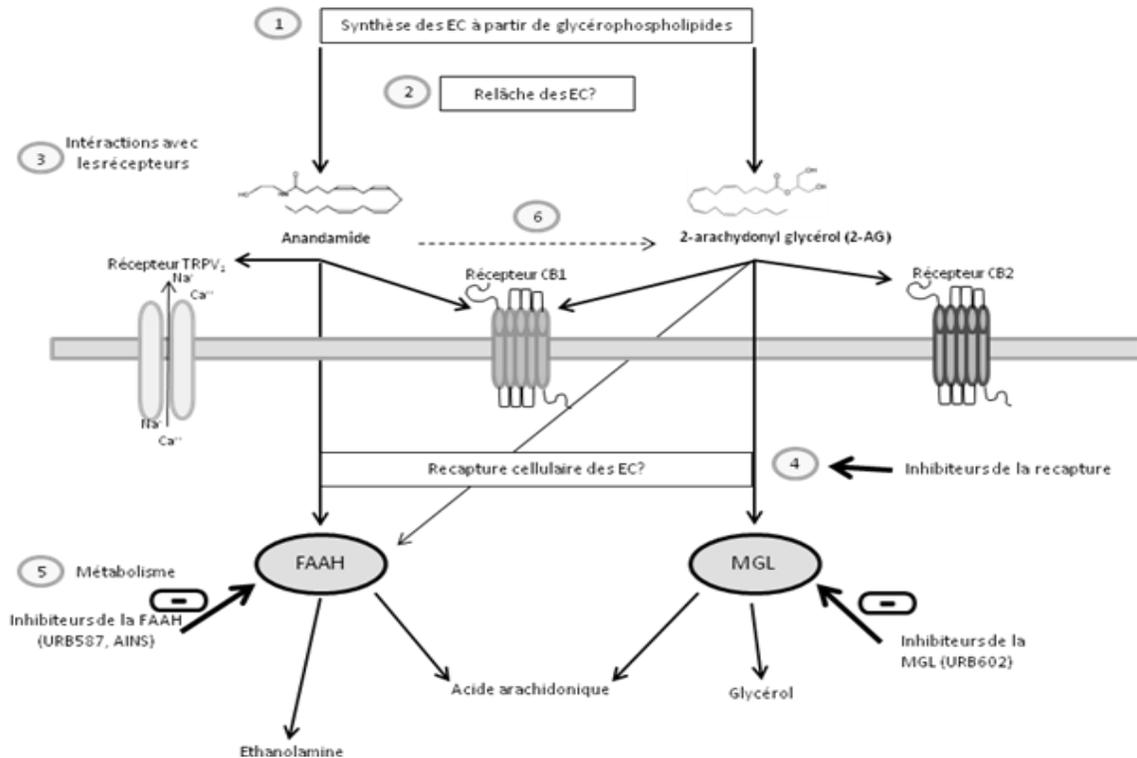


Figure 10 : Le SEC : potentiel thérapeutique. **1)** Il existe une régulation physiologique de la synthèse « à la demande » des EC à partir de phospholipides membranaires qui peut-être altérée sous certaines conditions pathologiques. Cependant, il n'existe actuellement aucun agent pharmacologique modulant de manière sélective cette synthèse des EC. **2)** La libération des EC serait réalisée par diffusion passive ou facilitée par un transporteur membranaire encore inconnu localisé sur les neurones pré- et postsynaptiques. La sécrétion pourrait être modulée par le VDM11 et l'AM404, des inhibiteurs potentiels de la recapture de l'AEA, mais ces mécanismes restent à élucider. **3)** Plusieurs agents pharmacologiques ont été développés dans le but de moduler l'interaction des EC avec les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 ainsi que les récepteurs TRPV<sub>1</sub> (ou récepteurs vanilloïdes dont la capsaïcine est un substrat) dans le cas précis de l'AEA. Le développement d'antagonistes spécifiques pour les CB1R (SR141716 et AM251), CB2R (SR14458 et AM630) et TRPV<sub>1</sub> (capsazépine) ainsi que l'inactivation de ces récepteurs ont permis de mieux caractériser l'implication de ces récepteurs dans les effets des EC. **4)** Suite à l'interaction avec les récepteurs, les EC seraient soumis à une recapture cellulaire. La recapture de l'AEA semble être bloquée par différents inhibiteurs (AM404, VDM11, UCM707, OMDM2) mais les données actuelles sont insuffisantes à la compréhension de ce phénomène. **5)** Le métabolisme des EC constitue une étape très importante en ce qui concerne les possibilités thérapeutiques. Ainsi, l'hydrolyse de l'AEA s'effectue par l'intermédiaire d'une amidohydrolase des acides gras ou fatty acid amidohydrolase (FAAH) pour former de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine. Le 2-AG est quant à lui hydrolysé en acide arachidonique et en glycérol principalement par une enzyme nommée monoacylglycérol lipase (MGL). Cependant, le 2-AG pourrait également être métabolisé par la FAAH. Ainsi des inhibiteurs de la FAAH tels que l'URB597 ainsi que des souris dont le gène codant pour la FAAH a été invalidé ont été développés. De plus, il a été démontré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens pouvaient également inhiber le métabolisme de l'AEA qui est aussi métabolisé par la cyclooxygénase 2 (Cox-2). Récemment, des inhibiteurs sélectifs pour la MGL ont été décrits tels que l'URB602 avec pour principales caractéristiques des effets analgésiques (Guindon *et al.*, 2007; Hohmann *et al.*, 2005). **6)** De nouvelles évidences suggèrent une profonde reconceptualisation du système EC puisqu'une étude récente a démontré que l'AEA pouvait moduler la synthèse et le métabolisme du 2-AG. En effet, l'élévation des concentrations d'AEA suite à l'inhibition pharmacologique ou génétique de la FAAH pourrait moduler le taux, le métabolisme et les effets physiologiques du 2-AG via l'activation des récepteurs TRPV1 dans le striatum (Maccarrone *et al.*, 2008). Ainsi, les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les CB1R et TRPV1 pouvaient interagir entre eux dans certaines régions du cerveau.

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) en a fortement limité sa prescription dès mai 2007 suite à des effets secondaires importants, concernant le risque de survenue de troubles dépressifs majeurs. La « Food And Drug(s) administration » (FDA) a également annoncé le 13 juin 2007 la non autorisation de la commercialisation du Rimonabant aux Etats-Unis. Au niveau de l'Union Européenne, malgré les effets secondaires et les décès notifiés, les agences du médicament ont proposé d'ajouter des contre-indications et des recommandations d'utilisation sur les notices. Le 9 août 2007, l'AFSSAPS actualise le plan de gestion des risques d'Acomplia et limite sa prescription à cause de ses effets secondaires. Un antécédent de dépression devient alors une contre indication définitive alors qu'elle n'était que préventive. En octobre 2008, l'agence européenne d'évaluation des médicaments et l'AFSSAPS recommande auprès de la commission européenne la suspension de l'autorisation de mise sur le marché de la molécule. Le jour même, Sanofi Aventis annonce le retrait immédiat d'Acomplia de toutes les pharmacies des 18 pays de l'Union européenne qui le distribuaient. Le 5 novembre 2008, Sanofi Aventis décide l'arrêt de tous les programmes de développement du produit, pour tous les usages sauf certains programmes de recherche fondamentaux.

## Problématique

Il ressort de cette analyse bibliographique que le SEC, via l'activation des CB1R, est largement impliqué dans le développement de pathologies associées au syndrome métabolique (figure 11). Il est clairement établi que l'activation centrale du SEC stimule la prise alimentaire et que l'augmentation du taux des deux principaux endocannabinoïdes agonistes des CB1R, l'AEA et le 2-AG, est associée à la prise de poids (Di Marzo *et al.*, 2001a; Jamshidi and Taylor, 2001; Williams and Kirkham, 1999).

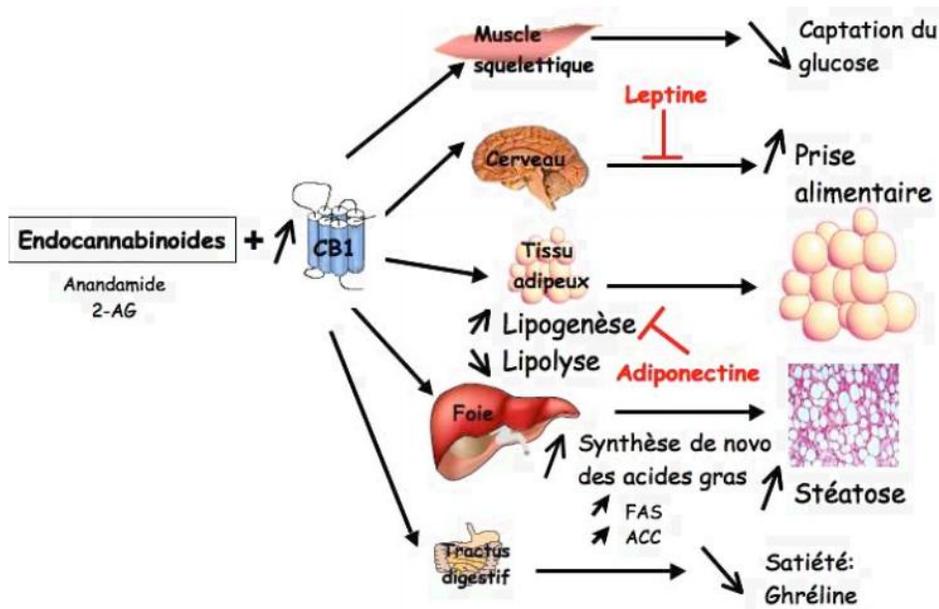


Figure 11 : Conséquences de l'activation du CB1R sur les organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Deveaux, 2008).

C'est pourquoi des stratégies pharmacologiques ont été développées pour antagoniser les CB1R. Le Rimonabant (SR141716) est le premier antagoniste à avoir été mis sur le marché et prescrit comme agent anti-obésité en Europe. Son efficacité en terme de réduction de masse corporelle a été mise en évidence dans une série de publications majeures (Curioni and Andre, 2006; Padwal and Majumdar, 2007). De plus, l'antagonisme des CB1R semble également améliorer plusieurs paramètres associés à l'obésité dont l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie et la dyslipidémie chez le rongeur (Gary-Bobo *et al.*, 2007; Poirier *et al.*, 2005; Ravinet Trillou *et al.*, 2003) et l'Homme (Despres *et al.*, 2005; Van Gaal *et al.*, 2005).

Toutefois, la méta-analyse RIO (Rimonabant In Obesity) a révélé qu'un traitement par le Rimonabant pouvait avoir des effets psychiatriques sévères (Christensen *et al.*, 2007) conduisant à des questions majeures concernant l'innocuité de ce médicament chez les patients obèses qui affichent déjà un risque de dépression élevé. Finalement, le développement et la vente du Rimonabant n'ont jamais vu le jour aux Etats Unis et ont été suspendues en Europe le 23 Octobre 2008 après que l'Agence Européenne du Médicament ait émis un avis défavorable à la prescription de ce traitement car le rapport bénéfice/risque pour la santé ne semblait plus en faveur des bénéfiques. En effet, les graves troubles psychiatriques (angoisse, insomnie, dépression, idées suicidaires,...) provoqués par le Rimonabant se sont révélées plus fréquents et plus puissants que le laissaient penser les études cliniques RIO (Sanofi-aventis, 2008). Malheureusement, le Rimonabant conduit à ces effets secondaires en agissant sur les CB1R localisés dans le cerveau, les mêmes que ceux impliqués dans les effets bénéfiques sur la prise alimentaire. Toutefois, même si la réduction de la prise alimentaire semble être un élément clé conduisant à la perte de poids et à l'amélioration des paramètres métaboliques, plusieurs études chez l'animal et chez l'Homme indiquent que les CB1R périphériques pourraient également être impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique (Bensaid *et al.*, 2003; Cote *et al.*, 2007; Di Marzo *et al.*, 2009; Engeli and Jordan, 2006; Matias *et al.*, 2008; Nogueiras *et al.*, 2008; Osei-Hyiaman *et al.*, 2008). Par conséquent, les effets bénéfiques à long terme de l'inactivation du SEC pourraient être dus à la fois aux effets centraux sur la prise alimentaire et à des effets périphériques concernant le tissu adipeux, le foie, le muscle squelettique et le pancréas (Duvivier *et al.*, 2009; Getty-Kaushik *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005).

C'est sur ce concept que ce travail de thèse s'est plus particulièrement orienté en abordant tout d'abord les effets de l'administration de l'antagoniste des CB1R à des souris préalablement rendues obèses par un régime enrichi en sucres et en graisses. Dans cette approche *in vivo*, nous analyserons conjointement la variation de la masse grasse (viscérale ou sous-cutanée), les paramètres plasmatiques (insuline, adiponectine, AGL...) et la régulation du métabolisme hépatique et adipocytaire. Les résultats seront interprétés en tenant compte de l'expression des CB1R dans chacun des tissus. Les effets du blocage spécifique des CB1R hépatiques et adipocytaires seront ensuite étudiés sur des modèles d'explants tissulaires en culture.

## Problématique

Ces travaux s'articulent donc autour de 3 axes complémentaires et l'objectif de cette étude est d'apporter de nouvelles informations concernant les effets de l'inactivation du SEC dans les tissus périphériques sur le métabolisme glucido-lipidique. De telles données permettront d'évaluer l'intérêt de développer des agents thérapeutiques ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et capables d'antagoniser spécifiquement les CB1R périphériques. Cette thèse est basée sur la réalisation d'un contrat de recherche établi en septembre 2007 avec SANOFI-AVENTIS.

# *Résultats*

## Chapitre I : Approche *in vivo* : Etude des effets de l'antagonisme des CB1R chez la souris obèse.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Diabetes* : Jourdan *et al*, 2010 *Diabetes* 59 :926-934

### 1. Paramètres morphologiques et sériques

Pour cette approche *in vivo*, les effets de l'antagonisme des CB1R ont été testés sur des souris préalablement soumises à un régime enrichi en sucres et en graisses dont la composition est assimilable au régime « cafétéria » (42,3% de sucres et 22,5% en lipides). Ce régime a été administré jusqu'à ce que leur masse corporelle ainsi que leur insulïnémie soient statistiquement différentes de celles d'un lot d'animaux « témoin » nourris avec un régime classique.

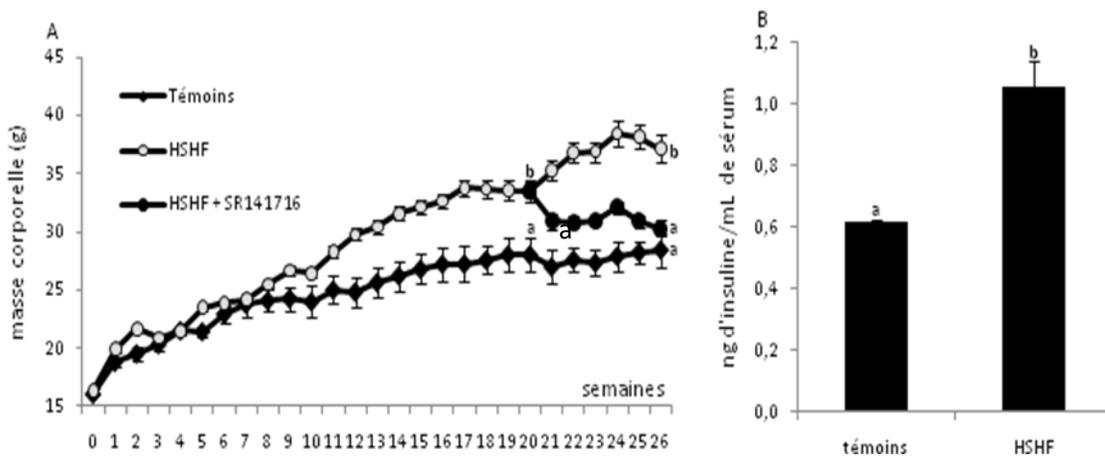


Figure 12 : Evolution de la masse (A) et insulïnémie (B) des animaux soumis soit à régime standard (Témoin, n=5) soit à un régime riche en sucres et en graisses saturées (HSHF, n=24) pendant 20 semaines puis traités 6 semaines par SR141716 (10mg/kg/jour) ou placebo.

Sur 40 animaux, 24 ont répondu aux critères de sélection après 20 semaines de régime, l'évolution de leur masse corporelle et leur insulïnémie est présentée dans les Figures 12A et 12B. Les animaux ont ensuite été séparés en 2 lots pour être traités soit par un placebo (HSHF) soit par l'antagoniste des CB1R SR141716 (HSHF+SR141716) tout en continuant à être soumis au régime enrichi en sucres et en graisses. Le traitement a consisté en une administration journalière d'une solution de Rimonabant (10mg/kg) *per os* en une seule prise l'après midi pendant 6 semaines. L'évolution de la masse des animaux obèses en fonction du traitement met en évidence un effet rapide et maintenu du Rimonabant sur la masse corporelle. En effet, dès la première semaine de traitement, les animaux perdent du poids. Les 5 semaines suivantes, le poids des animaux reste stable bien qu'ils continuent à consommer le régime HSHF sans réduction

apparente de prise alimentaire. A l'issue du traitement, les tissus et organes d'intérêt ont été prélevés pour analyses morphologiques, biochimiques et moléculaires.

Les mesures, présentées dans le Tableau 2 indiquent que les masses des TA épидидymal et inguinal qui ont été augmentées par le régime HSHF, sont diminuées par le traitement SR141716. Parallèlement, la masse du foie est la plus élevée chez les souris HSHF et la plus faible chez les souris HSHF + SR141716 (tableau 2). Ces résultats révèlent également qu'à la fin de l'expérience, la glycémie des souris HSHF n'est pas différente de celle mesurée chez les Témoins malgré une augmentation du taux d'insuline ce qui indique que les souris HSHF présentent une insulino-résistance. De même, les taux d'AGL et de cholestérol total sont plus élevés chez les souris HSHF que chez les souris Témoins tandis que la triglycéridémie est 50% plus basse. D'autre part, l'expansion de la masse grasse est associée à une réduction des taux d'adiponectine chez les souris nourries avec le régime HSHF par rapport aux Témoins. Fait intéressant, l'insulinémie et les niveaux d'adiponectine chez les souris HSHF ne sont plus différents des Témoins après traitement par l'antagoniste CB1R (tableau 2) et la concentration sérique en AGL est partiellement normalisée. Les taux de glucose, TG et cholestérol ne diffèrent pas entre les groupes HSHF et HSHF+SR141716.

## **2. Métabolisme hépatique**

### **2.1. Paramètres biochimiques**

Dans le foie, le régime HSHF induit une stéatose, avec une augmentation de 5 fois de la teneur en TG tandis que le contenu en cholestérol total reste inchangé. Le contenu en malonyl-CoA, un précurseur de la synthèse des AG via la voie de la lipogénèse et un inhibiteur puissant de la  $\beta$ -oxydation, a également nettement augmenté chez les animaux HSHF. De manière intéressante, les accumulations de TG et de malonyl-CoA sont partiellement normalisées après traitement avec l'antagoniste des CB1R et les réserves de glycogène sont moindres chez les souris HSHF par rapport aux souris témoins suggérant une stimulation de la glycogénolyse (tableau 3).

Le fait que le traitement puisse partiellement résorber la stéatose hépatique induite par le régime HSHF nous a incité à vérifier si cet effet pouvait être lié à une augmentation de la capacité oxydative des hépatocytes. Pour cela, nous avons mesuré l'activité  $\beta$ -oxydative sur de fines tranches de foie fraîchement prélevées sur les animaux obèses traités ou non par SR141716. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre ces 2 lots.

Tableau 3 : Effets de l'antagoniste CB1R sur la composition corporelle, les paramètres plasmatiques et le foie. Les souris ont été nourries avec un régime HSHF pendant 25 semaines. Au cours des 6 dernières semaines, elles ont reçu soit 10 mg/kg.jour<sup>-1</sup> de l'antagoniste CB1R SR141716 (HSHF + SR) soit un placebo (HSHF) par voie orale. En parallèle, une série de souris a été maintenue sous régime contrôle (Témoins). Les souris ont été privées de nourriture 4 h avant sacrifice. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

	Témoins	HSHF	HSHF + SR141716
	(n=5)	(n=10)	(n=14)
<b>Masse des organes</b>			
Foie (g)	1.38 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.21 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
TA épидидymaire (g)	0.67 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.04 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
TA inguinal (g)	0.31 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<b>Sérum</b>			
Glucose (mg/mL)	2.79 $\pm$ 0.16	2.72 $\pm$ 0.21	2.53 $\pm$ 0.08
Insuline (ng/mL)	0.40 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.44 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Adiponectine ( $\mu$ g/mL)	63.05 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>	42.31 $\pm$ 7.21 <sup>b</sup>	59.82 $\pm$ 3.95 <sup>a</sup>
Acides gras libres (mmol/L)	0.30 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
Triglycérides (mg/mL)	0.74 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
Total cholestérol (mg/mL)	1.09 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.87 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
<b>Foie</b>			
Glycogène (mg/g)	66.7 $\pm$ 8.1 <sup>a</sup>	49.2 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	37.4 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>
Triglycérides (mg/g)	24.4 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	118.7 $\pm$ 17.6 <sup>b</sup>	46.4 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>
Cholestérol total (mg/g)	16.07 $\pm$ 0.94	17.98 $\pm$ 1.63	15.72 $\pm$ 0.7
MalonylCoA (nmoles/g)	1.67 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	3.43 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	2.41 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>

Toutefois, au cours de ces mêmes expériences, les explants issus des foies de souris HSHF + SR141716 ont sécrété nettement moins d'ApoB dans le milieu de culture que les explants issus de souris HSHF alors que la sécrétion d'ApoA était identique entre les deux groupes. Ce modèle

a également été utilisé pour déterminer si le blocage des CB1R affectait le captage du HDL-CE. Il s'avère que l'incorporation d'HDL-CE a été plus important dans les explants de foie HSHF + SR141716 que dans les explants de foie HSHF suggérant d'intéressantes adaptations métaboliques pouvant influencer sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (tableau 4).

Tableau 4 : Effets de l'antagonisme des CB1R sur l'oxydation des acides gras et les paramètres relatifs au métabolisme des lipoprotéines dans des explants de foie. De fines tranches de foie (environ 200 micromètres) ont été obtenues à partir de souris nourries avec un régime HSHF puis traitées soit avec 10 mg/kg.jour-1 d'antagoniste CB1R (HSHF + SR; n = 5), soit avec un placebo (HSHF, n = 5). Pour l'oxydation des acides gras et la sécrétion d'apolipoprotéines, des tranches ont été incubées à 37 ° C dans du milieu William's Medium E oxygéné, complété par de la L-carnitine (0,5 mmol / L) en présence de 0,2 mmol / L de [1-14C] acide palmitique (55,5 GBq / mol) complexé à l'albumine (FA / BSA rapport molaire de 2,5 / 1). La mesure du captage des HDL a été effectuée à 37 ° C en incubant les tranches de foie avec de l'[3H]-éther de cholestérol-HDL sous légère agitation pendant 3 heures. Ensuite, les tranches ont été lavées et homogénéisées dans du PBS. La radioactivité retrouvée dans l'homogénat est représentative du cholestérol HDL capté par les cellules du foie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

	HSHF	HSHF + SR141716
Oxydation acide palmitique (nmoles/ h.g prot <sup>-1</sup> )	23 $\pm$ 1,3	22 $\pm$ 2,4
Sécrétion ApoB ( $\mu$ g/h.g prot <sup>-1</sup> )	155 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	123 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
Sécrétion ApoA ( $\mu$ g/h.g prot <sup>-1</sup> )	141 $\pm$ 2	140 $\pm$ 3
Captage HDL-CE ([3H]-cholesteryl ether dpm /h. $\mu$ g prot-1)	430 $\pm$ 119 <sup>a</sup>	1075 $\pm$ 139 <sup>b</sup>

## 2.2. Régulation génique

Les résultats sont présentés figure 13. Nous avons d'abord testé l'impact du régime et du traitement avec SR141716 sur l'expression génique des CB1R comme un indicateur de l'activité du SEC. L'expression des ARNm CB1R est fortement stimulée chez les souris HSHF et grandement réprimée chez les souris HSHF + SR en comparaison avec les témoins. Cela reflète une stimulation du SEC dans ce modèle de souris obèses et une inhibition efficace de cette voie par le traitement antagoniste CB1R. Ensuite, les niveaux d'expression de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de glucose-6-phosphatase (G6P) ont été mesurés en tant qu'indicateur de résistance à l'insuline du foie. On observe une relation inverse entre les niveaux d'insuline et l'expression de ces deux enzymes suggérant que l'insuline a encore la capacité de contrôler leur transcription. En raison d'un probable impact de l'antagonisme CB1 sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines, nous avons mesuré l'expression de la lipase hépatique (HL) et du scavenger receptor de classe B de type I (SR-B1) dans le foie.

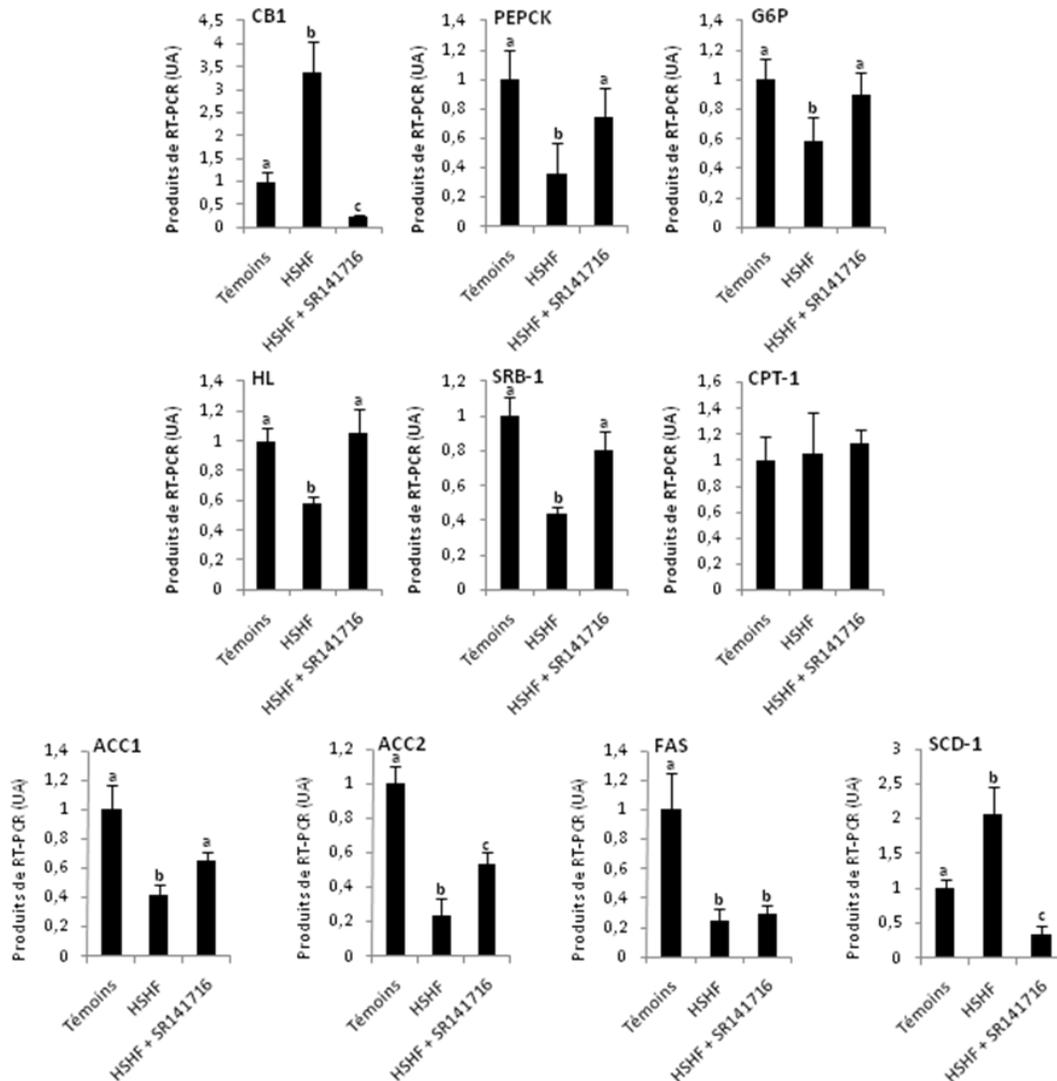


Figure 13: Effet de l'antagonisme CB1R sur l'expression des ARNm de CB1 et de différents gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides dans le foie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ . CB1, récepteur cannabinoïde 1; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6P, glucose-6-phosphatase, HL, lipase hépatique; SR-BI, scavenger receptor de classe B de type I; CPT-I, carnitine palmitoyltransferase I; ACC, acétyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; SCD-1, stéaroyl-CoA désaturase-1.

Les niveaux d'expression de ces deux gènes sont plus faibles chez les souris HSHF et ne diffèrent pas entre les témoins et les souris HSHF + SR. De manière surprenante, les niveaux d'expression des enzymes de la lipogenèse acétyl-CoA carboxylase (ACC) 1 et 2, et fatty acid synthase (FAS) ont été inhibés chez les souris HSHF par rapport aux souris Témoins. L'expression des deux isoformes de l'ACC est toutefois plus forte dans le foie des souris HSHF + SR que chez les souris HSHF tandis que l'antagonisme des CB1R n'a eu aucun effet sur l'expression de la FAS.

L'expression de la stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD-1), qui convertit les AG saturés en monoinsaturés, est stimulée chez les souris HSHF et réprimée chez les souris HSHF + SR, ce qui suggère que l'inhibition du SEC a limité la forte production d'AG monoinsaturés induite par une alimentation riche en sucres et en graisses. De plus, ni le régime ni le traitement n'ont modifié les taux de transcrits de la carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale.

### 2.3. Discussion

Les effets de l'antagoniste CB1R, SR141716 ont été testés sur des souris préalablement soumises à un régime enrichi en sucres et en lipides ayant une composition proche d'un régime « cafétéria ». L'administration de ce régime induit l'obésité et est associée à une accumulation de graisses dans le foie ainsi qu'à une résistance périphérique à l'insuline comme indiqué par l'élévation de l'insulinémie et des taux circulants d'AGL. Dans ces conditions, une stimulation de la lipogénèse hépatique *de novo* par une action de l'insuline était attendue. Cependant, l'expression de gènes impliqués dans cette voie métabolique s'est avérée réduite. Le régime alimentaire contenant des proportions élevées en acides gras saturés, nous pouvons supposer que la présence en quantité importante d'AG saturés préformés a conduit à la réduction de l'activité lipogénique comme l'ont déjà suggéré Ogiwara *et al* (Ogiwara *et al.*, 1978). L'induction de l'expression du gène codant pour SCD1 et l'augmentation de la teneur en AG monoinsaturés (données non présentées) dans le foie des souris HSHF semble également indiquer une augmentation des apports en AG saturés vers le foie. Dans ces conditions, il apparaît donc que la lipogénèse *de novo* n'a pas été stimulée chez les animaux hyperinsulinémiques et présentant une activation du SEC. Ces résultats sont en contraste avec d'autres travaux dans lesquels l'activation des CB1R par les EC est associée à une augmentation de la lipogénèse (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Ces différences pourraient en partie s'expliquer par le statut métabolique particulier des souris utilisées dans notre étude qui ont été soumises à un jeûne de seulement 4 heures.

Dans ces conditions, la glycémie normale et la diminution des réserves de glycogène chez les souris HSHF suggèrent que le glucose est principalement utilisé comme source de production d'énergie au lieu de servir à la synthèse d'acides gras. Cette observation est également renforcée par la limitation de la néoglucogénèse, comme indiqué par les faibles niveaux d'expression de la PEPCK et de la G6P. L'augmentation des quantités de malonyl-CoA semble contradictoire avec la régulation négative de l'expression d'ACC1, néanmoins, la régulation négative de l'expression

de FAS pourrait entraîner une réduction de la conversion du malonyl-CoA en AG saturés et donc une accumulation de ce composé dans les hépatocytes. Ainsi, selon les conclusions tirées de ces données expérimentales sur le foie, il est très probable que, dans nos conditions, la stéatose hépatique soit principalement due à la diminution de l'efficacité de l'insuline sur la lipolyse dans le TA, favorisant ainsi la libération et le flux d'AGL vers le foie plutôt qu'à une augmentation de la lipogenèse *de novo*. Cette notion est d'ailleurs renforcée par le profil d'expression génique du TA viscéral, qui est compatible avec une hyper-activation du métabolisme des lipides comme le suggère la surexpression des gènes impliqués dans le transport, la synthèse, l'oxydation et la libération des AG (section 3.2.).

Les effets bénéfiques de l'antagonisme des CB1R sur la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique chez la souris et l'Homme sont déjà bien établis (Vettor and Pagano, 2009). Avec ce modèle murin d'obésité, nous avons fourni une preuve supplémentaire que le blocage des CB1R entraîne de nombreux changements métaboliques périphériques ainsi que de nombreuses régulations moléculaires permettant de résorber la stéatose hépatique.

En accord avec l'amélioration des paramètres associés aux risques cardiovasculaires chez les patients diabétiques de type II traités par le Rimonabant (Pi-Sunyer *et al.*, 2006; Van Gaal *et al.*, 2005), nos résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle le blocage des CB1R peut être associé à une stimulation du catabolisme des HDL dans le foie. Des études antérieures ont en effet montré que la surexpression de SR-BI dans le foie, tout en réduisant les niveaux de HDL-C dans le plasma, réduisait l'athérosclérose chez la souris (Arai *et al.*, 1999; Kozarsky *et al.*, 2000), ce qui suggère que la surexpression de SR-BI dans le foie pourrait favoriser le transport inverse du cholestérol. L'augmentation de l'expression de SR-BI et de l'HL induite par l'antagonisme des CB1R pourrait aussi être associée à une modification de la taille des HDL et de leur cinétique (Nijstad *et al.*, 2009) et ainsi expliquer l'augmentation des capacités de captage des HDL-CE.

La forte augmentation de l'expression hépatique du CB1R induite par le régime HSHF étant pleinement contrecarrée par le traitement avec l'antagoniste CB1R, il est raisonnable de penser que les adaptations métaboliques observées sont, au moins en partie, liées à une réduction de l'activité du SEC. Ce concept est en accord avec d'autres études utilisant des souris CB1<sup>-/-</sup> (c'est-à-dire des animaux pour lesquels le gène du CB1R a été invalidé), démontrant que la présence du CB1R est obligatoire pour le développement d'une stéatose (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008; Ravinet Trillou *et al.*, 2004). Dans notre étude, la plupart des paramètres et gènes du foie testés sont

normalisés après le traitement par le SR141716. Outre l'effet direct de l'antagoniste sur les CB1R hépatiques, il est également envisageable que des effets indirects puissent s'exercer sur le foie. En effet, le blocage des CB1R musculaires et adipocytaires peuvent contribuer indirectement à l'amélioration des paramètres hépatiques en modifiant certains facteurs plasmatiques.

### 3. Métabolisme adipocytaire

#### 3.1. Paramètres biochimiques

Afin de déterminer si les variations des taux sériques d'adiponectine correspondent à des capacités sécrétoires différentes entre les tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés, nous avons mesuré la quantité d'adiponectine contenue dans les TA épидидymal et inguinal.

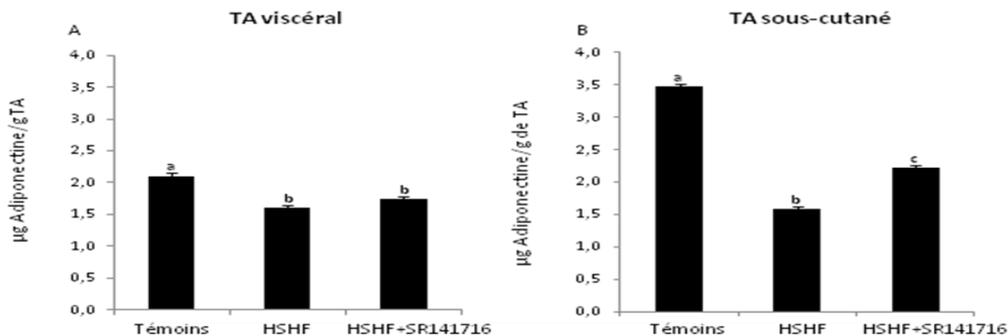


Figure 14 : Effet de l'antagonisme des CB1R sur la concentration d'adiponectine dans le TA épидидymaire (A) et inguinal (B). Les souris ont été nourries avec un régime HSHF pendant 25 semaines puis au cours des 6 dernières semaines, traitées soit par 10 mg/kg.jour-1 de l'antagoniste CB1 SR141716 (HSHF + SR; n = 14) ou par un placebo (HSHF, n = 10). En parallèle, une série de souris a été maintenue à un régime standard (CON, n = 5). La concentration d'adiponectine a été mesurée dans les homogénats de TA. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

Les résultats présentés en Figure 14 mettent tout d'abord en évidence que la concentration en adiponectine est plus élevée dans le TA sous-cutané que dans le viscéral chez les animaux Témoins. D'autre part, on constate que l'administration du régime HSHF conduit à la diminution des taux d'adiponectine dans les deux types de TA et en particulier dans le TA sous-cutané, ce qui est en accord avec la diminution de la concentration plasmatique observée dans ce lot d'animaux. Il est important de noter que la normalisation des taux plasmatiques d'adiponectine induite par le traitement s'accompagne d'une augmentation significative de la concentration de cette adipokine seulement dans le TA sous-cutané. L'ensemble de ces résultats permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la concentration d'adiponectine plasmatique induite par le traitement SR141716 serait principalement due à une stimulation de la production par le

TA sous-cutané.

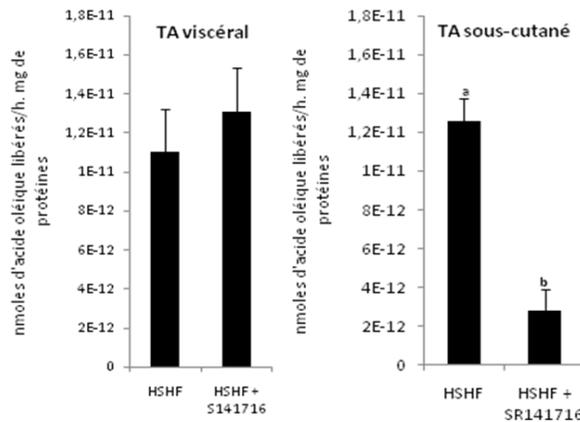


Figure 15: Effet de l'antagonisme des CB1R sur l'activité LPL du TA épидидymal (A) et inguinal (B) chez les souris HSHF et HSHF + SR141716. Les souris ont été nourries avec un régime HSHF et traitées soit avec 10 mg/kg.jour-1 d'antagoniste CB1R (HSHF + SR; n = 5), soit avec un placebo (HSHF, n = 5). Les échantillons de TA ont été homogénéisés à 4°C dans une solution tampon (1/10, v/v) contenant 0,25 M de saccharose, 10 mM Tris HCl (pH 7,4), 1 mM d'EDTA, 12 mM de déoxycholate et 10 mM d'héparine. Les surnageants obtenus après centrifugation à 12 000g pendant 20 min à 4°C ont été dilués de moitié avec le même tampon dépourvu de déoxycholate et d'héparine. Les activités lipolytiques déterminées sur ces homogénats de tissus correspondent aux quantités de [<sup>3</sup>H]acide oléique libéré de la trioléine radioactive ajoutée de la manière suivante: 100 µL de surnageant ont été ajoutés à des mélanges contenant 0, 1 ; 0,5 ; 1 ou 2 mM trioléine émulsionnée avec du tri (9,10[<sup>3</sup>H] oléoyl-glycérol (Perkin Elmer, Life Sciences Inc, Boston, MA, USA) (0,22 µCi / essai), 5% de gomme arabique, 0,2 M Tris HCl (pH8.6), 10% de sérum de poulet inactivé par chauffage (activateur de la LPL) et 1 ou 0,1 M de NaCl (voir ci-dessous), dans un volume final de 200 µl. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 1 h et la quantité de [<sup>3</sup>H]oléate libéré par action de la LPL a été mesurée par comptage à scintillation. L'activité LPL a été calculée en soustrayant l'activité lipolytique non spécifique effectuée dans le milieu contenant 1 mM de NaCl à l'activité lipolytique totale réalisée dans le milieu contenant 0,1 M de NaCl. L'activité LPL est exprimée en nmol d'oléate libéré par h par mg de protéines. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b) indique une différence significative à p < 0,05.

Dans le TA, la LPL est une enzyme vasculaire qui permet l'hydrolyse des TG des lipoprotéines plasmatiques à apoCIII comme les chylomicrons. Au regard de son indispensable rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique, il était judicieux de mesurer son activité dans les dépôts adipeux des souris HSHF et HSHF + SR141716. Les résultats présentés en figure 15 montrent que le blocage des CB1R n'entraîne pas d'effets sur l'activité LPL dans le TA viscéral puisque l'on observe aucune différence entre les souris HSHF et HSHF + SR141716. En revanche, concernant le TA sous-cutané, il apparaît qu'un traitement par SR141716 entraîne une forte baisse d'activité LPL (75%).

### 3.2. Régulation génique

En comparaison avec le régime Témoin, le régime HSHF a induit une augmentation de l'expression des CB1R à la fois dans le TA épидидymal et inguinal. Chez les souris obèses, le

traitement par l'antagoniste CB1R a été efficace en réduisant l'expression des CB1R dans les deux tissus. L'expression du TNF- $\alpha$ , une cytokine inflammatoire associée à une résistance à l'insuline a été stimulée dans les deux TA des souris HSHF par rapport aux souris Témoins. Il est intéressant de noter que l'induction de TNF- $\alpha$  est beaucoup plus importante dans le TA viscéral que dans la graisse sous-cutanée (respectivement 24-fois et 4,8 fois). Après le traitement par le Rimonabant, le niveau d'expression de TNF- $\alpha$  est totalement normalisé dans la graisse sous-cutanée et réprimé de moitié par rapport aux souris HSHF dans la graisse viscérale. Le traitement par l'antagoniste CB1R a également permis la normalisation de l'expression de PPAR- $\gamma_2$  dans le TA viscéral, laquelle avait été multipliée par 4 par le régime HSHF. Dans le TA sous-cutané, l'expression de PPAR- $\gamma_2$  est étonnamment stimulée chez les souris HSHF + SR tandis qu'elle ne diffère pas entre les deux autres groupes (Fig. 16B). De façon concomitante, l'expression de gènes liés au captage (FAT/CD36, LPL), à la lipolyse (LHS), à la  $\beta$ -oxydation (CPT-I) et à la lipogénèse (FAS et ACC1) est fortement stimulée dans le TA viscéral des souris HSHF par rapport aux souris Témoins (Figure 16A). Inversement, dans le TA inguinal des souris HSHF, l'expression de ces gènes a été soit réprimée (LPL, FAS et ACC1) soit inchangée (FAT/CD36, HSL et CPT-I), suggérant ainsi des différences de sensibilité et de fonction des adipocytes du TA sous-cutané et viscéral dans des conditions de résistance à l'insuline (figure 16B). De façon intéressante, tous les gènes surexprimés dans le TA viscéral des souris HSHF sont significativement réprimés après traitement avec l'antagoniste CB1R (figure 15A).

### 3.3. Discussion

Récemment, de nombreuses études ont montré que l'obésité est associée à une sur-activation du SEC dans le TA viscéral (Bensaid *et al.*, 2003; Cote *et al.*, 2007; Di Marzo *et al.*, 2009; Matias *et al.*, 2008). Plusieurs informations apportées par cette étude et via la littérature renforcent l'idée suggérant que le blocage des CB1R entraîne des effets spécifiques sur le métabolisme du TA viscéral pouvant être liés à la réduction de la teneur en TG hépatiques. Ainsi, la stimulation de l'expression de gènes agissant à différents niveaux de la voie de la lipogénèse et l'induction de PPAR- $\gamma_2$  suggère fortement que le régime HSHF a favorisé la synthèse de TG et la formation de dépôts de graisse au niveau viscéral.

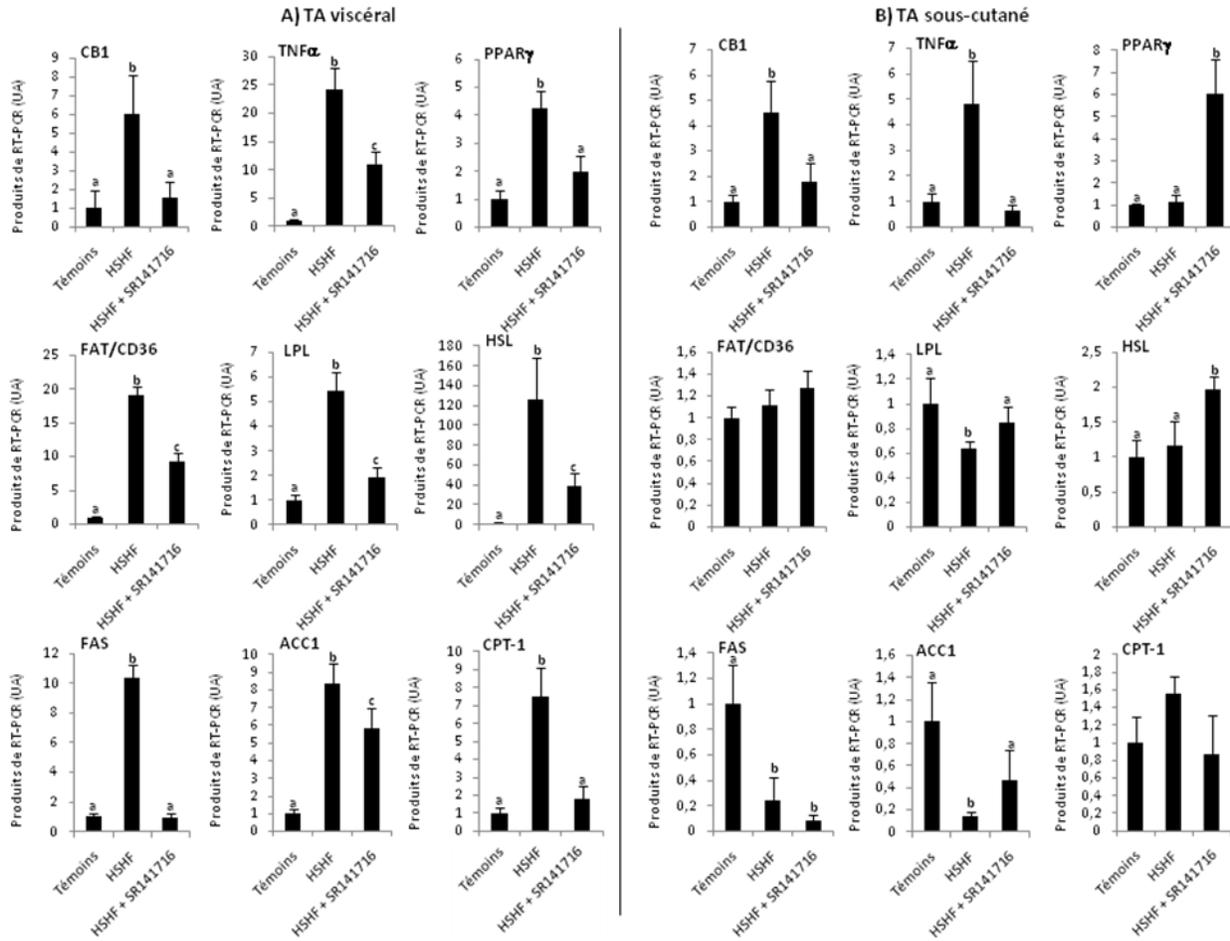


Figure 16: Effet du traitement de l'antagonisme des CB1R sur l'expression des ARNm de CB1 et de différents gènes impliqués dans le métabolisme adipocytaire au niveau viscéral (A) et sous-cutané (B). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05. CB1, récepteur cannabinoïde 1, TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; PPAR- $\gamma$ 2, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  2; FAT/CD36, fatty acid translocase; LPL, lipoprotéine lipase; HSL, lipase hormono-sensible, FAS, fatty acid synthase; ACC, acétyl-CoA carboxylase; CPT-I, carnitine palmitoyltransferase I.

L'hypertrophie adipocytaire observée dans le cadre d'une obésité est souvent la conséquence d'un déficit en adipogénèse (Nadler *et al.*, 2000). En effet, dans ce cas, les adipocytes atteignent leur limites de stockage conduisant à un dépôt ectopique de lipides dans le foie et le muscle squelettique, avec pour conséquence une diminution de l'action de l'insuline dans ces tissus (Heilbronn *et al.*, 2004).

Dans notre étude, la réduction de l'expression des gènes de la lipogénèse par l'antagoniste CB1R s'accompagne vraisemblablement d'une diminution de l'accumulation de TG dans les adipocytes avec pour conséquences la formation de cellules plus petites et une réduction de la masse grasse. La diminution de l'expression de la LHS consécutive au traitement par l'antagoniste CB1R est à

souligner car il est admis qu'une lipolyse excessive conduit à une libération accrue d'AGL dans la circulation, avec pour conséquence des effets délétères sur la sensibilité à l'insuline (Arner, 2002). Concernant la LPL, il est connu que l'activation des CB1R augmente l'activité lipoprotéine lipase dans les adipocytes primaires de souris (Cota *et al.*, 2003), ce qui permettrait d'accroître le flux des AGL vers les adipocytes pour la synthèse des TG. Le rôle des EC et des CB1R dans l'accumulation de lipides neutres dans les cellules adipeuses a été confirmé par Matias *et al.*, qui ont montré que le traitement de cellules 3T3-F442A avec le HU210, un puissant agoniste des CB1R augmente l'accumulation intracellulaire de gouttelettes lipidiques (Matias *et al.*, 2006). Dans notre étude, le blocage des CB1R n'a pas entraîné d'effets particuliers sur l'activité LPL du TA viscéral des souris HSHF + SR141716 malgré une réduction non négligeable de l'expression de cette enzyme et une amélioration du profil insulinique des animaux. Pourtant, l'insuline augmente théoriquement l'activité de la LPL adipocytaire ainsi que sa sécrétion grâce à des effets post-transcriptionnels (Eckel and Yost, 1987; Picard *et al.*, 1999; Semenkovich *et al.*, 1989). En revanche, au niveau sous-cutané, le blocage des CB1R entraîne une baisse impressionnante de l'activité LPL malgré une expression génique similaire entre les souris HSHF et HSHF + SR141716. Ces données démontrent encore une fois les différences de régulation entre le TA viscéral et le sous-cutané.

De récentes études suggèrent que l'inflammation du TA induite par une obésité pourrait activer directement le SEC (Kempf *et al.*, 2007) et d'après nos travaux, il apparaît que l'activation du SEC chez les animaux HSHF est associée à une augmentation de TNF- $\alpha$  dans les 2 dépôts adipeux. Cette interaction entre inflammation et SEC doit encore être explorée afin de déterminer si l'inflammation provoque l'activation du SEC ou vice versa. Néanmoins, la corrélation directe entre l'augmentation de TNF- $\alpha$ , de l'adiposité et la résistance à l'insuline est maintenant bien établie (Hotamisligil *et al.*, 1995). La stimulation de la lipolyse de manière concentration-dépendante à TNF- $\alpha$  est bien démontrée chez les rongeurs et dans les cellules adipeuses humaines et est considérée comme un facteur important dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Ruan and Lodish, 2003). Par conséquent, il est raisonnable de penser que la normalisation du métabolisme adipocytaire et certains effets sous-jacents induits par le traitement par l'antagoniste CB1R sont consécutifs à la réduction de l'expression de TNF- $\alpha$  dans le TA des souris HSHF+SR.

Cette étude met également en évidence des différences métaboliques entre le tissu adipeux sous-cutané et viscéral. En effet, ces tissus répondent différemment au régime HSHF et au traitement par le SR141716. Dans l'ensemble, ces résultats donnent la preuve moléculaire d'une part que le régime HSHF provoque des effets délétères dans le TA viscéral qui n'ont pas été observés dans le TA sous-cutané et d'autre part que le blocage des CB1R permet de reverser ces changements dans le TA viscéral tout en exerçant des effets spécifiques sur le TA sous-cutané. Ainsi, l'expression de gènes impliqués dans le transport, la synthèse, l'oxydation et la libération des acides gras n'a pas été modifiée ou alors réprimée dans les adipocytes sous-cutanés des souris HSHF+SR alors que ces gènes ont été surexprimés dans le TA viscéral. Ces résultats pourraient correspondre à des différents degrés d'activation du SEC dans ces tissus en accord d'autres études récentes démontrant des niveaux différents d'EC dans le TA viscéral et sous-cutané (D'Eon *et al.*, 2008; Izzo *et al.*, 2009; Matias *et al.*, 2006; Starowicz *et al.*, 2008). Ces différences de régulation génique entre TA viscéral et sous-cutané en réponse à un régime riche en graisses et à un traitement par un antagonisme des CB1R, également montrées par Poussin et al (Poussin *et al.*, 2008), pourraient être liée au fait que l'induction de l'expression de TNF- $\alpha$  par le régime HSHF est beaucoup moins importante dans le TA sous-cutané que dans TA viscéral. En effet, le traitement des souris obèses avec l'antagoniste CB1R provoque une normalisation complète de l'expression de TNF- $\alpha$  dans le TA sous-cutané tandis que l'inflammation reste élevée dans le TA viscéral. Ces données relatives à l'état inflammatoire du TA peuvent également être associées à la production d'adiponectine. En effet, la normalisation des niveaux d'ARNm de TNF- $\alpha$  dans TA sous-cutané est associée à une augmentation de la teneur en adiponectine dans ce tissu. Une relation inverse entre les concentrations sériques d'adiponectine et le TNF- $\alpha$  ayant déjà été évoquée (Lau *et al.*, 2005), suggère que l'inflammation des tissus adipeux pourrait modifier la production de l'adipokine. En outre, l'augmentation de l'expression de PPAR- $\gamma_2$  induite par l'antagonisme des CB1R dans TA sous-cutané pourrait correspondre à une activation de la différenciation adipocytaire (Schoonjans *et al.*, 1996) avec pour conséquence une stimulation de la sécrétion d'adiponectine (Gustafson *et al.*, 2003). La teneur en adiponectine restant faible dans le TA viscéral après l'inhibition du CB1R, il est raisonnable de penser que l'augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine observée est essentiellement due à la stimulation de sa production par les adipocytes sous-cutanés.

#### **4. Conclusion**

En conclusion, cette étude *in vivo*, indique que l'administration d'un antagoniste CB1R améliore les paramètres plasmatiques et résorbe la stéatose hépatique chez la souris obèse. L'amélioration du métabolisme du TA viscéral induite par l'antagonisme des CB1R pourrait être un facteur déterminant dans la réversion de cette stéatose. Nos résultats fournissent également de nouvelles preuves que le métabolisme du TA viscéral est régulé de manière différente du TA sous-cutané suite à une obésité induite par l'alimentation. La suite des travaux se focalisera plus particulièrement sur les effets directs de l'antagonisme des CB1R sur le foie et les différents TA à travers une approche *in vitro* afin de préciser les implications respectives du SEC et des produits sécrétés par le TA dans la régulation du métabolisme lipidique.

## CB1 Antagonism Exerts Specific Molecular Effects on Visceral and Subcutaneous Fat and Reverses Liver Steatosis in Diet-Induced Obese Mice

Tony Jourdan, Louiza Djaouti, Laurent Demizieux, Joseph Gresti, Bruno Vergès, and Pascal Degraze

**OBJECTIVE**—The beneficial effects of the inactivation of endocannabinoid system (ECS) by administration of antagonists of the cannabinoid receptor (CB) 1 on several pathological features associated with obesity is well demonstrated, but the relative contribution of central versus peripheral mechanisms is unclear.

We examined the impact of CB1 antagonism on liver and adipose tissue lipid metabolism in a mouse model of diet-induced obesity.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS**—Mice were fed either with a standard diet or a high-sucrose high-fat (HSHF) diet for 19 weeks and then treated with the CB1-specific antagonist SR141716 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) for 6 weeks.

**RESULTS**—Treatment with SR141716 reduced fat mass, insulin levels, and liver triglycerides primarily increased by HSHF feeding. Serum adiponectin levels were restored after being reduced in HSHF mice. Gene expression of scavenger receptor class B type I and hepatic lipase was induced by CB1 blockade and associated with an increase in HDL-cholesterol uptake. Concomitantly, the expression of CB1, which was strongly increased in the liver and adipose tissue of HSHF mice, was totally normalized by the treatment. Interestingly, in visceral but not subcutaneous fat, genes involved in transport, synthesis, oxidation, and release of fatty acids were upregulated by HSHF feeding, while this effect was counteracted by CB1 antagonism.

**CONCLUSIONS**—A reduction in the CB1-mediated ECS activity in visceral fat is associated with a normalization of adipocyte metabolism, which may be a determining factor in the reversion of liver steatosis induced by treatment with SR141716. *Diabetes* 59:926–934, 2010

Obesity results from an imbalance between energy intake and expenditure and is characterized by increased body weight and abnormal development of adipose tissue with excessive fat storage (1). Recently, evidence has accumulated for the overactivity of the endocannabinoid system (ECS) during conditions of unbalanced energy homeostasis (2). The ECS consists of the cannabinoid receptors (CBs), their endogenous ligands (the endocannabinoids), and the enzyme proteins catalyzing the endocannabinoid formation

and degradation (3). Activation of central CB1 receptors clearly promotes food intake and weight gain (4–6). Accordingly, pharmacological antagonism of CB1 has been shown to improve several pathological features associated with obesity, including overweight, hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperglycemia, and dyslipidemia in obese rodents (7–9) and humans (10,11).

Even if the reduction in food intake induced by central CB1 blockade may be the main initial cause of body weight loss and associated beneficial effects, several data collected from animal and human studies indicate that peripheral CB1 may also directly control lipid metabolism (12–14). Thus, an activation of ECS has been recently reported in peripheral tissues of animal models of obesity (15,16) and associated with visceral fat obesity in humans (17,18). Consequently, it has been proposed that the long-term effects of CB1 antagonism are resolved by stimulation of energy expenditure and by peripheral effects related to adipose tissue, liver, skeletal muscle, and pancreas physiology (19–21).

In the present work, we tested the effects of CB1 antagonism on the regulation of the liver and adipose tissue lipid metabolism in a mouse model of diet-induced obesity. We first examined the global impact of CB1 antagonism on plasma parameters and liver steatosis, which were primarily altered by long-term feeding of a high-sucrose high-fat (HSHF) diet. Next, we examined whether CB1 inactivation was associated with biochemical and molecular alterations in the liver and adipose tissue (distinguishing visceral and subcutaneous fat depots) that could account for an improvement of liver lipid metabolism.

### RESEARCH DESIGN AND METHODS

Official French regulations (no. 87848) for the use and care of laboratory animals were followed throughout the experimental period. The experimental protocol was approved by the local ethic committee for animal experimentation (no. BX0622). Four-week-old C57BL/6 male mice (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed in individual plastic cages and adapted to a standard diet (AO4; UAR, Epinay-sur-Orge, France) for 1 week. A series of mice was maintained on the standard diet (CON group;  $n = 5$ ), while another series was subjected to an HSHF diet containing casein 20%, corn starch 13%, sucrose 29.3%, cellulose 5%, maltodextrin 2.2%, lard 20%, soya oil 2.5%, mineral 205B SAFE 7%, vitamin 200 SAFE 1% (ref. 235HF SAFE; Augy, France). After 19 weeks, HSHF animals that were not both overweight and hyperinsulinemic were excluded from the study. Selected mice were maintained on an HSHF diet and received orally either  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  of SR141716 (HSHF+SR series;  $n = 14$ ) or vehicle (HSHF series;  $n = 10$ ). The CB1-specific antagonist SR141716 (Rimonabant) was supplied by sanofi-aventis (Paris, France). Animals had free access to fresh food and water throughout the experimental period. Mice were food deprived 4 h before anesthesia with ketamine/xylazine ( $7.5 \text{ mg} \cdot 1 \text{ mg}^{-1} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1}$ ) and tissue handling. Epididymal and inguinal fat were surgically removed as representatives of visceral and subcutaneous fat, respectively (22). Tissue samples were frozen in liquid nitrogen pending further analyses.

**Serum and tissue parameters.** Serum parameters were determined using commercial kits (glucose RTU, TG PAPI50, and cholesterol RTU from

From the Unité Mixte de Recherche 866 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Université de Bourgogne, Team Physiopathology of Dyslipidemia, Faculty of Sciences Gabriel, Dijon, France.

Corresponding author: Pascal Degraze, pascal.degraze@u-bourgogne.fr. Received 7 October 2009 and accepted 15 January 2010. Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 28 January 2010. DOI: 10.2337/db09-1482.

© 2010 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1794 solely to indicate this fact.

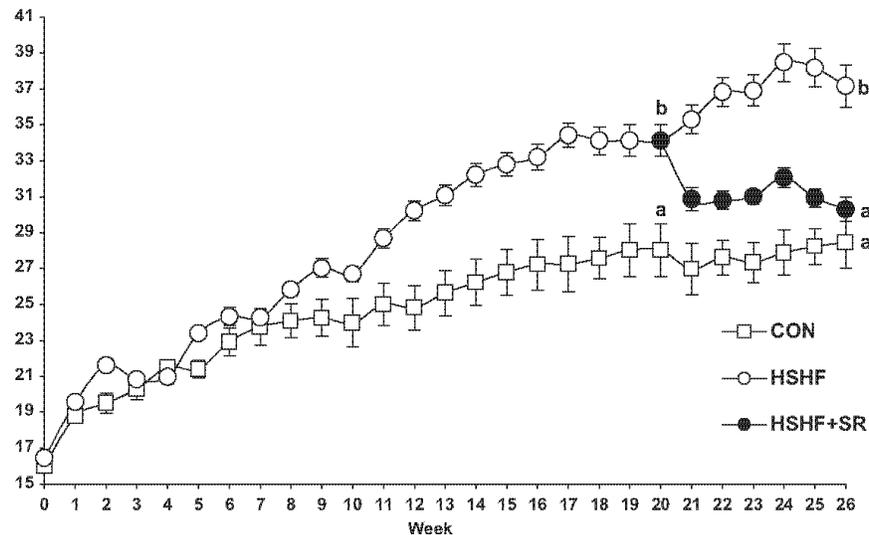


FIG. 1. Evolution of body weight during the induction period of obesity and during the treatment with CB1 antagonist. C57BL/6J mice were fed an HSHF diet (42.3% carbohydrates, 22.5% lipids) for 25 weeks receiving orally during the last 6 weeks either 10 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> of the CB1-specific antagonist SR141716 (HSHF+SR; n = 14) or the vehicle (HSHF; n = 10). In parallel, a series of mice was maintained on a control diet (CON; n = 5). Results are expressed as means ± SE. Results of statistical analysis were indicated at weeks 20 and 26, values with different superscript letters (a, b, c) are statistically different at P < 0.05.

BioMérieux [Marcy l'Etoile, France] for glucose, triglycerides, and cholesterol assay, respectively; nonesterified fatty acid C from Wako Pure Chemical Industries [Richmond, VA] for free fatty acid [FFA] assay; and mouse insulin and adiponectin enzyme-linked immunosorbent assay kits from AbCys [Paris, France]. Liver malonyl-CoA concentration was determined by high-performance liquid chromatography as previously described (23). Liver total lipids were extracted according to the method of Folch et al. (24). After mixing thoroughly, 1.0 ml of organic phase was transferred to a clean tube containing 1 ml of 1% Triton X-100 in chloroform and dried using nitrogen. The residue was resuspended in 0.25 ml distilled water and used for the determination of triglycerides and cholesterol as in serum. For determination of adiponectin content in adipose tissue, samples were homogenized in 10 volume of PBS. After centrifugation (10 min at 12,000g, 4°C), the supernatants were carefully collected through the fat cake, diluted to 1/40,000 in PBS, and used for adiponectin measurements as in serum.

**Fatty acid oxidation and apolipoprotein A and B secretion.** Freshly removed livers from five HSHF and five HSHF+SR mice were sliced using a Brendel/Vitron slicer (Tucson, AZ), and thin slices were used to measure [<sup>1-14</sup>C] palmitic acid oxidation and apolipoprotein (apo) A and B secretion as previously described (25).

**[<sup>3</sup>H]-cholesteryl ether-HDL uptake.** Liver slices, prepared as described above, were also intended for HDL uptake. First, an HDL fraction was isolated from human plasma by sequential flotation ultracentrifugations (26). HDL was radiolabeled with [<sup>3</sup>H]-cholesteryl ether (CE) combining [<sup>3</sup>H]cholesteryl hecacyl ether with L-α-phosphatidylcholine and butylhydroxytoluene in a 500:1:6 molar ratio and sonicating to form liposomes. HDL [<sup>3</sup>H]CE was obtained by addition of liposomes to the HDL fraction in presence of lipoprotein-free plasma, as a source of CE transfer protein, after an overnight incubation at 37°C under light agitation. Labeled HDL was separated from remaining liposomes by an other sequential flotation ultracentrifugation and washed twice in a solution of potassium bromide (density 1.21). Finally, HDL [<sup>3</sup>H]CE was aliquoted and stored at -80°C until used. Measurement of the uptake was carried out at 37°C by incubating two liver slices in 1 ml of William's medium E containing 40 μg proteins (0.3 mCi of HDL [<sup>3</sup>H]CE) under slight agitation. After 3 h, slices were removed from medium, washed three times, and homogenized in 400 ml PBS with a mini-beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK). The radioactivity recovered in the homogenate was finally estimated, representing the amount of HDL uptaken by the liver cells.

**Gene expression.** Total mRNA from liver and adipose tissue were extracted with Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and reverse transcribed using the Iscript cDNA kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Real-time PCR was performed as described previously (27) using a Bio-Rad

iCycler iQ. The sequences of forward and reverse primers used for the amplification are presented in the online supplemental Table 1 (available at <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/content/full/db09-1452/DC1>).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means ± SE. Data were analyzed statistically using the Kruskal-Wallis nonparametric test. Differences were considered significant at P < 0.05.

## RESULTS

**Body and organ weights.** Baseline body weights of the three groups of mice were comparable. After 19 weeks, body weights of HSHF animals were significantly higher than that of control mice (Fig. 1). From week 20 to 26, the body weight of HSHF+SR mice rapidly decreased to become similar to that of CON mice at week 26 (Fig. 1). Consistent with that, the masses of both epididymal and inguinal fat pads differed in the order HSHF > HSHF+SR > CON mice (Table 1). Concomitantly, the liver weight was greater in HSHF and less in HSHF+SR than in CON mice (Table 1).

**Serum and liver parameters.** At the end of the experiment, serum glucose concentration of HSHF mice was not different from CON mice despite an increase in insulin levels, indicating that the HSHF mice were in the early stage of developing insulin resistance (Table 1). Likewise, FFAs and total cholesterol levels were higher in HSHF than in CON mice. Surprisingly, HSHF mice had 50% lower plasma triglyceride levels than CON mice, suggesting an increase in triglyceride clearance by the liver and adipose tissue. In parallel with fat mass expansion, serum adiponectin levels were less in mice fed with the HSHF diet than in control mice. Interestingly, insulin and adiponectin levels in HSHF+SR mice were not different from the control group (Table 1). Serum FFA concentration was less in HSHF+SR than in HSHF mice, while glucose, triglycerides, and cholesterol levels did not differ between these groups. In the liver, administration of HSHF diet induced a steatosis with a fivefold increase in triglyceride

**CB1 ANTAGONISM IN DIET-INDUCED OBESE MICE**

**TABLE 1**  
Effects of CB1 antagonism on body composition, serum, and liver parameters

	CON group	HSHF group	HSHF+SR group
<i>n</i>	5	10	14
<b>Organ weight</b>			
Liver (g)	1.38 ± 0.03*	1.49 ± 0.06†	1.21 ± 0.03‡
Epididymal fat (g)	0.67 ± 0.14*	2.04 ± 0.16†	0.98 ± 0.07‡
Inguinal fat (g)	0.31 ± 0.06*	1.10 ± 0.10†	0.41 ± 0.03*
<b>Serum</b>			
Glucose (mg/ml)	2.79 ± 0.16	2.72 ± 0.21	2.53 ± 0.08
Insulin (ng/ml)	0.40 ± 0.03*	0.59 ± 0.07†	0.44 ± 0.03*
Adiponectin (µg/ml)	63.05 ± 3.24*	42.31 ± 7.21†	59.82 ± 3.95*
FFAs (nmol/l)	0.30 ± 0.04*	0.54 ± 0.06†	0.43 ± 0.03‡
Triglycerides (mg/ml)	0.74 ± 0.06*	0.36 ± 0.03†	0.31 ± 0.02†
Total cholesterol (mg/ml)	1.09 ± 0.04*	2.05 ± 0.07†	1.87 ± 0.06†
<b>Liver</b>			
Glycogen (mg/g)	66.7 ± 8.1*	49.2 ± 4.2†	37.4 ± 3.0‡
Triglycerides (mg/g)	24.4 ± 4.5*	118.7 ± 17.6†	46.4 ± 4.9‡
Total cholesterol (mg/g)	16.07 ± 0.94	17.98 ± 1.63	15.72 ± 0.7
Malonyl CoA (nmol/g)	1.67 ± 0.29*	3.43 ± 0.52†	2.41 ± 0.18‡

Data are means ± SE. Mice were fed an HSHF diet for 25 weeks, receiving during the last 6 weeks either 10 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> of the CB1-specific antagonist SR141716 (HSHF+SR) or the vehicle (HSHF diet). In parallel, a series of mice was maintained on a control diet (CON group). Mice were food deprived 4 h before tissue handling. \*,†,‡Statistically different at *P* < 0.05.

content, while total cholesterol content remained unchanged. The malonyl-CoA content, a potent inhibitor of fatty acid β-oxidation, was also markedly increased. Meanwhile, glycogen stores were less in HSHF than in CON mice, reflecting a stimulation of glycogenolysis. Interestingly, triglyceride and malonyl-CoA accumulations were partially reversed and glycogen concentration further decreased by CB1 antagonism (Table 1).

**Adiponectin content in visceral and subcutaneous fat.** To explore whether the variations of serum adiponectin levels could correspond to a different production of the

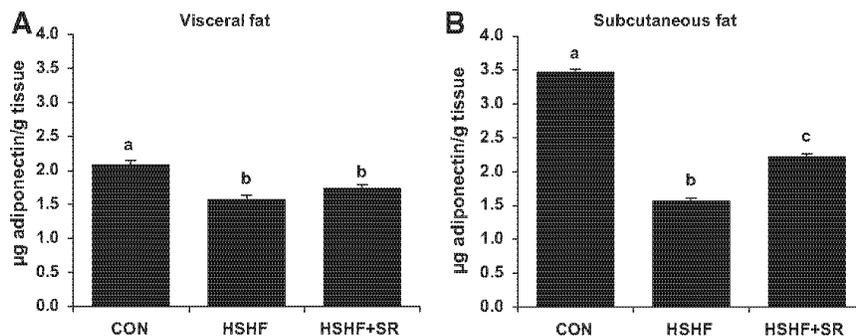
**TABLE 2**  
Effects of CB1 antagonism on fatty acid oxidation and parameters related to lipoprotein metabolism in liver explants

	HSHF	HSHF+SR
Palmitic acid oxidation (nmol · h <sup>-1</sup> · g protein <sup>-1</sup> )	23.0 ± 13	22.0 ± 2.4
ApoB secretion (µg · h <sup>-1</sup> · g protein <sup>-1</sup> )	155 ± 17*	123 ± 8†
ApoA secretion (µg · h <sup>-1</sup> · g protein <sup>-1</sup> )	141 ± 2	140 ± 3
HDL-CE uptake ([ <sup>3</sup> H]-CE dpm · h <sup>-1</sup> · µg protein <sup>-1</sup> )	430 ± 119*	1,075 ± 139†

Data are means ± SE. Thin liver slices (~200 µm) were obtained from mice fed an HSHF diet and treated either with 10 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> of SR141716 (HSHF+SR; *n* = 5) or vehicle (HSHF; *n* = 5). For fatty acid oxidation and apo secretion, slices were incubated at 37°C in oxygenated William's medium E supplemented with l-carnitine (0.5 nmol/l) in the presence of 0.2 nmol/l of [<sup>14</sup>C] palmitic acid (55.5 GBq/mol) complexed to albumin (fatty acid/BSA molar ratio 2.5/1). After 4 h of incubation, slices were rinsed with cold PBS and immediately submitted to lipid extraction for counting of labelled CO<sub>2</sub> and acid-soluble products, while the incubation medium was used for determination of apoB and apoA secreted. Measurement of HDL uptake was carried out at 37°C by incubating liver slices with [<sup>3</sup>H]-CE-HDL under slight agitation for 3 h. Then, slices were washed and homogenized in PBS. Radioactivity recovered in the homogenate represented the amount of HDL uptaken by the liver cells. \*,†Statistically different at *P* < 0.05.

adipokine by visceral and subcutaneous fats, we determined the adiponectin content in epididymal and inguinal fat, respectively. The adiponectin content was less in both fat depots of HSHF than CON mice with a more marked effect in inguinal fat. Remarkably, after treatment with CB1 antagonist, the adiponectin content significantly increased in inguinal fat only (Fig. 2).

**Fatty acid oxidation and parameters related to lipoprotein metabolism.** The ability of SR141716 to partially reverse HSHF-induced liver steatosis prompted us to verify whether this effect was related to an increased capacity of hepatocytes to β-oxidize fatty acid or to produce lipids and lipoproteins. Palmitic acid β-oxidation rates measured in liver explants did not differ between HSHF and HSHF+SR mice (Table 2). ApoB secretion was less with HSHF+SR than HSHF explants, while apoA secretion did not differ between the two groups. This



**FIG. 2.** Effect of CB1 antagonism on adiponectin concentration in visceral (A) and subcutaneous (B) fat. Mice were fed an HSHF diet for 25 weeks receiving during the last 6 weeks either 10 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> of the CB1-specific antagonist SR141716 (HSHF+SR; *n* = 14) or the vehicle (HSHF; *n* = 10). In parallel, a series of mice was maintained on a control diet (CON; *n* = 5). Adiponectin concentration was measured in adipose tissue homogenates prepared as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS. Results are expressed as means ± SE. Values with different superscript letters (a, b, c) are statistically different at *P* < 0.05.

model was also used to determine whether the blockade of CB1 affected HDL-CE uptake. The recovery of HDL-CE was greater in the liver explants from HSHF+SR than HSHF mice, suggesting interesting metabolic adaptations that could affect lipid and lipoprotein metabolism (Table 2).

#### Gene expression in liver and adipose tissue

**Liver.** We first tested the impact of the diet and of the treatment with SR141716 on CB1 gene expression as an indicator of ECS activity (Fig. 3). CB1 mRNA was the greatest in HSHF mice and less in HSHF+SR than in CON mice, reflecting a stimulation of ECS in our mice model of obesity and an effective inhibition of this pathway after CB1 antagonist treatment. Then, mRNA levels of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6P) were measured as an indicator of liver insulin resistance. The inverse relationship existing between insulin levels and expression levels of these two enzymes suggested that insulin still had the ability to control their transcription. In line with a possible impact of CB1 antagonism on lipoprotein and cholesterol metabolism, we measured the mRNA expression of hepatic lipase and scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the liver. The expression levels of these two genes were the lowest in HSHF mice and did not differ from CON in HSHF+SR mice.

Besides, mRNA levels of the lipogenic enzymes acetyl-CoA carboxylase (ACC) 1 and 2, and fatty acid synthase (FAS) were all markedly less in HSHF than in CON mice. Interestingly, the expression of both ACC isoforms was higher in the liver of HSHF+SR than HSHF mice, while antagonism of CB1 had no effect on FAS expression. The expression of stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1, which converts saturated fatty acids into monounsaturated fatty acids, was higher in HSHF and less in HSHF+SR than in CON mice, suggesting that the inhibition of ECS could have limited the high production of monounsaturated fatty acids primarily induced by HSHF feeding. Besides, neither the diet nor the treatment modified the transcript levels of carnitine palmitoyltransferase (CPT)-I, the rate-limiting enzyme of long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation.

**Adipose tissue.** CB1 expression was also induced in both visceral and subcutaneous adipose tissue of HSHF compared with CON mice (Fig. 4A and B). In obese mice, SR141716 treatment was efficient in reducing CB1 expression in the two tissues. The expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , an inflammatory cytokine associated with insulin resistance, was higher in both visceral and subcutaneous fat of HSHF than CON mice. It is noteworthy that the TNF- $\alpha$  induction was dramatically higher in visceral than in subcutaneous fat (24-fold vs. 4.8-fold, respectively). Likewise, in HSHF+SR mice, TNF- $\alpha$  mRNA levels were not different from CON mice in subcutaneous fat and were only half that of CON mice in visceral fat. In addition, compared with CON feeding, HSHF feeding gave rise to a fourfold increase in the expression of the  $\gamma$ 2 isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ 2 in visceral fat, while this induction was only twofold in HSHF+SR mice (Fig. 4A). In subcutaneous adipocytes, PPAR $\gamma$ 2 expression was surprisingly the highest in HSHF+SR mice, while the two other groups did not differ each other (Fig. 4B). Concomitantly, the expression of genes related to uptake (fatty acid translocase [FAT]/CD36), lipolysis (hormone-sensitive lipase [HSL]),  $\beta$ -oxidation (CPT-I), and lipogenesis (FAS and ACC1) was strongly higher in visceral fat of HSHF than CON mice (Fig. 4A). Conversely, in subcutaneous deposits of HSHF

mice, the expression of these genes was either less than CON mice (FAS and ACC1) or unchanged (FAT/CD36, HSL, and CPT-I), suggesting different sensitivity and function of subcutaneous versus visceral adipocytes in conditions of insulin resistance (Fig. 4B). Interestingly, in visceral fat, all genes that were upregulated by HSHF feeding were significantly downregulated after treatment with CB1 antagonist except FAT/CD36 (Fig. 4A).

#### DISCUSSION

In this study, the effects of CB1 antagonism were tested on mice previously exposed to a long-term HSHF diet (19 weeks) with a lipid content and fatty acid composition nearly similar to the human Western diet. Administration of HSHF diet-induced obesity, liver fat accumulation and peripheral insulin resistance as indicated by the elevation of plasma insulin and FFA levels. A significant number of experimental reports describe beneficial effects of CB1 antagonism on insulin resistance and fatty liver in mice and humans, and these data strongly indicate that the ECS has a major role in the regulation of lipid metabolism not only at the central but also at the peripheral level (rev. in 28). From our mouse model of obesity, we provided further evidence that CB1 blockade causes peripheral metabolic and molecular changes in liver and adipose tissue associated with the reversion of fatty liver. We particularly showed that the lipid metabolism of visceral and subcutaneous adipocytes was differently regulated in response to diet-induced obesity and to CB1 antagonism.

#### Effects of CB1 antagonism on liver lipid metabolism.

Our findings clearly indicate that the strong upregulation of liver CB1 primarily induced by an HSHF diet is fully reversed by the treatment with SR141716, suggesting that the metabolic improvements observed could be mediated by the blockade of these receptors. This concept is supported by other studies using CB1<sup>-/-</sup> mice, demonstrating that ECS overactivity occurs in the liver of animals fed a high-fat diet and that hepatic CB1 are required for the development of diet induced steatosis (14,29). In line with this, the normalization of liver parameters related to carbohydrate and lipid metabolism such as PEPCK, G6P, ACC, and SCD-1 mRNA levels after treatment with CB1 antagonist strongly suggests that these adaptations correspond to a normalization of liver insulin responsiveness as evoked in muscles of rimonabant-treated *ob/ob* mice (21). The activation of hepatic CB1 receptors has been recently associated with an increase in de novo lipogenesis, suggesting that this metabolic pathway participates to steatosis development in conditions of ECS overactivity (30). Unlike this finding, we observed no stimulation of the liver expression of ACC and FAS in HSHF animals, which were quite hyperinsulinemic. In the works of Osei-Hyiaman et al. (30), the stimulation of ECS consisted of an acute injection of CB1 agonist to control animals, while in our study, ECS activation was induced for a much longer period using an HSHF diet. Since the diet contained high proportions of saturated fatty acids, it can be hypothesized that the provision of a diet rich in preformed saturated fatty acids led to the reduced expression of mRNA for lipogenic genes. The inhibitory effect of palmitoyl-CoA on ACC demonstrated by Ogiwara et al. (31) supports this concept. The induction of the SCD-1 gene and the increase in monounsaturated fatty acid content in the liver of HSHF mice (data not shown) indicate that saturated fatty acid delivery to the liver was increased. Indeed, in HSHF mice,

**CB1 ANTAGONISM IN DIET-INDUCED OBESE MICE**

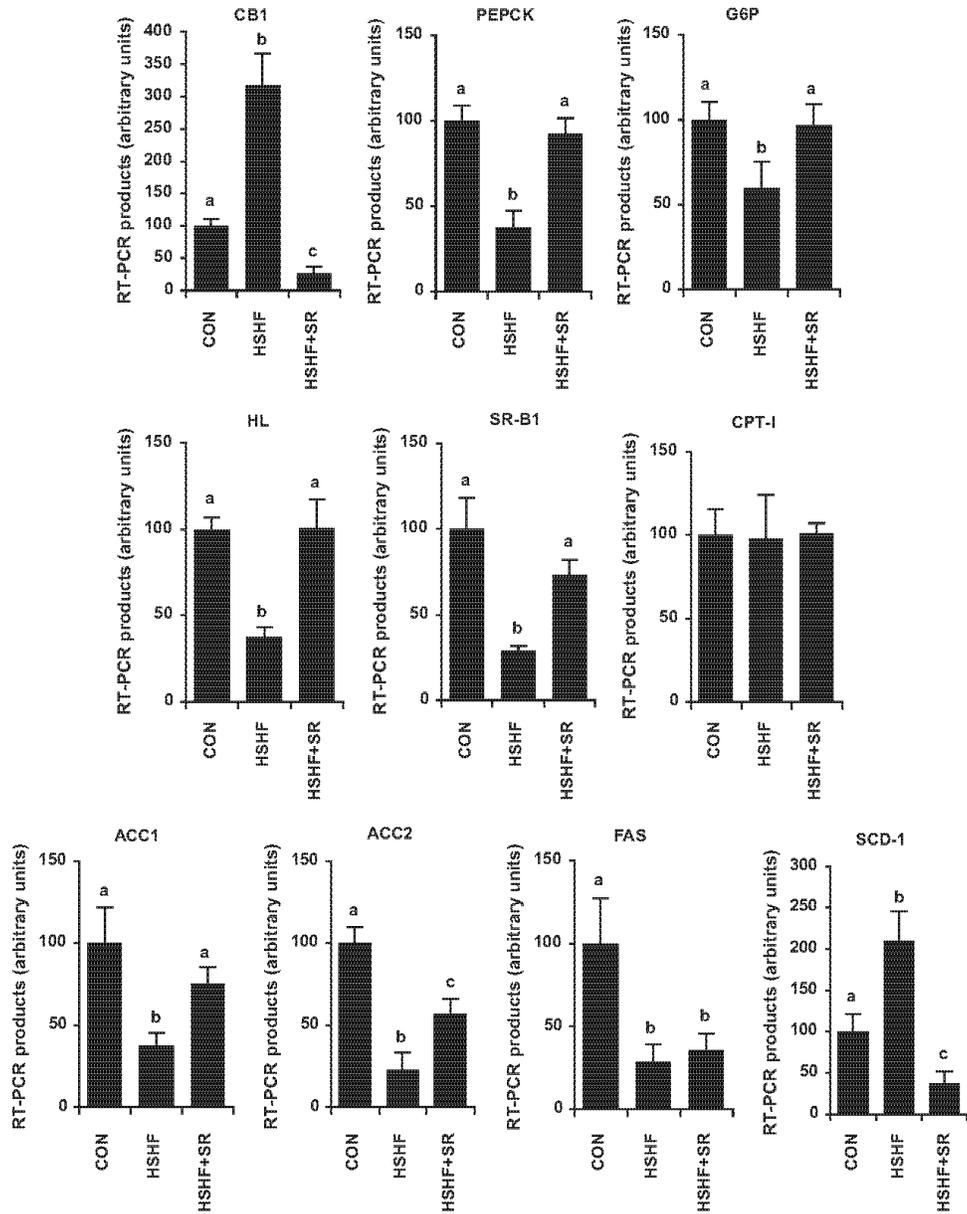


FIG. 3. Effect of CB1 antagonism on the mRNA expression of CB1 and genes involved in carbohydrate and lipid metabolism in the liver. Mice were fed an HSHF diet for 25 weeks receiving during the last 6 weeks either 10 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> of the CB1-specific antagonist SR141716 (HSHF+SR) or the vehicle (HSHF). In parallel, a series of mice was maintained on a control diet (CON). For each gene, a standard curve was established from four cDNA dilutions (1/10–1/10,000) and used to determine the relative gene expression after normalization with a geometric average of 18S and TATA box binding protein expression. Results are expressed as means ± SE (n = 5 per group). Values with different superscript letters (a, b, c) are statistically different at P < 0.05.

the liver steatosis appears to be mainly due to an enhanced delivery of FFAs to the liver rather to an increase in de novo lipogenesis. Aside from direct effects on the liver, steatosis might have also been reduced indirectly by the

limitation of the influx of fatty acids originating from adipose tissue. The gene expression profile of visceral adipose tissue is consistent with an hyperactivation of lipid metabolism as suggested by the strong upregulation

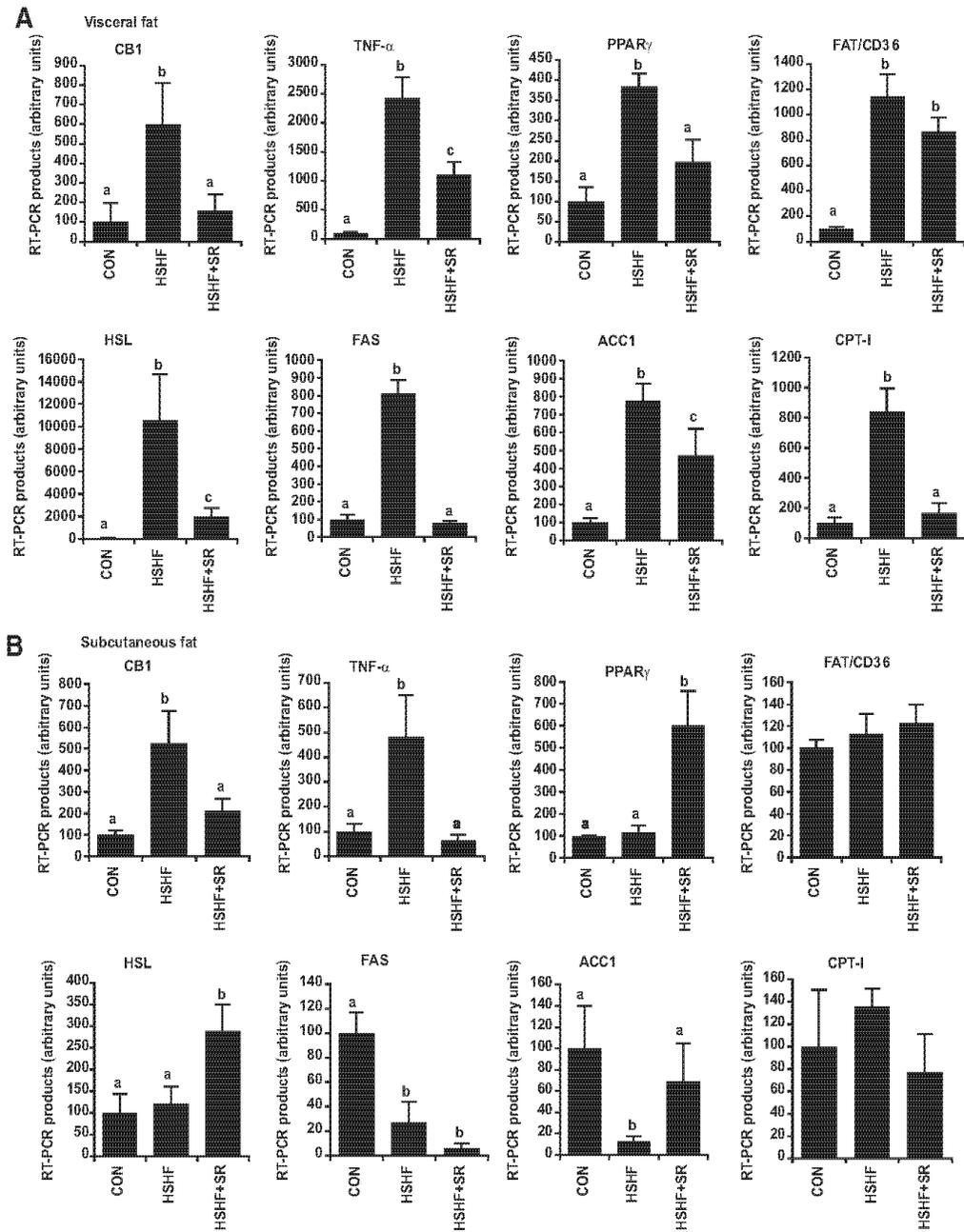


FIG. 4. Effect of CB1 antagonism treatment on the mRNA expression of CB1 and genes involved in adipocyte metabolism in epididymal (A) and inguinal (B) fat. Mice were fed an HSHF diet for 25 weeks receiving during the last 6 weeks either 10 mg · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> of the CB1-specific antagonist SR141716 (HSHF+SR) or the vehicle (HSHF). In parallel, a series of mice was maintained on a control diet (CON). For each gene, a standard curve was established from four cDNA dilutions (1/10–1/10,000) and used to determine the relative gene expression after normalization with a geometric average of 18S and TATA box binding protein expression. Results are expressed as means ± SE (n = 5 per group). Values with different superscript letters (a, b, c) are statistically different at P < 0.05.

of genes involved in transport, synthesis, oxidation, and release of fatty acids. Altogether, these data suggest that the reversion of liver steatosis induced by the treatment with CB1 antagonist was associated with an improvement of adipose tissue metabolism.

In line with an improvement of cardiovascular risk in type 2 diabetic patients treated with rimonabant (11,32), our findings support the possibility that CB1 antagonism is associated with an alteration of liver HDL catabolism. Previous studies (33) showed that overexpression of SR-BI in the liver, while reducing plasma HDL cholesterol levels, reduced atherosclerosis in mice, suggesting that hepatic SR-BI overexpression may promote reverse cholesterol transport. Accordingly, the increase in SR-BI and hepatic lipase expression induced by CB1 antagonism may be associated with a modification of HDL size and kinetics (34) and thereby explain the increase in HDL-CE uptake observed in our model of liver slices. Additional studies are currently under investigation to clearly identify the direct effects of CB1 antagonism on liver lipid metabolism. **Effects of CB1 antagonism on visceral fat.** Recently, evidence has accumulated from animal and human studies (17,35–37) that obesity is also associated with overactivation of ECS in visceral fat. Concordant findings from this study and from literature support the view that CB1 blockade exerts specific effects on visceral fat metabolism that could be associated with the reduction of liver triglyceride content. Hence, the coordinated upregulation of genes acting at different levels of the lipogenic pathway and that of the nuclear activator PPAR $\gamma$  strongly suggested that an HSHF diet favored triglyceride synthesis and thereby formation of enlarged visceral fat deposits. Adipocyte hypertrophy in obesity is consecutive to a deficit in adipogenesis (38), and the limitation of fat stores would promote ectopic lipid deposition in liver and skeletal muscle, leading to decreased insulin action in these tissues (39). Remarkably, the fact that CB1 antagonism totally or partially normalized the expression levels of lipogenic genes in adipocytes may limit the accumulation of intracellular lipid droplets and give rise to smaller cells and reduction of visceral fat mass as also suggested in (40). The decrease in HSL expression consecutive to CB1 antagonism is of particular importance since excessive HSL-dependent fat lipolysis leads to an increased release of FFAs into the circulation, which in turn has deleterious effects on insulin sensitivity (41).

It has been suggested recently that obesity-induced inflammation of adipose tissue may directly activate ECS (42). This could result in a protective response against inflammation as described in colon (43). From our research, it appears that ECS activation induced by an HSHF diet is also associated with an increase in TNF- $\alpha$  in adipose tissue. This interaction between inflammation and ECS needs to be further explored to determine whether inflammation causes ECS activation or vice versa. However, the concentration-dependent stimulation of lipolysis by TNF- $\alpha$  demonstrated in rodent and human fat cells is considered to be an important pathogenetic factor in the development of insulin resistance and type 2 diabetes (44). Therefore, it is reasonable to suggest that the reduction of TNF- $\alpha$  expression in visceral adipose tissue of HSHF mice treated with CB1 antagonist is linked to the normalization of adipocyte metabolism and to underlying effects on lipid and carbohydrate metabolism.

**Effects of an HSHF diet and CB1 antagonism in subcutaneous versus visceral fat.** This study also provides new information regarding the impact of HSHF diet and subsequent CB1 antagonism on the regulation of lipid metabolism in subcutaneous compared with visceral adipose tissue. Taken together, our findings give molecular evidence that 1) an HSHF diet causes deleterious effects in visceral adipose tissue that were not observed in subcutaneous fat and 2) CB1 blockade is able to reverse the molecular changes primarily induced by an HSHF diet in visceral adipose tissue and to exert specific effects on subcutaneous adipocytes. These discrepancies in gene regulation between visceral and subcutaneous adipocytes in response to high-fat diet and CB1 antagonism are consistent with a different degree of ECS activation in these tissues. This consideration is supported by several recent findings (36,37,45,46) indicating differences in endocannabinoid levels between epididymal and subcutaneous fat. In addition, the overexpression of PPAR $\gamma$ 2, FAS, and ACC gene in epididymal fat of obese mice is also in favor of the activation of ECS in this tissue since it has been reported that CB1 activation stimulates lipogenesis by increasing PPAR $\gamma$  and lipogenic enzyme expression in adipocytes and liver (30,36,47). Collectively, data suggest that ECS is more activated in epididymal than in subcutaneous fat in our mice model of obesity and it can be predicted that antagonism of CB1 was more effective in the tissue presenting elevated levels of endocannabinoids (36,45).

Interestingly, an HSHF diet or CB1 antagonist treatment induced nearly similar effects on the amounts of epididymal and subcutaneous fat, suggesting that molecular and metabolic differences observed are not solely related to the modification of the fat depot size. In contrast, the induction of TNF- $\alpha$  expression by an HSHF diet was far less important in subcutaneous than in visceral fat, and the treatment of obese mice with CB1 antagonist induced the complete normalization of TNF- $\alpha$  expression only in subcutaneous fat, whereas inflammation remains high in visceral adipocytes. Concomitantly, the normalization of TNF- $\alpha$  mRNA levels in subcutaneous fat is associated with an increase in adiponectin content in this tissue. An inverse relationship between circulating adiponectin and TNF- $\alpha$  has already been evoked (48), suggesting that adipose tissue inflammation could alter adiponectin production. The increased expression of PPAR $\gamma$ 2 induced by CB1 antagonism in subcutaneous fat may also correspond to an activation of adipocyte differentiation (49) and thereby of adiponectin secretion (50). In addition, our findings regarding the adiponectin content in visceral and subcutaneous fat suggest that the normalization of adiponectin plasma levels induced by CB1 antagonism may be exclusively associated with an increased production of this adipokine by subcutaneous adipocytes.

In conclusion, this study indicates that treating obese mice with a CB1 antagonist exerts beneficial effects on liver steatosis and various lipid parameters, providing supportive evidence that the hyperactivity of ECS associated with obesity was adjusted by the antagonism of CB1. This notion is further supported by data from an ongoing study indicating that CB1 antagonism exerts no effects on body weight, fat mass, and liver triglyceride content in control mice (T.J., L.Dj., L.De., J.G., B.V., and P.D.; personal data). Our findings are also consistent with a contribution of peripheral CB1 and suggest different degrees of ECS activity in visceral and subcutaneous fat. In this way,

the improvement of visceral adipose tissue metabolism appears to be a determining factor for the normalization of plasma parameters and the reversion of liver steatosis. Therefore, future studies should investigate the direct effects of CB1 antagonism on the liver to precise the respective implication of ECS and products secreted by adipose tissue in the regulation of lipid metabolism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from sanofi-aventis and the Région Bourgogne.

No other potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001;60:329-339
2. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:27-37
3. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005;8:585-589
4. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmieri RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;410:822-825
5. Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 2001;134:1151-1154
6. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;143:315-317
7. Gary-Boho M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruciani N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrie P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007;46:122-129
8. Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P, Herbert JM. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:65-72
9. Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, 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
10. Despres JP, Golay A, Sjöström L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005;353:2121-2134
11. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, 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
12. Engeli S, Jordan J. The endocannabinoid system: body weight and metabolic regulation. *Clin Cornerstone* 2006;8(Suppl. 4):S24-S35
13. Nogueiras R, Veyrat-Durebex C, Suchanek PM, Klein M, Tschöp J, Caldwell C, Woods SC, Wittmann G, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C, Reizes O, Rohrer-Jeanrenaud F, Tschöp MH. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes* 2005;57:2977-2991
14. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Batkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G. 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
15. Bensaid M, Gary-Boho M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrie P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003;63:908-914
16. Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286:S66-S78
17. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP, Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:692-699
18. Di Marzo V, Cote M, Matias I, Lemieux I, Arsenault BJ, Cartier A, Piscitelli

- F, Petrosino S, Almeras N, Despres JP. Changes in plasma endocannabinoid levels in visceraally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 2009;52:213-217
19. Duvivier VF, Delafoy Plasse L, Delion V, Lechevalier P, Le Bail JC, Guillot E, Pruniaux MP, Galzin AM. Beneficial effect of a chronic treatment with rimonabant on pancreatic function and beta-cell morphology in Zucker Fatty rats. *Eur J Pharmacol* 2009;616:314-320
20. Getty-Kaushik L, Richard AM, Deeney JT, Krawczyk S, Shirihai O, Corkey BE. The CB1 antagonist rimonabant decreases insulin hypersecretion in rat pancreatic islets. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1856-1860
21. Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:183-187
22. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007;117:2621-2637
23. Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Chardigny JM, Sebedio JL, Clouet P. Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans-10, cis-12 isomer of linoleic acid. *J Nutr* 2004;134:561-567
24. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509
25. Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Verges B, Degrace P. Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Nutr* 2009
26. Persegh L, Verges B, Foisac M, Gamber P, Duvillard L. Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. *Diabetologia* 2006;49:1380-1386
27. Degrace P, Moindrot B, Mohamed I, Gresti J, Du ZY, Chardigny JM, Sebedio JL, Clouet P. Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR-/- apoB100/100 mice fed trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res* 2006;47:2647-2655
28. 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
29. Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:640-648
30. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005;115:1298-1305
31. Ogiwara H, Tanabe T, Nikawa J, Numa S. Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A: formation of equimolar enzyme-inhibitor complex. *Eur J Biochem* 1978;89:33-41
32. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J. 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* 2006;295:761-775
33. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-B1 reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:721-727
34. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor BI mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* 2009;284:6033-6100
35. Blüher M, Engeli S, Klotting N, Berndt J, Fasshauer M, Batkai S, Pacher P, Schon MR, Jordan J, Smmvoll M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 2006;55:3053-3060
36. Matias I, Gonthier MP, 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. 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
37. Starowiez KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, Di Marzo V. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:553-565
38. Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. The

**CB1 ANTAGONISM IN DIET-INDUCED OBESE MICE**

- expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11371-11376
39. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;23(Suppl 4):S12-S21
  40. Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Peleraux A, Penarier G, Soubrie P, Le Fur G, Galiegue S, Casellas P. 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
  41. Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18(Suppl 2):S5-S9
  42. Kempf K, Hector J, Strate T, Schwarzloh B, Rose B, Herder C, Martin S, Algenstaedt P. Immune-mediated activation of the endocannabinoid system in visceral adipose tissue in obesity. *Horm Metab Res* 2007;39:596-600
  43. Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Storr M, Lutz B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* 2004;113:1202-1209
  44. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:447-455
  45. 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;57:1262-1268
  46. Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Aviello G, Romano B, Borrelli F, Petrosino S, Di Marzo V. Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol* 2009;158:451-461
  47. Pagano C, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, Bianchi K, Rizzuto R, Bernante P, Federspil G, Vettor R. 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
  48. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2031-H2041
  49. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302:93-109
  50. Gustafson B, Jack MM, Cushman SW, Smith U. Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:933-939

## **Chapitre II : Approche in vitro : Etude des effets du blocage du SEC sur le métabolisme des lipides et des glucides dans le foie.**

(Résultats faisant l'objet d'une publication en préparation)

Dans le foie, une sur-activation du SEC dépendante de l'activation des CB1R et de la signalisation cellulaire qui en découle, stimule la lipogenèse et favorise l'apparition d'une stéatose (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005 ; Osei-Hyiaman *et al.*, 2008). Ceci suggère que la stimulation de ce système biologique particulier contribue à la pathogénie de la stéatohépatite non alcoolique (NASH), une caractéristique commune des patients en surpoids ou obèses avec diabète de type 2, fortement associée à la résistance à l'insuline (Luyckx *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2004). Malgré les nombreuses études montrant que l'antagonisme sélectif des CB1R est associé à des effets anti-fibrotiques chez la souris et l'Homme (Mallat *et al.*, 2007; Teixeira-Clerc *et al.*, 2008) et à une réduction la stéatose hépatique chez le rat obèse Zucker fa/fa (Gary-Bobo *et al.*, 2007), il n'existe actuellement aucune étude ayant réellement déterminé les effets de l'inactivation des CB1R périphériques. Pourtant, lors d'un traitement par un antagoniste CB1R, une action directe sur les organes périphériques ne peut pas être exclue. C'est pourquoi, le but de cette étude est d'examiner l'impact de l'inhibition du SEC via l'antagonisme des CB1R sur le foie, organe central du métabolisme lipidique en utilisant un modèle d'explants. Pour cette approche, nous avons donc développé un modèle d'explants de foie en culture, permettant de conserver la structure des cellules intactes et l'organisation tissulaire afin de déterminer si le blocage des CB1R peut exercer des effets directs sur le métabolisme glucido-lipidique du foie, indépendamment de facteurs nerveux ou circulant (comme ceux produits par les adipocytes ou liés à l'insuline). Les coupes de foie réalisées à l'aide d'un slicer (Brendel/Vitron) ont tout d'abord été soumises à différents tests qui ont permis de déterminer les conditions de préparation, de culture et de traitement (temps d'incubation, mode d'administration, test de viabilité des tissus... voir Matériel et Méthodes).

Au final, trois approches expérimentales ont été retenues : 1) Des coupes de foies issus d'animaux sains ont été incubées 21h dans un milieu de culture contenant du Rimonabant (100nM) afin d'inactiver les CB1R. 2) Dans certains cas, nous avons en plus ajouté de l'AEA (5µM) dans le milieu dans le but d'induire une activation du SEC et 3) dans une autre série d'expérience, nous avons utilisé du foie de souris rendues obèses par un régime HSHF chez qui le

SEC est hyper-activé. La mesure de l'expression du CB1R est utilisée comme critère permettant de caractériser l'état d'activation du SEC en fonction des différents traitements (figure 17<sub>A,B,C</sub>). Dans le modèle d'explants de foie sain, l'efficacité du traitement par le SR141716 est mise en évidence par la forte diminution de l'expression du gène codant pour le CB1R. Ce résultat indique également que le SR141716 est capable de réguler l'expression des CB1R sur un tissu dont le SEC n'est pas activé (foie sain, en absence d'agoniste) ce qui semble traduire l'effet agoniste inverse du composé. A l'inverse, l'AEA provoque une stimulation de l'expression du CB1R. Lorsque les deux molécules sont associées, c'est à dire en compétition, on observe un niveau d'expression légèrement supérieure à celui des témoins, suggérant que l'effet inducteur de l'AEA l'emporte (probablement du fait de sa concentration plus importante). En conclusion, il est raisonnable de penser que les modifications d'expression hépatique du gène codant pour le CB1R induites par les traitements correspondent à des variations de l'activité du SEC.

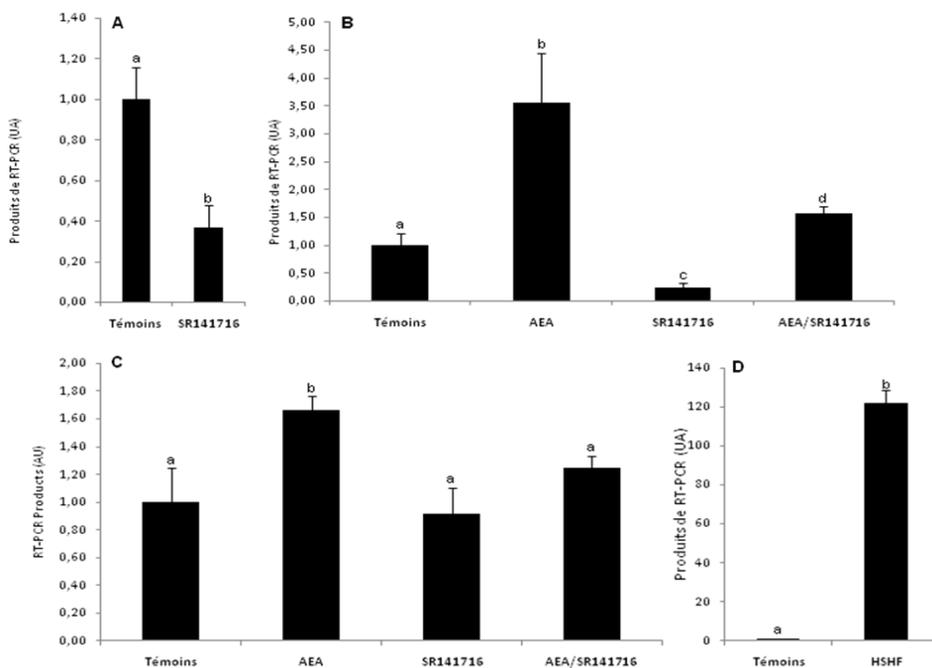


Figure 17: Expression du CB1R suite à un traitement SR141716 (100nM) sur A) des explants de foie sain, B) des explants de foie sain traités ou non par de l'AEA (5µM) et C) des explants de foie de souris HSHF traités ou non par de l'AEA. D) Comparaison du niveau d'expression du CB1R dans le foie sain et le foie HSHF. Les traitements ont eu lieu pendant 21h à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05. *CB1*, récepteur cannabinoïde 1.

Dans le modèle HSHF, l'AEA induit également l'expression des CB1R alors que le traitement par SR141716 n'a, dans ce cas, aucun effet. Ce résultat plutôt inattendu pourrait s'expliquer par une concentration en SR141716 trop faible par rapport à la densité des CB1R présents à en juger par leur niveau d'expression dans le foie des souris obèses HSHF beaucoup plus élevé que chez les souris témoins (figure 17D). Lorsque le SR141716 et l'AEA sont ajoutés simultanément dans le milieu de culture, l'expression du CB1R est stimulée à un degré moindre par rapport au traitement AEA seul, suggérant un effet compétition entre les deux composés.

## **1. Paramètres relatifs à l'oxydation des acides gras.**

Les résultats obtenus *in vivo* et présentés précédemment ayant mis en évidence un effet bénéfique du traitement par l'antagoniste CB1R sur la stéatose hépatique, nous nous sommes intéressés à d'éventuels effets directs du SR141716 sur le métabolisme lipidique du foie et en particulier sur certains paramètres liés à l'oxydation des AG.

### **1.1. Approche 1: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain.**

La figure 17 révèle qu'un traitement par l'antagoniste CB1R provoque une augmentation de 50% de l'oxydation de l'acide palmitique dans les explants de foie traités (Figure 18A). La même mesure réalisée sur un homogénat obtenu à partir des explants (ce qui conduit à supprimer l'étape de franchissement de la membrane plasmique) donne des résultats similaires (Figure 18B) ce qui permet de suggérer que l'augmentation de l'activité  $\beta$ -oxydative n'est pas due à un meilleur captage des AG par les cellules. D'autre part, la quantité de malonyl-CoA intracellulaire est diminuée dans les explants de foie traités (Figure 18C). Ainsi, l'augmentation de l'activité  $\beta$ -oxydative pourrait correspondre à la levée de l'inhibition exercée par cet inhibiteur spécifique sur la CPT-1 catalysant l'étape d'entrée des AGLC dans la mitochondrie. Toutefois, l'expression de la CPT-I n'a pas été induite par le traitement dans cette expérience. Compte tenu du rôle central de l'AMPK dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique nous avons examiné si le blocage des CB1R avait des conséquences sur l'activation de l'AMPK dans les explants. Les données cinétiques présentées dans la figure 19 indiquent que l'AMPK est phosphorylée et donc activée lors d'un traitement des explants de foie par l'antagoniste CB1R.

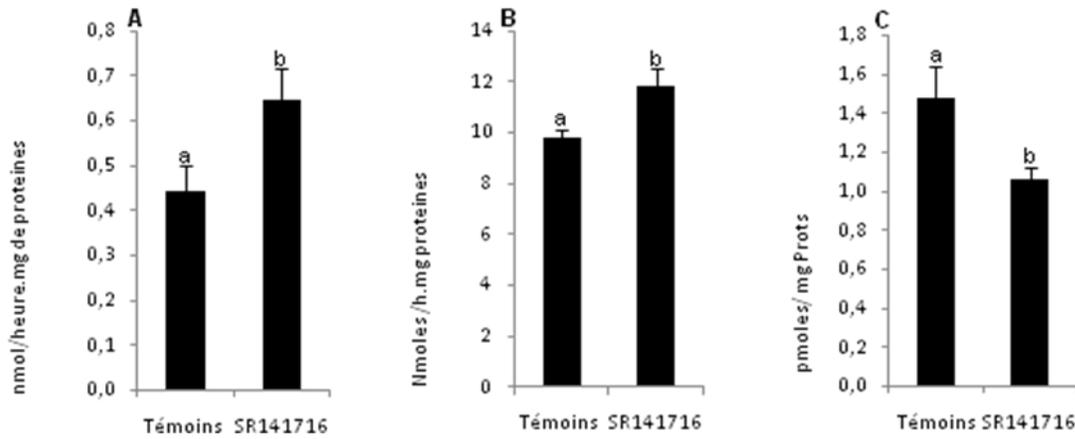


Figure 18: Effet du traitement de l'antagonisme des CB1R sur A) les capacités oxydatives des explants de foies, B) les capacités oxydatives d'un homogénat d'explants traités et C) les concentrations en malonyl-CoA intracellulaire après 21h de traitement par SR141716 (100nM). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

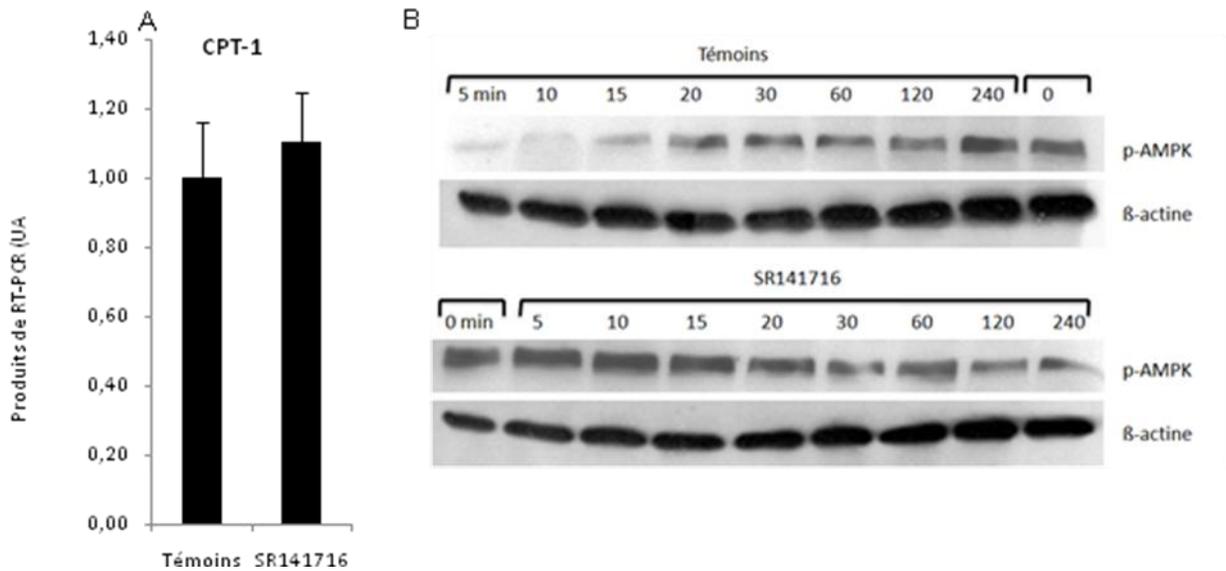


Figure 19 : A) Effet du traitement par l'antagonisme des CB1R (SR141716 100nM) sur l'expression des ARNm de la CPT-1 après 21h de traitement. B) Effet du traitement de l'antagonisme des CB1R (SR141716 100nM) sur la phosphorylation de l'AMPK. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ . CPT-1, carnitine palmitoyltransferase I.

**1.2. Approche 2: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain traités ou non avec de l'anandamide.**

Afin se rapprocher des conditions physiopathologiques rencontrées dans le foie de sujets obèses, nous avons décidé de répéter l'expérience en traitant cette fois une série d'explants avec de l'AEA dans le but d'hyper-activer le SEC. Nous avons ensuite mesuré l'activité  $\beta$ -oxydative (figure 20) et l'expression de la CPT-I (figure 21). Le traitement par l'antagoniste CB1R provoque à nouveau une augmentation de l'oxydation de l'acide palmitique (+35%) alors que l'agoniste CB1R entraîne une baisse (-30%) de l'activité  $\beta$ -oxydative. Les explants co-traités par l'AEA et par SR141716 présentent une oxydation équivalente à celle des témoins.

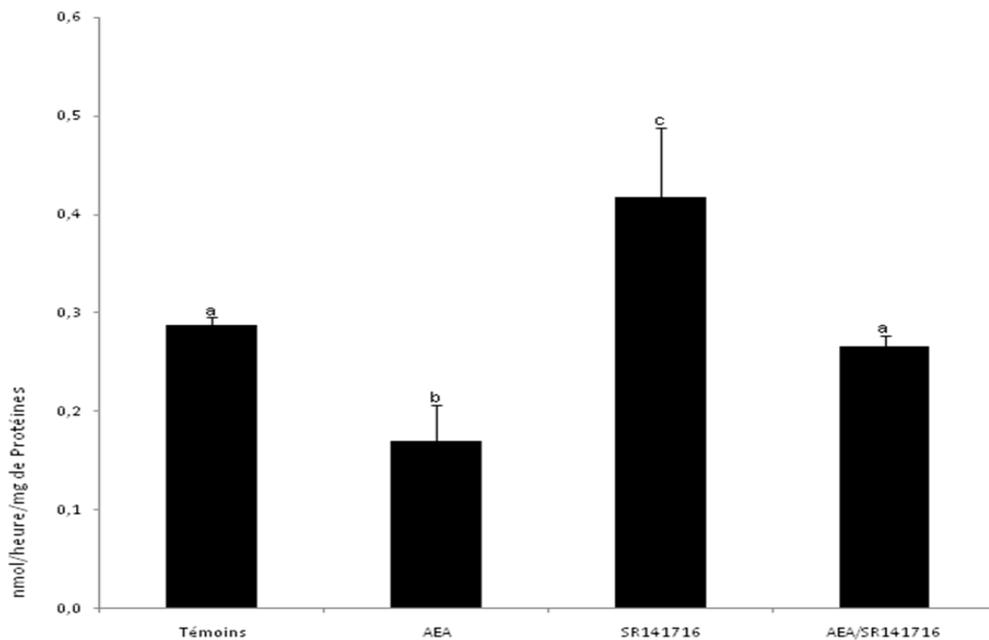


Figure 20: Effets de l'antagonisme des CB1R sur l'oxydation des acides gras. De fines tranches de foie (environ 200  $\mu$ m) ont été obtenues à partir de souris nourries avec un régime standard. Les coupes ont ensuite été mises en culture dans un milieu X en présence d'AEA (5 $\mu$ M) et/ou d'antagoniste CB1R (SR141716, 100 $\mu$ M) pendant 21h (n=5 pour chaque lot). A l'issue des 21 h, les tranches ont été incubées pendant 2h à 37 ° C dans du milieu William's Medium E oxygéné, complété par de la L-carnitine (0,5 mmol / L) en présence de 0,2 mmol / L de [1-<sup>14</sup>C] acide palmitique (55,5 GBq /mol) complexés à l'albumine (FA / BSA rapport molaire de 2,5 / 1).

Dans cette série de résultats qui confirme que l'inactivation des CB1R est associée à une stimulation de l'activité  $\beta$ -oxydative, nous observons cette fois une induction de l'expression de la CPT-I dans les explants traités par SR141716 (Figure 21). Ce phénomène semble bien dépendre des CB1R puisque la présence de l'AEA réprime l'expression CPT-I.

### 1.3 Approche 3: Effets d'un traitement par AEA et SR141716 sur des explants de foie de souris HSHF.

Nous avons voulu vérifier si les effets des agonistes et antagonistes des CB1R sur les capacités oxydatives d'explants de foie sain étaient reproduits sur des explants de foie provenant de souris rendues obèses par un régime HSHF. Il s'avère que dans les mêmes conditions de traitement, l'AEA induit à nouveau une diminution de l'oxydation de l'acide palmitique alors que le traitement par SR141716 n'a aucun effet.

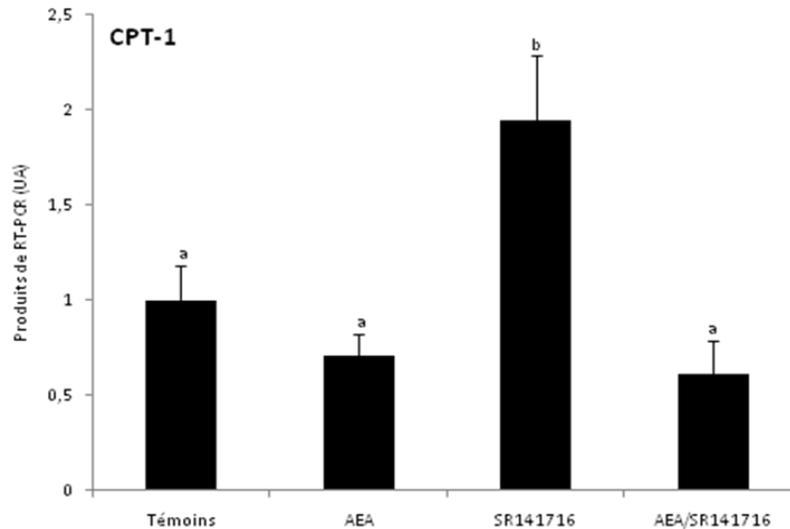


Figure 21: Effet d'un traitement par agoniste et antagoniste CB1R sur l'expression des ARNm de la CPT-1. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les explants ont été mis en présence d'AEA (5 $\mu$ M) et/ou de SR141716 (100nM) pendant 21h avant extraction des ARN. Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05. CPT-1, carnitine palmitoyltransferase I.

Lorsque les deux composés sont mis en compétition, on retrouve l'effet AEA avec une baisse des capacités oxydatives équivalente à celle retrouvée pour l'AEA seule (Figure 22). Ces résultats sont à rapprocher de ceux concernant l'expression des CB1R (Figure 17) qui révèlent que la quantité de transcrits CB1R est plus de 120 fois supérieure dans le foie des souris obèses par rapport aux souris témoins. Nous pouvons donc raisonnablement penser que l'absence d'effet marquant de SR141716 sur l'expression des CB1R est due à une quantité insuffisante d'antagoniste au regard du nombre de récepteurs à saturer.

### 1.4. Discussion

Le rôle des CB1R périphériques dans la régulation du métabolisme lipidique est évoqué dans de nombreuses études (Cota *et al.*, 2003). Les travaux plus récents d'Osei-Hyiaman *et al.*, ont

partiellement mis en évidence que l'activation des CB1R affecte le métabolisme lipidique en stimulant la synthèse des AG dans le foie. Les auteurs ont également démontré que ces effets étaient annulés suite à un traitement par l'antagoniste CB1R (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008). Dans notre modèle, il apparaît que le blocage des CB1R entraîne une augmentation des capacités d'oxydation de l'acide palmitique par le foie alors que la présence d'AEA entraîne une diminution importante des capacités oxydatives des explants. Cette augmentation peut être associée à l'activation de l'AMPK. En effet, l'AMPK joue un rôle important dans le contrôle du métabolisme glucido-lipidique en phosphorylant et inactivant l'ACC catalysant la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA ce qui, dans le foie constitue la première réaction de la biosynthèse des acides gras.

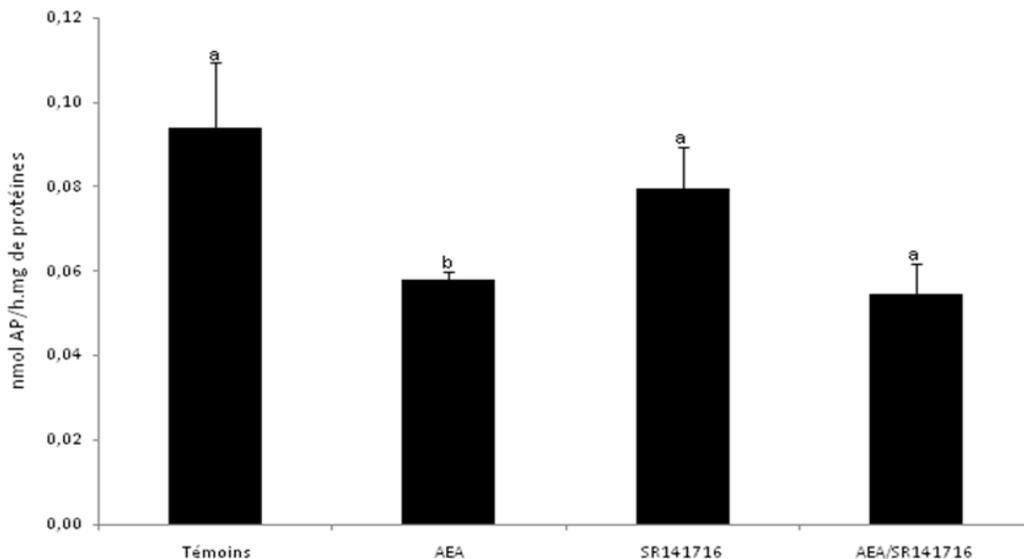


Figure 22 : Effets de l'antagonisme des CB1R sur l'oxydation des acides gras. De fines tranches de foie (environ 200 micromètres) ont été obtenues à partir de souris nourries avec un régime HSHF et traitées par de l'AEA (5 $\mu$ M) et/ou avec 100 $\mu$ M d'antagoniste CB1R (SR141716), soit avec un placebo (n=5 pour chaque lot). Les tranches ont été incubées à 37 ° C dans du milieu William's Medium E oxygéné, complété par de la L-carnitine (0,5 mmol / L) en présence de 0,2 mmol / L de [1-14C] acide palmitique (55,5 GBq / mol) complexés à l'albumine (FA / BSA rapport molaire de 2,5 / 1).

En inactivant l'ACC, l'AMPK est donc responsable d'une inhibition de la synthèse des acides gras dans ce tissu. De plus, l'AMPK possède également un effet de régulation à long terme sur la transcription des gènes de la lipogenèse (Foretz *et al.*, 2005), en inhibant l'expression et l'activité des facteurs de transcription SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) (Foretz *et*

*al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2001) et ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) (Foretz *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2002). En outre, le malonyl-CoA produit par l'ACC joue le rôle d'élément régulateur : il inhibe l'activité de la CPT-1 qui permet le transport des acides gras du cytosol vers la mitochondrie (Kashfi *et al.*, 1994; Murthy and Pande, 1987). La diminution de la concentration cytosolique en malonyl-CoA facilite ainsi la pénétration des acides gras dans la mitochondrie et leur oxydation. En résumé, en activant l'AMPK, le traitement par l'antagoniste CB1R pourrait conduire à la fois à une normalisation de la lipogenèse et à une amélioration de l'oxydation des acides gras. Ces résultats sont en accord avec ceux montrant qu'un traitement par l'antagoniste CB1R stimule l'activité CPT-1 dans le foie de souris soumises à un régime standard (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008) et avec ceux de Watanabe *et al.*, dans lesquels l'antagoniste CB1R entraîne une phosphorylation de l'AMPK chez des souris *adipo<sup>-/-</sup>ob/ob* pouvant conduire à une inactivation de l'ACC et une diminution des quantités de malonyl-CoA (Watanabe *et al.*, 2009). De plus, il est démontré que l'AEA entraîne une stimulation de l'expression de gènes de la lipogenèse et que l'administration d'un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes (HU-210) chez la souris stimule la lipogenèse dans un foie sain par un mécanisme CB1R dépendant. Les mécanismes alors impliqués dans cet effet incluent l'activation de SREBP-1c, de l'ACC et de la FAS (Shimomura *et al.*, 1998). En conclusion, cette étude et plusieurs autres démontrent que la réduction de la lipogenèse et l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation consécutives à une diminution de l'activité du SEC sont des événements favorables à la réduction de la stéatose hépatique (Gary-Bobo *et al.*, 2007 88; Lotersztajn *et al.*, 2007; Luyckx *et al.*, 2000). L'antagonisme des CB1R hépatiques apparaît donc comme une cible très intéressante pour stimuler l'oxydation des AG et ainsi permettre de lutter contre la stéatose fréquemment retrouvée chez des patients obèses.

## **2. Paramètres relatifs à la lipogenèse et au captage du HDL-CE.**

Lors des essais cliniques de phase III RIO, le Rimonabant a entraîné des modifications de distribution des lipoprotéines avec une diminution de la fraction des LDL petites et denses (- 4,7 %), une augmentation du pourcentage des grosses particules de LDL (+ 6,3 %) et des effets très favorables sur le HDL cholestérol (+ 9,3 % vs placebo) (Pi-Sunyer *et al.*, 2006; Van Gaal *et al.*, 2008a; Van Gaal *et al.*, 2008b). L'étude Stradivarius a également mis en évidence des effets favorables du Rimonabant sur les taux d'hémoglobine glyquée (HbA-1c), d'HDL-C et des triglycérides (Nissen *et al.*, 2008). C'est pourquoi nous avons utilisé le modèle d'explants pour

étudier les effets du blocage des CB1R sur la régulation de la voie de la lipogenèse et de la synthèse du cholestérol ainsi que sur le captage du HDL-CE.

### 2.1 Approche 1: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain.

Nous avons tout d'abord cherché à savoir si l'antagonisme des CB1R pouvait affecter les capacités de captage du HDL-CE dans notre modèle. Pour cela, les explants sont cultivés 21h en présence ou non de SR141716 puis incubés 2h avec des HDL marquées (matériel et méthodes section 6.). Les résultats mettent en évidence une augmentation du captage du HDL-CE dans les explants de foie SR141716 par rapport aux témoins (Figure 23A). En parallèle, il s'avère qu'une incubation avec l'antagoniste CB1R provoque une augmentation significative du cholestérol et des triglycérides intracellulaires en comparaison aux valeurs contrôles (figure 23B et 23C). Ces données laissent supposer que l'augmentation de la concentration de cholestérol intracellulaire induite par le blocage des CB1R hépatiques est, au moins en partie, associée à la prise en charge du cholestérol porté par les HDL.

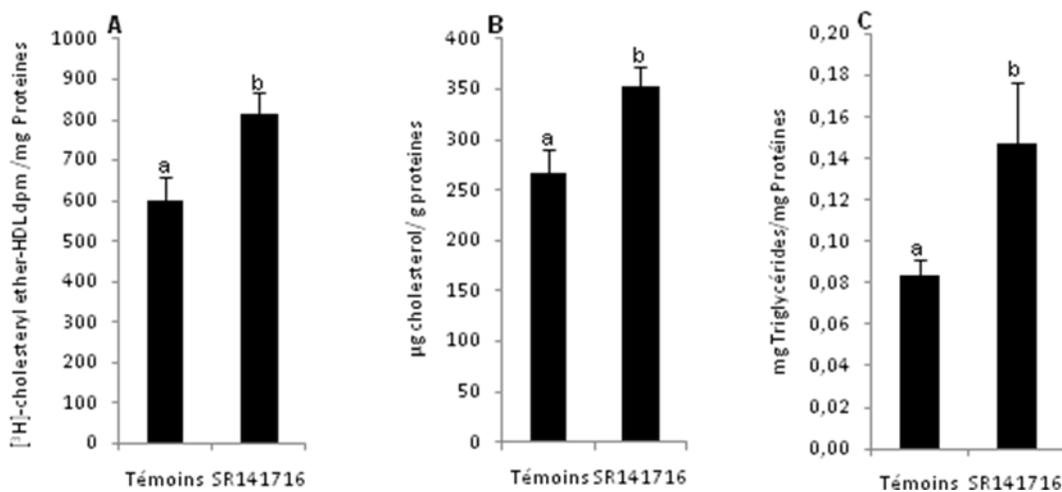


Figure 23: Effet de l'antagonisme des CB1R(SR141716 100nM) sur A) les capacités des explants de foies à capter les HDL-CE, B) la concentration en cholestérol intracellulaire et C) la concentration en triglycérides intracellulaires. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ .

Puisqu'une augmentation de la teneur en cholestérol intracellulaire a été observée après le traitement par l'antagoniste CB1R, nous avons mesuré l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Le blocage des CB1R hépatiques entraîne une augmentation de l'expression de l'hydroxy-méthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA) suggérant un impact sur la

régulation de la production de cholestérol endogène. Parallèlement, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le captage du cholestérol, SR-B1 et HL a été réprimée par le traitement. Les données indiquent également que le traitement ne modifie ni l'expression des 2 isoformes de l'ACC ni celle de la FAS alors que les taux de transcrits de SREBP-1c sont augmentés de 50%. Malgré l'absence d'effets apparents sur l'expression des gènes associés à lipogenèse *de novo*, la stimulation du facteur de transcription SREBP-1c suggère que le traitement par SR141716 affecte le métabolisme lipidique (Figure 24).

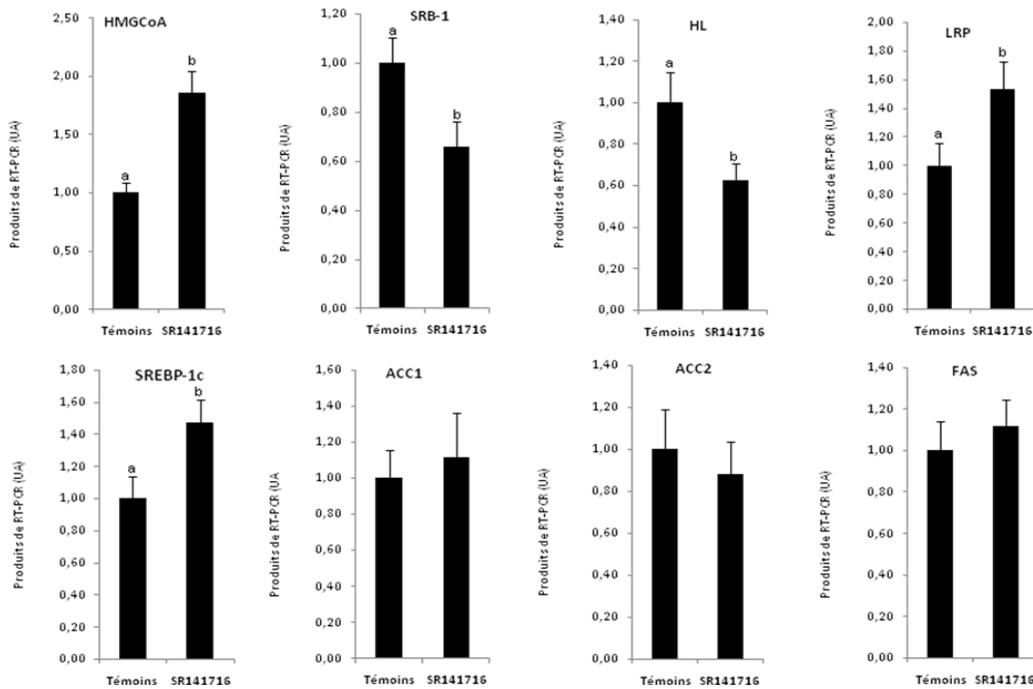


Figure 24: Effet du traitement de l'antagonisme des CB1R (SR141716 100nM) sur l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme lipidique du foie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ . FAS, fatty acid synthase; ACC, acétyl-CoA carboxylase; HMGCoA, hydroxy-methylglutaryl-CoA réductase, SR-B1, Scavenger Receptor B1, HL, Hepatic lipase, SREBP-1c, Sterol regulatory element binding protein-1c, LRP, lipoprotein receptor-related protein-1.

Afin de déterminer si la voie de synthèse *de novo* du cholestérol participe à l'augmentation de cholestérol intracellulaire, nous avons traité des explants par SR141716 et par l'atorvastatine (5 $\mu$ M) afin d'inhiber l'HMG-CoA reductase, enzyme responsable de la première étape de la synthèse (Figure 25). Dans cette nouvelle expérience, nous retrouvons bien l'augmentation du cholestérol dans les explants traités 21h par l'antagoniste CB1R alors que le traitement par l'atorvastatine, tend à le diminuer ( $p < 0,185$ ). Il est intéressant de noter que les explants traités à la

fois par l'antagoniste CB1R et l'atorvastatine ne présentent pas d'augmentation du cholestérol intracellulaire ce qui démontre que la synthèse de novo est bien stimulée par le traitement SR141716. Parallèlement, le profil d'expression de l'HMG-CoA reductase apparaît corrélé à la concentration intracellulaire de cholestérol (figure 23). En ce qui concerne la lipase hépatique et SR-B1, tous deux impliqués dans le captage du HDL-CE, la diminution de leur expression génique consécutive à l'antagonisme des CB1R est bien reproduite, mais dans cette expérience, il est en plus démontré qu'un co-traitement avec l'atorvastatine annule l'effet inhibiteur du SR141716.

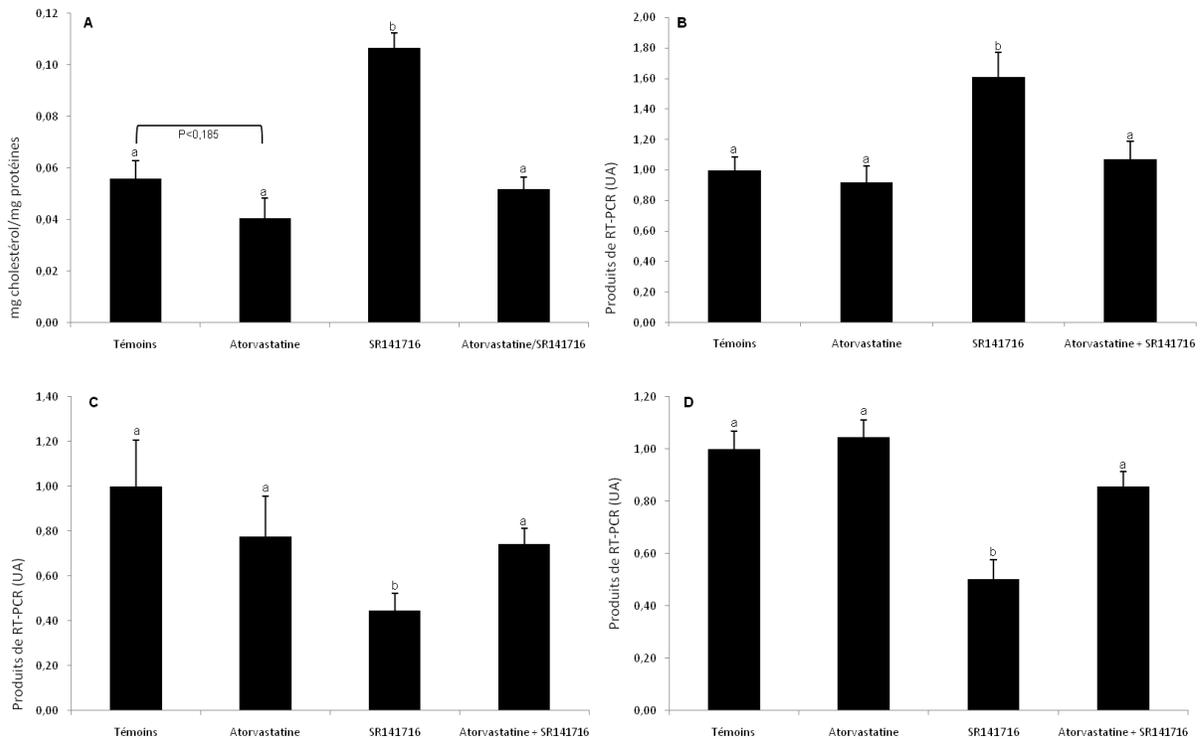


Figure 25: Effet du traitement par l'atorvastatine (5µM) et par l'antagoniste CB1R SR141716 (100nM) sur A) la concentration en cholestérol intracellulaire, B) l'expression de l'ARNm de l'HMG-CoA réductase, C) l'expression de l'ARNm de l'HL et D) l'expression de l'ARNm de SRB-1. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05.

## 2.2. Approche 2: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sains traités ou non avec de l'anandamide.

Dans cette approche expérimentale, nous avons ajouté des séries d'explants traités à l'AEA et à l'AEA+SR141716 puis nous avons mesuré l'expression des gènes précédemment étudiés. Le traitement SR141716 n'exerce à nouveau aucun effet sur l'expression de l'ACC1, l'ACC2 et la

FAS. Toutefois, il apparaît que le SR141716 est capable d'annuler les effets inducteurs de l'AEA lorsque ces deux composés sont en compétition (Figure 26).

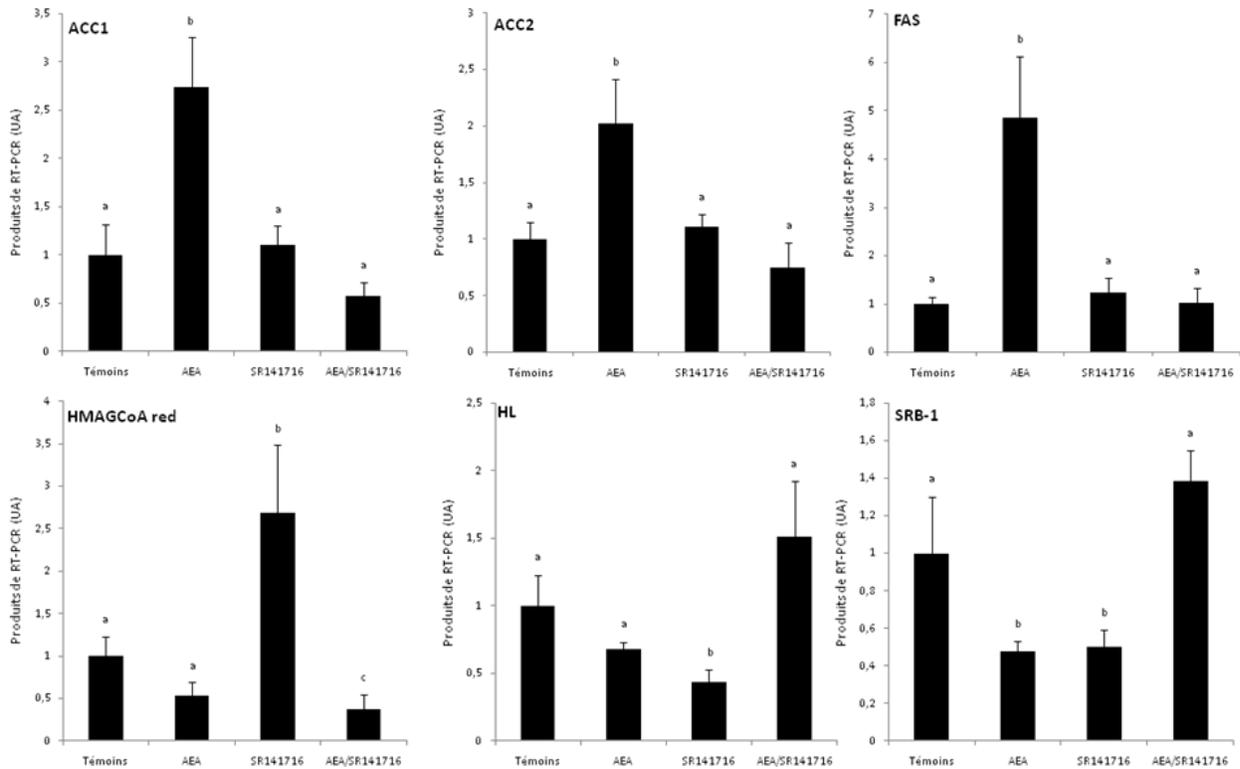


Figure 256 : Effet d'un traitement par agoniste et antagoniste CB1R sur l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme lipidique du foie. AEA (5 $\mu$ M), SR141716(100nM). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05. ACC, acétyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; HMGCoA, hydroxy-methylglutaryl-CoA réductase, HL, Hepatic lipase; SR-B1, Scavenger Receptor B-1.

Concernant la synthèse *de novo* du cholestérol, l'activation des CB1R hépatiques n'a pas d'effet significatif sur l'expression de l'HMG-CoA reductase alors que le blocage de ces récepteurs entraîne, cette fois encore, une augmentation de l'expression de cette enzyme. Cet effet inducteur n'existe pas lorsque que l'antagoniste est en compétition avec l'AEA. Parallèlement, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le captage du cholestérol, SR-B1 et HL a été modifiée par l'AEA et SR141716. Avec le traitement par l'antagoniste CB1R, on retrouve un profil similaire à celui précédemment observé, à savoir une diminution de l'expression de ces 2 protéines. L'AEA entraîne une baisse significative des taux de transcrits SR-B1 et à tendance à diminuer l'expression de l'HL. Enfin, la présence conjointe de l'AEA et de SR141716 dans le milieu normalise les ARNm.

### 2.3. Discussion

Dans la cellule, les taux de cholestérol sont contrôlés par une régulation coordonnée de sa biosynthèse, de son captage et de sa sécrétion. Dans cette approche *in vitro*, nous avons montré que le blocage des CB1R entraîne une augmentation de la teneur en cholestérol dans les explants de foie. Dans notre modèle, l'augmentation du taux de cholestérol intracellulaire est associée à une induction de l'expression de l'HMG-CoA reductase, l'enzyme responsable du contrôle du taux de biotransformation de la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA en mévalonate, précurseur des stérols et en particulier du cholestérol. Cela suggère que le blocage des CB1R par SR141716 induit une augmentation de la synthèse du cholestérol. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons associé le traitement SR141716 avec un traitement par l'atorvastatine qui est un inhibiteur sélectif de l'HMG-CoA reductase. Dans ces conditions, c'est à dire lorsque les 2 composés sont en compétition, le traitement par l'atorvastatine inhibe l'effet SR141716 à la fois sur l'expression de l'HMG-CoA reductase et sur la concentration en cholestérol. Ainsi, il est raisonnable de penser que l'augmentation de la concentration en cholestérol intracellulaire induite par l'antagonisme des CB1R est la conséquence d'une augmentation de la synthèse. Néanmoins, les capacités de captage du HDL-CE étant stimulées par le traitement SR141716, une participation du cholestérol exogène n'est pas exclue d'autant que les données relatives à l'HL et SR-B1 sont favorables à cette éventualité. Plusieurs données expérimentales suggèrent que l'HL est régulée en fonction de la demande en cholestérol, de même que les différentes protéines responsables de l'homéostasie des stérols. L'HL est impliquée à différentes étapes du métabolisme des lipoprotéines car elle possède à la fois des activités de lipase de triglycérides et de phospholipase (Groot *et al.*, 1981; Kuusi *et al.*, 1980). Ainsi, l'HL peut catalyser l'hydrolyse des phospholipides des HDL (Groot *et al.*, 1981; Kuusi *et al.*, 1980) et donner lieu à un remodelage des HDL favorable à une meilleure absorption du cholestérol par les hépatocytes (Jansen *et al.*, 1980; Kadowaki *et al.*, 1992). En plus de son activité lipolytique, l'HL permet de renforcer l'interaction lipoprotéine-SR-B1, facilitant ainsi l'incorporation du cholestérol (Lambert *et al.*, 1999; Vidal-Puig *et al.*, 1997; Collet *et al.*, 1999; Marques-Vidal *et al.*, 1994). L'hypothèse du rôle synergique est également soutenue par la régulation commune et réciproque de l'HL et de SR-B1 dans le foie (Perret *et al.*, 2002). Dans notre étude, nous observons que le traitement par l'antagoniste CB1R conduit à une réduction coordonnée de l'expression de SR-B1 et de HL qui ne semble pas en faveur d'une augmentation de la prise en charge du cholestérol par les hépatocytes. Toutefois, il n'est pas exclu que la diminution de l'expression de SR-B1 et de HL soit le reflet de la mise en place d'un

rétrocontrôle consécutif à une augmentation des quantités de cholestérol intracellulaire, en accord avec d'autres travaux effectués avec des cellules d'hépatome en culture démontrant une relation inverse entre la teneur en cholestérol des cellules et les niveaux d'ARNm de l'HL (Perret *et al.*, 2002). Il est également possible que le récepteur LRP dont l'expression est stimulée par le traitement SR141716 participe à augmenter le captage des HDL via un mécanisme similaire à celui décrit par Vassiliou *et al* dans des adipocytes humains (Vassiliou and McPherson, 2004).

SREBP-1c appartient à une famille de facteurs de transcription décrite initialement comme contrôlant des gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique. Son expression est sous le contrôle de l'environnement glucidique. En effet, l'expression de SREBP-1c, très faible dans le foie d'un rat à jeun est augmentée très fortement lorsque l'animal est re-nourri avec un régime riche en glucides (Foretz *et al.*, 1999b). Des résultats identiques ont été obtenus par le groupe de Bruce Spiegelman dans le tissu adipeux blanc (Kim *et al.*, 1998) et par Brown et Goldstein dans le foie de rats diabétiques traités par l'insuline (Shimomura *et al.*, 1999). Dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat, la transcription de SREBP-1c est considérablement stimulée par l'insuline mais inhibée par le glucagon (ou son médiateur, l'AMPc). Cette stimulation de la transcription du gène SREBP-1c par l'insuline qui implique la voie de la PI3-kinase, s'accompagne d'une augmentation des formes membranaires et nucléaires de SREBP-1c (Azzout-Marniche *et al.*, 2000). SREBP-1c est donc capable de mimer les effets de l'insuline sur les gènes contrôlés par cette hormone et le glucose comme les gènes codant pour la GLCK, la G6P, la PEPCK mais également la FAS et l'ACC élargissant ainsi l'importance de ce facteur dans la régulation à long terme du métabolisme glucido-lipidique hépatique (Foretz *et al.*, 1999b). Ainsi, dans notre étude, l'augmentation des taux d'expression de SREBP-1c suggère une stimulation de la lipogenèse. En effet, une étude a montré qu'une stimulation de SREBP-1c contribue à l'augmentation de la synthèse *de novo* d'AG, dans des conditions normales et dans les hépatocytes présentant une accumulation de graisse en stimulant l'expression des gènes codant pour des enzymes lipogéniques dont ACC et FAS (Horton *et al.*, 2002; Shimano, 2001; Kohjima *et al.*, 2008). Même si l'expression d'ACC et FAS n'est pas augmentée, l'induction de SREBP-1c associée à l'augmentation de la synthèse de cholestérol et des contenus intracellulaires en TG et cholestérol suggère une activation de la lipogenèse dans les hépatocytes traités par l'antagoniste CB1R.

### 3. Paramètres relatifs au contrôle du métabolisme glucidique.

En plus de ces différents effets sur le métabolisme lipidique, l'antagonisme des CB1R conduit également à une amélioration des paramètres glucidiques chez l'Homme et la souris (Scheen and Paquot, 2008). Dans ce cas aussi, il est possible que l'inactivation des CB1R dans le foie puisse avoir un impact sur l'homéostasie glucidique en modifiant les voies de synthèse et de dégradation du glucose. Cet aspect est étudié en mesurant les effets du traitement SR141716 sur l'expression d'enzymes clé du métabolisme glucidique dans des explants de foie sain.

#### 3.1 Approche 1: Effets d'un traitement par SR141716 sur des explants de foie sain.

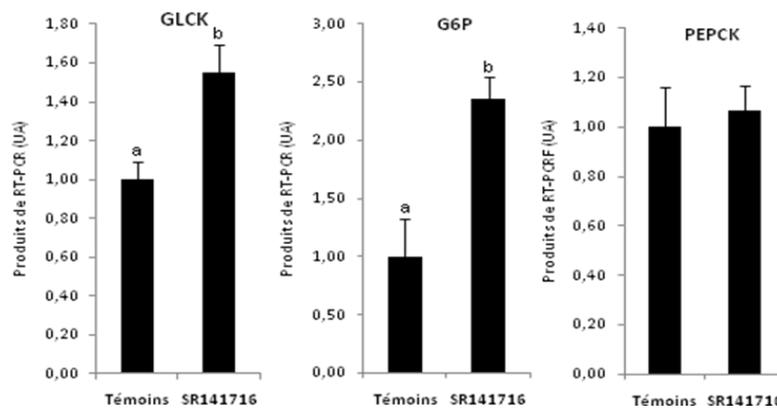


Figure 27 : Effet d'un traitement par l'antagoniste CB1R (SR141716 100nM) sur l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme glucidique du foie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à  $p < 0,05$ . *GLCK*, Glucokinase, *G6P*, glucose 6 phosphatase ;*PEPCK*, phosphoenolpyruvate carboxykinase.

L'analyse des profils d'expression de la Glucokinase, de la G6P et de la PEPCK révèlent une augmentation significative des transcrits de la GLCK et de la G6P dans les explants de foie traités 21h par l'antagoniste SR141716 par rapport aux témoins alors que le traitement n'exerce aucun effet sur les ARNm de la PEPCK (figure 27).

#### 3.2. Discussion

Dans le foie, la transcription de la GLCK est stimulée par l'insuline (Iynedjian *et al.*, 1989; Magnuson *et al.*, 1989). La GLCK exerce une grande influence sur l'utilisation du glucose et la synthèse du glycogène. Il a été montré, en utilisant des modèles de souris transgéniques, que même des changements minimes d'expression de cette enzyme provoquent des effets mesurables sur la concentration plasmatique de glucose (Ferre *et al.*, 1996; Hariharan *et al.*, 1997; Niswender

*et al.*, 1997). D'autres études menées sur des hépatocytes en culture primaire ont également permis de montrer qu'une surexpression de la GLCK induit celle de la G6P, ce qui conduit à la fois à une augmentation de la glycolyse et de la synthèse de glycogène (Aiston *et al.*, 1999; Seoane *et al.*, 1996). En accord avec ces données, l'augmentation de l'expression de la GLCK dans les explants traités par le SR141716 suggère un effet « insulin-like » de la molécule qui pourrait se traduire par une stimulation de l'utilisation du glucose. Le fait que les explants soient sujets à un épuisement rapide de leur stock de glycogène (matériel et méthodes section 2.3.) indique que le glucose s'engage préférentiellement dans la voie de la glycolyse plutôt que dans la voie de synthèse du glycogène. La GLCK, en jouant un rôle sur l'utilisation du glucose régule indirectement l'expression de gènes répondant au glucose et de gènes impliqués dans la lipogenèse (Girard *et al.*, 1997). Ceci semble être le cas dans notre modèle en particulier en ce qui concerne la G6P. En effet, la G6P est une enzyme commune à la voie de la néoglucogénèse et à la glycolyse. L'antagonisme des CB1R provoque une augmentation de l'expression de cette enzyme ce qui peut paraître paradoxal avec l'hypothèse d'une activation de la glycolyse. Toutefois ce phénomène inexplicé a déjà été observé dans d'autres études dans lesquelles une utilisation accrue du glucose est associée à une surexpression de la G6P, même en absence d'insuline (Massillon *et al.*, 1996). De plus, l'expression de la G6P est induite dans des cellules FAO surexprimant la GLCK et ceci est corrélé à une forte production de lactate (Argaud *et al.*, 1997). Ainsi ces données suggèrent que l'augmentation des ARNm de la G6P induite par le traitement SR141716 correspond à une stimulation de l'utilisation du glucose via la glycolyse. Enfin, l'augmentation des taux d'expression de SREBP-1c (figure 34) peut être associée à la stimulation de la glycolyse induite par le traitement SR141716. En effet, l'isoforme SREBP-1c est impliqué dans la régulation de l'expression de la glucokinase hépatique comme le démontre des travaux menés sur des cultures d'hépatocytes exprimant une isoforme non fonctionnelle de SREBP-1c endogène, qui indiquent que dans ces conditions, l'induction de l'expression de la glucokinase par l'insuline est abolie (Foretz *et al.*, 1999a). Dans le foie SREBP-1c est également capable de réguler la néoglucogénèse en inhibant l'expression du gène de la PEPCK en réponse à l'insuline (Granner *et al.*, 1983). Ainsi, il a été montré que la surexpression d'une forme mature de SREBP-1c dans des hépatocytes en culture primaire inhibe complètement l'expression de la PEPCK par un mécanisme transcriptionnel (Chakravarty *et al.*, 2001). Dans notre modèle, le traitement par SR141716 n'a curieusement aucun effet sur l'expression de la PEPCK, ceci est

peut-être dû à l'absence d'insuline car le promoteur du gène contient des séquences régulatrices répondant à cette hormone ((McGrane *et al.*, 1992).

#### **4. Mise en évidence d'adaptations métaboliques par oxygraphie.**

D'après les résultats précédemment discutés, l'antagonisme des CB1R conduit à des régulations moléculaires et enzymatiques dans les explants de foie pouvant correspondre à une adaptation du métabolisme énergétique des hépatocytes. Afin de déterminer si le blocage des CB1R peut favoriser l'utilisation préférentielle de glucose ou d'AG, nous avons mesuré la consommation d'O<sub>2</sub> des explants par oxygraphie. Cette approche est basée sur le fait que le catabolisme du glucose utilise moins d'O<sub>2</sub> que celui des AG. Chaque substrat utilisé est plus ou moins riche en O<sub>2</sub>, par conséquent, la quantité d'oxygène nécessaire pour assurer leur combustion est donc d'autant plus importante que le substrat est pauvre en oxygène. Ainsi, l'oxydation d'une molécule d'AG nécessite plus d'O<sub>2</sub> que la dégradation d'une molécule de glucose. En effet, contrairement aux AG, les glucides apportent l'oxygène suffisant pour la combustion de l'hydrogène. Il reste donc à fournir l'oxygène nécessaire à la seule combustion du carbone. Tout l'oxygène est alors retrouvé sous forme de CO<sub>2</sub>. De ce fait, il existe un rapport entre les volumes de CO<sub>2</sub> rejetés et ceux d'O<sub>2</sub> utilisés (RQ, respiratory quotient of Pflüger CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>). La valeur de ce rapport est généralement inférieure à l'unité (0,82) mais elle varie suivant le type de substrats impliqués dans le métabolisme. Dans tous les cas où les glucides sont préférentiellement utilisés, on assiste à une diminution de la consommation d'oxygène avec pour conséquence une élévation du quotient respiratoire (Malmejac, 1962).

La consommation d'O<sub>2</sub> est mesurée pendant quelques minutes dans un milieu de base sans substrat après que les explants aient été conditionnés soit dans un milieu classique soit dans un milieu favorisant l'utilisation du glucose soit dans un milieu favorisant l'utilisation des AG (voir matériel et méthodes section 8). Les résultats montrent qu'un traitement par l'antagoniste CB1R entraîne une diminution marquée de la consommation d'oxygène par les explants pré-incubés dans un milieu classique (figure 28 colonnes noires). Ce phénomène suggère que le métabolisme des hépatocytes traités par le SR141716 s'oriente préférentiellement vers le catabolisme du glucose. Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus avec des explants Témoins et SR141716 pré-incubés dans un milieu favorable à l'utilisation du glucose (colonnes bleues) qui indiquent des valeurs de consommation d'O<sub>2</sub> équivalentes à celles obtenues avec les explants traités par l'antagoniste CB1R dans le milieu classique.

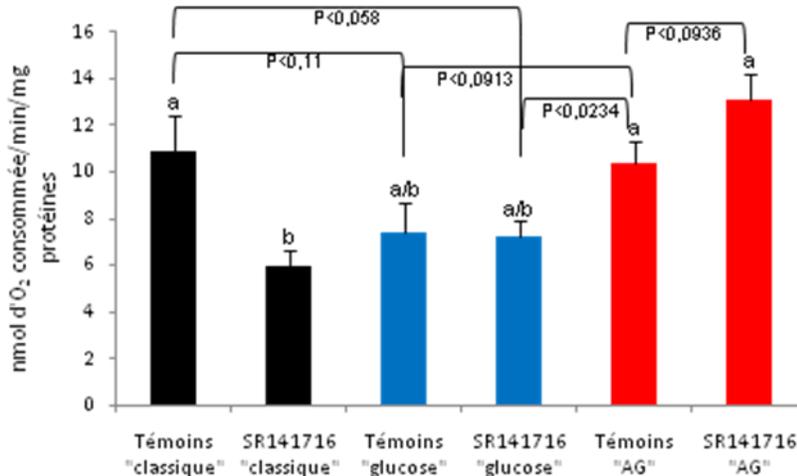


Figure 28 : Mesure de la consommation en oxygène des explants de foie traités ou non par SR141716 (100nM) en fonction des substrats par oxygraphie. Les explants ont été incubés 21h à 37°C puis la consommation d'O<sub>2</sub> de chaque explant a été mesurée dans 1 mL de PBS pendant 5 minutes. En noir, les explants ont été incubés dans un milieu WME (SVF 10%, antibiotiques 1%) pendant 21h. En bleu, la dernière heure d'incubation a été effectuée dans du WME contenant 5µg/mL d'insuline et 100 µM de malonyl-CoA afin de favoriser l'utilisation du glucose. En rouge, la dernière heure d'incubation a été effectuée dans du milieu DMEM (D5030) dépourvu en sucre et supplémenté avec de l'acide palmitique 50µM, de l'AICAR 100 µM et du glucagon 200 ng/L. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05.

Inversement, lorsque le catabolisme des AG est favorisé (colonnes rouges) la consommation des explants Témoins et traités par l'antagoniste CB1R n'est pas significativement différente de celle des explants Témoins pré-incubés dans un milieu classique. L'ensemble de ces données suggère que l'antagoniste CB1R est capable d'aiguiller le métabolisme énergétique des explants utilisant majoritairement les AG comme substrats vers l'utilisation du glucose. Il est également intéressant de noter que, lorsque l'utilisation du glucose est inhibée, l'antagonisme des CB1R a tendance à stimuler le catabolisme des AG (p < 0,0936).

Par cette approche, nous avons cherché à savoir si le blocage des CB1R pouvait avoir un effet sur le choix de l'utilisation du glucose ou des AG comme substrat énergétique préférentiel par les hépatocytes. Dans notre modèle, il apparaît que l'antagonisme des CB1R favorise l'utilisation préférentielle de glucose lorsque les explants sont incubés dans un milieu classique. Ce résultat est à rapprocher des données moléculaires suggérant une activation de la glycolyse dans les explants traités par le SR141716. D'autre part, lorsque le métabolisme des hépatocytes est expérimentalement orienté vers l'utilisation des AG comme substrats énergétiques, le traitement par l'antagoniste CB1R semble stimuler le catabolisme. Ce résultat est en accord avec l'augmentation des capacités β-oxydatives démontrées dans des conditions similaires. Au final,

une augmentation de l'utilisation des graisses est un événement favorable pouvant être associé à la résorption de la stéatose observée *in vivo* (Gary-Bobo *et al.*, 2007; Jourdan *et al.*, 2010).

## 5. Conclusion

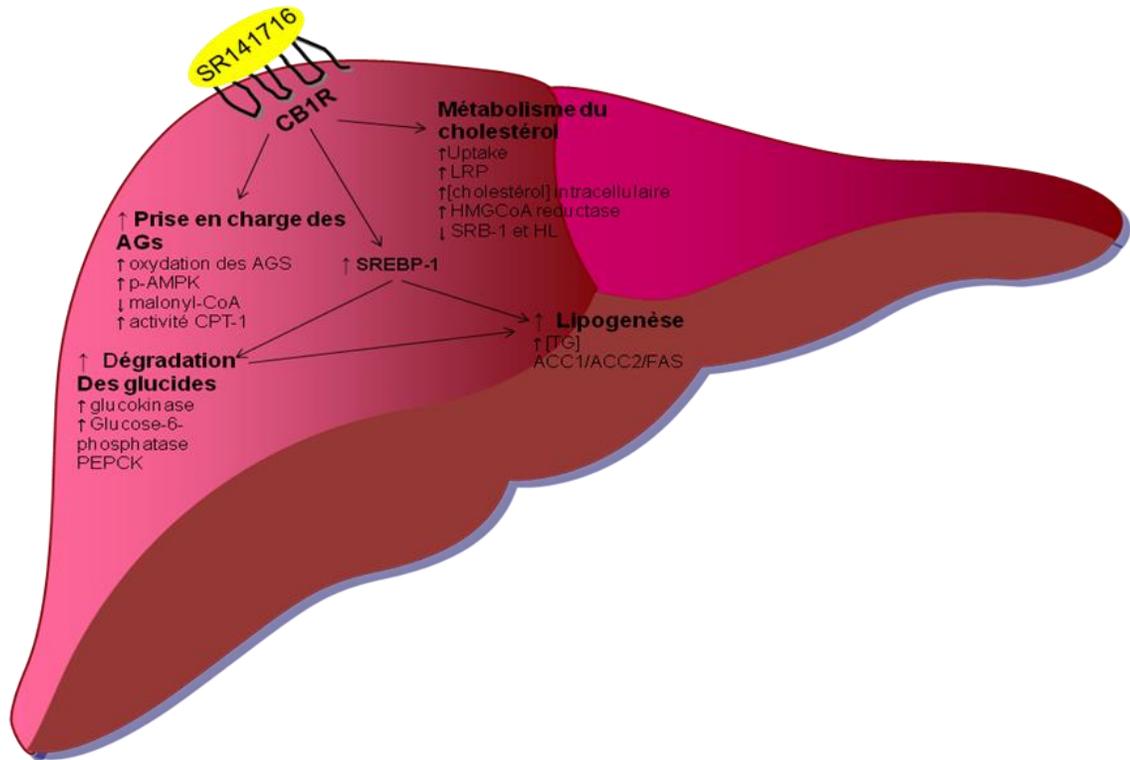


Figure 29 : Schéma de synthèse des différents effets résultants du blocage des CB1R hépatiques.

En conclusion, ces résultats démontrent que l'antagonisme des CB1R hépatiques par le SR141716 est capable d'induire d'importantes régulations du métabolisme énergétique dans le foie. En effet, l'action antagoniste/agoniste inverse de SR141716 peut, dans certaines conditions, entraîner une stimulation de la prise en charge et du catabolisme des AG pouvant se révéler favorable à la résorption de la stéatose. Cependant, il semble que dans d'autres conditions, cette molécule puisse stimuler l'augmentation du catabolisme du glucose ainsi que la synthèse de nouveaux AG provoquant une accumulation de TG. Il apparaît également que le blocage pharmacologique des CB1R entraîne une profonde régulation du métabolisme du cholestérol hépatique. Il est toutefois difficile de statuer sur la part des effets bénéfiques (augmentation de l'oxydation des AG) et des effets néfastes (stimulation de la glycolyse et de la lipogenèse) qu'exerce le traitement *in vivo*. Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces données constitue un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse annonçant que le SEC périphérique pourrait

modifier l'équilibre énergétique et devenir une véritable cible thérapeutique (Caraceni *et al.*, 2008; De Petrocellis and Di Marzo, 2009; Despres, 2007; Di Marzo and Matias, 2005; Ducobu, 2005; Engeli and Jordan, 2006; Herling *et al.*, 2008; Pagotto *et al.*, 2006).

## **Chapitre III : Approche *in vitro* : Impact de l'antagonisme des CB1R sur le métabolisme des lipides et des glucides dans des explants de TA viscéral et sous-cutané.**

(Résultats n'ayant pas fait l'objet d'une publication)

Dans l'étude menée *in vivo*, nous avons démontré que le blocage des CB1R pouvait contrecarrer les altérations géniques induites par un régime HSHF dans le TA viscéral et exercer des effets spécifiques sur le TA sous-cutané. Ces résultats ont permis de suggérer que les effets bénéfiques exercés par le SR141716 sur le TA viscéral de la souris obèse pourraient être en partie responsables de la normalisation des paramètres plasmatiques et de la réversion de la stéatose hépatique. Toutefois, dans cette étude, la part des effets associés à la diminution de la prise alimentaire induite par l'inactivation du SEC central n'a pu être établie. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier les effets directs de l'antagonisme des CB1R sur un modèle d'explants de TA permettant de s'affranchir des effets centraux. Dans cette approche originale nous avons utilisé du TA prélevé sur des animaux obèses hyperinsulinémiques c'est à dire présentant une hyperactivation du SEC dans le TA. Puisque le TA viscéral et le TA sous-cutané ont répondu différemment au régime HSHF et à l'inactivation du SEC dans l'étude réalisée *in vivo*, nous avons pris soin de faire la distinction entre ces deux tissus. A partir de ce modèle, nous étudierons les paramètres concernant la lipolyse, le captage des lipides, l'inflammation, la taille des cellules et la production d'adipokines dans le TA viscéral et sous-cutané. Nous nous intéresserons également à d'éventuelles régulations géniques induites par l'antagonisme des CB1R.

### **1. Mise au point du modèle**

La première partie de cette étude a consisté à mettre au point le modèle d'explants de TA en culture, permettant de conserver l'organisation tissulaire et la structure des cellules intactes. La technique et les méthodes utilisées sont développées dans la section 3 de la partie « matériel et méthodes ». Afin de vérifier si les explants de TA restent viables après 21h de culture, nous avons réalisé des tests de viabilité à base de MTT. Ce test est basé sur l'activité de la succinate deshydrogénase (complexe II de la chaîne respiratoire) et permet de rendre compte de l'activité mitochondriale assimilable à une mesure de la vitalité cellulaire. Le réactif utilisé est un sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en cristaux insolubles de formazan de couleur bleue-violacée. L'intensité de

cette coloration est non seulement proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais également à leur activité métabolique. Après plusieurs essais, il s'est avéré que les conditions de cultures les plus favorables consistaient en une incubation de 21h en plaques 6 puits contenant environ 300 mg de tissu pour 5 mL de milieu DMEM-HAM/F12 supplémenté en BSA (1%), acide ascorbique (100  $\mu$ M) et en cocktail d'antibiotiques-antifongiques (1%). En effet, dans ces conditions, les tests réalisés donnent une survie cellulaire d'environ 76% après 21 heures d'incubation (figure 30).

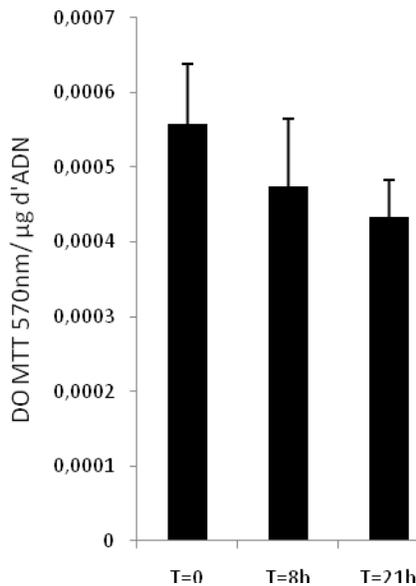


Figure 30 : Mesure de la viabilité cellulaire des explants de TA via un test MTT. Après incubation, les explants sont rincés avec du PBS puis incubés dans 500 $\mu$ L de MTT à 2mg/mL pendant 2h à 37°C. Les explants sont ensuite rincés et incubés 20 minutes à température ambiante sous agitation. Ensuite, les explants sont rincés et soumis à une extraction d'ADN et le DMSO coloré est dilué au 1/10 puis sa densité optique est mesurée à 570nm. Les valeurs sont ensuite ramenées au  $\mu$ g d'ADN.

Pour la suite de cette étude, nous avons donc choisi de travailler dans 2 conditions différentes.

- Condition 1 : juste après prélèvement, des mesures de lipolyse ont été réalisées sur les explants afin de déterminer l'existence ou non d'interactions ne nécessitant pas de régulation génique entre les voies de signalisation de la lipolyse et celles du SEC.
- Condition 2 : après 21h d'incubation en présence d'AEA et/ou de SR141716 afin de déterminer si le blocage des CB1R adipeux induit des régulations à long terme pouvant faire intervenir des modifications géniques.

Pour chaque condition, nous avons tenté deux approches. La première a consisté à mesurer le glycérol libéré dans le milieu de culture dans des conditions de lipolyse basale et la deuxième a consisté en une mesure du glycérol libéré suite à une stimulation de la lipolyse avec de

l'isoprotérénol (agoniste de la famille des récepteurs  $\beta$  adrénergiques). A chaque fois, les TA prélevés chez des souris saines ont été comparés à ceux prélevés chez des souris rendues obèses par un régime HSHF en sachant que les animaux présentent un jeûne de 6 heures lors du sacrifice.

## **2. Effets sur la lipolyse**

La mobilisation des réserves lipidiques, stockées sous forme de TG dans le TA, relève de l'activation de la lipolyse dans l'adipocyte. Cette voie métabolique est une voie clé dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. La voie de l'AMPc et la LHS jouent un rôle très important dans le contrôle de la lipolyse. En effet, les caractéristiques structurales de la LHS, enzyme limitante du processus lipolytique, les partenaires protéiques intervenant dans le complexe lipolytique et les mécanismes d'activation de l'enzyme sont maintenant bien définis (Figure 30). L'activation de la LHS est essentiellement sous le contrôle de l'AMPc et de la PKA qui phosphoryle cette enzyme. Son activation conduit à l'hydrolyse des TG et des diglycérides de l'adipocyte. L'hydrolyse terminale des monoglycérides est assurée par une lipase spécifique, enzyme abondante et non régulée par les hormones, dont l'activation conduit à la libération par l'adipocyte d'AGL et de glycérol.

Les données de la littérature et nos résultats *in vivo* indiquent qu'en situation pathologique d'obésité, la suractivation du SEC est associée à une hypo adiponectinémie et à une insulino-résistance. Au contraire, le blocage des CB1R avec SR141716 entraîne une augmentation des taux circulants d'adiponectine et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Dans le tissu adipeux, il est envisageable que l'antagoniste CB1R exerce un effet sur la voie de signalisation de l'insuline permettant à cette hormone de recouvrer son rôle d'inhibiteur de la lipolyse. Toutefois, il n'est pas exclu que les voies de signalisation du SEC intra-adipocytaire puissent interagir avec les voies contrôlant la lipolyse tels que l'inhibition de l'adénylate cyclase, une stimulation de la PKB lorsque les CB1R sont couplés à une protéine  $G_i$  ou encore la stimulation de l'adénylate cyclase lorsque les CB1R sont couplés à une protéine  $G_s$ . Le tout aboutissant respectivement à une inhibition ou une stimulation de la phosphorylation de la LHS et donc de l'activité lipolytique. Au regard de ces différentes voies et interactions possibles, il nous est apparu indispensable de rechercher un éventuel effet du SEC sur la lipolyse.

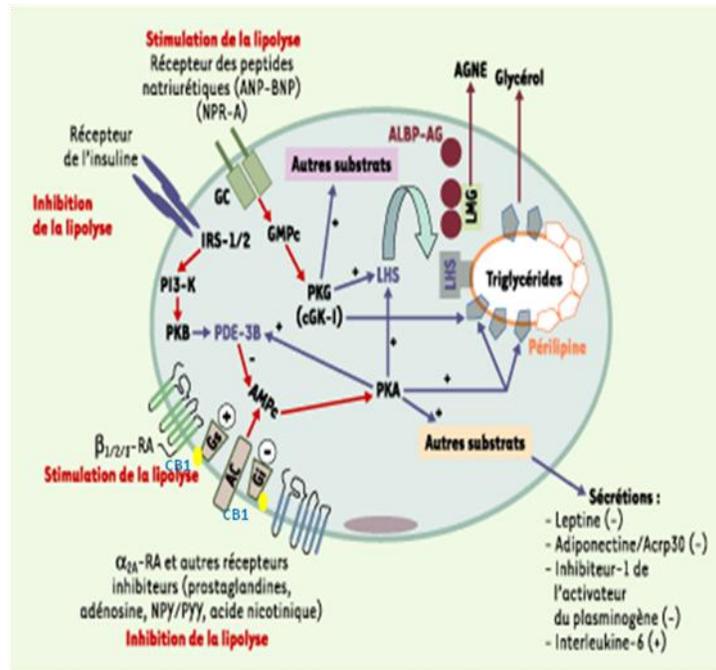


Figure 31. Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain (d'après (Sengenès *et al.*, 2005)). Les récepteurs β- et α<sub>2A</sub>-adrénergiques (RA) sont couplés positivement ou négativement à l'adénylyl cyclase et à la production d'AMPc par des protéines G hétérotrimériques (Gs et Gi). La stimulation des récepteurs β<sub>1/2</sub>- ou α<sub>2A</sub>-adrénergiques active les protéines Gs ou Gi, respectivement. L'AMPc produit par l'activation de l'adénylyl cyclase active la PKA qui stimule la phosphorylation des périlipines et de la LHS. La PKA phosphoryle également diverses autres protéines-cibles de l'adipocyte (non représentées dans le schéma). Les éléments (récepteur à l'insuline, IRS-1/2, PI3-kinase et PKB/Akt) impliqués dans la transduction du signal insulinaire et l'activation de la phosphodiesterase de type 3B, qui hydrolyse l'AMPc, sont représentés. Cette voie exerce des effets modulateurs puissants sur la lipolyse adrénergique. Les peptides natriurétiques stimulent l'activité guanylyl cyclase du récepteur NPR-A des peptides natriurétiques, induisent une augmentation des taux de GMPc, l'activation d'une protéine kinase G (PKG, cGK-I) puis la phosphorylation et l'activation de la périlipine et de la LHS. La LHS activée hydrolyse les tri- et les diglycérides. Les monoglycérides sont hydrolysés par une lipase des monoglycérides (LMG). L'activité lipolytique de l'adipocyte humain est sous le contrôle permanent des voies pro-lipolytiques (β-adrénergiques, peptides natriurétiques) et antilipolytiques (insuline, α<sub>2</sub>-adrénergiques, adénosine, prostaglandines, neuropeptide Y et peptide YY). Le système nerveux sympathique contrôle également (positivement ou négativement) la production de protéines sécrétées par l'adipocyte (telles que la leptine, l'adiponectine, l'IL-6 ou l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène). ALBP-AG représente la protéine de liaison des AG qui influence l'exportation des AGNE vers le compartiment extracellulaire. Les flèches de couleur bleue indiquent les effets apparaissant au-delà de l'activation des kinases. + : stimulation ; - : inhibition.

Nous avons mesuré la lipolyse basale et la lipolyse stimulée avec de l'isoprotrénol en présence de l'agoniste CB1R AEA et/ou de l'antagoniste SR141716 afin de stimuler le SEC d'une part et de mimer une situation thérapeutique en mettant en compétition l'agoniste et l'antagoniste des CB1R d'autre part.

Les résultats de la première approche sont présentés figure 32. Dans nos conditions, il apparaît que dans le TA viscéral, la lipolyse basale est plus forte chez les animaux témoins que chez les animaux HSHF quel que soit le traitement appliqué aux explants. En revanche, en ce qui

concerne le tissu adipeux sous cutané, aucune différence entre les lots n'est observée. Lorsque l'on ajoute de l'isoprotérénol dans le milieu, on n'obtient curieusement aucune stimulation de la lipolyse pour les explants issus de souris saines. En revanche, lorsque ce produit est ajouté au milieu contenant les explants provenant des souris obèses, on obtient des taux de glycérol libre nettement plus importants que lors de la mesure de l'activité basale. Il est à noter que la stimulation de la lipolyse dans les explants de TA viscéral est significativement moins importante lorsque l'AEA et SR141716 sont en compétition (-15%) tandis qu'aucune différence n'est visible entre les deux traitements pour le TA sous cutané.

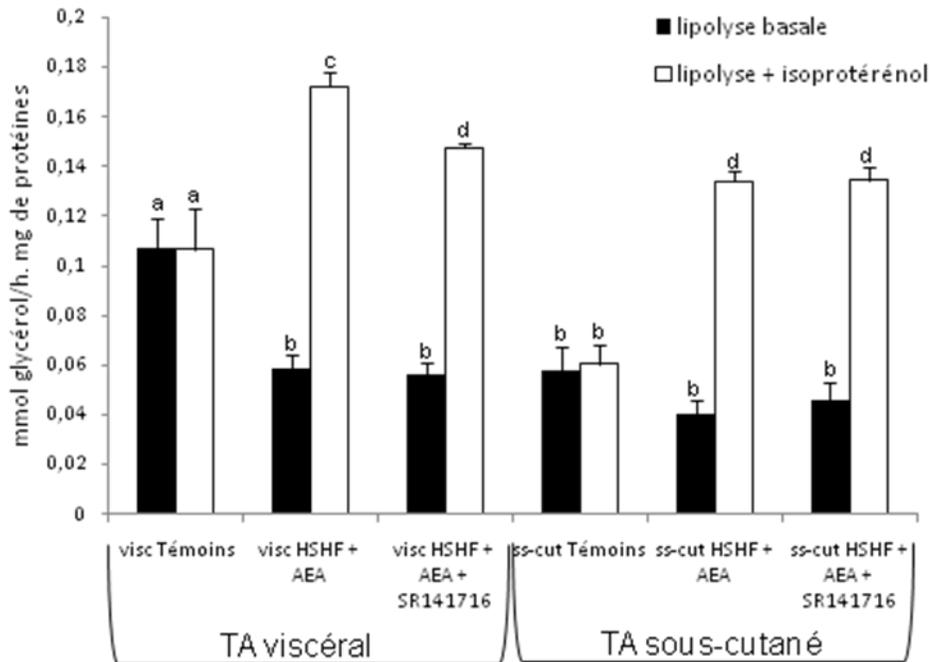


Figure 32: Mesure de l'activité lipolytique basale et stimulée (+ isoprotérénol) des explants de TA viscéral et sous-cutané après prélèvement (n=6). Aussitôt après prélèvement, les explants sont mis en présence d'AEA (5µM) ou d'un mélange AEA (5µM)/SR141716 (1µM). La lipolyse basale est alors estimée à travers la quantité de glycérol libre secrété par les explants dans le milieu pendant 90 min. Les explants sont ensuite rincés puis à nouveau incubés 90min avec les mêmes traitements dans un milieu contenant de l'isoprotérénol (10µM) afin de stimuler la lipolyse.

Le fait que la lipolyse basale soit plus faible pour les explants provenant de souris obèses paraît surprenant. Toutefois, il est déjà été montré dans des astrocytes que l'AEA est capable d'induire une diminution des quantités d'AMPC en culture (Sagan *et al.*, 1999) via l'activation de protéines G couplées à des récepteurs autres que les CB1R. Il n'est donc pas exclu que l'AEA puisse exercer un effet similaire dans d'autres types cellulaires comme les adipocytes, et entraîner ainsi une baisse de l'activité LHS. En revanche, l'action de l'antagoniste CB1R sur la lipolyse stimulée

par l'isoprotérénol apparaît comme un résultat majeur puisque cet événement, s'il est applicable *in vivo* à la graisse viscérale de l'organisme entier, pourrait être à l'origine d'une réduction significative de la production d'AGL par les adipocytes et expliquer en partie la diminution des concentrations plasmatiques observée chez les souris traitées par le SR141716.

### **3. Effets de la stimulation ou du blocage des CB1R adipocytaires sur l'expression génique.**

Les résultats sont présentés figures 33 et 34. Dans des conditions d'hyperactivation du SEC (tissu prélevé sur des souris obèses + présence d'AEA), les explants de TA viscéral présentent une surexpression du CB1R par rapport aux témoins (tissu prélevé sur des souris saines) qui est partiellement réprimée en présence de SR141716. Au contraire, les quantités de transcrits sont similaires dans les explants de TA sous-cutané quel que soit le traitement. La surexpression des CB1R, si elle se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs, est donc bien en accord avec l'hypothèse selon laquelle notre modèle d'explants présente une suractivation du SEC également favorisée par la présence de l'agoniste AEA. A l'inverse, le SR141716 qui conduit à une diminution de l'expression des CB1R semble limiter l'état d'activation du SEC. Le même constat est fait en ce qui concerne l'expression de TNF- $\alpha$  qui a été stimulée dans les explants de TA viscéral et fortement réprimée par l'action de l'antagoniste CB1R alors qu'aucune modification n'est constatée pour les explants de TA sous cutané. Ces données corroborent celles obtenues dans l'étude *in vivo* qui suggéraient déjà une relation étroite entre l'activation des CB1R et l'état inflammatoire des adipocytes. Ce modèle permet en plus de mettre en évidence un effet direct de l'antagoniste CB1R sur l'expression de TNF- $\alpha$ . Il apparaît également que ces effets sont peu significatifs dans le TA sous-cutané.

Compte tenu des résultats intéressants obtenus lors des mesures d'activité lipolytique, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression de la LHS. Il est à noter que les taux d'ARNm LHS sont nettement plus faibles dans les explants de TA viscéral des souris HSHF+AEA que dans celui des souris témoins. Ce résultat est à rapprocher de la faible lipolyse basale obtenue avec les explants de TA viscéral HSHF+AEA (figure 30). Concernant le TA sous cutané pour lequel la lipolyse basale n'était pas altérée par le traitement, l'expression de la LHS n'est pas non plus modifiée dans les conditions d'hyperactivation du SEC.

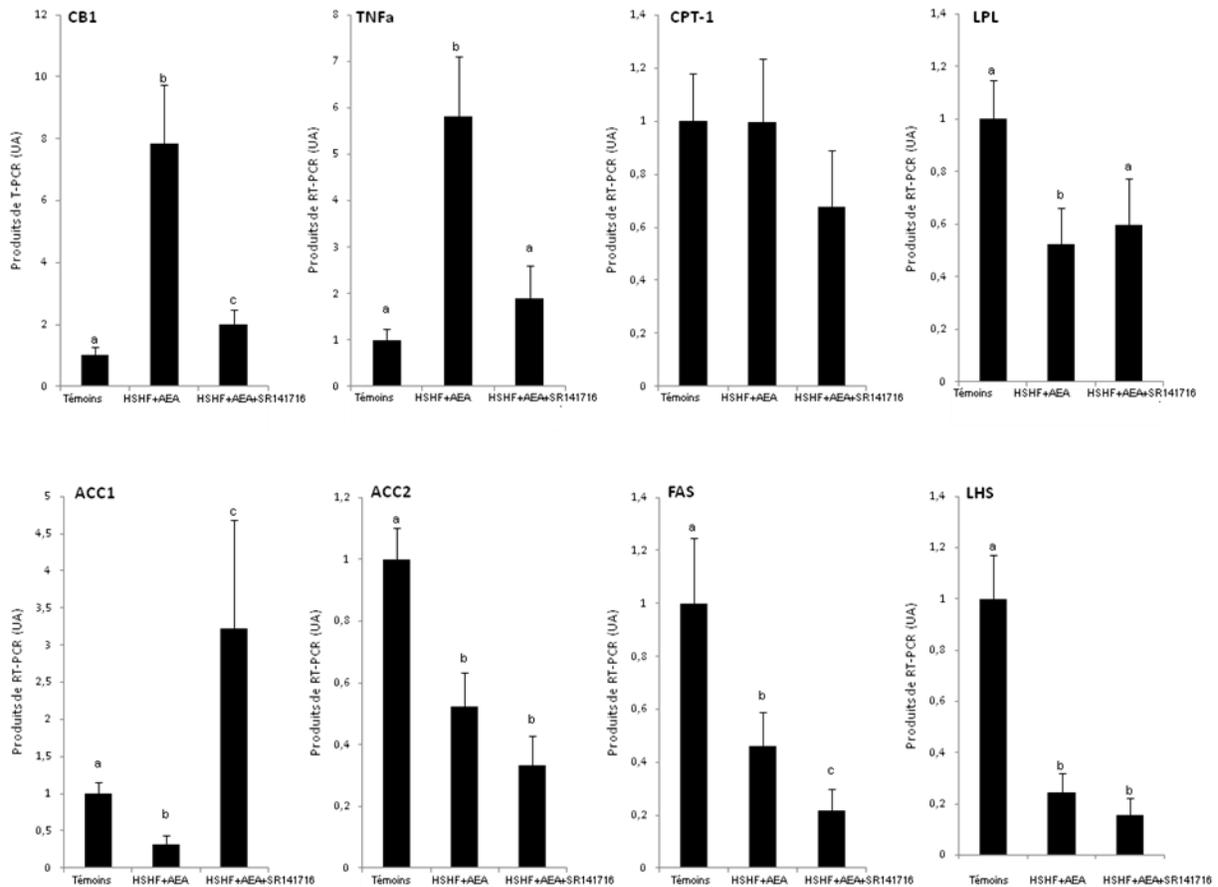


Figure 33 : Effets d'un traitement par agoniste (AEA, 5 $\mu$ M) et/ou antagoniste CB1R (SR141716, 1 $\mu$ M) sur l'expression des ARNm de CB1 et de différents gènes impliqués dans le métabolisme adipocytaire au niveau viscéral. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05. CB1, récepteur cannabinoïde 1, TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; CPT-I, carnitine palmitoyltransférase I; LPL, lipoprotéine lipase; ACC, acétyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; HSL, lipase hormono-sensible.

En revanche, quel que soit le TA, l'expression de la LHS et l'activité lipolytique mesurée à la suite du traitement SR141716 ne sont pas corrélées. En effet, dans les explants de TA viscéral, l'expression LHS n'est pas modifiée alors que la lipolyse est réduite et à l'inverse les ARNm LHS sont fortement réduits dans le TA sous-cutané sans modification de la lipolyse. Ceci suggère que les régulations induites par l'antagonisme des CB1R font intervenir des voies de signalisation agissant par exemple sur la production d'AMPc plutôt que des modifications d'expression génique. Au cours de cette expérience, nous avons également analysé l'expression de gènes non directement impliqués dans les voies de la lipolyse. Ainsi, concernant la CPT-1, nous observons que l'hyperactivation du SEC ne conduit à aucune modification de son expression dans les

explants de TA viscéraux pendant qu'une tendance à la baisse est détectée dans le cas où l'AEA et SR141716 sont en compétition.

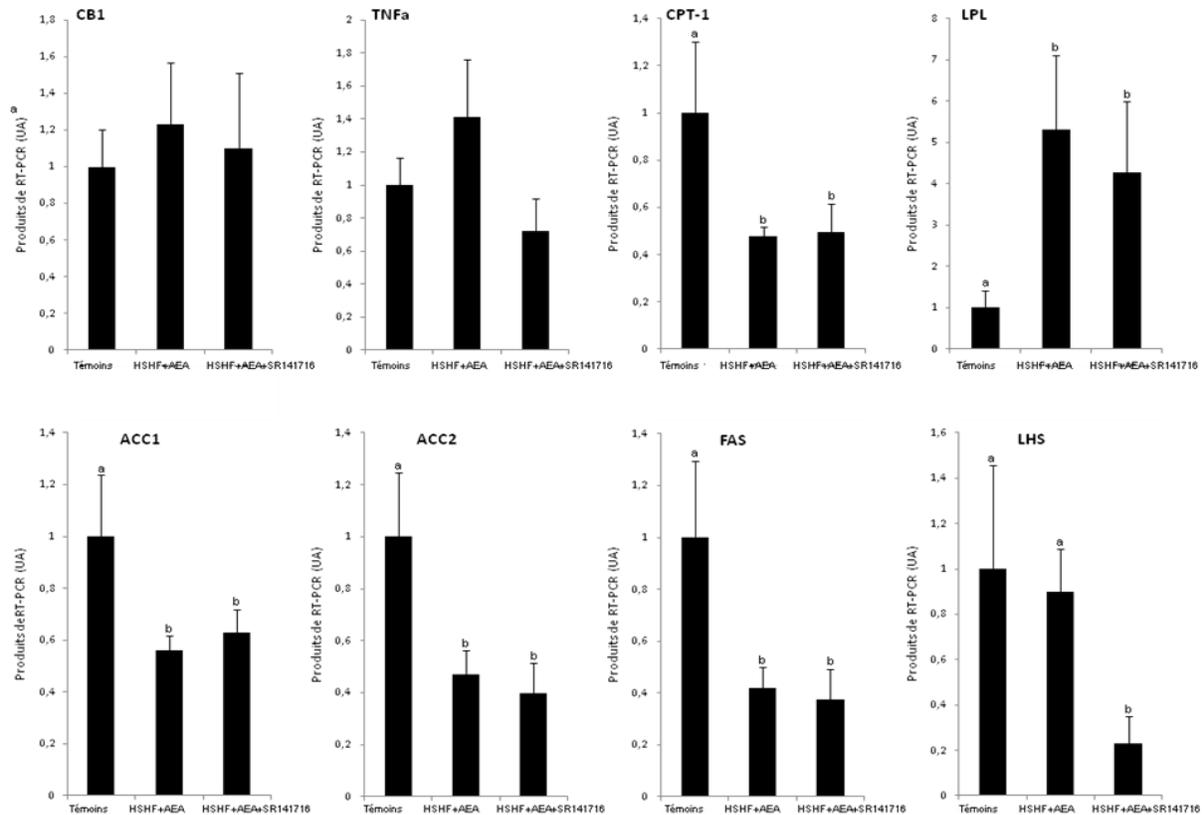


Figure 34: Effets d'un traitement par agoniste (AEA, 5µM) et/ou antagoniste CB1R (SR141716, 1µM) sur l'expression des ARNm de CB1 et de différents gènes impliqués dans le métabolisme adipocytaire au niveau sous-cutané. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5 par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes à p < 0,05. CB1, récepteur cannabinoïde 1, TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α; CPT-I, carnitine palmitoyltransferase I; LPL, lipoprotéine lipase; ACC, acétyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; HSL, lipase hormono-sensible.

Dans les explants de TA sous cutanés, l'expression de CPT-1 est réprimée à la fois par le traitement AEA et AEA+SR141716. En étudiant les gènes de la lipogenèse, on observe une diminution de l'expression d'ACC1, ACC2 et FAS pour les deux TA lorsque les explants de souris obèses sont traités par l'AEA par rapport aux témoins. L'ajout de SR141716 n'a aucun effet excepté pour l'ACC1 dont l'expression est augmentée dans les explants de TA viscéral. Enfin, il apparaît que les deux TA réagissent de manière opposée quant à la régulation de la LPL puisque que l'agoniste CB1R AEA induit une diminution du taux de transcrits LPL dans le TA viscéral tandis qu'il entraîne une augmentation de l'expression du gène codant pour la LPL dans le TA sous cutané. Ces effets ne sont pas modifiés par l'ajout de SR141716. Ces données *in vitro*

relatives à l'expression génique sont difficiles à rapprocher de celles obtenues *in vivo* du fait des conditions expérimentales particulières conçues pour mettre en évidence l'effet de l'antagoniste SR141716 sur des explants présentant une hyperactivation du SEC (souris obèses + AEA). Quoiqu'il en soit, dans ces conditions, en plus de démontrer l'existence d'effets directs du SR141716 sur le TA, les résultats confirment que le TA viscéral et le sous cutané présentent des sensibilités différentes à l'activation et au blocage des CB1R.

#### **4. Perspectives**

L'importance et l'originalité de ce projet réside dans le fait que les effets du blocage ciblé des CB1R dans le TA n'ont pas encore été caractérisés. Notre modèle d'explants de tissus prélevés sur des souris rendues obèses par un régime HSHF est particulièrement adapté à l'étude de l'impact de l'antagonisme des CB1R sur les adipocytes et permet même de distinguer le TA viscéral du sous-cutané. Ces résultats préliminaires sont encourageants, cependant il y a encore beaucoup de travail à effectuer avant de pouvoir véritablement comprendre l'impact du SEC au niveau adipeux.

Pour cela, il nous semble nécessaire de continuer les expériences de lipolyse avec une mesure l'expression génique et protéique de la LHS et de la périlipine en parallèle ainsi qu'une mesure de l'éventuelle fluctuation de taux d'AMPC. Il semble également indispensable de s'intéresser aux capacités de captage des lipides via la mesure de l'activité LPL. Si des changements concernant le captage ou la libération d'AG sont décelés dans le TA, il est envisageable qu'ils puissent conduire à des modifications de la taille des adipocytes. Puisqu'il existe une relation entre la taille des adipocytes et leur capacité à sécréter des adipokines telles que l'adiponectine et la leptine, nous envisageons de mesurer la taille des cellules à l'issue des 21h de traitement. Enfin, il apparaît primordial d'étudier la production d'adipokines et le niveau d'inflammation des TA en présence d'antagoniste CB1R. En effet, L'inflammation étant induite dans le TA de la souris obèse et jouant un rôle majeur dans l'installation de l'insulinorésistance, il convient d'évaluer les effets du traitement sur le degré d'inflammation en mesurant l'expression du marqueur TNF- $\alpha$ . Les données obtenues, si elles confirment nos hypothèses proposées lors de la précédente étude menée *in vivo*, devraient encourager le développement d'antagonistes capables de cibler exclusivement les CB1R périphériques, pour le traitement de l'obésité, du diabète et des pathologies associées. Cette stratégie éviterait l'apparition d'effets secondaires de nature neuropsychiatriques dépendants des CB1R centraux.

## **Chapitre IV : Conclusion générale, quel avenir pour les EC?**

Chez l'homme, plusieurs essais cliniques de phase I, II, et certains en phase III ont été réalisés avec des antagonistes CB1R. Dans l'une des plus importantes études sur le Rimonabant, les thématiques ont été divisés en quatre groupes: "Rimonabant in Obesity (RIO)": RIO-Lipids (Despres *et al.*, 2005), RIO-North America (Pi-Sunyer *et al.*, 2006), RIO-Europe (Van Gaal *et al.*, 2005), et RIO-Diabetes (Scheen *et al.*, 2006). L'objectif était d'évaluer le rôle du Rimonabant dans le traitement de l'obésité, le maintien de la perte de poids, la prévention d'une reprise de poids après la perte initiale, et l'amélioration des facteurs de risque d'obésité, tels que le diabète et les dyslipidémies. Ces quatre études ont évalué les effets du médicament sur les facteurs de risque cardio-métabolique chez des patients en surpoids ou obèses. L'une des observations la plus marquante a été que le traitement par SR141716 était accompagné d'une diminution de la prise alimentaire transitoire ainsi que d'une perte de poids continue (Jbilo *et al.*, 2005; Pi-Sunyer *et al.*, 2006; Ravinet Trillou *et al.*, 2003; Van Gaal *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que ce phénomène est également retrouvé chez des souris obèses pour lesquelles SR141716 n'entraîne une diminution de la prise alimentaire que durant la première semaine de traitement. Cependant, la perte de poids se prolonge pendant les 5 semaines restantes malgré une normalisation de la prise alimentaire (Jbilo *et al.*, 2005; Ravinet Trillou *et al.*, 2003). Cette hypophagie transitoire ne peut expliquer complètement la perte de poids prolongée induite par la molécule (Matias and Di Marzo, 2007; Pagotto *et al.*, 2006) ce qui suggère que le SEC est associé à des régulations métaboliques indépendantes de la prise alimentaire. Ces effets métaboliques peuvent donc être la conséquence de l'antagonisme des récepteurs aux EC périphériques (Engeli and Jordan, 2006).

Dans ce sens, ces travaux de thèse mettent en évidence l'importance du SEC périphérique dans la modulation du métabolisme glucido-lipidique. Ils apportent entre autres, des informations nouvelles sur les mécanismes impliqués dans la réversion de la stéatose hépatique lors d'un traitement par un antagoniste CB1R (figure 35). Dans le modèle de souris HSHF utilisé au cours de cette étude, la stéatose hépatique est principalement due à la résistance du tissu adipeux viscéral à l'insuline favorisant ainsi la libération et le flux d'AGL vers le foie. Inversement, le traitement par l'antagoniste CB1R, SR141716, semble exercer des effets bénéfiques sur le métabolisme adipocytaire conduisant à une diminution des taux plasmatiques d'AGL, une stimulation de la synthèse d'adiponectine par le TA sous-cutané et une normalisation des taux plasmatiques de cette hormone.

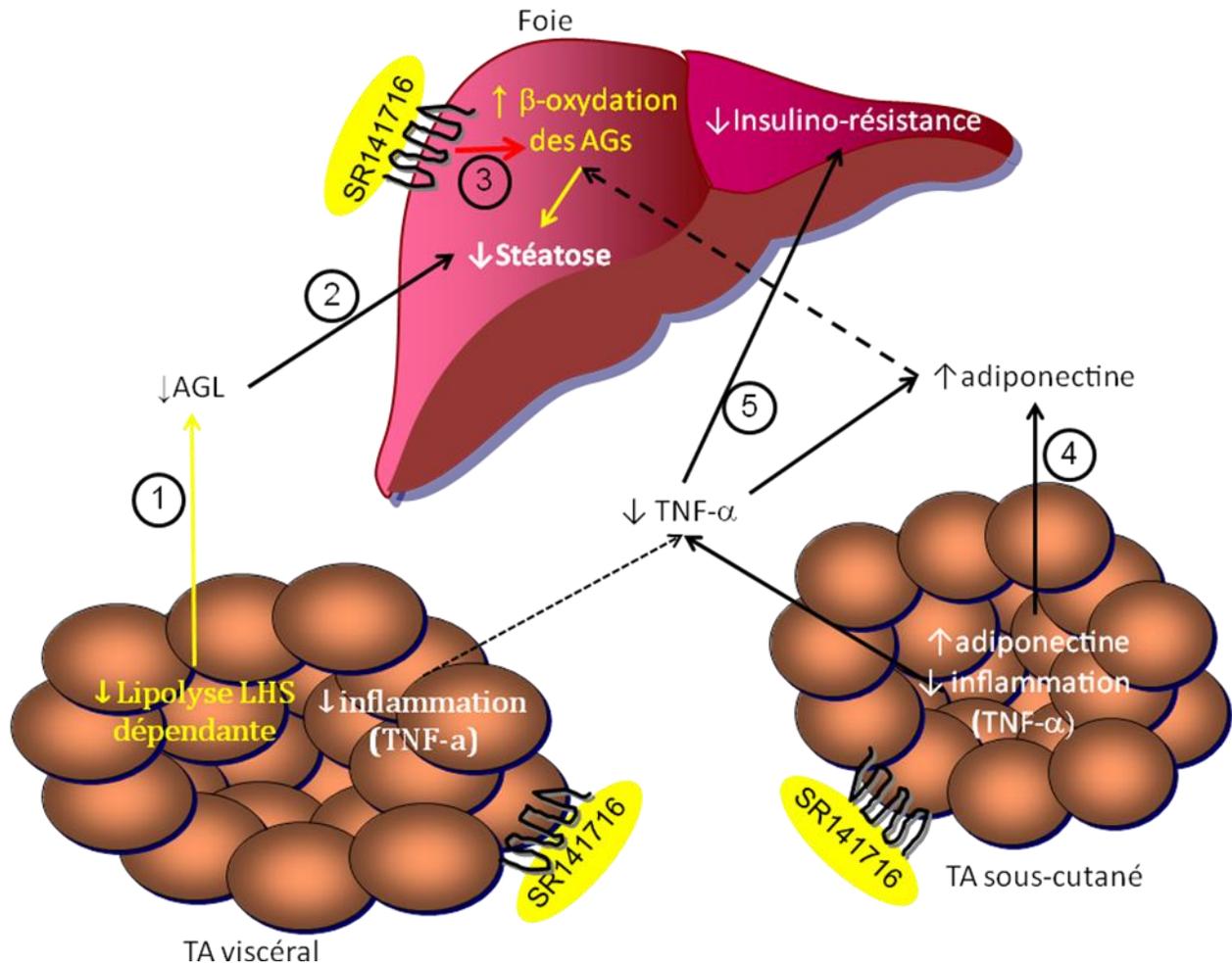


Figure 35: Schéma récapitulatif des améliorations métaboliques pouvant expliquer la réversion de la stéatose lors d'un traitement par SR141716 chez la souris obèse. SR141716 semble exercer des effets bénéfiques sur le métabolisme hépatique et adipocytaire conduisant à la réversion de la stéatose. (1) SR141716 semble exercer un effet direct sur la lipolyse du TA viscéral pouvant en partie expliquer la baisse des taux sériques en AGL. (2) Cette diminution des AGL plasmatiques entraîne probablement une baisse de la captation des AGL par le foie et donc un stockage moindre. (3) Dans des conditions où les AG sont la source majeure d'énergie, l'antagonisme des CB1R hépatiques entraîne une augmentation de la dégradation des AGL par β-oxydation mitochondriale. (4) Le traitement par SR141716 est associé à une augmentation des taux d'adiponectine qui semble consécutive à une amélioration de l'état inflammatoire concernant principalement le TA sous-cutané. Cette augmentation de l'adiponectine pourrait également avoir des effets favorables sur le foie en favorisant la β-oxydation des AG. (5) Enfin, la diminution de l'état inflammatoire du TA induite par le traitement SR141716 pourrait conduire à une baisse de la sécrétion de TNF-α et ainsi limiter ses effets néfastes sur l'insulino-résistance hépatique. Tous ces phénomènes permettent en partie d'expliquer comment un traitement par SR141716 permet de reverser une stéatose induite pour un régime obésogène. En jaune, les effets périphériques observés grâce aux approches *in vitro*, en blanc, les effets remarquables observés *in vivo*.

Au final, ces effets qui paraissent corrélés à l'état inflammatoire, s'accompagnent de la normalisation de l'insulinémie et d'une moindre accumulation d'AG dans le foie. Les travaux réalisés *in vitro* permettent en plus de suggérer l'existence d'effets directs du SR141716 sur le

foie et le tissu adipeux impliqués dans les processus de résorption de la stéatose. Ainsi, l'antagonisme des CB1R hépatiques favorisait la dégradation des AG à travers une stimulation de la  $\beta$ -oxydation. De plus, des résultats préliminaires réalisés sur des explants de TA viscéral et sous-cutané traités par SR141716 suggèrent que l'antagonisme des CB1R entraîne une inhibition partielle de la lipolyse dans le TA viscéral. Cette perte d'activité lipolytique pourrait expliquer en partie la diminution des taux plasmatiques d'AGL et limiter ainsi leurs effets cytotoxiques. Il est donc raisonnable de penser que l'antagonisme des CB1R périphériques joue un rôle non négligeable dans la réversion de la stéatose observée lors d'un traitement par SR141716 chez des souris obèses. De plus, un impact direct de l'adiponectine produite par le tissu adipeux sur le métabolisme hépatique peut également être envisagé. Les effets insulino-sensibilisateurs et stimulateurs de l'oxydation des graisses sont bien démontrés dans le muscle et contribuent à l'amélioration de l'insulino-résistance, par contre les effets directs de l'adiponectine sur le foie ne sont pas encore clairement définis et doivent être explorés.

En conclusion, ces travaux de thèse démontrent que les CB1R périphériques peuvent constituer une cible thérapeutique très prometteuse pour le traitement de l'obésité et des désordres associés. Ces données devraient encourager le développement d'antagonistes capables de cibler exclusivement les CB1R périphériques permettant ainsi d'éviter l'apparition de troubles neuropsychiatriques dépendants des CB1R centraux. Cet axe d'étude semble actuellement être pris en compte par la communauté scientifique puisque plusieurs composés candidats à cette fonction ont d'ors et déjà été publiés (figure 36). Cependant, la prudence est de rigueur à en juger par les premières données rapportées. En effet, en fonction du produit pharmacologique utilisé, les résultats apparaissent encourageants ou totalement décevants. Une chose est certaine, toutes ces molécules sont structurellement très proches du Rimonabant (figure 36). Le LH-21 est un dérivé triazole et un antagoniste des récepteurs cannabinoïdes avec un faible taux de pénétration dans le SNC. Lorsqu'il est administré à des rats Zucker, il entraîne une diminution de la prise alimentaire mais il est sans effets sur l'hypertriglycéridémie, l'hypercholestérolémie ou encore sur la masse grasse et le degré de stéatose (Pavon *et al.*, 2006; Pavon *et al.*, 2008). Les résultats obtenus avec ce composé suggèrent donc que l'agonisme inverse et/ou l'antagonisme des CB1R centraux est nécessaire aux améliorations métaboliques observés lors du blocage des CB1R. Une autre molécule, l'URB447 ([4-amino-1-(4-chlorobenzyl)-2-méthyl-5-phényl-1H-pyrrol-3-yl] (phényl) méthanone) est le premier agent pharmacologique décrit présentant à la fois une activité

CB1R antagoniste et CB2R agoniste. Il conduit à une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle chez la souris, sans exercer d'action antagoniste sur les CB1R centraux. L'URB447 pourrait devenir un outil pharmacologique utile afin d'étudier les effets périphériques du système endocannabinoïdien, et pourrait servir de point de départ pour un développement viable sur le plan clinique d'antagonistes CB1R dépourvus d'effets secondaires centraux (LoVerme *et al.*, 2009). La molécule « compound-1 » également dérivée de SR141716 présente, quant à elle, une pénétration à travers la BHE beaucoup plus faible que celle de SR141716. Cependant, son action est 10 fois moins puissante que celle de SR141716. En effet, bien que les concentrations plasmatiques du « compound-1 » soient cinq fois plus élevés que celle de SR141716, son efficacité est 10 fois plus faible que celle de SR141716 puisque la dose efficace pour l'activité anti-obésité de ce composé est supérieure à 30 mg/kg/jour même si une dose de 10mg/kg/jour suffit à normaliser la surexpression de SREBP-1 dans le foie. Finalement, l'étude de ce composé suggère que les modulations du système endocannabinoïdien périphérique ne sont pas les principaux mécanismes des effets anti-obésité des antagonistes des CB1R (Son *et al.*, 2010).

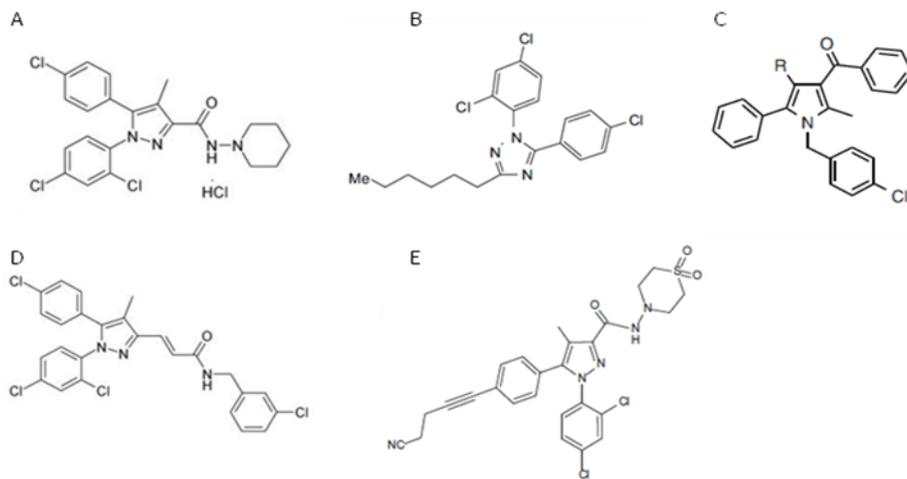


Figure 36: Structures chimiques des différents antagonistes CB1R à action périphérique. A) SR141716 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994), B) LH-21 (Pavon *et al.*, 2006; Pavon *et al.*, 2008), C) URB447 (LoVerme *et al.*, 2009), D) Compound-1 (Son *et al.*, 2010), E) AM6445 (Tam *et al.*, 2010).

Enfin, l'un des candidats les plus sérieux est l'AM6445 qui est un nouvel antagoniste CB1R n'affectant pas les réponses comportementales induites par les effets centraux du système endocannabinoïdien. En revanche, un traitement par AM6445 chez des souris obèses entraîne des améliorations de l'homéostasie glucidique, une réversion de la stéatose et une amélioration du

profil lipidique plasmatique. Ces effets sont dus au blocage des CB1R dans les tissus périphériques, y compris le foie. Cette nouvelle molécule renforce l'idée que le ciblage des CB1R périphérique possède un potentiel thérapeutique important pour la réduction des risques cardio-métaboliques associés à l'obésité (Tam *et al.*, 2010). Les entreprises pharmaceutiques ne sont pas en reste puisqu'en 2008, l'entreprise 7TM Pharma annonçait la sélection et le développement d'un nouveau candidat (TM38837) à l'antagonisme des CB1R (7TMPharma., 2008). Le 4 février 2010, un communiqué de presse de cette même entreprise annonçait la réussite des études cliniques de phase I avec cet antagoniste de deuxième génération (7TMPharma., 2010). Les données concernant cette molécule sont assez pauvres toutefois, 7TM Pharma indique que le TM38837 a été conçu pour contourner les effets secondaires CNS dépendant provoqués par les antagonistes des CB1R de première génération. En ciblant les récepteurs périphériques, le composé a montré un effet puissant sur la perte de poids dans divers modèles animaux d'obésité chronique. Surtout, il a entraîné très peu d'effets défavorables en comparaison à d'autres antagonistes CB1R connus.

En ce qui nous concerne, notre équipe a démarré une collaboration avec l'équipe de Jean-Michel Robert (Service de Pharmacochimie, UPRES EA 1155, Faculté de Pharmacie, Nantes, France) afin de développer une série de composés originaux pouvant déboucher sur la mise au point de nouveaux outils pharmacologiques d'investigation des potentialités des CB1R périphériques. A l'heure actuelle, plusieurs composés sont étudiés et certains semblent prometteurs. Toutefois, l'extrapolation de ces différentes données à l'Homme s'avère complexe du fait des fortes différences génétiques et phénotypiques entre les modèles animaux et l'Homme. Avant de pouvoir véritablement croire en l'utilité et la pertinence de l'antagonisme des CB1R périphériques, il sera nécessaire de réaliser des tests sur des modèles beaucoup plus proche de l'Homme comme des tissus issus de biopsie ou encore l'utilisation de culture cellulaire humaine. Cependant tout cela reste compliqué à mettre en œuvre, aussi bien d'un point de vue matériel que d'un point de vue éthique et il s'avère donc nécessaire de continuer les investigations afin de clairement démontrer l'existence d'effets périphériques en utilisant de nouveaux composés ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique avant que les grands groupes de l'industrie pharmaceutique acceptent de revenir sur ce terrain rendu très glissant suite aux mésaventures du Rimonabant d'autant plus que l'émergence de nouveaux effets attribués aux CB2R pourraient se révéler plus tentants.

# Matériel et méthodes

## **1. Traitement des animaux.**

Les réglementations officielles Françaises relatives à l'utilisation et l'entretien des animaux de laboratoire (n°87848) ont été respectées pendant la période expérimentale et le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique locale concernant l'expérimentation animale (n°BX0622). Nous avons utilisé des souris mâles de souche C57BL/6 âgées de 4 semaines. Durant leur acclimatation à leur nouvel environnement, les animaux sont répartis en cages individuelles et ont libre accès à un régime standard sous forme de bouchons (AO4; UAR, Epinay-sur-Orge, France) contenant 6% de lipides (composition % : caséine 18%, amidon de maïs 46%, saccharose 22%, cellulose 2%, sels minéraux 5%, vitamines 1%, huile de tournesol 5%, huile de lin 1%) ainsi qu'à l'eau de boisson. Après cette période d'une semaine, 2 lots de souris sont constitués, un lot Témoin (n=5) maintenu sous régime standard et un autre lot (n=40) est soumis à un régime alimentaire High Sucrose High Fat à 22,5% de lipides et 40% de glucides (HSHF ; ref. 235HF SAFE; Augy, France) (composition : caséine 20%, amidon de maïs 13%, saccharose 29,3%, cellulose 5%, malto dextrine 2,2%, saindoux 20%, huile de soja 2,5%, Minéral 205B SAFE 7%, Vitamine 200 SAFE 1%). Après 19 semaines de régime, seules les souris HSHF présentant une hyperinsulinémie et un surpoids ont été retenues pour la suite de l'étude. Les souris ainsi sélectionnées toujours maintenues sous régime HSHF reçoivent oralement pendant 6 semaines, soit 10 mg/kg/jour (dose la plus efficace compte tenu de la ½ vie du produit et du métabolisme rapide des souris) de l'antagoniste CB1R spécifique SR141716 (Rimonabant, série HSHF+SR141716; n=14) soit un placebo (série HSHF; n=10). Le SR141716 a été fourni par Sanofi-Aventis (Paris, France). Tout au long de la période de traitement, les animaux ont eu libre accès aux aliments renouvelés quotidiennement ainsi qu'à l'eau de boisson. Les souris ont été privées de nourriture 4 h avant d'être anesthésiées à la kétamine (17 g/L) / xylazine ( 2,2 g/L). Le sang a tout d'abord été recueilli par ponction dans la veine cave puis les organes d'intérêt ont été extraits.

La fiche technique du régime HSHF indique que les matières grasses représentent 22,5% des apports caloriques tandis que les glucides représentent 40% de ces apports (kcal/kg). Nous avons analysé et validé la composition lipidique en AG du régime par chromatographie en phase gazeuse (figure 38).

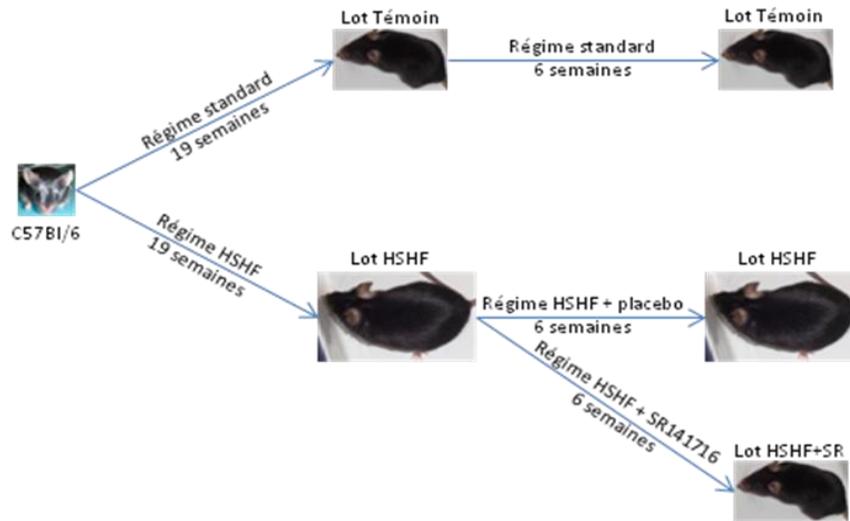


Figure 37 : Protocole schématique du traitement des animaux.

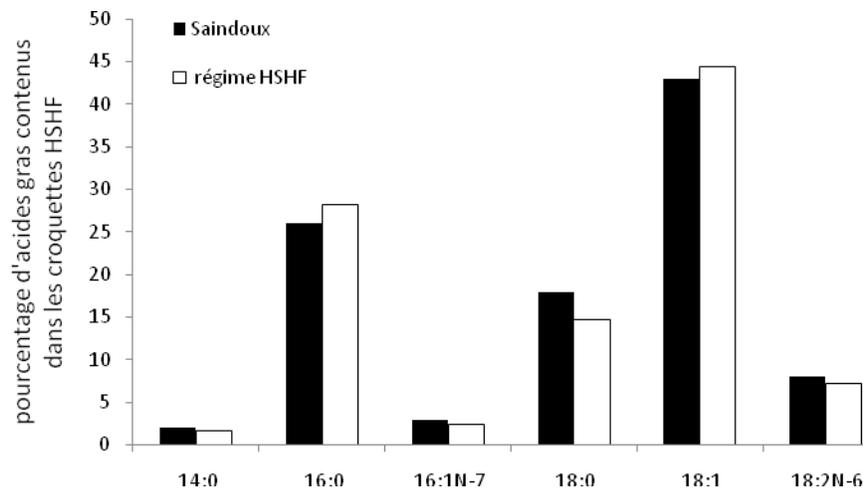


Figure 38 : Composition en AG contenus dans le saindoux et le régime HSHF. Le résultat montre que la composition et la quantité totale d'AG est bien conforme à celle annoncée par le fournisseur.

## 2. Explants de foie

Afin d'étudier les effets du blocage des CB1R sur le métabolisme hépatique, nous avons choisi un modèle d'étude original : les explants de foie en culture. Cette technique développée notamment dans les domaines de la pharmacologie et de la toxicologie pour étudier le métabolisme hépatique des médicaments préserve l'organisation tissulaire et les interactions cellule-matrice et cellule-cellule. Ainsi, l'exploration de l'environnement cellulaire d'un tissu intact isolé permet une compréhension plus juste des effets métaboliques *in vivo*.

## 2.1. Mise au point du protocole expérimental sur des explants de foie

Le protocole expérimental des explants de foie en culture a été adapté aux conditions de notre laboratoire à partir de la méthode décrite par Graulet *et al.* (Graulet *et al.*, 1998). Dans un premier temps, différents tests préliminaires ont été réalisés afin d'établir les conditions optimales à la survie des tissus en culture. Dans ce cadre, plusieurs paramètres tels que le matériel, le prélèvement du foie, le tampon de rinçage, le milieu d'incubation (pH, oxygénation, insuline, ...) et le système d'incubation (boîtes de culture, tubes, durée d'incubation, ...) ont été testés. A l'issue de chaque essai, un test de viabilité des cellules a été effectué en mesurant leur consommation en oxygène via un oxygraphe. L'intégrité des ARN a été également contrôlée afin de valider le protocole expérimental final.

### 2.1.1 Mesure de l'intégrité des ARNs

Après 21 h d'incubation, les ARN totaux sont extraits des explants par la technique du Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) adaptée de la procédure décrite par Chomczynski (Chomczynski and Mackey, 1995). Les ARNs sont alors quantifiés à 260 nm puis dénaturés (solution dénaturante : 500 µl MOPS 10X ; 500 µl formamide 50% ; 60 µl formaldéhyde 37%) à 60° C pendant 15 minutes. Mélangés avec du BET (Bromure d'Ethidium) puis dilués au 1/1000 dans du bleu de bromophénol, 4 µg d'ARNs sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve remplie de MOPS 1X et mise sous tension (120 volts) pendant 45 min. Le gel est révélé par une exposition aux UV (réf : GEL DOC 2000, Biorad. N° de série 75500344).

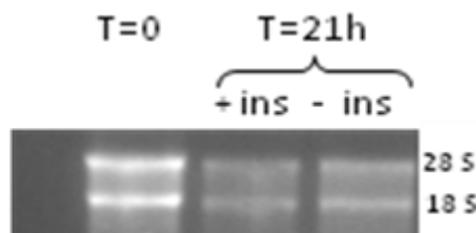


Figure 39 : Mesure de l'intégrité des ARN par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

La figure 39 montre après 21h d'incubation une perte de signal, pouvant suggérer une partielle mort cellulaire ; cependant, il est important de remarquer que les bandes d'ARN 28S et 18S sont encore bien visibles sans stries de dégradation. Le fait que les ARN ne soient pas dégradés nous permet de continuer la mise au point par une mesure de la vitalité cellulaire.

### 2.1.2. Mesure de la respiration cellulaire par oxygraphie

La respiration à partir des substrats intracellulaires est mesurée en utilisant une électrode à oxygène de type Clark (Hansatech instrument, Eurosep instrument) et un milieu de base sans substrat, du PBS. La mesure est effectuée dans une chambre de 1 ml sous agitation magnétique, reliée à un système de circulation d'eau pour maintenir une température stable de 37 °C. L'électrode est reliée à un ordinateur via une interface et les signaux entrants sont détectés et analysés avec le logiciel « Oxygraph Plus V1.01 (Hansatech) ». La consommation d'oxygène est mesurée pendant environ 5 min puis l'activité respiratoire est normalisée par un dosage des protéines. La quantité d'O<sub>2</sub> consommée rend compte de l'activité mitochondriale et par extrapolation de la vitalité cellulaire.

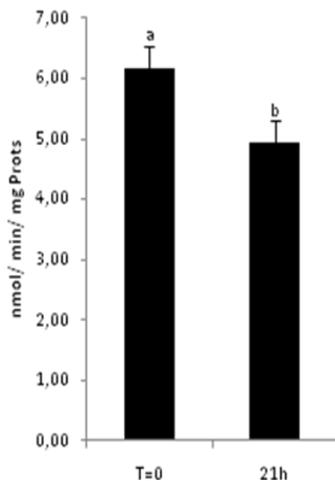


Figure 40 : Mesure de la consommation en oxygène des explants de foie par oxygraphie après prélèvement ou après 21h d'incubation à 37°C.

Il s'avère qu'après 21h d'incubation, la consommation d'oxygène n'est diminuée que d'environ 20% ce qui pourrait traduire une perte de viabilité restant acceptable dans un modèle de culture d'explants.

### 2.2. Préparation des explants de foie et description du dispositif expérimental

Le foie des souris est perfusé *in situ*, sous anesthésie, avec du milieu de Hank's (pH 7,4) saturé en oxygène et maintenu à 4°C afin d'éliminer le sang contenu dans l'organe avant prélèvement. Une fois prélevé, le foie est tranché en utilisant un slicer Brendel/Vitron (Tucson, AZ, USA) dans le même milieu.

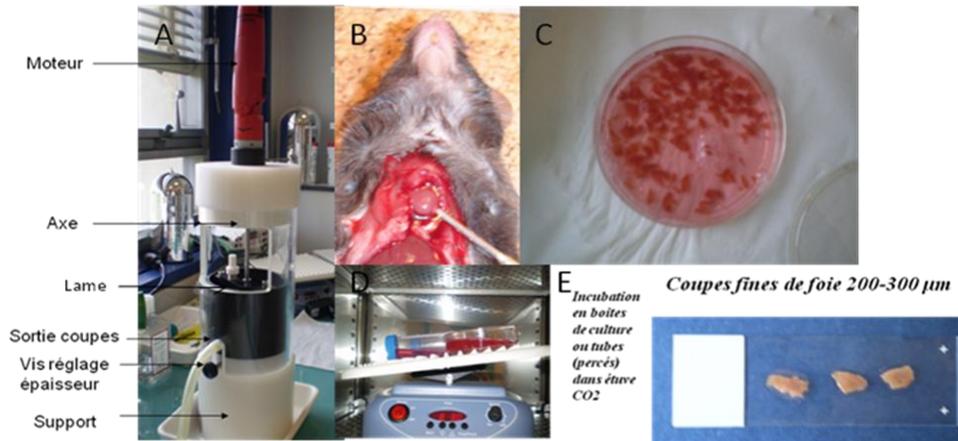


Figure 41 : différentes étapes de préparations des explants de foie. A slicer Brendel/vitron ; B perfusion intracardiaque afin de laver les organes du sang résiduel ; C explants de foie après la pré-incubation de 30 minutes ; D incubation des explants 21h à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> ; E explants de foie après 21h d'incubation.

Les coupes de foie (environ 200 µm) sont ensuite rincées puis pré-incubées 30 min à 37 ° C dans du milieu HBS (cette étape permet aux explants de foie de s'adapter à leur nouvel environnement en recréant un équilibre osmotique et en ajustant leur métabolisme énergétique). Les explants sont ensuite distribués au hasard dans des tubes type Falcon de 15 mL ; percés sur le dessus afin de permettre les échanges gazeux et contenant 10 ml de milieu de William's E (WME) oxygéné et supplémenté en sérum de veau fœtal désactivé (10%) et cocktail d'antibiotiques antifongiques (1%), auquel on ajoute soit l'antagoniste CB1R SR141716 (100 nM) soit un placebo. L'antagoniste CB1R est ajouté dans le milieu après homogénéisation dans du DMSO pur et dilution dans du WME. Dans certaines expériences, des séries d'explants sont traitées par de l'anandamide (AEA, 5µM) préparé dans les mêmes conditions. Les tubes sont ensuite installés horizontalement sur un agitateur à bascule et incubés pendant 21 h à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> sous agitation légère. À la fin de la période d'incubation, les coupes sont réparties pour les différentes expériences décrites par la suite. Les produits chimiques et les milieux utilisés dans cette procédure proviennent de chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

### 2.3. Caractérisation de l'état nutritionnel des explants au cours des 21h d'incubations.

La figure 42 montre que les réserves de glycogène restent stables au cours de la première heure d'incubation puis sont rapidement dégradées entre 1h et 6h d'incubation. Après 21h, les explants n'ont plus de réserves de glycogène et tirent donc leur énergie des nutriments contenus dans le milieu de culture.

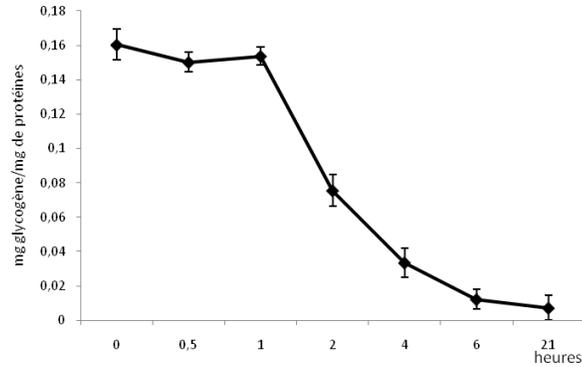


Figure 42 : Cinétique de dégradation du glycogène des explants de foie au cours des 21h d'incubations à 37°C. La quantité de glycogène a été déterminée de la manière décrite en point 9.

### 3. Explants de TA



Figure 43 : Différentes étapes de la préparation des explants de TA. A découpe du TA au scalpel sur glace ; B rinçage et séchage des explants sur papier ; C répartitions des explants dans les plaques 6 puits avant incubation.

Dès le prélèvement, le TA viscéral et le TA sous-cutané sont rapidement découpés sur glace au scalpel en petits morceaux d'environ  $4-5 \text{ mm}^3$ . Ces explants sont pré-incubés 30 minutes à 37°C en milieu de culture (DMEM-HAM/F12 supplémenté en BSA 1% et en acide ascorbique 100 $\mu\text{M}$ ). Les explants sont ensuite rincés avec ce même milieu puis séchés sur papier. Les explants sont alors répartis dans des plaques de culture 6 puits remplis de milieu de culture supplémenté à hauteur de 1% en cocktail d'antibiotiques antifongiques et contenant soit l'antagoniste SR141716 (1  $\mu\text{M}$ ) soit le placebo. L'antagoniste CB1R est ajouté dans le milieu après homogénéisation dans du DMSO et dilué dans du DMEM. Dans certaines expériences, des séries d'explants sont traitées par de l'anandamide (AEA, 5 $\mu\text{M}$ ) préparé dans les mêmes conditions. Les plaques sont incubées 21h à 37°C sous atmosphère saturée en oxygène (95%  $\text{O}_2$  et 5%  $\text{CO}_2$ ) puis les explants sont répartis pour les différentes expériences décrites par la suite.

## 4. Dosages colorimétriques

### 4.1 Dosages plasmatiques

Les paramètres sériques ont été déterminés en utilisant des kits commerciaux : glucose RTU, TG PAP150 et cholestérol RTU de bioMérieux (Marcy l'Etoile, France) pour respectivement le dosage du glucose, des TG et du cholestérol; nonesterified fatty acid C de Wako Pure Chemical Industries (Richmond, VA) pour le dosage des AGL, mouse insulin et adiponectin enzyme-linked immunosorbent assay kits de AbCys (Paris, France) pour le dosage de l'adiponectine et de l'insuline. Les protéines totales quant à elles ont été dosées en utilisant le kit BCA protein assay (Sigma).

### 4.2. Dosages dans les tissus

Pour le dosage des TG et du cholestérol contenus dans le foie, les lipides totaux sont extraits après broyage de 200 mg de foie selon la méthode de Folch *et al.*, (Folch *et al.*, 1957) en présence d'un mélange de chloroforme/méthanol (2/1 v/v). Les lipides totaux extraits sont dilués dans un volume précis de chloroforme et un aliquot est mélangé pour moitié avec du Triton X-100 à 1% dans du chloroforme puis évaporé à sec sous azote et remis en suspension dans un volume d'eau connu. Les TG et le cholestérol sont alors dosés en utilisant les kits commerciaux précédemment cités.

Pour la détermination de la teneur en adiponectine dans le TA, les échantillons sont homogénéisés dans 10 volumes de PBS ; après centrifugation (10 min à 12000g, 4 ° C), les surnageants sont soigneusement collectés à travers la couche de graisse puis dilués au 1/40 000 avec du PBS puis l'adiponectine est dosée à l'aide du kit AbCys.

## 5. Oxydation des acides gras

- Sur explants de foie : Les explants de foie frais sont rincés avec du milieu WME puis et incubés à 37°C dans un milieu DMEM dépourvu de glucose (D5030) et supplémenté en L-carnitine (0,5 mM), en présence de 0,2 mM d'un AG radioactif marqué au carbone 14 sur le carboxyle ([1-<sup>14</sup>C acide palmitique] (55,5 GBq / mol, PerkinElmer) complexé à l'albumine (AG: BSA rapport molaire 2.5/1 ; 0,2 mM). Après 2 h d'incubation, les explants sont récupérés après rinçage avec du PBS froid pour doser les protéines totales et permettre ainsi la normalisation des résultats. Les réactions enzymatiques sont arrêtées par addition de 1,5 mL d'acide perchlorique à 25%. L'acide provoque la libération du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dissous qui est piégé par 0,4 mL d'hydroxyde de hyamine (PerkinElmer) placée dans une louche en verre suspendue au centre du montage. Deux heures

plus tard, la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  formé est estimée par scintigraphie (Tri-Carb 2900 TR) et le milieu ainsi acidifié est filtré à travers une membrane Millipore (pores de  $0,45\mu\text{m}$  de diamètre) sous léger vide. Le comptage de la radioactivité du filtrat contenant les produits issus de la  $\beta$ -oxydation (acétyl-CoA, acétyl-carnitine, intermédiaires du cycle de Krebs et corps cétoniques) permet d'estimer la quantité de molécules d'AG dégradées au-delà du stade acétyl-CoA. La quantité d'AG utilisée pour la  $\beta$ -oxydation est donc déterminée par la mesure de leurs produits de dégradation c'est à dire la somme de la radioactivité portée par le  $\text{CO}_2$  libéré et les produits acido-solubles.

- Sur homogénats de foie : Les explants de foie frais sont rincés puis séchés sur papier absorbant. Après pesée, ils sont dilués au  $1/80^{\text{ème}}$  dans du STE (saccharose 0,25M, EGTA 2 mM et Tris/HCl pH7,4 10 mM) puis homogénéisés à l'aide d'un potter verre-verre. L'oxydation cellulaire totale (oxydation mitochondriale et péroxysomale) s'effectue dans 1 ml de milieu composé de KCL 30 mM, Tris/HCl 75 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, EGTA 0.7 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{NAD}^+$  1mM, ATP 5 mM, CoA 0,1 mM, L-malate 0.5 mM, cytochrome c 25  $\mu\text{M}$ , L-carnitine 0.4 mM, AG 120  $\mu\text{M}$  ([1- $^{14}\text{C}$  acide palmitique] ; 55,5 GBq / mol, PerkinElmer), le tout à pH 7,4. L'AG est lié à l'albumine dans un rapport AG/albumine de 4/1. Une préincubation, correspondant à l'addition de 200  $\mu\text{l}$  d'homogénat dans le milieu de base, est nécessaire ; la réaction ne commence réellement qu'après l'addition de l'AG radiomarqué. Elle s'effectue pendant 30 min à  $37^\circ\text{C}$  et est arrêtée par 1.5 ml d' $\text{HClO}_4$  à 25 %. La quantité d'AG utilisée pour la  $\beta$ -oxydation est déterminée comme décrit précédemment pour les explants.

## **6. Uptake des HDL**

Les explants de foie, préparés comme indiqué ci-dessus, ont également été utilisés afin de mesurer le captage du HDL-cholestérol.

### **6.1. Isolement des HDL**

Une fraction HDL est isolée à partir de plasma humain par ultracentrifugation séquentielle par flottation selon la méthode décrit par Perségol et *al.* (*Persegol et al., 2006*). Après une centrifugation de 24 heures à 184000g dans un rotor 70.Ti (XL-90; Beckman, Palo Alto, CA, USA), le surnageant contenant les lipoprotéines de densité  $<1,063\text{g/mL}$ , a été éliminé. Enfin, les HDL sont isolées à partir du sous-nageant avec une densité ajustée à  $1,21\text{g/mL}$  par une nouvelle centrifugation de 24 heures à 184000g. La fraction récupérée est dialysée une nuit contre un tampon TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

### **6.2. Radio-marquage des HDL**

Les HDL ont ensuite été radiomarquées avec des [<sup>3</sup>H] éthers de cholestérol formés à partir de liposomes composés d'éther de [3H]cholestéryl hédacyl, de L- $\alpha$ -phosphatidylcholine et de butylhydroxytoluène (500 :1 :6 ratio molaire). Les HDL-[<sup>3</sup>H]CE sont obtenues par addition des liposomes à la fraction HDL en présence de lipoprotéines plasmatiques libres, comme source de protéine de transfert des CE, après une nuit d'incubation à 37 ° C sous agitation légère. Les HDL radiomarquées sont ensuite séparées des liposomes restants par une nouvelle ultracentrifugation séquentielle et lavées deux fois dans une solution de bromure de potassium (densité 1,21). Enfin, les HDL-[<sup>3</sup>H] CE sont aliquotées et congelés à -80 ° C jusqu'à leur utilisation.

### **6.3. Mesure de l'uptake des HDL**

Des explants de foie sont incubés à 37°C dans 1 mL de WME contenant 40  $\mu$ g de lipoprotéines (0,3 mCi de HDL-[3H] CE) sous agitation légère. Après 3 h, les explants sont retirés du milieu, lavés trois fois, et homogénéisés dans 400  $\mu$ L de PBS avec un mini-beadbeater (Produits BIOSPEC, Bartlesville, OK). La radioactivité retrouvée dans l'homogénat est estimée, représentant la quantité de HDL captées par les cellules du foie.

## **7. Malonyl-CoA**

Le dosage de malonyl-CoA est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Un échantillon de 200 mg de foie congelé à l'azote liquide immédiatement après prélèvement est homogénéisé à l'aide d'un mini broyeur à billes (Biospec Products) en présence d'1 mL d'une solution glacée d'acide perchlorique à 6% et de 0,2 mM de dithiothreitol (DTT). L'homogénat est centrifugé à 20000 g pendant 10 min à 4 °C. Un volume de 20  $\mu$ L de surnageant est immédiatement injecté dans une colonne en phase inverse C18 (Merck, LiChroCART, supersphere ; 4 mm de diamètre interne et 250 mm de long). L'analyse s'effectue sur un appareillage HPLC de type Varian équipé d'une pompe à gradient Prostar (modèle 230) et d'un détecteur UV ( $\lambda = 254$  nm) Prostar (modèle 310). La phase mobile permettant la séparation est composée d'un mélange tampon A (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et tampon B (0,25 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 20% acétonitrile) dont la proportion varie selon le gradient défini dans la figure 43, avec un débit de 0,6 mL/min. La quantité de malonyl-CoA présent est estimée par étalonnage externe.

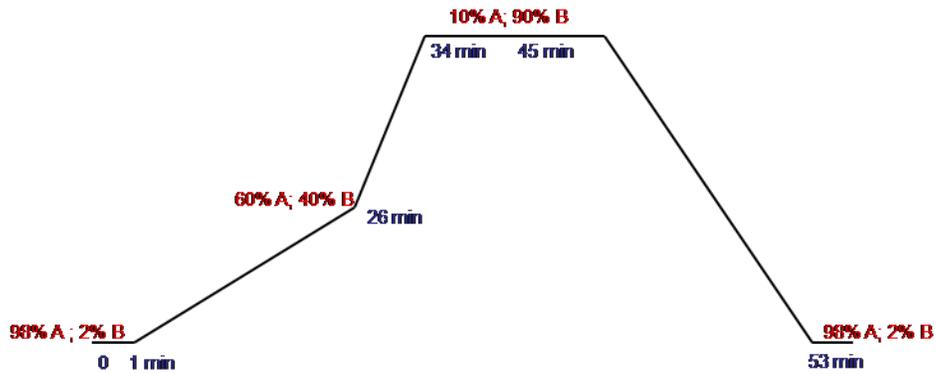


Figure 44 : Gradient de la phase mobile lors du dosage du malonyl-CoA par HPLC.

## 8. Mesure de la consommation d'oxygène par des explants de foie traités au SR141716

Les explants ont préalablement été incubés 20h à 37°C dans les conditions normales de culture puis une dernière heure dans un nouveau milieu permettant d'orienter le métabolisme énergétique des hépatocytes avant la mesure. Ainsi, 3 conditions ont été retenues : 1) les conditions normales préalablement décrites (milieu de culture classique), 2) des conditions favorisant l'utilisation du glucose en incubant les explants dans un milieu WME supplémenté avec 5µg/mL d'insuline et 100µM de malonyl-CoA et 3) des conditions favorisant l'utilisation des graisses en incubant les explants dans un milieu DMEM dépourvu en sucre et supplémenté avec 50µM d'acide palmitique, 100 µM d'AICAR et 200 ng/L de glucagon.

La respiration à partir des substrats intracellulaires est mesurée en utilisant une électrode à oxygène de type Clark (Hansatech instrument, Eurosep instrument) et un milieu de base sans substrat, le PBS. La mesure est effectuée dans une chambre de 1 ml sous agitation magnétique, reliée à un système de circulation d'eau pour maintenir une température stable de 37 °C. L'électrode est reliée à un ordinateur via une interface et les signaux entrants sont détectés et analysés avec le logiciel « Oxygraph Plus V1.01 (Hansatech) ». La consommation d'oxygène est mesurée pendant environ 5 min puis l'activité respiratoire est normalisée par un dosage des protéines.

## 9. Glycogène

La mesure du glycogène est réalisée après hydrolyse enzymatique selon Bergmeyer *et al.*, (Bergmeyer *et al.*, 1974). Un homogénat de foie dilué dans 7 volumes de HClO<sub>4</sub> (0,4 M) est centrifugé à 13000 g pendant 5 min. Un volume connu de surnageant est neutralisé avec du

$K_2CO_3$  (0,75 M), puis maintenu 10 min à 4°C. Une partie est mélangée à 4 volumes d'une solution d'amyloglucosidase à 10 mg/mL en milieu acétate de sodium (0,3 M ; pH 4,8) et une autre partie est mélangée à 4 volumes de tampon acétate (0,3M ; pH 4,8). Les mélanges sont incubés à 37°C pendant 2 h, puis centrifugés à 20000g pendant 10 min à 4°C. La quantité de glycogène correspond à la différence entre la quantité de glucose obtenu pour l'essai « amyloglucosidase » et l'essai témoin ne contenant que l'acétate de sodium. L'ensemble du protocole opératoire est également appliqué à des solutions de concentrations connues en glycogène. Le glucose est dosé avec le kit utilisé pour les dosages plasmatiques.

### **10. Détermination de l'activité LPL**

250 mg de TA fraîchement prélevé sont homogénéisés dans un tampon sucrose (saccharose réfrigéré 0,25 M, Tris/HCL (pH7,4) 10 mM, EDTA 1 mM, désoxycholate 12 mM et de l'héparine 10 UI/mL). Une partie des homogénats (100  $\mu$ L) est ajoutée à 200  $\mu$ L d'une mixture émulsionnée contenant 0,1 ; 0,5 ou 1 mM de glycérol-tri[9,10- $^3$ H]oléate (222 MBq/mmol), 5% de gomme arabique, 0,2 M de Tris/HCl (pH 8,6), 10% de sérum de poulet inactivé (activateur de la LPL) et 0,5 ou 5M de NaCl. L'activité lipoprotéine lipase des homogénats est déterminée en mesurant la quantité d'acide oléique radiomarqué libérée par hydrolyse de [ $^3$ H]trioléine. Après 1 h d'incubation à 37°C, l'acide oléique libéré par l'activité LPL est séparé de la trioléine marquée par ajout de 3,15 mL de chloroforme/méthanol/heptane (1/1,25/0,88 ; v/v/v) et 1,05 mL de tampon borate ( $Na_2B_4O_7$  15mM,  $K_2CO_3$  1M, pH 10,5). Le mélange est centrifugé 15 minutes à 2000g puis la radioactivité de la phase supérieure (contenant les AGL) est mesurée après mélange de 400 $\mu$ L de cette phase avec de l'Ultima Gold XR. L'activité LPL est obtenue par la soustraction de l'activité non spécifique (déterminée dans les conditions à 5M de NaCl) de l'activité lipasique totale (déterminée dans les conditions à 0,5M NaCl) et est exprimée en nmol d' [ $^3$ H]oléate libéré par heure par mg de protéines.

### **11. Lipolyse basale et stimulée**

Les tissus adipeux viscéral et sous-cutané sont prélevés et rapidement découpés au scalpel en petits morceaux d'environ 4-5 mm<sup>3</sup>. Ces explants sont pré-incubés 30 minutes à 37°C en milieu de culture (DMEM-HAM F12 supplémenté en BSA 1%, cocktail d'antibiotiques antifongiques 1%). Les explants sont ensuite rincés avec ce même milieu puis séchés sur papier et répartis dans des plaques de culture 6 puits contenant le milieu de culture supplémenté soit avec de l'AEA (5 $\mu$ M) soit avec de l'AEA (5 $\mu$ M) plus SR141716 (1  $\mu$ M) soit un placebo puis incubés pendant 90

minutes à 37°C. Après cette incubation, le milieu de culture est prélevé afin de doser le glycérol libre libéré par les explants. Ces données permettent ainsi de rendre compte de la lipolyse basale. Les explants sont ensuite remis à incuber 90 minutes dans les mêmes conditions et supplémentés avec de l'isoprotérénol (10µM) afin de stimuler la lipolyse. Après ces 90 minutes d'incubations, le milieu est prélevé pour dosage du glycérol afin de rendre compte de l'activité lipolytique. Les explants sont ensuite broyés dans du PBS afin de doser les protéines pour normaliser les données obtenues.

### **12. Western blotting**

Les échantillons de foie sont homogénéisés dans du PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche diagnostics) et dilués dans un tampon 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, glycérol 20%, SDS 4%, DTT, 5 mM, et β-mercaptoéthanol 5%). 25µg de protéines sont déposés puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% contenant 0,1% de SDS et transférés sur des membranes de nitrocellulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences). Les membranes sont ensuite bloquées pendant 1 h à température ambiante avec 5% de BSA dans un tampon salin (TBST), Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, 0,1% Tween-20. Les membranes sont incubées soit pendant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-phospho-AMP kinase a (p-AMPK;Thr172) (dilution 1:1000; Signalisation cellulaire) soit 1 h à température ambiante avec un anticorps anti β-actine (dilution 1:10000; Sigma). Les blots sont lavés avec du TBST pendant 1 h et incubés avec l'anticorps secondaire, un anti-IgG lié à une peroxydase (dilution 1:10,000) pendant 1 h. Les blots sont ensuite lavés avec TBST et révélés sur film photographique à l'aide du réactif ECL (Amersham Biosciences).

### **13. Expression génique**

L'expression des gènes est évaluée par RT-PCR semi-quantitative en temps réel. L'extraction des ARN messagers (ARNm) totaux est réalisée par la technique du Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) consistant en une extraction, une précipitation, puis une re-solubilisation des ARNm totaux en eau pure. Ensuite, la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir d'1 µg d'ARNm avec Iscript cDNA kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Tableau 5 : séquences des différentes amorces utilisées.

Gènes	5'-sens primer-3'	5'-anti-sens primer-3'	Longueur de l'amplicon (pb)
18S	gtgtgggagtgaaagg	gcgagacagtc aaacacg	60
ACC1	acaccaatggtggagttgtg	gctgttcctcaggctcacat	64
ACC2	catggtagtgcttgaaggga	cggtcgtatcgttctctg	114
CB1	ccgcaagatagtcoccaatg	aaccocac ccagttgaac	48
CPT-1	ggatctacaattccccctctgc	atcttaa ctg ccggatccac	110
FAS	ggctgcagtgaaatgattg	ttctaacctcttgccaac	55
FAT/CD36	aattagtagaacgggccac	ccaactocaggtaaatca	67
G6P	tggcctggcttattgtaacct	gtgc taa gaggaa gaccoga	64
Glck	actttcaggccacaaaca	tcacagaa ctg taagccactc	78
HL	gtgaaatgtgggttagtgac	acttcgcagattctcagc	129
HMGCoA	gocctggatgggaaggagta	cttatggctctgcagccctc	90
HSL	ttacca tctcacctccctgg	aacctgctgctctgctctc	96
LPL	ctaaggaccctgaagacaca	tctcatatcattcccgttaccgt	142
LRP	gaccgactggcgaacaaat	ctgggtgtggctcctctgta	87
PEPCK	cagccagtgccccattatt	ccacc aaagtagaacctca	77
PPAR $\gamma$ 2	atcttaactccggatccac	aggcactctgaaacgaca	69
SCD-1	ccggagacccc ttatgacga	tagcctgtaaagattctgcaaac	100
SRB-1	tccttcgtgcattttctca	gttcatcccaacaaacaggc	86
SREBP-1c	acctggtgtcagcttgg	accacttcgggttctatgc	70
TNF- $\alpha$	ggcctcccctcctcagtt	gatctgagtgtagggctctgg	49
TPB	acggcacaggactactcca	gctgtctttgtgctctccaa	77

Les couples d'amorces ont été déterminés avec le logiciel Primers! puis ont été synthétisés par MWG-Biotech AG (Ebersberg, Allemagne). ACC, acetyl-CoA carboxylase; CB1, cannabinoid receptor 1; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase I; FAS, fatty acid synthase; FAT/CD36, fatty acid translocase; G6P, glucose-6-phosphatase; Glck, glucokinase; HL, Hepatic lipase; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; HSL, hormone-sensitive lipase; LPL, lipoprotéine lipase; LRP, LDL receptor related protein; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPAR- $\gamma$ 2, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1; SR-BI, scavenger receptor class B type I; SREBP-1c, Sterol Regulatory Element Binding Proteins-1c; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TBP, TATA box binding protein.

Les PCR en temps réel sont réalisées sur des plaques de 96 puits à partir de 2,5 ng d'ADNc dans un volume final de 25  $\mu$ L composé de 12,5  $\mu$ L de Mix PCR contenant du Sybr-green (Bio-Rad S.A., France) et 300 mM de chaque amorce (sens et anti-sens). Les amorces utilisées ont été déterminées à l'aide du logiciel « Primers » et synthétisées par MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne). Les données sont analysées à l'aide du logiciel Bio-Rad et de Microsoft Excel. La semi quantification du nombre de copies d'ADN est calculée à partir de courbes standards pour chaque gène d'intérêt établies à l'aide de 4 dilutions (1/10 à 1/10000) d'un ADNc contrôle

positif. Les résultats sont standardisés avec une moyenne d'expression de plusieurs gènes rapporteurs. 18S et TATAbox binding protein pour le foie et L38 et TATAbox binding protein pour le TA.

#### **14. Statistiques**

Les résultats sont exprimés en tant que moyennes  $\pm$  sem. Les données ont été analysées par le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les différences sont considérées comme significatives à  $P < 0,05$ .

# Bibliographie

## Bibliographie

- 7TMPharma. (2008) 7TM Pharma announces the selection of a new preclinical development candidate, TM38837, for treatment of obesity and Type 2 diabetes. February 06, 2008. <http://www.7tm.com/News.aspx?M=News&PID=42&NewsID=33>
- 7TMPharma. (2010) 7TM Pharma successfully conducts clinical phase I trial with its second generation CB1 receptor antagonist. February 4th, 2010. <http://www.7tm.com/News.aspx?M=News&PID=42&NewsID=53>
- Abel, E. L. (1971) Effects of marihuana on the solution of anagrams, memory and appetite. *Nature*, 231, 260-261.
- Abel, E. L. (1975) Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behav Biol*, 15, 255-281.
- Adami, M., Frati, P., Bertini, S., Kulkarni-Narla, A., Brown, D. R., de Caro, G., Coruzzi, G. and Soldani, G. (2002) Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol*, 135, 1598-1606.
- Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C. E., Brenner, G. J., Rubino, T., Michalski, C. W., Marsicano, G., Monory, K., Mackie, K., Marian, C., Batkai, S., Parolaro, D., Fischer, M. J., Reeh, P., Kunos, G., Kress, M., Lutz, B., Woolf, C. J. and Kuner, R. (2007) Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci*, 10, 870-879.
- Agudo, J., Martin, M., Roca, C., Molas, M., Bura, A. S., Zimmer, A., Bosch, F. and Maldonado, R. (2010) Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia*.
- Aiston, S., Trinh, K. Y., Lange, A. J., Newgard, C. B. and Agius, L. (1999) Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase. *J Biol Chem*, 274, 24559-24566.
- Al-Massadi, O., Gabellieri, E., Trujillo, M. L., Señaris, R., Pagotto, U., Pasquali, R., Casanueva, F. F. and Seoane, L. M. (2010) Peripheral endocannabinoid system mediated actions of rimonabant on GH secretion are ghrelin dependent. *Journal of Neuroendocrinology*, no-no.
- Allison, D. B., Kaprio, J., Korkeila, M., Koskenvuo, M., Neale, M. C. and Hayakawa, K. (1996) The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20, 501-506.
- Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, 58, 315-348.
- Angulo, P. and Lindor, K. D. (2002) Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16, 797-810.
- Annuzzi, G., Piscitelli, F., Di Marino, L., Patti, L., Giacco, R., Costabile, G., Bozzetto, L., Riccardi, G., Verde, R., Petrosino, S., Rivellese, A. and Di Marzo, V. (2010) Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids in Health and Disease*, 9, 43.
- Arai, T., Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C. and Tall, A. R. (1999) Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J Biol Chem*, 274, 2366-2371.
- Argaud, D., Kirby, T. L., Newgard, C. B. and Lange, A. J. (1997) Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J Biol Chem*, 272, 12854-12861.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Kumada, M., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Shimomura, I., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2002) Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived

## Bibliographie

- growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation*, 105, 2893-2898.
- 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. and Matsuzawa, Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257, 79-83.
- Arner, P. (2002) Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev*, 18 Suppl 2, S5-9.
- Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiebot, M. H., Poncelet, M., Soubrie, P. and Le Fur, G. (1997) Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 132, 104-106.
- Asilmaz, E., Cohen, P., Miyazaki, M., Dobrzyn, P., Ueki, K., Fayzikhodjaeva, G., Soukas, A. A., Kahn, C. R., Ntambi, J. M., Soccia, N. D. and Friedman, J. M. (2004) Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J Clin Invest*, 113, 414-424.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., Brichard, S., Rencurel, F., Cusin, I. and Jeanrenaud, B. (1995) In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism*, 44, 228-233.
- Avramoglu, R. K., Basciano, H. and Adeli, K. (2006) Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*, 368, 1-19.
- Azzout-Marniche, D., Becard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferre, P. and Foufelle, F. (2000) Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J*, 350 Pt 2, 389-393.
- Barish, G. D., Narkar, V. A. and Evans, R. M. (2006) PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 116, 590-597.
- Barth, N., Langmann, T., Scholmerich, J., Schmitz, G. and Schaffler, A. (2002) Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 ( apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways. *Diabetologia*, 45, 1425-1433.
- Bartova, A. and Birmingham, M. K. (1976) Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on mitochondrial NADH-oxidase activity. *J Biol Chem*, 251, 5002-5006.
- Bastard, J. P., Robert, J. J., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A. and Hainque, B. (2001) Is quantitative insulin sensitivity check index, a fair insulin sensitivity index in humans? *Diabetes Metab*, 27, 69-70.
- Batkai, S., Jarai, Z., Wagner, J. A., Goparaju, S. K., Varga, K., Liu, J., Wang, L., Mirshahi, F., Khanolkar, A. D., Makriyannis, A., Urbaschek, R., Garcia, N., Jr., Sanyal, A. J. and Kunos, G. (2001) Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med*, 7, 827-832.
- Batkai, S., Osei-Hyiaman, D., Pan, H., El-Assal, O., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Hong, F., Harvey-White, J., Jafri, A., Hasko, G., Huffman, J. W., Gao, B., Kunos, G. and Pacher, P. (2007) Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J*, 21, 1788-1800.
- Bayewitch, M., Rhee, M. H., Avidor-Reiss, T., Breuer, A., Mechoulam, R. and Vogel, Z. (1996) (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 271, 9902-9905.
- Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Tiribelli, C., Marchesini, G. and Bellentani, S. (2005) Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*, 42, 44-52.
- Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Oury-Donat, F. and Soubrie, P. (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression

## Bibliographie

- in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol*, 63, 908-914.
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M. and Scherer, P. E. (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 7, 947-953.
- Bergmeyer, H. U., Keppler, D. and Decker, K. (1974) Glycogen, determination with amyloglucosidase. *Methods of enzymatic analysis*, 3, 1128-1131.
- Bermudez-Silva, F. J., Sanchez-Vera, I., Suarez, J., Serrano, A., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Nadal, A. and Rodriguez de Fonseca, F. (2007) Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur J Pharmacol*, 565, 207-211.
- Bermudez-Silva, F. J., Suarez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Munoz, A. L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M. J., Milman, G., Mechoulam, R., Nadal, A. and Rodriguez de Fonseca, F. (2008) Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia*, 51, 476-487.
- Blankman, J. L., Simon, G. M. and Cravatt, B. F. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14, 1347-1356.
- Bluher, M., Engeli, S., Kloting, N., Berndt, J., Fasshauer, M., Batkai, S., Pacher, P., Schon, M. R., Jordan, J. and Stumvoll, M. (2006) Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*, 55, 3053-3060.
- Bluher, M., Michael, M. D., Peroni, O. D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B. B. and Kahn, C. R. (2002) Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell*, 3, 25-38.
- Bluher, S. and Mantzoros, C. S. (2009) Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*, 89, 991S-997S.
- Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z. and Ruderman, N. (2005) Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*, 54, 3458-3465.
- Bogacka, I., Ukropcova, B., McNeil, M., Gimble, J. M. and Smith, S. R. (2005a) Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 6650-6656.
- Bogacka, I., Xie, H., Bray, G. A. and Smith, S. R. (2005b) Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*, 54, 1392-1399.
- Bouaboula, M., Desnoyer, N., Carayon, P., Combes, T. and Casellas, P. (1999) Gi protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: implication for intracellular signalization cross-regulation. *Mol Pharmacol*, 55, 473-480.
- Bouaboula, M., Hilairet, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G. and Casellas, P. (2005) Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*, 517, 174-181.
- Bouaboula, M., Perrachon, S., Milligan, L., Canat, X., Rinaldi-Carmona, M., Portier, M., Barth, F., Calandra, B., Pecceu, F., Lupker, J., Maffrand, J. P., Le Fur, G. and Casellas, P. (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem*, 272, 22330-22339.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G. and Casellas, P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312 ( Pt 2), 637-641.
- Bouchard, C., Despres, J. P. and Mauriege, P. (1993) Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev*, 14, 72-93.

## Bibliographie

- Browning, J. D. and Horton, J. D. (2004) Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114, 147-152.
- Brunt, E. M. (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*, 21, 3-16.
- Bruun, J. M., Lihn, A. S., Verdich, C., Pedersen, S. B., Toubro, S., Astrup, A. and Richelsen, B. (2003) Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E527-533.
- Buettner, C., Muse, E. D., Cheng, A., Chen, L., Scherer, T., Poci, A., Su, K., Cheng, B., Li, X., Harvey-White, J., Schwartz, G. J., Kunos, G. and Rossetti, L. (2008) Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med*, 14, 667-675.
- Buettner, C., Poci, A., Muse, E. D., Etgen, A. M., Myers, M. G., Jr. and Rossetti, L. (2006) Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab*, 4, 49-60.
- Cadas, H., di Tomaso, E. and Piomelli, D. (1997) Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci*, 17, 1226-1242.
- Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A. and Piomelli, D. (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 394, 277-281.
- Capeau, J. (2003) Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés par l'insulino-résistance. *M/S: médecine sciences*, 19, 834-839.
- Caraceni, P., Domenicali, M. and Bernardi, M. (2008) The endocannabinoid system and liver diseases. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 47-52.
- Carlini, E. A. and Kramer, C. (1965) Effects of Cannabis sativa (marihuana) on maze performance of the rat. *Psychopharmacologia*, 7, 175-181.
- Casu, M. A., Porcella, A., Ruiu, S., Saba, P., Marchese, G., Carai, M. A., Reali, R., Gessa, G. L. and Pani, L. (2003) Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol*, 459, 97-105.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. and Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- Cavuto, P., McAinch, A. J., Hatzinikolas, G., Janovska, A., Game, P. and Wittert, G. A. (2007) The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 364, 105-110.
- Chakravarty, K., Leahy, P., Becard, D., Hakimi, P., Foretz, M., Ferre, P., Fougelle, F. and Hanson, R. W. (2001) Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Mimics the Negative Effect of Insulin on Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 34816-34823.
- Charriere, G., Cousin, B., Arnaud, E., Andre, M., Bacou, F., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2003) Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*, 278, 9850-9855.
- Chaytor, A. T., Martin, P. E., Evans, W. H., Randall, M. D. and Griffith, T. M. (1999) The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J Physiol*, 520 Pt 2, 539-550.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Nargeot, J. and Lory, P. (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J*, 20, 7033-7040.
- Childers, S. R. and Deadwyler, S. A. (1996) Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 52, 819-827.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995) Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, 19, 942-945.

## Bibliographie

- Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H. and Astrup, A. (2007) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 370, 1706-1713.
- Christiansen, T., Richelsen, B. and Bruun, J. M. (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)*, 29, 146-150.
- Collet, X., Tall, A. R., Serajuddin, H., Guendouzi, K., Royer, L., Oliveira, H., Barbaras, R., Jiang, X. C. and Francone, O. L. (1999) Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *J Lipid Res*, 40, 1185-1193.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J. C., Patti, M. E., Klein, S. L., Weinstein, R. S. and Scherer, P. E. (2003) Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*, 52, 268-276.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K. and Pagotto, U. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112, 423-431.
- Cote, M., Matias, I., Lemieux, I., Petrosino, S., Almeras, N., Despres, J. P. and Di Marzo, V. (2007) Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)*, 31, 692-699.
- Cousin, B., Andre, M., Arnaud, E., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2003) Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 1016-1022.
- Coutts, A. A., Irving, A. J., Mackie, K., Pertwee, R. G. and Anavi-Goffer, S. (2002) Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol*, 448, 410-422.
- Coutts, A. A. and Izzo, A. A. (2004) The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol*, 4, 572-579.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A. and Gilula, N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384, 83-87.
- Cuchel, M., Bloedon, L. T., Szapary, P. O., Kolansky, D. M., Wolfe, M. L., Sarkis, A., Millar, J. S., Ikewaki, K., Siegelman, E. S., Gregg, R. E. and Rader, D. J. (2007) Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 356, 148-156.
- Curioni, C. and Andre, C. (2006) Rimonabant for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006162.
- D'Eon, T. M., Pierce, K. A., Roix, J. J., Tyler, A., Chen, H. and Teixeira, S. R. (2008) The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes*, 57, 1262-1268.
- Das, U. N. (2002a) Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med (Maywood)*, 227, 989-997.
- Das, U. N. (2002b) Obesity, metabolic syndrome X, and inflammation. *Nutrition*, 18, 430-432.
- De Gottardi, A., Spahr, L., Ravier-Dall'Antonia, F. and Hadengue, A. (2010) Cannabinoid receptor 1 and 2 agonists increase lipid accumulation in hepatocytes. *Liver International*, 30, 1482-1489.
- De Petrocellis, L. and Di Marzo, V. (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23, 1-15.

## Bibliographie

- Del Prato, S. (1999) Measurement of insulin resistance in vivo. *Drugs*, 58 Suppl 1, 3-6; discussion 75-82.
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Fougelle, F., Dyck, J. R., Girard, J. and Postic, C. (2006) Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*, 55, 2159-2170.
- Derkinderen, P., Toutant, M., Burgaya, F., Le Bert, M., Siciliano, J. C., de Franciscis, V., Gelman, M. and Girault, J. A. (1996) Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science*, 273, 1719-1722.
- Despres, J. P. (2007) The endocannabinoid system: a new target for the regulation of energy balance and metabolism. *Crit Pathw Cardiol*, 6, 46-50.
- Despres, J. P., Golay, A. and Sjostrom, L. (2005) Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*, 353, 2121-2134.
- Despres, J. P., Lemieux, I. and Almeras, N. (2006) Contribution of CB1 blockade to the management of high-risk abdominal obesity. *Int J Obes (Lond)*, 30 Suppl 1, S44-52.
- Devane, W. A., Breuer, A., Sheskin, T., Jarbe, T. U., Eisen, M. S. and Mechoulam, R. (1992a) A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem*, 35, 2065-2069.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R. (1992b) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-1949.
- Deveaux, V. (2008) Mise en évidence de deux nouvelles fonctions du système endocannabinoïde dans la physiopathologie hépatique: propriétés stéatogènes du récepteur CB2 et profibrogéniques du récepteur CB1. Thèse de doctorat
- Deveaux, V., Cadoudal, T., Ichigotani, Y., Teixeira-Clerc, F., Louvet, A., Manin, S., Nhieu, J. T.-V., Belot, M. P., Zimmer, A., Even, P., Cani, P. D., Knauf, C., Burcelin, R., Bertola, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2009) Cannabinoid CB2 Receptor Potentiates Obesity-Associated Inflammation, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *PLoS One*, 4, e5844.
- Di Carlo, G. and Izzo, A. A. (2003) Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs*, 12, 39-49.
- Di Marzo, V. (2008a) The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51, 1356-1367.
- Di Marzo, V. (2008b) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*, 7, 438-455.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Brandi, I., Jefferson, R. G., Winckler, R. L., Davis, J. B., Dasse, O., Mahadevan, A., Razdan, R. K. and Martin, B. R. (2001a) Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 281, 444-451.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., Melck, D., Ross, R., Brockie, H., Stevenson, L., Pertwee, R. and De Petrocellis, L. (1998) Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett*, 436, 449-454.
- Di Marzo, V., Cote, M., Matias, I., Lemieux, I., Arsenault, B. J., Cartier, A., Piscitelli, F., Petrosino, S., Almeras, N. and Despres, 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, 213-217.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L. and Bisogno, T. (2005) The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 147-185.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. and Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372, 686-691.

## Bibliographie

- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sugiura, T. and Kunos, G. (2001b) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410, 822-825.
- Di Marzo, V. and Matias, I. (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*, 8, 585-589.
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S. and Piomelli, D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10819-10824.
- Domenicali, M., Caraceni, P., Pertosa, A., Giannone, F., Principe, A., Zambruni, A., Trevisani, F. and Bernardi, M. (2008) Effect of cannabinoid CB1-receptor antagonism on ascitic decompensation of rats with preascitic cirrhosis. *J Hepatol*, 48 (Suppl 2), S38.
- Domenicali, M., Ros, J., Fernandez-Varo, G., Cejudo-Martin, P., Crespo, M., Morales-Ruiz, M., Briones, A. M., Campistol, J. M., Arroyo, V., Vila, E., Rodes, J. and Jimenez, W. (2005) Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut*, 54, 522-527.
- Ducobu, J. (2005) [The endocannabinoid system and the regulation of the metabolism]. *J Pharm Belg*, 60, 84-88.
- Ducobu, J. and Sternon, J. (2005) [Rimonabant (Acomplia), specific inhibitor of the endocannabinoid system]. *J Pharm Belg*, 60, 89-91.
- Dunstan, D. W., Zimmet, P. Z., Welborn, T. A., De Courten, M. P., Cameron, A. J., Sicree, R. A., Dwyer, T., Colagiuri, S., Jolley, D., Knuiman, M., Atkins, R. and Shaw, J. E. (2002) The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*, 25, 829-834.
- Duvivier, V. F., Delafoy-Plasse, L., Delion, V., Lechevalier, P., Le Bail, J. C., Guillot, E., Pruniaux, M. P. and Galzin, A. M. (2009) Beneficial effect of a chronic treatment with rimonabant on pancreatic function and beta-cell morphology in Zucker Fatty rats. *Eur J Pharmacol*, 616, 314-320.
- Eckel, R. H. and Yost, T. J. (1987) Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J Clin Invest*, 80, 992-997.
- Engeli, S., Bohnke, J., Feldpausch, M., Gorzelnik, K., Janke, J., Batkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F. C., Sharma, A. M. and Jordan, J. (2005) Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*, 54, 2838-2843.
- Engeli, S. and Jordan, J. (2006) The endocannabinoid system: body weight and metabolic regulation. *Clin Cornerstone*, 8 Suppl 4, S24-35.
- Engstrom, G., Hedblad, B., Stavenow, L., Lind, P., Janzon, L. and Lindgarde, F. (2003a) Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*, 52, 2097-2101.
- Engstrom, G., Stavenow, L., Hedblad, B., Lind, P., Eriksson, K. F., Janzon, L. and Lindgarde, F. (2003b) Inflammation-sensitive plasma proteins, diabetes, and mortality and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based study. *Diabetes*, 52, 442-447.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. and Grodsky, G. M. (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*, 52, 1-8.
- Fabbrini, E., Sullivan, S. and Klein, S. (2010) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51, 679-689.
- Farooqi, I. S. and O'Rahilly, S. (2008) Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4, 569-577.
- Farooqi, I. S. and O'Rahilly, S. (2009) Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr*, 89, 980S-984S.

## Bibliographie

- Farooqui, A. A., Rammohan, K. W. and Horrocks, L. A. (1989) Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain. *Ann N Y Acad Sci*, 559, 25-36.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Glass, M., Mackie, K. P., Fahey, K. J., Cullinan, G. J., Hunden, D. C., Johnson, D. W., Chaney, M. O., Koppel, G. A. and Brownstein, M. (1998) LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 291-297.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L. and Mitchell, R. L. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, 48, 443-450.
- Felder, C. C., Nielsen, A., Briley, E. M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D. N., Richardson, J. M., Riggin, R. M., Koppel, G. A., Paul, S. M. and Becker, G. W. (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*, 393, 231-235.
- Fernandez-Rodriguez, C. M., Romero, J., Petros, T. J., Bradshaw, H., Gasalla, J. M., Gutierrez, M. L., Lledo, J. L., Santander, C., Fernandez, T. P., Tomas, E., Cacho, G. and Walker, J. M. (2004) Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver Int*, 24, 477-483.
- Ferrannini, E. (2006) Is insulin resistance the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med*, 38, 42-51.
- Ferre, P. (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S43-50.
- Ferre, T., Riu, E., Bosch, F. and Valera, A. (1996) Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J*, 10, 1213-1218.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497-509.
- Foltin, R. W., Brady, J. V. and Fischman, M. W. (1986) Behavioral analysis of marijuana effects on food intake in humans. *Pharmacol Biochem Behav*, 25, 577-582.
- 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., Van der Ploeg, L. H., Goulet, M. T., Hagmann, W. K., Lin, L. S., Lanza, T. J., Jr., Jewell, J. P., Liu, P., Shah, S. K., Qi, H., Tong, X., Wang, J., Xu, S. S., Francis, B., Strack, A. M., MacIntyre, D. E. and Shearman, L. P. (2007) 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*, 321, 1013-1022.
- Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S. and Viollet, B. (2005) Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*, 54, 1331-1339.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P. and Foulle, F. (1999a) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12737-12742.
- Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Liepvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J. B., Ferre, P. and Foulle, F. (1999b) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol*, 19, 3760-3768.
- Franklin, A. and Stella, N. (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol*, 474, 195-198.
- Freedland, C. S., Sharpe, A. L., Samson, H. H. and Porrino, L. J. (2001) Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. *Alcohol Clin Exp Res*, 25, 277-282.

## Bibliographie

- Fride, E. (1995) Anandamides: tolerance and cross-tolerance to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Brain Res*, 697, 83-90.
- Fride, E., Suris, R., Weidenfeld, J. and Mechoulam, R. (2005) Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid CB1 receptor knockout newborn and adult mice. *Behav Pharmacol*, 16, 431-440.
- Fromenty, B. and Pessayre, D. (1995) Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*, 67, 101-154.
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., Bihain, B. E. and Lodish, H. F. (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2005-2010.
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodriguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G. and Piomelli, D. (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, 425, 90-93.
- Fukunaga, K. and Miyamoto, E. (1998) Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol*, 16, 79-95.
- Gallate, J. E. and McGregor, I. S. (1999) The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716. *Psychopharmacology (Berl)*, 142, 302-308.
- Galve-Roperh, I., Sanchez, C., Cortes, M. L., Gomez del Pulgar, T., Izquierdo, M. and Guzman, M. (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med*, 6, 313-319.
- Gao, Z., Zuberi, A., Quon, M. J., Dong, Z. and Ye, J. (2003) Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem*, 278, 24944-24950.
- Gaoni, Y. and Mechoulam, R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*, 86, 1646-1647.
- Gary-Bobo, M., Elachouri, G., Gallas, J. F., Janiak, P., Marini, P., Ravinet-Trillou, C., Chabbert, M., Cruccioli, N., Pfersdorff, C., Roque, C., Arnone, M., Croci, T., Soubrie, P., Oury-Donat, F., Maffrand, J. P., Scatton, B., Lacheretz, F., Le Fur, G., Herbert, J. M. and Bensaid, M. (2007) Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology*, 46, 122-129.
- Gasperi, V., Fezza, F., Pasquariello, N., Bari, M., Oddi, S., Agro, A. F. and Maccarrone, M. (2007) Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci*, 64, 219-229.
- Gatley, S. J., Gifford, A. N., Volkow, N. D., Lan, R. and Makriyannis, A. (1996) 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*, 307, 331-338.
- Getty-Kaushik, L., Richard, A. M., Deeney, J. T., Krawczyk, S., Shirihai, O. and Corkey, B. E. (2009) The CB1 antagonist rimonabant decreases insulin hypersecretion in rat pancreatic islets. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 1856-1860.
- Giannini, L., Nistri, S., Mastroianni, R., Cinci, L., Vannacci, A., Mariottini, C., Passani, M. B., Mannaioni, P. F., Bani, D. and Masini, E. (2008) Activation of cannabinoid receptors prevents antigen-induced asthma-like reaction in guinea pigs. *J Cell Mol Med*, 12, 2381-2394.
- Girard, J., Ferre, P. and Foufelle, F. (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr*, 17, 325-352.
- Glass, M. and Northup, J. K. (1999) Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol*, 56, 1362-1369.

## Bibliographie

- Gonthier, M. P., Hoareau, L., Festy, F., Matias, I., Valenti, M., Bes-Houtmann, S., Rouch, C., Robert-Da Silva, C., Chesne, S., Lefebvre d'Hellencourt, C., Cesari, M., Di Marzo, V. and Roche, R. (2007) Identification of endocannabinoids and related compounds in human fat cells. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 837-845.
- Gonzalez, S., Manzanares, J., Berrendero, F., Wenger, T., Corchero, J., Bisogno, T., Romero, J., Fuentes, J. A., Di Marzo, V., Ramos, J. A. and Fernandez-Ruiz, J. (1999) Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 70, 137-145.
- Granner, D., Andreone, T., Sasaki, K. and Beale, E. (1983) Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature*, 305, 549-551.
- Graulet, B., Gruffat, D., Durand, D. and Bauchart, D. (1998) Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. *J Biochem*, 124, 1212-1219.
- Greenberg, I., Kuehnle, J., Mendelson, J. H. and Bernstein, J. G. (1976) Effects of marihuana use on body weight and caloric intake in humans. *Psychopharmacology (Berl)*, 49, 79-84.
- Groop, L. (2000) Pathogenesis of type 2 diabetes: the relative contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion. *Int J Clin Pract Suppl*, 3-13.
- Groot, P. H., Jansen, H. and Van Tol, A. (1981) Selective degradation of the high density lipoprotein-2 subfraction by heparin-releasable liver lipase. *FEBS Lett*, 129, 269-272.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. and Czech, M. P. (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 367-377.
- Guindon, J., Desroches, J. and Beaulieu, P. (2007) The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol*, 150, 693-701.
- Gustafson, B., Jack, M. M., Cushman, S. W. and Smith, U. (2003) Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308, 933-939.
- Guzman, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blazquez, C. and Piomelli, D. (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*, 279, 27849-27854.
- Guzman, M., Sanchez, C. and Galve-Roperh, I. (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther*, 95, 175-184.
- Haffner, S. M. (1999) Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 84, 11J-14J.
- Hajos, N. and Freund, T. F. (2002) Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers. *Neuropharmacology*, 43, 503-510.
- Hajos, N., Ledent, C. and Freund, T. F. (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, 106, 1-4.
- Halperin, F., Beckman, J. A., Patti, M. E., Trujillo, M. E., Garvin, M., Creager, M. A., Scherer, P. E. and Goldfine, A. B. (2005) The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia*, 48, 2147-2154.
- Handschin, C. and Spiegelman, B. M. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev*, 27, 728-735.
- Hanson, E. S. and Dallman, M. F. (1995) Neuropeptide Y (NPY) May Integrate Responses of Hypothalamic Feeding Systems and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 7, 273-279.

## Bibliographie

- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I. and Mechoulam, R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3662-3665.
- Hao, S., Avraham, Y., Mechoulam, R. and Berry, E. M. (2000) Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol*, 392, 147-156.
- Hariharan, N., Farrelly, D., Hagan, D., Hillyer, D., Arbeeny, C., Sabrah, T., Treloar, A., Brown, K., Kalinowski, S. and Mookhtiar, K. (1997) Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight. *Diabetes*, 46, 11-16.
- Harrold, J. A. and Williams, G. (2003) The cannabinoid system: a role in both the homeostatic and hedonic control of eating? *Br J Nutr*, 90, 729-734.
- Hegde, V. L., Hegde, S., Cravatt, B. F., Hofseth, L. J., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. S. (2008) Attenuation of experimental autoimmune hepatitis by exogenous and endogenous cannabinoids: involvement of regulatory T cells. *Mol Pharmacol*, 74, 20-33.
- Heilbronn, L., Smith, S. R. and Ravussin, E. (2004) Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28 Suppl 4, S12-21.
- Herling, A. W., Kilp, S., Elvert, R., Haschke, G. and Kramer, W. (2008) Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats. *Endocrinology*, 149, 2557-2566.
- Higgs, H. N. and Glomset, J. A. (1994) Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9574-9578.
- Hildebrandt, A. L., Kelly-Sullivan, D. M. and Black, S. C. (2003) Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol*, 462, 125-132.
- Hill, M. N. and Gorzalka, B. B. (2006) Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 526-536.
- Hillard, C. J., Edgemond, W. S., Jarrahan, A. and Campbell, W. B. (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, 69, 631-638.
- Ho, W. S. and Hiley, C. R. (2003) Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, 138, 1320-1332.
- Hodgkin, D. (1969) Insulin Structure Deciphered. *Facts on File*, 29, 783A.
- Hohmann, A. G., Suplita, R. L., Bolton, N. M., Neely, M. H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J. F., Walker, J. M., Holmes, P. V., Crystal, J. D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G. and Piomelli, D. (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 435, 1108-1112.
- Hollister, L. E. (1971) Hunger and appetite after single doses of marijuana, alcohol, and dextroamphetamine. *Clin Pharmacol Ther*, 12, 44-49.
- Hornby, P. J. and Prouty, S. M. (2004) Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception. *Br J Pharmacol*, 141, 1335-1345.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109, 1125-1131.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. and Spiegelman, B. M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95, 2409-2415.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. and Spiegelman, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91.

## Bibliographie

- Howlett, A. C. and Fleming, R. M. (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 26, 532-538.
- Howlett, A. C. and Mukhopadhyay, S. (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids*, 108, 53-70.
- Howlett, A. C., Qualy, J. M. and Khachatrian, L. L. (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, 29, 307-313.
- Hoyumpa, A. M., Jr., Greene, H. L., Dunn, G. D. and Schenker, S. (1975) Fatty liver: biochemical and clinical considerations. *Am J Dig Dis*, 20, 1142-1170.
- Hubbard, S. R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J*, 16, 5572-5581.
- Idris, A. I. and Ralston, S. H. (2010) Cannabinoids and bone: friend or foe? *Calcif Tissue Int*, 87, 285-297.
- Idris, A. I., Sophocleous, A., Landao-Bassonga, E., Canals, M., Milligan, G., Baker, D., van't Hof, R. J. and Ralston, S. H. (2009) Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab*, 10, 139-147.
- Ilyedjian, P. B., Jotterand, D., Nospikel, T., Asfari, M. and Pilot, P. R. (1989) Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem*, 264, 21824-21829.
- Izzo, A. A. (2004) Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors. *Br J Pharmacol*, 142, 1201-1202.
- Izzo, A. A. and Coutts, A. A. (2005) Cannabinoids and the digestive tract. *Handb Exp Pharmacol*, 573-598.
- Izzo, A. A., Fezza, F., Capasso, R., Bisogno, T., Pinto, L., Iuvone, T., Esposito, G., Mascolo, N., Di Marzo, V. and Capasso, F. (2001) Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol*, 134, 563-570.
- Izzo, A. A., Pinto, L., Borrelli, F., Capasso, R., Mascolo, N. and Capasso, F. (2000) Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br J Pharmacol*, 129, 1627-1632.
- Izzo, A. A., Piscitelli, F., Capasso, R., Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Petrosino, S. and Di Marzo, V. (2009) Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol*, 158, 451-461.
- Jamshidi, N. and Taylor, D. A. (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*, 134, 1151-1154.
- Jansen, H., van Tol, A. and Hulsmann, W. C. (1980) On the metabolic function of heparin-releasable liver lipase. *Biochem Biophys Res Commun*, 92, 53-59.
- Jarai, Z., Wagner, J. A., Varga, K., Lake, K. D., Compton, D. R., Martin, B. R., Zimmer, A. M., Bonner, T. I., Buckley, N. E., Mezey, E., Razdan, R. K., Zimmer, A. and Kunos, G. (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14136-14141.
- Jbilo, O., Ravinet-Trillou, C., Arnone, M., Buisson, I., Bribes, E., Peleraux, A., Penarier, G., Soubrie, P., Le Fur, G., Galiegue, S. and Casellas, P. (2005) The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *Faseb J*, 19, 1567-1569.
- Jeong, W. I., Osei-Hyiaman, D., Park, O., Liu, J., Batkai, S., Mukhopadhyay, P., Horiguchi, N., Harvey-White, J., Marsicano, G., Lutz, B., Gao, B. and Kunos, G. (2008) Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab*, 7, 227-235.

## Bibliographie

- Jhaveri, M. D., Sagar, D. R., Elmes, S. J., Kendall, D. A. and Chapman, V. (2007) Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol*, 36, 26-35.
- Johns, D. G., Behm, D. J., Walker, D. J., Ao, Z., Shapland, E. M., Daniels, D. A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P. C., Green, P., Shabon, U., Bao, W., Aiyar, N., Yue, T. L., Brown, A. J., Morrison, A. D. and Douglas, S. A. (2007) The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*, 152, 825-831.
- Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Verges, B. and 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, 926-934.
- Juan-Pico, P., Fuentes, E., Bermudez-Silva, F. J., Javier Diaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodriguez de Fonseca, F. and Nadal, A. (2006) Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39, 155-162.
- Juge-Aubry, C. E., Henrichot, E. and Meier, C. A. (2005) Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19, 547-566.
- Julien, B., Grenard, P., Teixeira-Clerc, F., Van Nhieu, J. T., Li, L., Karsak, M., Zimmer, A., Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2005) Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*, 128, 742-755.
- Kadowaki, H., Patton, G. M. and Robins, S. J. (1992) Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J Lipid Res*, 33, 1689-1698.
- Kadowaki, T. and Yamauchi, T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, 26, 439-451.
- Kamagate, A., Qu, S., Perdomo, G., Su, D., Kim, D. H., Slusher, S., Meseck, M. and Dong, H. H. (2008) FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J Clin Invest*, 118, 2347-2364.
- Karsak, M., Malkin, I., Toliat, M. R., Kubisch, C., Nurnberg, P., Zimmer, A. and Livshits, G. (2009) The cannabinoid receptor type 2 (CNR2) gene is associated with hand bone strength phenotypes in an ethnically homogeneous family sample. *Hum Genet*, 126, 629-636.
- Kashfi, K., Mynatt, R. L. and Cook, G. A. (1994) Hepatic carnitine palmitoyltransferase-I has two independent inhibitory binding sites for regulation of fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1212, 245-252.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T. and Uyeda, K. (2002) Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 277, 3829-3835.
- Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I. G., Iseli, T., Michell, B. J. and Witters, L. A. (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans*, 31, 162-168.
- Kempf, K., Hector, J., Strate, T., Schwarzloh, B., Rose, B., Herder, C., Martin, S. and Algenstaedt, P. (2007) Immune-mediated activation of the endocannabinoid system in visceral adipose tissue in obesity. *Horm Metab Res*, 39, 596-600.
- Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. B. and Spiegelman, B. M. (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*, 101, 1-9.
- Kirkham, T. C. and Williams, C. M. (2001) Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutr Res Rev*, 14, 65-86.
- Kirkham, T. C., Williams, C. M., Fezza, F. and Di Marzo, V. (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*, 136, 550-557.

## Bibliographie

- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J. and Sanyal, A. J. (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41, 1313-1321.
- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M. and Lehmann, J. M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4318-4323.
- Kohjima, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Enjoji, M., Takayanagi, R. and Nakamuta, M. (2008) SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, 21, 507-511.
- 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. and Korbonits, M. (2005) Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 280, 25196-25201.
- Kopelman, P. G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635-643.
- Kozak, K. R., Gupta, R. A., Moody, J. S., Ji, C., Boeglin, W. E., DuBois, R. N., Brash, A. R. and Marnett, L. J. (2002) 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem*, 277, 23278-23286.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Glick, J. M., Krieger, M. and Rader, D. J. (2000) Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 721-727.
- Krowicki, Z. K., Moerschbaecher, J. M., Winsauer, P. J., Digavalli, S. V. and Hornby, P. J. (1999) Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits gastric motility in the rat through cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*, 371, 187-196.
- Kunos, G. and Osei-Hyiaman, D. (2008) Endocannabinoids and liver disease. IV. Endocannabinoid involvement in obesity and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G1101-1104.
- Kuusi, T., Saarinen, P. and Nikkila, E. A. (1980) Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man. *Atherosclerosis*, 36, 589-593.
- Lafontan, M. and Viguerie, N. (2006) Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol*, 6, 580-585.
- Lambert, G., Chase, M. B., Dugi, K., Bensadoun, A., Brewer, H. B., Jr. and Santamarina-Fojo, S. (1999) Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J Lipid Res*, 40, 1294-1303.
- Lan, R., Gatley, J., Lu, Q., Fan, P., Fernando, S. R., Volkow, N. D., Pertwee, R. and Makriyannis, A. (1999) Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci*, 1, E4.
- Landi, M., Croci, T., Rinaldi-Carmona, M., Maffrand, J. P., Le Fur, G. and Manara, L. (2002) Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol*, 450, 77-83.
- Lau, D. C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P. E. and Verma, S. (2005) Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H2031-2041.
- Laychock, S. G., Hoffman, J. M., Meisel, E. and Bilgin, S. (1986) Pancreatic islet arachidonic acid turnover and metabolism and insulin release in response to delta-9-tetrahydrocannabinol. *Biochem Pharmacol*, 35, 2003-2008.

## Bibliographie

- Le Roith, D. and Zick, Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24, 588-597.
- Lefebvre, P. (2003) [Non-insulin-dependent diabetes: an expanding disease. Importance of a multidisciplinary approach]. *Bull Acad Natl Med*, 187, 1307-1315; discussion 1315-1306.
- Lehmann, A., Blackshaw, L. A., Branden, L., Carlsson, A., Jensen, J., Nygren, E. and Smid, S. D. (2002) Cannabinoid receptor agonism inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux in dogs. *Gastroenterology*, 123, 1129-1134.
- Lever, I. J. and Rice, A. S. (2007) Cannabinoids and pain. *Handb Exp Pharmacol*, 265-306.
- Li, C., Jones, P. M. and Persaud, S. J. (2010) Cannabinoid receptors are coupled to stimulation of insulin secretion from mouse MIN6 beta-cells. *Cell Physiol Biochem*, 26, 187-196.
- Lihn, A. S., Bruun, J. M., He, G., Pedersen, S. B., Jensen, P. F. and Richelsen, B. (2004) Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol*, 219, 9-15.
- Lindborg, K. A., Teachey, M. K., Jacob, S. and Henriksen, E. J. (2010) Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12, 722-730.
- Liu, J., Li, H., Burstein, S. H., Zurier, R. B. and Chen, J. D. (2003) Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol*, 63, 983-992.
- Liu, Y. L., Connoley, I. P., Wilson, C. A. and 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. *Int J Obes (Lond)*, 29, 183-187.
- Lofgren, P., Sjolind, E., Wahlen, K. and Hoffstedt, J. (2007) Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1555-1559.
- Lopez-Moreno, J. A., Gonzalez-Cuevas, G., Moreno, G. and Navarro, M. (2008) The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addict Biol*, 13, 160-187.
- Lotersztajn, S., Julien, B., Teixeira-Clerc, F., Grenard, P. and Mallat, A. (2005) Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 605-628.
- Lotersztajn, S., Teixeira-Clerc, F., Hezode, C., Tran van Nhieu, J., Deveaux, V. and Mallat, A. (2007) [Endocannabinoids: therapeutic perspectives in chronic liver diseases]. *Gastroenterol Clin Biol*, 31, 255-258.
- LoVerme, J., Duranti, A., Tontini, A., Spadoni, G., Mor, M., Rivara, S., Stella, N., Xu, C., Tarzia, G. and Piomelli, D. (2009) Synthesis and characterization of a peripherally restricted CB1 cannabinoid antagonist, URB447, that reduces feeding and body-weight gain in mice. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 639-643.
- LoVerme, J., Russo, R., La Rana, G., Fu, J., Farthing, J., Mattace-Raso, G., Meli, R., Hohmann, A., Calignano, A. and Piomelli, D. (2006) Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J Pharmacol Exp Ther*, 319, 1051-1061.
- Luc, G., Bard, J. M., Juhan-Vague, I., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Arveiler, D., Fruchart, J. C. and Ducimetiere, P. (2003) C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1255-1261.
- Luyckx, F. H., Lefebvre, P. J. and Scheen, A. J. (2000) Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab*, 26, 98-106.
- Maccarrone, M., Di Rienzo, M., Finazzi-Agro, A. and Rossi, A. (2003) Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. *J Biol Chem*, 278, 13318-13324.

## Bibliographie

- Maccarrone, M., Lorenzon, T., Bari, M., Melino, G. and Finazzi-Agro, A. (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem*, 275, 31938-31945.
- Maccarrone, M., Rossi, S., Bari, M., De Chiara, V., Fezza, F., Musella, A., Gasperi, V., Prosperetti, C., Bernardi, G., Finazzi-Agro, A., Cravatt, B. F. and Centonze, D. (2008) Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci*, 11, 152-159.
- Mach, F., Montecucco, F. and Steffens, S. (2008) Cannabinoid receptors in acute and chronic complications of atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 153, 290-298.
- Mach, F. and Steffens, S. (2008) The role of the endocannabinoid system in atherosclerosis. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 53-57.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*, 8, 731-737.
- Magnuson, M. A., Andreone, T. L., Printz, R. L., Koch, S. and Granner, D. K. (1989) Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4838-4842.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lazdunski, M. and Honore, E. (2001) The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J*, 20, 47-54.
- Mallat, A. (1998) Hepatic stellate cells and intrahepatic modulation of portal pressure. *Digestion*, 59, 416-419.
- Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2008) Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G9-G12.
- Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., Deveaux, V. and Lotersztajn, S. (2007) Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 11, 403-409.
- Malmejac, J. (1962) Etape pulmonaire. *Elements de physiologie* (4eme édition) Editions médicales flammation, 261-295.
- Manara, L., Croci, T., Guagnini, F., Rinaldi-Carmona, M., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Mukenge, S. and Ferla, G. (2002) Functional assessment of neuronal cannabinoid receptors in the muscular layers of human ileum and colon. *Dig Liver Dis*, 34, 262-269.
- Marques-Vidal, P., Azema, C., Collet, X., Vieu, C., Chap, H. and Perret, B. (1994) Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *J Lipid Res*, 35, 373-384.
- Martorell, R., Khan, L. K., Hughes, M. L. and Grummer-Strawn, L. M. (2000) Obesity in women from developing countries. *Eur J Clin Nutr*, 54, 247-252.
- Massa, F., Marsicano, G., Hermann, H., Cannich, A., Monory, K., Cravatt, B. F., Ferri, G. L., Sibaev, A., Storr, M. and Lutz, B. (2004) The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest*, 113, 1202-1209.
- Massillon, D., Barzilai, N., Chen, W., Hu, M. and Rossetti, L. (1996) Glucose regulates in vivo glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *J Biol Chem*, 271, 9871-9874.
- Mathison, R., Ho, W., Pittman, Q. J., Davison, J. S. and Sharkey, K. A. (2004) Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol*, 142, 1247-1254.
- Matias, I. and Di Marzo, V. (2007) Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*, 18, 27-37.
- 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. and Di

## Bibliographie

- Marzo, V. (2006) Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 3171-3180.
- Matias, I., Petrosino, S., Racioppi, A., Capasso, R., Izzo, A. A. and Di Marzo, V. (2008) Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol*, 286, S66-78.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. and Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-564.
- McAllister, S. D. and Glass, M. (2002) CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 161-171.
- McGrane, M. M., Yun, J. S., Patel, Y. M. and Hanson, R. W. (1992) Metabolic control of gene expression: in vivo studies with transgenic mice. *Trends Biochem Sci*, 17, 40-44.
- 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. and et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50, 83-90.
- Mechoulam, R. and Fride, E. (2001) Physiology. A hunger for cannabinoids. *Nature*, 410, 763, 765.
- Medina, J., Fernandez-Salazar, L. I., Garcia-Buey, L. and Moreno-Otero, R. (2004) Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care*, 27, 2057-2066.
- Mendez-Sanchez, N., Zamora-Valdes, D., Pichardo-Bahena, R., Barredo-Prieto, B., Ponciano-Rodriguez, G., Bermejo-Martínez, L., Chavez-Tapia, N. C., Baptista-González, H. A. and Uribe, M. (2007) Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 27, 215-219.
- Mezey, E., Toth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P. M. and Szallasi, A. (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3655-3660.
- Mokdad, A. H., Bowman, B. A., Ford, E. S., Vinicor, F., Marks, J. S. and Koplan, J. P. (2001) The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA*, 286, 1195-1200.
- Moller, D. E. and Berger, J. P. (2003) Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27 Suppl 3, S17-21.
- Monteleone, P., Matias, I., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Maj, M. and 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*, 30, 1216-1221.
- Mosca, L. (2002) C-reactive protein--to screen or not to screen? *N Engl J Med*, 347, 1615-1617.
- Muccioli, G. G., Naslain, D., Backhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M. and Cani, P. D. (2010) The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol*, 6.
- Mukhopadhyay, B., Liu, J., Osei-Hyiaman, D., Godlewski, G., Mukhopadhyay, P., Wang, L., Jeong, W. I., Gao, B., Duyster, G., Mackie, K., Kojima, S. and Kunos, G. (2010) Transcriptional regulation of cannabinoid receptor-1 expression in the liver by retinoic acid acting via retinoic acid receptor-gamma. *J Biol Chem*, 285, 19002-19011.
- Munoz-Luque, J., Ros, J., Fernandez-Varo, G., Tugues, S., Morales-Ruiz, M., Alvarez, C. E., Friedman, S. L., Arroyo, V. and Jimenez, W. (2008) Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 475-483.
- Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-65.

## Bibliographie

- Murthy, M. S. and Pande, S. V. (1987) Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 378-382.
- Musi, N. (2006) AMP-activated protein kinase and type 2 diabetes. *Curr Med Chem*, 13, 583-589.
- Nadler, S. T., Stoehr, J. P., Schueler, K. L., Tanimoto, G., Yandell, B. S. and Attie, A. D. (2000) The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11371-11376.
- Nakata, M. and Yada, T. (2008) Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. *Regul Pept*, 145, 49-53.
- NCEP (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285, 2486-2497.
- Newman, Z., Malik, P., Wu, T. Y., Ochoa, C., Watsa, N. and Lindgren, C. (2007) Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*, 25, 1619-1630.
- Nijstad, N., Wiersma, H., Gautier, T., van der Giet, M., Maugeais, C. and Tietge, U. J. (2009) Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem*, 284, 6093-6100.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. and Carruba, M. O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299, 896-899.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S. and Carruba, M. O. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, 310, 314-317.
- Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Wolski, K., Rodes-Cabau, J., Cannon, C. P., Deanfield, J. E., Despres, J. P., Kastelein, J. J., Steinhubl, S. R., Kapadia, S., Yasin, M., Ruzyllo, W., Gaudin, C., Job, B., Hu, B., Bhatt, D. L., Lincoff, A. M. and Tuzcu, E. M. (2008) Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*, 299, 1547-1560.
- Niswender, K. D., Shiota, M., Postic, C., Cherrington, A. D. and Magnuson, M. A. (1997) Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem*, 272, 22570-22575.
- Nogueiras, R., Veyrat-Durebex, C., Suchanek, P. M., Klein, M., Tschop, J., Caldwell, C., Woods, S. C., Wittmann, G., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., Reizes, O., Rohner-Jeanrenaud, F. and Tschop, M. H. (2008) Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes*, 57, 2977-2991.
- O'Sullivan, S. E. (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, 152, 576-582.
- O'Sullivan, S. E., Tarling, E. J., Bennett, A. J., Kendall, D. A. and Randall, M. D. (2005) Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 824-831.
- ObEpi (2010) Cinquième enquête épidémiologique nationale ObÉpi-Roche 2009 rendue publique le 27 janvier 2010.  
[http://www.roche.fr/gear/newcontents/servlet/staticfilesServlet?type=data&communityId=re719001&id=static/attachedfile/re7300002/re72700003/AttachedFile\\_10101.pdf](http://www.roche.fr/gear/newcontents/servlet/staticfilesServlet?type=data&communityId=re719001&id=static/attachedfile/re7300002/re72700003/AttachedFile_10101.pdf)

## Bibliographie

- Ogiwara, H., Tanabe, T., Nikawa, J. and Numa, S. (1978) Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex. *Eur J Biochem*, 89, 33-41.
- OMS (2005) Le surpoids et l'obésité en quelques chiffres. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/index.html>.
- Ong, J. P. and Younossi, Z. M. (2007) Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis*, 11, 1-16, vii.
- Oral, E. A., Simha, V., Ruiz, E., Andewelt, A., Premkumar, A., Snell, P., Wagner, A. J., DePaoli, A. M., Reitman, M. L., Taylor, S. I., Gorden, P. and Garg, A. (2002) Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*, 346, 570-578.
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L. and Kunos, G. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115, 1298-1305.
- Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Zhou, L., Godlewski, G., Harvey-White, J., Jeong, W. I., Batkai, S., Marsicano, G., Lutz, B., Buettner, C. and Kunos, G. (2008) Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest*, 118, 3160-3169.
- Otto, B., Spranger, J., Benoit, S. C., Clegg, D. J. and Tschop, M. H. (2005) The many faces of ghrelin: new perspectives for nutrition research? *Br J Nutr*, 93, 765-771.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 100, 2473-2476.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Hotta, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2001) Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 103, 1057-1063.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Okamoto, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2000) Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*, 102, 1296-1301.
- Pacheco, M. A., Ward, S. J. and Childers, S. R. (1993) Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells. *Brain Res*, 603, 102-110.
- Pacher, P., Batkai, S. and Kunos, G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58, 389-462.
- Pacher, P. and Gao, B. (2008) Endocannabinoids and liver disease. III. Endocannabinoid effects on immune cells: implications for inflammatory liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G850-854.
- Padwal, R. S. and Majumdar, S. R. (2007) Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*, 369, 71-77.
- Pagano, C., Pilon, C., Calcagno, A., Urbanet, R., Rossato, M., Milan, G., Bianchi, K., Rizzuto, R., Bernante, P., Federspil, G. and Vettor, R. (2007) The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 4810-4819.
- Pagano, C., Rossato, M. and Vettor, R. (2008) Endocannabinoids, adipose tissue and lipid metabolism. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 124-129.

## Bibliographie

- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. and Pasquali, R. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 27, 73-100.
- Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., Engel, J., Brownlee, M. and Scherer, P. E. (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 278, 9073-9085.
- Pardina, E., Baena-Fustegueras, J. A., Catalan, R., Galard, R., Lecube, A., Fort, J. M., Allende, H., Vargas, V. and Peinado-Onsurbe, J. (2009) Increased expression and activity of hepatic lipase in the liver of morbidly obese adult patients in relation to lipid content. *Obes Surg*, 19, 894-904.
- Partosoedarso, E. R., Abrahams, T. P., Scullion, R. T., Moerschbaeher, J. M. and Hornby, P. J. (2003) Cannabinoid1 receptor in the dorsal vagal complex modulates lower oesophageal sphincter relaxation in ferrets. *J Physiol*, 550, 149-158.
- Patel, S., Cravatt, B. F. and Hillard, C. J. (2005) Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 30, 497-507.
- Pavon, F. J., Bilbao, A., Hernandez-Folgado, L., Cippitelli, A., Jagerovic, N., Abellan, G., Rodriguez-Franco, M. A., Serrano, A., Macias, M., Gomez, R., Navarro, M., Goya, P. and Rodriguez de Fonseca, F. (2006) Antiobesity effects of the novel in vivo neutral cannabinoid receptor antagonist 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1H-1,2,4-triazole--LH 21. *Neuropharmacology*, 51, 358-366.
- Pavon, F. J., Serrano, A., Perez-Valero, V., Jagerovic, N., Hernandez-Folgado, L., Bermudez-Silva, F. J., Macias, M., Goya, P. and de Fonseca, F. R. (2008) Central versus peripheral antagonism of cannabinoid CB1 receptor in obesity: effects of LH-21, a peripherally acting neutral cannabinoid receptor antagonist, in Zucker rats. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 116-123.
- Perreault, M. and Marette, A. (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*, 7, 1138-1143.
- Perret, B., Mabile, L., Martinez, L., Terce, F., Barbaras, R. and Collet, X. (2002) Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res*, 43, 1163-1169.
- Perrini, S., Laviola, L., Cignarelli, A., Melchiorre, M., De Stefano, F., Caccioppoli, C., Natalicchio, A., Orlando, M. R., Garruti, G., De Fazio, M., Catalano, G., Memeo, V., Giorgino, R. and Giorgino, F. (2008) Fat depot-related differences in gene expression, adiponectin secretion, and insulin action and signalling in human adipocytes differentiated in vitro from precursor stromal cells. *Diabetologia*, 51, 155-164.
- Persegol, L., Verges, B., Foissac, M., Gambert, P. and Duvillard, L. (2006) Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. *Diabetologia*, 49, 1380-1386.
- Pertwee, R. G. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem*, 6, 635-664.
- Pertwee, R. G. (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*, 48, 859-867.
- Pi-Sunyer, F. X., Aronne, L. J., Heshmati, H. M., Devin, J. and Rosenstock, J. (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, 761-775.
- Picard, F., Naimi, N., Richard, D. and Deshaies, Y. (1999) Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes*, 48, 452-459.
- Pinto, L., Capasso, R., Di Carlo, G. and Izzo, A. A. (2002a) Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 333-341.
- Pinto, L., Izzo, A. A., Cascio, M. G., Bisogno, T., Hospodar-Scott, K., Brown, D. R., Mascolo, N., Di Marzo, V. and Capasso, F. (2002b) Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology*, 123, 227-234.

## Bibliographie

- Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4, 873-884.
- Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S. Y., Goutopoulos, A., Xie, X. Q. and Makriyannis, A. (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5802-5807.
- Pocai, A., Obici, S., Schwartz, G. J. and Rossetti, L. (2005) A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab*, 1, 53-61.
- Poirier, B., Bidouard, J. P., Cadrouvele, C., Marniquet, X., Staels, B., O'Connor, S. E., Janiak, P. and Herbert, J. M. (2005) The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab*, 7, 65-72.
- Poussin, C., Hall, D., Minehira, K., Galzin, A. M., Tarussio, D. and Thorens, B. (2008) Different transcriptional control of metabolism and extracellular matrix in visceral and subcutaneous fat of obese and rimonabant treated mice. *PLoS One*, 3, e3385.
- Prestifilippo, J. P., Fernandez-Solari, J., de la Cal, C., Iribarne, M., Suburo, A. M., Rettori, V., McCann, S. M. and Elverdin, J. C. (2006) Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231, 1421-1429.
- Price, R. A. and Gottesman, II (1991) Body fat in identical twins reared apart: roles for genes and environment. *Behav Genet*, 21, 1-7.
- Prieur, X., Tung, Y. C., Griffin, J. L., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S. and Coll, A. P. (2008) Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake. *Endocrinology*, 149, 5432-5439.
- Raccah, D., Janand-Delenne, B. and Vague, P. (1999) [Non-insulin-dependent diabetes]. *Rev Prat*, 49, 629-634.
- Ravinet Trillou, C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J. P. and Soubrie, P. (2003) Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R345-353.
- Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M. and Soubrie, P. (2004) CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28, 640-648.
- Reuben, A. (2008) Alcohol and the liver. *Curr Opin Gastroenterol*, 24, 328-338.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D. and et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, 350, 240-244.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J. M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Breliere, J. C. and Le Fur, G. L. (1998) SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 644-650.
- Rivers, J. R. and Ashton, J. C. (2010) The development of cannabinoid CBII receptor agonists for the treatment of central neuropathies. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 10, 47-64.
- Robichon, C., Girard, J. and Postic, C. (2008) [Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP]. *Med Sci (Paris)*, 24, 841-846.
- Roche, R., Hoareau, L., Bes-Houtmann, S., Gonthier, M. P., Laborde, C., Baron, J. F., Haffaf, Y., Cesari, M. and Festy, F. (2006) Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol*, 126, 177-187.
- Rockey, D. C. (2006) Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis*, 10, 459-479, vii-viii.
- Rockwell, C. E., Snider, N. T., Thompson, J. T., Vanden Heuvel, J. P. and Kaminski, N. E. (2006) Interleukin-2 suppression by 2-arachidonoyl glycerol is mediated through peroxisome

## Bibliographie

- proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol*, 70, 101-111.
- Ronesi, J., Gerdeman, G. L. and Lovinger, D. M. (2004) Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci*, 24, 1673-1679.
- Ross, R. A., Craib, S. J., Stevenson, L. A., Pertwee, R. G., Henderson, A., Toole, J. and Ellington, H. C. (2002) Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 900-907.
- Rozen, R., Banegas, E., Davilla, M. and Apfelbaum, M. (1984) Effects of a very-low-calorie diet on adrenergic responsiveness in human adipose tissue. *Int J Obes*, 8, 141-149.
- Ruan, H. and Lodish, H. F. (2003) Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 447-455.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. and Greasley, P. J. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152, 1092-1101.
- Sagan, S., Venance, L., Torrens, Y., Cordier, J., Glowinski, J. and Giaume, C. (1999) Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci*, 11, 691-699.
- Sanofi-aventis (2008) Sanofi-aventis is complying with the EMEA's recommendation to temporarily suspend the marketing authorisation of Acomplia in obese and overweight patients [press release]. <http://www.sanofi-aventis.ca/live/ca/medias/28852FA7-9BC8-44FB-AAC9-81ECE7EA5870.pdf>.
- Satoh, H., Nguyen, M. T., Trujillo, M., Imamura, T., Usui, I., Scherer, P. E. and Olefsky, J. M. (2005) Adenovirus-mediated adiponectin expression augments skeletal muscle insulin sensitivity in male Wistar rats. *Diabetes*, 54, 1304-1313.
- Scheen, A. J., Finer, N., Hollander, P., Jensen, M. D. and Van Gaal, L. F. (2006) Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet*, 368, 1660-1672.
- Scheen, A. J. and Paquot, N. (2008) Inhibitors of cannabinoid receptors and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 505-511.
- Schonfeld, G., Patterson, B. W., Yablonskiy, D. A., Tanoli, T. S., Aversa, M., Elias, N., Yue, P. and Ackerman, J. (2003) Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *J Lipid Res*, 44, 470-478.
- Schoonjans, K., Staels, B. and Auwerx, J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1302, 93-109.
- Schweitzer, P. (2000) Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*, 20, 51-58.
- Semenkovich, C. F., Wims, M., Noe, L., Etienne, J. and Chan, L. (1989) Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem*, 264, 9030-9038.
- Sengenes, C., Moro, C., Galitzky, J., Berlan, M. and Lafontan, M. (2005) Les peptides natriurétiques: une nouvelle voie de régulation de la lipolyse chez l'homme. *M/S: médecine sciences*, 21, 61-65.
- Seoane, J., Gomez-Foix, A. M., O'Doherty, R. M., Gomez-Ara, C., Newgard, C. B. and Guinovart, J. J. (1996) Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *J Biol Chem*, 271, 23756-23760.

## Bibliographie

- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H. and Flier, J. S. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116, 3015-3025.
- Shimano, H. (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*, 40, 439-452.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13656-13661.
- Shimomura, I., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1998) Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev*, 12, 3182-3194.
- Showalter, V. M., Compton, D. R., Martin, B. R. and Abood, M. E. (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 278, 989-999.
- Shulman, G. I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106, 171-176.
- Siegmund, S. V., Qian, T., de Minicis, S., Harvey-White, J., Kunos, G., Vinod, K. Y., Hungund, B. and Schwabe, R. F. (2007) The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J*, 21, 2798-2806.
- Siegmund, S. V. and Schwabe, R. F. (2008) Endocannabinoids and Liver Disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G357-362.
- Siegmund, S. V., Uchinami, H., Osawa, Y., Brenner, D. A. and Schwabe, R. F. (2005) Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology*, 41, 1085-1095.
- Siler, J. F., Sheep, W. L. and Bates, L. B. (1933) Marihuana smokin in Panama. *Mil Surg* 73, 269-280.
- Simiand, J., Keane, M., Keane, P. E. and Soubrie, P. (1998) SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol*, 9, 179-181.
- Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., Chambers, J. K., Randall, A. D. and Davis, J. B. (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol*, 129, 227-230.
- 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., Moon, H. S., Kim, S. H., Shin, Y. G. and Yoon, S. H. (2010) Peripherally acting CB1-receptor antagonist: the relative importance of central and peripheral CB1 receptors in adiposity control. *Int J Obes (Lond)*, 34, 547-556.
- Spoto, B., Fezza, F., Parlongo, G., Battista, N., Sgro, E., Gasperi, V., Zoccali, C. and Maccarrone, M. (2006) Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie*, 88, 1889-1897.
- Starowicz, K. M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A. A. and Di Marzo, V. (2008) Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 553-565.
- Staton, P. C., Hatcher, J. P., Walker, D. J., Morrison, A. D., Shapland, E. M., Hughes, J. P., Chong, E., Mander, P. K., Green, P. J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H. C., Smith, J. C., Bailey, L. T., Wise, A., Brown, A. J., Richardson, J. C. and Chessell, I. P. (2008) The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 139, 225-236.
- Stella, N., Schweitzer, P. and Piomelli, D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388, 773-778.
- Stienstra, R., Duval, C., Muller, M. and Kersten, S. (2007) PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*, 2007, 95974.

## Bibliographie

- Sun, Y., Alexander, S. P., Kendall, D. A. and Bennett, A. J. (2006) Cannabinoids and PPAR $\alpha$  signalling. *Biochem Soc Trans*, 34, 1095-1097.
- Szallasi, A. and Blumberg, P. M. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51, 159-212.
- Tam, J., Vemuri, V. K., Liu, J., BÅitkai, S. n., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S. V., Pickel, J., Makriyannis, A. and Kunos, G. (2010) Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 2953-2966.
- Tedesco, L., Valerio, A., Cervino, C., Cardile, A., Pagano, C., Vettor, R., Pasquali, R., Carruba, M. O., Marsicano, G., Lutz, B., Pagotto, U. and Nisoli, E. (2008) Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes*, 57, 2028-2036.
- Teixeira-Clerc, F., Belot, M. P., Manin, S., Deveaux, V., Cadoudal, T., Chobert, M. N., Louvet, A., Zimmer, A., Tordjmann, T., Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2010) Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology*, 52, 1046-1059.
- Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Hezode, C., Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2008) [The endocannabinoid system as a novel target for the treatment of liver fibrosis]. *Pathol Biol (Paris)*, 56, 36-38.
- Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2006) CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med*, 12, 671-676.
- Tharp, W. G., Lee, Y. H., Maple, R. L. and Pratley, R. E. (2008) The cannabinoid CB1 receptor is expressed in pancreatic delta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 372, 595-600.
- Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., Zhang Cc, C., Itani, S. I., Lodish, H. F. and Ruderman, N. B. (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16309-16313.
- Trujillo, M. E. and Scherer, P. E. (2005) Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*, 257, 167-175.
- Tucci, S. A., Rogers, E. K., Korbonits, M. and Kirkham, T. C. (2004) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol*, 143, 520-523.
- Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. and Hotamisligil, G. S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature*, 389, 610-614.
- Van Gaal, L., Pi-Sunyer, X., Despres, J. P., McCarthy, C. and Scheen, A. (2008a) Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S229-240.
- Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O. and Rossner, S. (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*, 365, 1389-1397.
- Van Gaal, L. F., Scheen, A. J., Rissanen, A. M., Rossner, S., Hanotin, C. and Ziegler, O. (2008b) Long-term effect of CB1 blockade with rimonabant on cardiometabolic risk factors: two year results from the RIO-Europe Study. *Eur Heart J*, 29, 1761-1771.
- Van Sickle, M. D., Oland, L. D., Mackie, K., Davison, J. S. and Sharkey, K. A. (2003) Delta9-tetrahydrocannabinol selectively acts on CB1 receptors in specific regions of dorsal vagal complex to inhibit emesis in ferrets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285, G566-576.

## Bibliographie

- Vassiliou, G. and McPherson, R. (2004) A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholesteryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1669-1675.
- Venance, L., Maldonado, R. and Manzoni, O. (2004) Le système endocannabinoïde central. *M/S: médecine sciences*, 20, 45-53.
- Vettor, R. and Pagano, C. (2009) The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23, 51-63.
- Vidal-Puig, A. J., Considine, R. V., Jimenez-Linan, M., Werman, A., Pories, W. J., Caro, J. F. and Flier, J. S. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*, 99, 2416-2422.
- Wagner, J. A., Varga, K., Jarai, Z. and Kunos, G. (1999) Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension*, 33, 429-434.
- Wajchenberg, B. L. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 21, 697-738.
- Watanabe, T., Kubota, N., Ohsugi, M., Kubota, T., Takamoto, I., Iwabu, M., Awazawa, M., Katsuyama, H., Hasegawa, C., Tokuyama, K., Moroi, M., Sugi, K., Yamauchi, T., Noda, T., Nagai, R., Terauchi, Y., Tobe, K., Ueki, K. and Kadowaki, T. (2009) Rimonabant ameliorates insulin resistance via both adiponectin-dependent and adiponectin-independent pathways. *J Biol Chem*, 284, 1803-1812.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W., Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1796-1808.
- Weitz-Schmidt, G. (2002) Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci*, 23, 482-486.
- Wellen, K. E. and Hotamisligil, G. S. (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1785-1788.
- Wellen, K. E. and Hotamisligil, G. S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115, 1111-1119.
- Westerbacka, J., Kolak, M., Kiviluoto, T., Arkkila, P., Siren, J., Hamsten, A., Fisher, R. M. and Yki-Jarvinen, H. (2007) Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes*, 56, 2759-2765.
- White, M. F. (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E413-422.
- White, R., Ho, W. S., Bottrill, F. E., Ford, W. R. and Hiley, C. R. (2001) Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol*, 134, 921-929.
- Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A. and Prins, J. B. (2006) Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*, 8, 264-280.
- WHO (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Part I: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. . Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wierzbicki, A. S. (2006) Rimonabant: endocannabinoid inhibition for the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract*, 60, 1697-1706.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
- Williams, C. M. and Kirkham, T. C. (1999) Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 143, 315-317.

## Bibliographie

- Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P. and Corvera, S. (2004) Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*, 114, 1281-1289.
- Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T. J., Scalia, R. and Goldstein, B. J. (2003) Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes*, 52, 1355-1363.
- Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S. and Cooper, G. J. (2003) The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*, 112, 91-100.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2003a) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423, 762-769.
- 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. and Kadowaki, T. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 8, 1288-1295.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., Takata, M., Eto, K., Terauchi, Y., Komeda, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohnishi, Y., Naitoh, T., Yamamura, K., Ueyama, Y., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2003b) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*, 278, 2461-2468.
- 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., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, 7, 941-946.
- Yan, Z. C., Liu, D. Y., Zhang, L. L., Shen, C. Y., Ma, Q. L., Cao, T. B., Wang, L. J., Nie, H., Zidek, W., Tepel, M. and Zhu, Z. M. (2007) Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 427-433.
- Yanovski, S. Z. and Yanovski, J. A. (2002) Obesity. *N Engl J Med*, 346, 591-602.
- Yin, M. J., Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, 396, 77-80.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. and Moller, D. E. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108, 1167-1174.
- Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C. and Ravussin, E. (1990) Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest*, 86, 1423-1427.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. and Hogestatt, E. D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-457.

# Annexes

## **PUBLICATIONS**

### **Articles issus des travaux réalisés au cours du M2R :**

Degrace, P., Demizieux, L., Du, Z. Y., Gresti, J., Caverot, L., Djaouti, L., Jourdan, T., Moindrot, B., Guillard, J. C., Hocquette, J. F. and Clouet, P. (2007) Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 282, 20816-20826.

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Verges, B. and Degrace, P. (2009) Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Nutr*, 139, 1901-1907.

### **Articles issus des travaux de thèse :**

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Verges, B. and 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, 926-934.

Jourdan, T., Demizieux, L., Djaouti, L., Gresti, J., Verges, B. and Degrace, P. (2010) Antagonism of peripheral hepatic CB1R improves liver energy metabolism : Evidence from cultured explants. *En préparation*

### **Articles issus de collaborations au cours de la thèse de doctorat:**

Saez, G., Davail, S., Gentes, G., Hocquette, J. F., Jourdan, T., Degrace, P. and Baeza, E. (2009) Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poult Sci*, 88, 2382-2391.

Djaouti L., Jourdan T., Demizieux L., Chevrot M., Gresti J., Vergès B. and Degrace P. (2010) Comparative effects of Pioglitazone and Rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants. *Diabetes Metab Res Rev*, 26, 297-305.

### **Abstracts publiés**

Djaouti L., Jourdan T., Demizieux L., Chevrot M., Gresti J., Vergès B. and Degrace P. (2009) Pioglitazone and Rosiglitazone have significantly different effects on lipid metabolites in mouse cultured liver explants. 45th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Vienne, Autriche.

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Verges, B. and Degrace, P. (2010) CB1 antagonism exerts specific effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. XIth International Congress on Obesity (ICO), Stockholm, Suède (T2:OS2.5).

## **COMMUNICATIONS**

### **Communications orales**

2009 : Communication orale lors du XVe forum des jeunes chercheurs à Dijon, France

2010 : Communication orale lors du XIe « international congress on obesity » à Stockholm, Suède

### **Communications affichées**

2008 : Présentation d'un poster lors du XIVE forum des jeunes chercheurs à Besançon, France.

2008 : Présentation d'un poster lors de la 1ère Journée IFR-Santé-STIC à Dijon, France

2009 : Présentation d'un poster lors 4<sup>ème</sup> congrès Goût-nutrition-santé à Dijon, France

2009 : Présentation d'un poster lors du 45e «European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting» à Vienne, Autriche.

## Liver Carbohydrate and Lipid Metabolism of Insulin-Deficient Mice Is Altered by *trans*-10, *cis*-12 Conjugated Linoleic Acid<sup>1,2</sup>

Tony Jourdan, Louiza Djaouti, Laurent Demizieux, Joseph Gresti, Bruno Vergès, and Pascal Degrace\*

Unité Mixte de Recherche 866 INSERM-Université de Bourgogne, Equipe physiopathologie des dyslipidémies, Faculté des Sciences Gabriel, 21000 Dijon, France

### Abstract

Feeding mice the *trans*-10, *cis*-12 ( $\tau$ 10 $\tau$ 12) conjugated linoleic acid (CLA) isomer is associated with lipodystrophy, insulin resistance, hyperinsulinemia, and liver steatosis. It has been hypothesized that CLA-induced liver steatosis is the result of increased hepatic lipogenesis stimulated by high insulin levels. We studied the effects of a 12-d  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA treatment (1 g/100 g diet) on liver carbohydrate and lipid metabolism in control and streptozotocin (STZ)-injected mice. STZ mice were characterized by insulin deficiency, hypertriglyceridemia, and depletion of liver triglyceride and glycogen. Remarkably, feeding  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA to diabetic mice (STZ-CLA) normalized these variables. Reconstitution of fat stores in the livers of STZ-CLA mice was associated with lower fatty acid (FA) oxidation rates and greater malonyl-CoA concentration than in STZ mice. FA translocase and VLDL receptor mRNA levels were greater in STZ-CLA than in STZ mice, suggesting that  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA increased liver lipid uptake. Phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels and AMP kinase phosphorylation were lower in STZ-CLA than in STZ mice, indicating that  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA may reduce gluconeogenic activity and promote glycogenesis in diabetic mice. Because glycemia and glucokinase expression were not modified by  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA treatment, we postulated that glycogen accumulation is likely not the result of an effect of  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA on plasma glucose utilization, but rather is due to the contribution of lactate, the concentration of which was higher in muscle of STZ-CLA mice. The results demonstrate that  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA stimulates liver lipid accumulation in the absence of insulin and, thus, suggest that  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA can improve liver carbohydrate and lipid metabolism in type I diabetic mice. J. Nutr. 139: 1901–1907, 2009.

### Introduction

Conjugated linoleic acids (CLA)<sup>3</sup> refer to a group of dienolic derivatives of linoleic acid *cis*-9, *cis*-12 18:2(n-6). In most feeding studies, CLA are mainly represented by *cis*-9, *trans*-11 18:2(n-7), the main natural isomer produced in ruminants, and by *trans*-10, *cis*-12 18:2(n-6) ( $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA), which essentially originates from vegetable oil processing. During the last decade, dietary supplementation with CLA mixtures and  $\tau$ 10 $\tau$ 12-isomer alone was associated with reduced fat mass in rodents (1–3), suggesting that  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA may be useful as a weight loss

agent. In humans, some studies also indicated a correlation between CLA consumption and the degree of body weight loss (4–8). Even if CLA have been shown to reduce hyperglycemia in severely insulin-resistant Zucker diabetic rats and, consequently, have been considered as a potential insulin-sensitizing agent (9,10), there is conflicting information on CLA isomer(s) role in beneficial effects on body composition, glucose tolerance, and lipid metabolism in rodents and humans. Obviously, there is some evidence that CLA may give rise to deleterious effects on insulin sensitivity and glycemic control in animals and human studies (11–15). In mice,  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA-induced alterations of lipid and carbohydrate metabolism are particularly marked and associated with severe lipodystrophy, hyperinsulinemia, and liver steatosis (12,16–18). Accumulating evidence indicates that an increase in lipogenesis is primarily responsible for liver triglyceride (TG) accumulation, which may be due to the conversion of glucose not metabolized by atrophied adipose tissue (19–21). Nevertheless, we recently observed that  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA strongly increased mRNA levels of genes involved in hepatic lipid uptake, suggesting that circulating lipids could also account for TG enrichment (22).

Our primary objective in this study was to explore the mechanisms of  $\tau$ 10 $\tau$ 12CLA-induced steatosis in a setting where glucose compared with plasma lipid contribution to TG formation

<sup>1</sup> Author disclosures: T. Jourdan, L. Djaouti, L. Demizieux, J. Gresti, B. Vergès, and P. Degrace, no conflicts of interest.

<sup>2</sup> Supplemental Table 1 is available with the online posting of this paper at [jn.nutrition.org](http://jn.nutrition.org).

<sup>3</sup> Abbreviations used: ACC, acetyl-CoA carboxylase; apo, apolipoprotein; BSA, bovine serum albumin; CLA, conjugated linoleic acid; CON, control mice; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase I; FA, fatty acid; FAS, fatty acid synthase; FAT/CD36, fatty acid translocase; GK, glucokinase; GPDH, glycerol-phosphate dehydrogenase; p-AMPK, phospho-AMP kinase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1; STZ, streptozotocin; STZ-CLA, streptozotocin-injected mice treated with conjugated linoleic acid; TBST, Tris-buffered saline;  $\tau$ 10 $\tau$ 12, *trans*-10, *cis*-12; TG, triglyceride; TPB, TATA box binding protein; VLDLR, VLDL receptor.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [pascal.degrace@u-bourgogne.fr](mailto:pascal.degrace@u-bourgogne.fr).

## Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants

Louiza Djaouti  
Tony Jourdan  
Laurent Demizieux  
Michaël Chevrot  
Joseph Grestì  
Bruno Vergès  
Pascal Degrace\*

UMR 866 INSERM-UB, Team  
Physiopathology of dyslipidemias,  
Faculty of Sciences Gabriel, University  
of Burgundy, Dijon 21000, France

\*Correspondence to:  
Pascal Degrace, UMR 866  
INSERM-UB, Equipe  
Physiopathologie des dyslipidémies,  
Faculté des Sciences Gabriel,  
Université de Bourgogne, 6  
Boulevard Gabriel, Dijon 21000,  
France. E-mail:  
pascal.degrace@u-bourgogne.fr

Received: 29 June 2009  
Revised: 15 January 2010  
Accepted: 25 March 2010

### Abstract

**Background** Pioglitazone (PIO) and rosiglitazone (ROSI) are widely used as oral antidiabetic agents for treatment of type 2 diabetes. Although these medications exert similar effects on blood glucose, recent clinical studies indicated that PIO has a more pronounced beneficial effect on lipid parameters than ROSI. In order to get further insight into the lipid effects of both drugs, we tested whether PIO, compared to ROSI, could exert direct effects on lipid liver metabolism in relation with plasma lipids.

**Methods** We performed *in vitro* studies using mice liver slices incubated 21 h either with ROSI (1  $\mu\text{mol/L}$ ) or PIO (7.5  $\mu\text{mol/L}$ ).

**Results** We showed that both glitazones slightly reduced HMG-CoA reductase mRNA levels at the same degree but only PIO reduced intracellular cholesterol content, suggesting an alteration of cholesterol uptake rather than an inhibition of cholesterol biosynthesis. This concept was supported by the reduction of scavenger receptor class B type I expression, hepatic lipase activity and high-density lipoprotein cholesterol uptake in PIO-treated liver explants. Conversely, hepatic lipase mRNA levels were increased 3.5-fold. ROSI, but not PIO, induced acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase gene expression and increased apoB secretion suggesting a stimulation of lipogenesis. Concurrently, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  mRNA levels were induced by ROSI and not significantly changed by PIO. Besides, PIO appeared to be a more potent activator of AMP-Activated Protein Kinase than ROSI.

**Conclusions** PIO and ROSI exert specific direct effects on liver and extrapolating these data to humans could explain the significant improvements in plasma lipids observed in diabetic patients treated with PIO. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** glitazones; liver explants; lipid metabolism; HDL-C uptake; PPAR; cholesterol

### Introduction

Pioglitazone (PIO) and rosiglitazone (ROSI), two members of the thiazolidinediones (TZDs) family, are widely used as oral antidiabetic agents for treatment of type 2 diabetes [1,2]. These medications have both a glucose-lowering effect and the potential to modify lipid metabolism. Despite

## Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks

G. Saez,\*† S. Davail,\* G. Gentès,‡ J. F. Hocquette,‡ T. Jourdan,§ P. Degrace,§ and E. Baéza†<sup>1</sup>

*\*Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux-Equipe Environnement et Microbiologie, L'institut Universitaire de Technologie des Pays de l'Adour, F-40004 Mont de Marsan Cedex, France; †INRA, UR 83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France; ‡INRA, UR 1213 Herbivores, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France; and §UMR 866 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Université de Bourgogne, Equipe Physiopathologie des Dyslipidémies, Faculté des Sciences, F-21000 Dijon, France*

**ABSTRACT** Independent of their nutritional condition, Pekin ducks always exhibit higher i.m. fat content than Muscovy ducks. To understand this difference between species, the expression level of genes involved in lipid metabolism was analyzed in the pectoralis major muscle of Pekin and Muscovy ducks ad libitum-fed or overfed. The lipoprotein lipase (LPL) gene expression was not different between species and not influenced by overfeeding. The protein content for LPL was higher in Pekin ducks than in Muscovy ducks when birds were ad libitum-fed, whereas in overfed ducks, we found no difference between species. Adipocyte fatty acid-binding protein (A-FABP) gene expression and protein content were higher in Pekin ducks than in Muscovy ducks for each nutritional condition (suggesting a higher intrac-

ellular transport within i.m. adipocytes of fatty acids mainly provided by liver for this species). Overfeeding did not affect the expression of genes involved in oxidation [carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A), cytochrome-c oxidase 4 (COX4), succinyl-coenzyme A:3-ketoacid coenzyme A transferase (SCOT)] but increased the expression of fatty acid synthase (FAS) involved in lipogenesis. For all nutritional conditions, Pekin duck exhibited higher expression levels of CPT1A, COX4, SCOT, and FAS than Muscovy ducks. Results for mRNA SCOT suggested that the muscles of Pekin ducks use ketone bodies as an energy source. In conclusion, i.m. lipogenesis could contribute to the i.m. fat, particularly in Pekin ducks.

**Key words:** duck, fatness, gene expression, lipid metabolism, pectoralis major muscle

2009 Poultry Science 88:2382–2391  
doi:10.3382/ps.2009-00208

### INTRODUCTION

Meat quality is largely influenced by i.m. fat (IMF) content, which affects sensory properties and nutritional values of meats (Ruiz et al., 2001). The IMF content varies between species. For example, in ducks species, Chartrin et al. (2006a) observed different IMF content in pectoralis major (PM) muscle between Muscovy and Pekin ducks ad libitum-fed (2.3 vs. 4.6%) or overfed (3.7 vs 7.6%). De novo lipogenesis is essentially hepatic in avian species (Pearce, 1977); therefore, the differences in IMF content observed between these ducks can result from different mechanisms. Davail et al. (2003) suggested that the degree of liver steatosis and IMF in waterfowls may partly depend on the peripheral ac-

tivity of lipoprotein lipase (LPL). The role of fatty acid-binding protein in the intracellular trafficking of long-chain fatty acids within i.m. adipocytes has been shown to be related to IMF level in different species (Bénistant et al., 1998; Damon et al., 2006; Jurie et al., 2007). It can be also hypothesized that difference in the balance between muscular lipogenesis and oxidation of the long-chain fatty acids (precursor of triacylglycerol synthesis) may be an important factor implicated in different IMF content between species (Jeukendrup, 2002; Holloway et al., 2009) and within species (Gondret et al., 2004).

In this context, the aim of the present study was to determine the effect of species (Muscovy and Pekin ducks) and dietary level (overfeeding and ad libitum feeding) on gene expression and protein content of factors involved in lipid deposition in PM muscle in relation with muscle fat metabolism (lipogenesis and oxidation), muscle ability in lipid uptake via the LPL protein, and the intracellular transport of long-chain

©2009 Poultry Science Association Inc.

Received April 23, 2009.

Accepted July 11, 2009.

<sup>1</sup>Corresponding author: Elisabeth.Baeza@tours.inra.fr

## Regulation of Lipid Flux between Liver and Adipose Tissue during Transient Hepatic Steatosis in Carnitine-depleted Rats\*

Received for publication, December 12, 2006, and in revised form, May 11, 2007. Published, JBC Papers in Press, May 12, 2007, DOI 10.1074/jbc.M611391200

Pascal Degrace<sup>†</sup>, Laurent Demizieux<sup>†</sup>, Zhen-yu Du<sup>†</sup>, Joseph Gresti<sup>†</sup>, Laurent Caverot<sup>†</sup>, Louiza Djaouti<sup>†</sup>, Tony Jourdan<sup>†</sup>, Bastien Moindrot<sup>†</sup>, Jean-Claude Guillard<sup>§</sup>, Jean-François Hocquette<sup>¶</sup>, and Pierre Clouet<sup>†1</sup>

From the <sup>†</sup>UMR 866 INSERM-UB, Equipe Physiopathologie des dyslipidémies, Faculté des Sciences, 21000 Dijon, the <sup>§</sup>LPPCE, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, and the <sup>¶</sup>Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA, 63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

Rats with carnitine deficiency due to trimethylhydrazinium propionate (mildronate) administered at 80 mg/100 g body weight per day for 10 days developed liver steatosis only upon fasting. This study aimed to determine whether the transient steatosis resulted from triglyceride accumulation due to the amount of fatty acids preserved through impaired fatty acid oxidation and/or from up-regulation of lipid exchange between liver and adipose tissue. In liver, mildronate decreased the carnitine content by ~13-fold and, in fasted rats, lowered the palmitate oxidation rate by 50% in the perfused organ, increased 9-fold the triglyceride content, and doubled the hepatic very low density lipoprotein secretion rate. Concomitantly, triglyceridemia was 13-fold greater than in controls. Hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation capacities measured *in vitro* were increased after treatment. Gene expression of hepatic proteins involved in fatty acid oxidation, triglyceride formation, and lipid uptake were all increased and were associated with increased hepatic free fatty acid content in treated rats. In periepididymal adipose tissue, mildronate markedly increased lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activities in fed and fasted rats, respectively. On refeeding, carnitine-depleted rats exhibited a rapid decrease in blood triglycerides and free fatty acids, then after ~2 h, a marked drop of liver triglycerides and a progressive decrease in liver free fatty acids. Data show that up-regulation of liver activities, peripheral lipolysis, and lipoprotein lipase activity were likely essential factors for excess fat deposit and release alternately occurring in liver and adipose tissue of carnitine-depleted rats during the fed/fasted transition.

Fat is mainly deposited in adipose tissue, but is also observed in liver biopsies of humans suffering from disorders originating, for instance, from alcohol abuse, diabetes (1), or intoxications (2). Fat storage usually results from the imbalance of the partitioning of lipids between their utilization as energy sources and

their preservation or synthesis as triglycerides (TG)<sup>2</sup> initially provided by excess feeding or increased lipogenesis (3). Liver steatosis may also exist when the lipoprotein secretion mechanisms are impaired (4, 5). Genetic models of animal obesity (6, 7) and overweight humans (8, 9) have provided information on regulations occurring in adipose tissue and liver, in which fat deposit may be the consequence of actions mediated by insulin, such as inhibition of fatty acid (FA) oxidation (10) or increased lipogenesis (11, 12), and even of hypothalamic injuries (13). Experimental studies have been undertaken to amplify the inhibition of the FA oxidation pathway with drugs that reduce the carnitine-dependent transfer of FA into mitochondria, for example, etomoxir for the carnitine palmitoyltransferase (CPT) I step (14), L-aminocarnitine for the CPT II step (15), or 3,2,2-trimethylhydrazinium propionate (mildronate) for liver carnitine biosynthesis (16, 17). Under normal conditions, liver mitochondrial FA oxidation is inhibited via the insulin secretion in the fed state, whereas TG formation and VLDL secretion are increased (18) without liver fat accumulation. In the present study, we have tried to reproduce the early stage of induction of liver steatosis to know whether liver fat accumulation is associated with severe impairments or appropriate reactions of lipid metabolic pathways, and if a correction for liver steatosis is still possible. In this goal, the inhibition of FA oxidation occurring in the fed state was extended to the fasted state through the mildronate-mediated carnitine depletion to obtain, in a minimum of time, the accumulation of fat in the liver (16, 17). The experimental procedure also aimed to amplify the relationship between liver and adipose tissue in terms of up- or down-regulation occurring during the fed/fasted state transition.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### Animals and Treatments

Official French regulations (number 87848) for the care and use of laboratory animals were followed (number 03056) throughout. Male Wistar rats weighing about 170 g were

\* This work was supported by grants from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France) and the Région Bourgogne (Dijon, France). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Faculté des Sciences Gabriel, 6 Boulevard Gabriel, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France. Tel.: 33-380-39-63-23; Fax: 33-380-39-63-30; E-mail: pclouet@u-bourgogne.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: TG, triglyceride; VLDL, very low density lipoprotein; CPT I, carnitine palmitoyltransferase I; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; FA, fatty acid; FAT/CD36, fatty acid translocase; GPAT, glycerol phosphate acyltransferase; HSL, hormone-sensitive lipase; KB, ketone bodies; LPL, lipoprotein lipase; PAT, periepididymal adipose tissue; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; FFA, free fatty acid.