



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Paul Sabatier Toulouse III

Discipline ou spécialité : Innovation Pharmacologique

---

Présentée et soutenue par Camille ATTANÉ  
Le 17 décembre 2010

## Apeline et métabolisme énergétique : implication dans la résistance à l'insuline

---

### JURY

*Professeur Dominique LANGIN - Président*  
*Professeur Jacques DELARUE - Rapporteur*  
*Professeur Bruno FEVE - Rapporteur*  
*Docteur Jennifer RIEUSSET - Examineur*  
*Professeur Isabelle CASTAN-LAURELL - directrice de thèse*

---

Ecole doctorale : **Biologie Santé Biotechnologies Toulouse**  
Unité de recherche : **INSERM U858 équipe 3**  
Directrice de Thèse : **Pr Isabelle CASTAN-LAURELL**



Pour commencer (même si, chronologiquement ce sont les dernières lignes que je vais écrire), je tiens à remercier un certain nombre de personnes ayant contribué à ce travail de thèse.

Tout d'abord, merci à Monsieur **Bruno Fève**, Monsieur **Jacques Delarue** et Madame **Jennifer Rieusset** d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'avoir engagé une discussion très intéressante lors de la soutenance. Merci également à Monsieur **Dominique Langin** d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse et merci pour tes questions un peu difficiles, il faut le dire, mais très pertinentes...

Merci aussi à **Philippe Valet** de m'avoir prise dans ton équipe pour mon stage de M2R puis pour ces 3 années de thèse. Mais l'histoire a commencé avant le M2R, lorsque j'étais en licence, tu m'as trouvé un stage d'été à l'IPBS chez Cathie Muller. Ca a été le déclic pour moi, c'est là que j'ai compris que c'était ça que je voulais faire, donc un grand merci pour ça aussi. J'en profite du coup pour remercier **Cathie** et sa troupe, car l'histoire a commencé et continué là bas par l'étude du métabolisme des cellules cancéreuses. J'ai vraiment adoré cette collaboration et notamment toutes les manips avec Béra : et oui, il y en a eu pas mal, des cachées et des non-cachées, les idées qui fusent, mes râleries... enfin que des bonnes choses et c'était vraiment très motivant et enrichissant. Merci aussi à Yuan-Yuan qui a pris la relève toujours dans la bonne humeur.

Maintenant un énorme merci à ma directrice de thèse, **Isabelle Castan-Laurell**. C'est difficile de trouver les mots justes. Toi, tu as su les trouver lors de la soutenance, c'était si touchant et j'ai encore les yeux qui brillent quand j'y repense. Tu as dit que j'avais des bonnes étoiles qui veillaient sur moi et tu fais partie de celles qui brillent le plus ! J'ai passé 4 ans avec toi au labo, tu m'as toujours soutenu et donné de ton temps : tu étais toujours là quand mon moral était en baisse, lorsque les manips ne marchaient pas, toujours disponible pour me débloquer sur des présentations orales et pour les corrections de la thèse à tout moment. Merci aussi pour toutes ces belles surprises pour le 17 décembre : je sais qu'il y avait une bonne équipe mais ça a du prendre beaucoup de temps ! Je garderai aussi un super souvenir des bons moments passés ensemble en congrès à Vienne ou des moments partagés comme le concert de -M-, entre autres... C'était vraiment super d'avoir une telle complémentarité avec toi et, pour continuer dans ton parallèle avec la musique, je pense qu'on a fait de beaux accords, on a su changer de tempo ensemble et surtout pour le dernier « mouvement » de ma thèse, c'est sûr on était dans un magnifique *allegro vivace*. Vraiment, un immense merci pour tout !

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes de l'équipe mais avec quelques mentions spéciales. Pour commencer, l'autre **Camille**, ou kamièf : comme on se l'est souvent dit, c'était un bonheur de travailler ensemble, là encore, quelle complémentarité ! Mais au-delà de ça, c'est rare de rencontrer des personnes comme toi qui donnent autant d'elle-même pour aider les autres, toujours disponible pour tout, que ce soit dans la correction (merci aussi **Aurélien** !), l'impression ou la reliure de ma thèse que dans la préparation de mes surprises pour ma thèse ou pour m'aider à choisir ma tenue ou pour nous motiver pour le sport. Merci pour tout ça et reste comme ça ! Merci également à **Daniëfle** (notamment pour tous les explants que tu as pu découper pour diverses manips...), **Sophie, Estelle, Chloé, Chantal, Rodolphe, Danielle, Cédric, Karine** pour leur aide précieuse dans les manips ainsi que pour leur soutien de tous les jours, c'était très important !

Merci aussi au reste de l'équipe : **Thomas** pour ta gentillesse, ton aide (notamment pour End-note) et ton soutien ; **Dédé** pour ta bonne humeur et les phénotypages d'AMPK-DN que tu adorais faire ; **Didi** pour ton soutien et ton aide que ce soit pour les remarques pertinentes mais aussi pour toujours dénicher des publis intéressantes qui m'ont bien aidé ; **Christian** pour ton soutien et ton humour ! ; **Claude** pour tes questions qui piquent et aussi pour m'avoir permis de donner des cours au CNAM, c'était une très bonne expérience ; **Oksana** pour ton soutien ; **Sandra** pour tous les primers mais surtout pour ta sympathie ; **Thibaut** pour tes 14 « bonjours » quotidiens et pour m'avoir aidée dans le formatage des figures en TIFF pour la publi... ; **Pep** pour m'avoir permis de travailler un peu mon anglais... et grâce à toi je n'étais pas seule au labo les week-end !

Je tiens également à remercier 2 personnes qui ne sont plus au labo mais qui ont largement contribué à mon travail. Merci à **Rocio** pour ton aide mais surtout pour ta bonne humeur, ton entrain, tes lapsus (in)volontaires, c'était super de travailler avec toi. Un grand merci à **Veronic Bézaire** pour beaucoup de choses... Tu m'as beaucoup appris au début de ma thèse sur les mitochondries, la  $\beta$ -ox, les activités mitochondriales mais aussi tu as donné pas mal de ton temps dans l'analyse des résultats puis dans la relecture de la publi avant la soumission, et maintenant tu m'aides pour ma recherche de post-doc. Merci, c'est l'fun !

Merci également aux personnes qui ont collaboré à ce travail de thèse : **Thierry Levade** pour le dosage des acylcarnitines ; **Luc Pénicaud** et **Alexandre Bénani** pour la respiration mitochondriale ; la **plateforme de Phénotypage**, en particulier **Aurore** et **Laurent** ; le **service de zootechnie** ; la **plateforme de Lipidomique** pour la quantification des diglycérides et céramides ; **Physiogenex** pour le turn-over des lipides. Merci également à **François Crampes** pour son aide dans l'interprétation des résultats et son soutien.

Enfin, merci aux amis du labo ! Et oui, en 4 ans on fait de chouettes rencontres... Merci à **Amandine** pour ton soutien, ta gentillesse, ces bons moments à Amsterdam mais aussi à Toulouse. Comme Kamiëf toujours là pour m'aider dans le speed, pour relire ou imprimer ma thèse... ; **Marion** pour ton soutien, ta gentillesse et là encore ces bons moments entre apéros, ski et bons repas avec du bon vin bien sûr ! ; **Balbine**, ma testeuse de « camilloritos » officielle, merci pour ta gentillesse, nos discussions sur la musique, nos délires à Condom et au ski, pour avoir prêté ta voix à « l'effet Attané » et pour ce super photomontage ... et merci à **Cyril** pour ce bel accompagnement à la guitare ; **Coralie** et **Virginie** pour votre gentillesse, votre soutien et aux bons moments passés ensemble ; **Anne-Laure** pour ces bons moments entre piscine et petits apéro d'après-piscine ; **Carine** pour ta bonne compagnie en radioactivité et **Aline** pour les questions de 18h ; **Gene** pour ton soutien ; **Cédric M** pour tes chansons en salle de radioactivité ! **Katie** pour ta gentillesse et pour avoir instauré les goutaillons et merci à l'ensemble de l'équipe 4 qui contribue à la bonne humeur et au dynamisme du 2<sup>ème</sup> étage !

Et merci à tous pour ces supers photos en -M-, c'était une très bonne idée et je garderai ces photos précieusement. Merci, pour tous ces cadeaux, pour ces moments d'émotions, pour les chansons revues et corrigées en « j'ai le complexe de l'apeline » et « l'effet Attané ». Vous avez eu de supers idées et ça m'a vraiment touchée.

Pour terminer, je voudrais remercier toute ma famille, **mes parents, ma sœur** (et **Raph** bien sûr !), **ma tatie, mes grands parents, mamie L** et même si **papi Georges** n'était pas là, nous avons tous eu une pensée pour lui le 17 décembre. Merci pour votre soutien pendant ces années de thèse, c'était très important et réconfortant pour moi. Merci également à **Anne-Marie et Jacques** d'être venus pour la soutenance, cela m'a fait très plaisir.

Merci aussi à mes amis : **Claire, Benjoy, Mimi, Julie** et **JP**. Merci pour votre amitié, votre soutien pendant ces années et aussi pour m'avoir accompagnée voir M.ASQUES (n'est ce pas Claire !). Et puis, grâce à vous je sais que ma thèse pèse 1.1kg, par contre je ne me souviens plus de la superficie, Jules il va falloir recalculer tout ça ! Ca m'a fait très plaisir que vous veniez pour la soutenance.

Bien sûr, un grand merci aussi aux amis de la **banda** avec qui j'ai partagé de très bons moments qui m'ont permis parfois de me changer les idées.

Et enfin, le meilleur pour la fin, merci à **Nico**, pour ton soutien si important au quotidien, pour tes encouragements, pour m'avoir aidée à piquer les souris ou m'avoir accompagnée pour les mettre à jeun mais aussi pour avoir accepté mes week-end passés au labo ces derniers mois. Merci pour tout, tu as largement contribué à ma réussite.

Voilà, j'espère n'avoir oublié personne. Ces remerciements sont longs certes, mais à la hauteur de ce que vous m'avez apporté pendant ces années de thèse jusqu'au jour de ma soutenance (et même après).



## Résumé

L'apeline est le ligand endogène du récepteur membranaire couplé aux protéines G appelé APJ. Plusieurs isoformes de ce peptide existent comme l'apeline-36 et l'apeline-13. L'apeline et APJ sont exprimés dans le système nerveux central, en particulier dans l'hypothalamus et dans de nombreux tissus périphériques (cœur, poumons, cellules endothéliales, muscle squelettique...). L'apeline est impliquée dans la régulation de la prise hydrique par ses effets diurétiques, des fonctions cardiovasculaires, de la prise alimentaire, de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse. L'apeline a été décrite par notre groupe comme pouvant être produite et sécrétée par les adipocytes chez la souris et chez l'Homme. Avec l'obésité et les pathologies associées comme le diabète de type 2, les concentrations plasmatiques d'apeline sont augmentées. Le lien entre l'apeline et les troubles métaboliques est un nouveau domaine d'investigation. Des données récentes du laboratoire et par d'autres équipes ont mis en évidence un rôle important de l'apeline sur le métabolisme glucidique. Les travaux réalisés au cours de la thèse ont eu pour objectif d'étudier les effets de l'apeline sur le métabolisme lipidique et, dans un premier temps, les effets sur le tissu adipeux. Nous avons pu montrer que sur du tissu adipeux humain, l'apeline stimule l'AMPK, une enzyme importante dans la régulation du métabolisme énergétique. De plus, l'apeline stimule le transport de glucose par une voie dépendante de l'AMPK mais n'a pas d'effet sur la lipolyse. Dans un deuxième temps, l'effet d'un traitement chronique à l'apeline a été étudié sur le métabolisme lipidique du muscle squelettique chez des souris obèses et résistantes à l'insuline. Nous avons pu montrer une augmentation de l'utilisation des lipides *in vivo* et *ex vivo* sur le muscle soléaire de souris traitées à l'apeline. Cet effet est associé à une augmentation de la biogenèse mitochondriale permettant une meilleure capacité oxydative du muscle squelettique et à une diminution de la formation d'acylcarnitines. Enfin, le traitement chronique à l'apeline améliore globalement la sensibilité à l'insuline mais aussi au niveau musculaire, en augmentant le transport de glucose stimulé par l'insuline. Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis d'identifier de nouveaux effets métaboliques pour l'apeline, ceux-ci pouvant participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'apeline et son récepteur APJ constituent ainsi une cible pharmacologique d'avenir dans le traitement du diabète de type 2.

## Abstract

Apelin is the endogenous ligand of the G protein-coupled receptor named APJ. Several isoforms of this peptide exist as apelin-36 and apelin-13. Apelin and APJ are expressed in the central nervous system, particularly in the hypothalamus and in many peripheral tissues (heart, lungs, endothelial cells, skeletal muscle ...). Apelin is involved in fluid homeostasis by its diuretic effect, in the regulation of cardiovascular function, food intake, cell proliferation and angiogenesis. Apelin has been described by our group as being produced and secreted by adipocytes in mice and humans. With obesity and associated diseases such as diabetes type 2, plasma concentrations of apelin are increased. The relationship between apelin and metabolic disorders is a new area of investigation. Recent data from our laboratory and by other teams have shown an important role of apelin on carbohydrate metabolism. The aim of the work, done during the thesis, was to study the effects of apelin on lipid metabolism on both adipose tissue and skeletal muscle in physiological and pathological conditions such as insulin resistance. First, acute effect of apelin was studied on human adipose tissue. We have shown that on adipose tissue explants, apelin stimulated AMPK, an enzyme important in regulating energy metabolism. Moreover, apelin stimulated glucose transport by an AMPK-dependent pathway but has no effect on lipolysis (basal or stimulated).

Secondly, the effect of chronic apelin treatment has been studied on lipid metabolism in skeletal muscle of obese and insulin resistant mice. We have shown an increased utilization of lipids *in vivo* and *ex vivo* in the soleus muscle of mice treated with apelin. This effect was associated with increased mitochondrial biogenesis allowing better oxidative capacity of skeletal muscle. Finally, chronic treatment with apelin improves overall insulin sensitivity but also in muscle, by decreasing acylcarnitine levels and increasing insulin-stimulated glucose transport.

Altogether, these results show that apelin treatment allows muscle mitochondria to better cope with a high fat diet in order to induce metabolic benefits. Since mitochondrial dysfunction is now considered as a central event in whole body metabolic dysregulation with regards to type 2 diabetes, apelin represents an attractive therapeutic target by acting on both glucose and lipid metabolism.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>PARTIE I : LE METABOLISME ENERGETIQUE</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Métabolisme glucidique</b> .....	<b>9</b>
A. Voies utilisatrices du glucose .....	10
B. Production de glucose .....	19
<b>II. Métabolisme lipidique</b> .....	<b>23</b>
A. Voies utilisatrices des AG .....	24
B. Production des AG : la lipolyse .....	36
<b>III. Régulation du métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme</b> .....	<b>41</b>
A. Coopération tissulaire dans l'adaptation du métabolisme à l'alternance repas/jeûne .....	41
B. Les effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique.....	46
<b>PARTIE II : INSULINO-RESISTANCE ET DIABETE DE TYPE 2</b> .....	<b>53</b>
<b>I. Le diabète de type II</b> .....	<b>53</b>
A. Définition.....	53
B. Etiologie du diabète de type II.....	54
C. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'insulino-résistance .....	56
<b>II. De l'obésité à la résistance à l'insuline</b> .....	<b>58</b>
A. Modifications du tissu adipeux associées à l'obésité et conséquences sur le muscle .....	59
B. Mécanismes intracellulaires conduisant à l'insulino-résistance dans le muscle.....	70
<b>III. Traitements du diabète de type 2</b> .....	<b>83</b>
A. Mesures hygiéno-diététiques .....	83
B. Les médicaments anti-diabétiques .....	87
C. AMPK : cible d'intérêt dans le traitement du diabète.....	92
<b>PARTIE III : LE SYSTEME APELINE/APJ</b> .....	<b>97</b>
<b>I. Découverte du système Apeline/APJ</b> .....	<b>97</b>
A. Le récepteur APJ .....	97
B. L'apeline.....	99
C. Interaction apeline /APJ .....	102
<b>II. Les principaux rôles du système apeline/APJ</b> .....	<b>103</b>
A. Rôle de l'apeline dans le système cardiovasculaire .....	104
B. Rôles de l'apeline au niveau du système nerveux central .....	111
C. Rôle de l'apeline dans le système gastro-intestinal.....	114
<b>III. Régulation du système apeline/APJ au cours de l'obésité et du diabète</b> .....	<b>114</b>

A.	Régulation de l'apeline adipocytaire.....	114
B.	Régulation de l'apelinémie lors de l'obésité et du DT2.....	117
<b>IV.</b>	<b>Rôle de l'apeline dans le métabolisme énergétique.....</b>	<b>119</b>
A.	Effet de l'apeline sur le métabolisme glucidique.....	119
B.	Effet de l'apeline sur le métabolisme lipidique .....	122
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>127</b>
<b>I.</b>	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>129</b>
<b>II.</b>	<b>Effet de l'apeline sur le métabolisme énergétique du tissu adipeux humain.....</b>	<b>130</b>
<b>III.</b>	<b>Effets de l'apeline sur le métabolisme lipidique dans le muscle squelettique.....</b>	<b>141</b>
A.	Mesure du métabolisme lipidique musculaire chez la souris normopondérale .....	141
B.	Effet d'un traitement chronique par l'apeline chez des souris obèses et insulino-résistantes.....	144
C.	Discussion générale sur les effets obtenus par les 2 types de traitement chronique par l'apeline.....	182
	<b>CONCLUSION- PERSPECTIVES .....</b>	<b>189</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>197</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABP : *Albumin binding protein*

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

Acétyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A

ACS : Acyl-coA synthétase

AG : Acides gras

AGPAT : Acylglycérol 3-phosphate acyltransférase

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribonucleoside

AMPK : *AMP-activated kinase*

ATGL : *Adipose triglyceride lipase*

CACT : Carnitine acylcarnitine translocase

CK : Cycle de Krebs

CPT-I : Carnitine palmitoyl transférase-I

CPT-II : Carnitine palmitoyl transférase-II

CR : Chaîne respiratoire

CREBP : *cAMP-response element-binding protein*

ChREBP : *Carbohydrate response element-binding protein*

DG : Diglycéride

DGAT : Diacylglycéroltransférase

DT2 : Diabète de type 2

eNOS : NO-synthase endothéliale

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

F-1,6 bisPase : Fructose 1,6 bisphosphatase

F-1,6-bisP : Fructose 1,6 bisphosphate

FABP<sub>pm</sub> : *Plasma membrane-associated fatty acid binding protein*

FAT : *Fatty acid translocase*

FATP : *Fatty acid transport protein*

FOXO1 : *Forhead box transcription factor 1*

G1P : Glucose 1 phosphate

G6P : Glucose 6 phosphate

G6-Pase : Glucose 6 phosphatase

GLUT : *Glucose transporter*

Glycérol-3P : Glycérol 3-phosphate

GP : Glycogène-phosphorylase

GPAT : Sn-glycerol-3-phosphate acyltransférase

GSK3 : Glycogène synthase kinase 3

HIF-1 $\alpha$  : *Hypoxia Inductible Factor-1 $\alpha$*

HNF4 $\alpha$  : *Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$*

IKK- $\beta$  : *I $\kappa$ B kinase catalytic subunit  $\beta$*

IL-6 : Interleukine-6

IMC : Indice de masse corporelle

IMTG : *Intramuscular triglycerides*

JNK : C-jun amino-terminal kinase

LHS : Lipase hormono-sensible

LPL : Lipoprotéine lipase

MCD : Malonyl-coA décarboxylase

MG : Monoglycéride

MGL : Monoglycéride-lipase

MME : Membrane mitochondriale externe

MMI : Membrane mitochondriale interne

MP : Membrane plasmique

NF- $\kappa$ B : *Nuclear factor kappa B*

NO : Monoxyde d'azote

NPV : Noyau paraventriculaire

NSO : Noyau supraoptique

OAA : Acide oxaloacétique

PDH : Pyruvate deshydrogénase

PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK : Phosphofructokinase

PGC1 $\alpha$  : *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$*

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PP1 : Protéine phosphatase de type 1

PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptors*

PTPases : Tyrosines phosphatases

QR : Quotient respiratoire

RXR : Récepteurs aux rétinoïdes

SPT-1 : *Serine palmitoyl transferase-1*

SREBP-1C : *Sterol regulatory element-binding protein-1C*

TG : Triglycérides

TNF $\alpha$  : *Tumor necrosis factor  $\alpha$*

TORC2 : *Transducer of regulated CREB activity 2*

TZD : Thiazolidinediones

UCP : *Uncoupling proteins*

VLDL : *Very low density lipoprotein*



# ***INTRODUCTION***



## Partie I : Le métabolisme énergétique

L'apport alimentaire est discontinu et variable chez l'homme quantitativement et qualitativement. A l'inverse, la consommation énergétique de l'organisme est globalement permanente même s'il existe d'importantes variations liées à l'effort ou à la thermogénèse. L'organisme n'est donc jamais à l'équilibre et on peut distinguer deux situations métaboliques qui se succèdent : la situation post-prandiale (ou période alimentaire), pendant laquelle l'énergie est apportée par les glucides et les lipides de l'alimentation, puis utilisée ou stockée, et la situation de jeûne durant laquelle l'organisme puise dans les réserves énergétiques stockées.

La régulation du métabolisme énergétique s'exerce principalement au niveau de trois tissus : le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques et fait intervenir différentes hormones selon l'état énergétique. Parmi ces hormones, l'insuline active l'utilisation et le stockage des substrats pendant la période alimentaire alors que le glucagon permet de maintenir la glycémie (taux de glucose sanguin) dans une situation de jeûne. Lors d'un jeûne prolongé, ce sont les glucocorticoïdes qui jouent un rôle important pour maintenir une glycémie normale. De plus, une kinase intracellulaire, l'AMPK (*AMP-activated kinase*) est un senseur énergétique de la cellule et est largement impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique. En effet, l'AMPK active les voies cataboliques (productrices d'énergie) tout en inhibant les voies anaboliques (consommatrices d'énergie) en réponse à une déplétion en énergie (ATP) dans la cellule.

Nous allons développer dans cette première partie les principales voies métaboliques et nous verrons que la régulation du métabolisme énergétique est importante pour maintenir le niveau d'énergie nécessaire pour les cellules, quelque soit l'état nutritionnel de l'organisme.

### I. Métabolisme glucidique

Le glucose est un nutriment énergétique fondamental pour notre organisme puisqu'il représente la seule source d'énergie pour les cellules en anaérobie et les tissus gluco-dépendants comme le cerveau.

Le taux de glucose sanguin est relativement constant (entre 4 et 6 mM soit 0,7 à 1,1g/l) et nécessite une régulation fine en fonction de l'état nutritionnel. En période alimentaire, l'amidon, un des polysaccharides les plus abondants dans l'alimentation, libère après digestion, des molécules de glucose qui sont absorbées au niveau intestinal et se retrouvent dans la circulation sanguine afin d'être dirigées vers les organes utilisateurs. En période de jeûne, le foie produit et libère du glucose dans la circulation sanguine, *via* la glycogénolyse et la néoglucogenèse, à partir des stocks de glycogène ou de substrats non glucidiques.

## A. Voies utilisatrices du glucose

### 1. *Transport de glucose*

Avant d'être utilisé, le glucose doit être transporté à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques. Il existe deux familles distinctes de protéines de transport, les SGLT (*sodium glucose co-transporter*) assurant un co-transport actif de glucose et de sodium, et les GLUT (*glucose transporter*) assurant la diffusion facilitée du glucose. Les SGLT ne sont exprimés qu'au niveau de l'intestin grêle et du rein et ont un rôle spécifique dans l'absorption intestinale et la réabsorption tubulaire rénale du glucose. A l'inverse, les GLUT sont exprimés de manière ubiquiste et participent à la régulation de métabolisme glucidique, c'est pourquoi, pour la suite de cette partie, nous aborderons seulement les GLUT.

#### a) Les GLUT

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui changent de conformation après la fixation de glucose sur la face extracellulaire de la membrane ce qui permet au glucose de passer sur la face interne où il est libéré. Il existe chez l'Homme 12 isoformes de GLUT dont les plus connues sont les GLUT1 à 4. Ces différents transporteurs se distinguent par leur localisation tissulaire, leur affinité pour le glucose ainsi que par leur aptitude à être activés ou non par l'insuline. Les transporteurs GLUT1 et 3 sont des isoformes ubiquistes, alors que GLUT2 est exprimé au niveau de l'intestin, des reins, du foie et des cellules  $\beta$  du pancréas. GLUT4 est quant à lui présent dans le muscle et les adipocytes.

L'apport de glucose dans une cellule dépend des propriétés des transporteurs de glucose qui y sont exprimés. Le transporteur GLUT2 possède une faible affinité pour le glucose (son  $K_D$  est

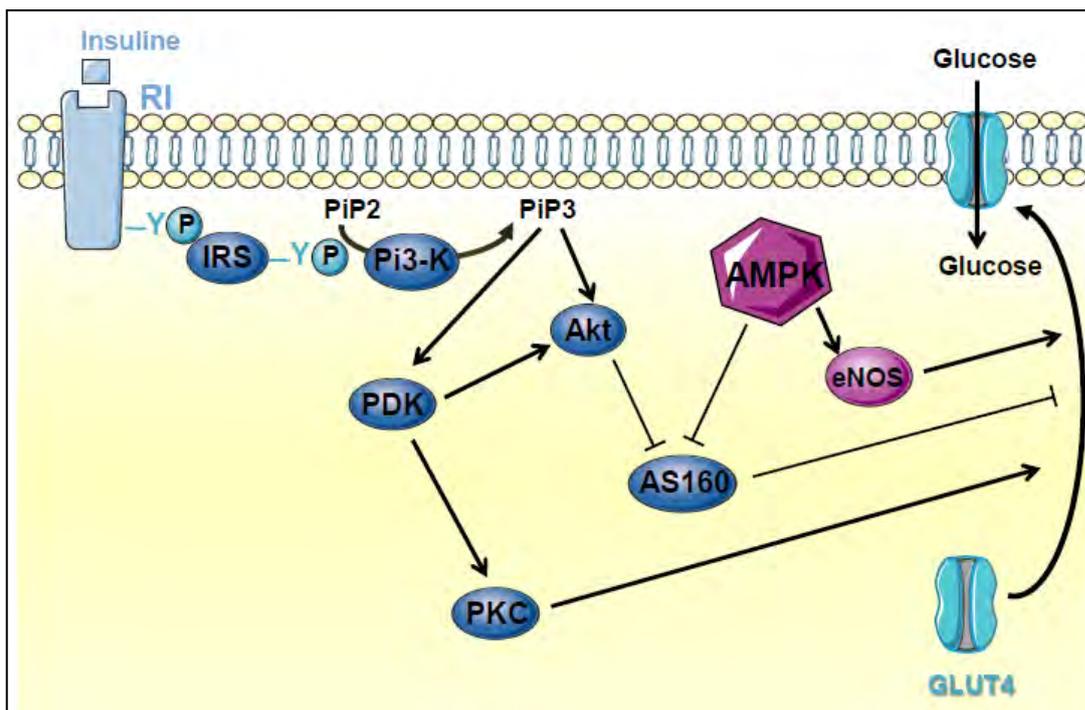
de l'ordre de 20 mM alors que la glycémie physiologique est de l'ordre de 5 mM). Ainsi, le glucose pénétrera proportionnellement à la glycémie dans les cellules exprimant ce transporteur (hépatocytes et cellules  $\beta$  pancréatiques). Au contraire, les transporteurs GLUT1 et 3 ont une forte affinité pour le glucose ( $K_D$  de l'ordre de 2 mM) ce qui permet une entrée maximale de glucose dans ces cellules. Enfin, le transporteur GLUT4 possède également une forte affinité pour le glucose mais il a la particularité d'être régulé par l'insuline. En effet, les myocytes et les adipocytes possèdent des stocks intracellulaires de GLUT4 qui seront adressés à la membrane plasmique sous l'influence de l'insuline.

b) Régulation du transport de glucose par l'insuline et l'AMPK

Lorsque la glycémie augmente (en période post-prandiale), l'insuline est sécrétée au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas puis elle agit sur ses tissus cibles : le tissu adipeux, les muscles squelettiques et le foie. Au niveau du tissu adipeux et du muscle, elle va réguler le transport de glucose en stimulant la translocation des GLUT4 à la membrane plasmique. L'insuline exerce des effets différents au niveau du foie qui seront décrits par la suite.

Le récepteur de l'insuline est un récepteur à activité tyrosine kinase, composé de 2 sous-unités  $\alpha$  extracellulaires, assurant la liaison de l'insuline et de 2 sous-unités  $\beta$  transmembranaires, portant l'activité tyrosine kinase. La liaison de l'insuline sur son récepteur entraîne un changement conformationnel de celui-ci et l'autophosphorylation des sous-unités  $\beta$  sur des résidus tyrosine (figure 1). Le substrat du récepteur à l'insuline, IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), vient alors se fixer sur ces phospho-tyrosines *via* son domaine PTB (*phosphotyrosine-binding domain*) puis est phosphorylé à son tour, sur des résidus tyrosine, par le récepteur à l'insuline. Ceci permet le recrutement de différentes protéines, en particulier d'enzymes comme la sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidylinositol 3-phosphate (Pi3K) et de sa sous-unité catalytique p110, elle-même activée par phosphorylation. La Pi3K ainsi activée va ainsi convertir le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PiP3) (Saltiel and Kahn 2001). La formation de PiP3 à la membrane plasmique va entraîner le recrutement et l'activation de différentes protéines kinases telles que la protéine kinase B (PKB, aussi appelée Akt), les protéines kinases C  $\lambda$  et  $\zeta$  (PKC  $\lambda/\zeta$ ) ainsi que PDK1 (*3-phosphoinositide-dependant protein kinase-1*). PDK1 est aussi capable de phosphoryler et d'activer PKB et PKC  $\lambda/\zeta$ . Ces protéines kinases vont alors permettre la translocation à la membrane plasmique des vésicules contenant GLUT4.

L'AMPK est également capable d'activer le transport de glucose en stimulant la translocation de GLUT4 à la membrane (Kurth-Kraczek, Hirshman et al. 1999) par une voie indépendante de celle de l'insuline. La voie de signalisation impliquée dans cet effet de l'AMPK fait intervenir la synthèse de l'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) (Fryer, Hajdudch et al. 2000; Fryer, Fougelle et al. 2002) mais également une Rab GTPase, l'AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*). L'AS160 retient les transporteurs GLUT4 dans les vésicules cytoplasmiques (Sakamoto and Holman 2008) et son inhibition par phosphorylation induite par l'AMPK permet donc une augmentation de la translocation de GLUT4 ce qui favorise l'entrée de glucose dans la cellule (Treebak, Glund et al. 2006).



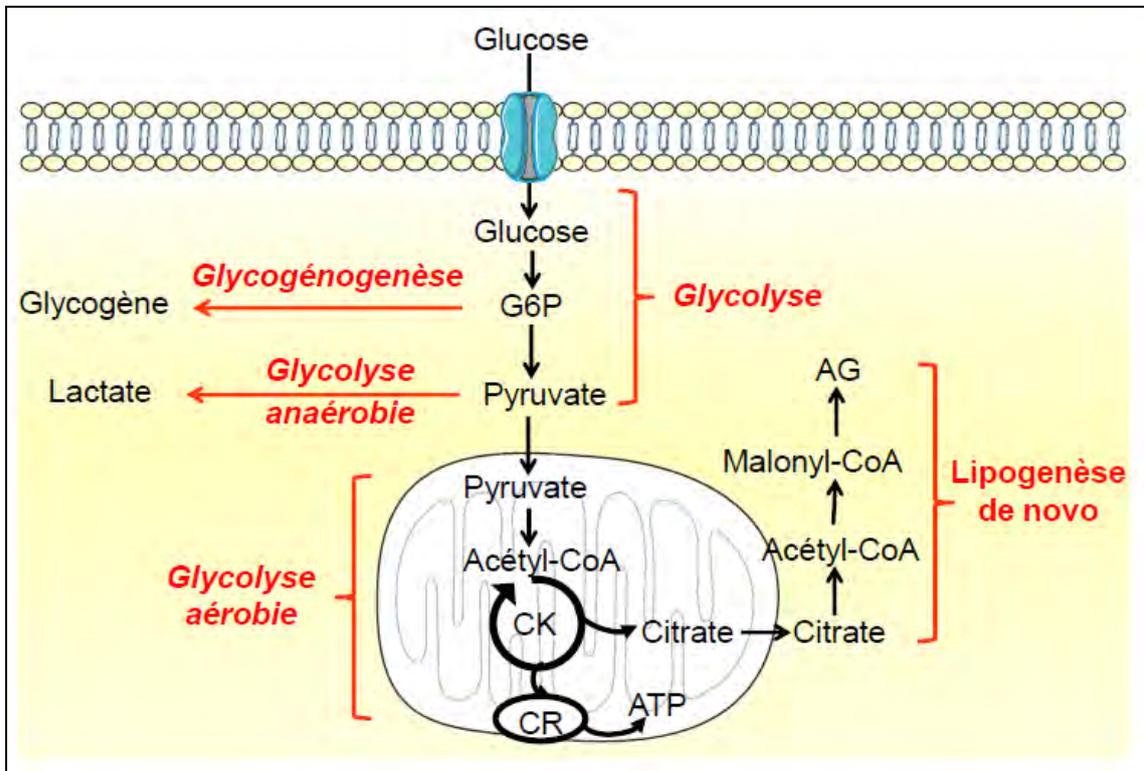
**Figure 1 : régulation du transport de glucose par l'insuline et l'AMPK**

La fixation de l'insuline sur son récepteur va induire la phosphorylation de ce dernier sur des résidus tyrosine (Y) permettant alors à la protéine IRS1 (*Insulin receptor substrate 1*) de se fixer sur ces phospho-tyrosines (Y-P) et d'être activée. IRS1 phosphorylée active à son tour la PI3K (phosphoinositide-3-kinase) en se liant sur sa sous-unité p85 puis active la sous-unité catalytique p110. Celle-ci transforme alors les PIP2 (phosphoinositide-2-phosphate) membranaires en PIP3 (phosphoinositide-3-phosphate), des seconds messagers intracellulaires. La liaison des PIP3 à la PDK1 (*phosphoinositide dépendant kinase 1*) active la PKC (protéine kinase C) permettant la translocation de GLUT4 (contenu dans des vésicules) à la membrane plasmique. PDK1 active également Akt qui inhibe l'AS160, une protéine inhibitrice de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique. Ainsi, Akt augmente la translocation de GLUT4 à la membrane.

L'AMPK (*AMP-activated Kinase*) augmente aussi la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique via l'activation de la eNOS (synthase de l'oxyde nitrique endothéliale) et l'inhibition de l'AS160.

## 2. Devenir du glucose dans la cellule

Une fois dans la cellule, le glucose peut entrer dans différentes voies métaboliques telles que la glycolyse anaérobie ou aérobie, permettant de produire de l'énergie à partir du glucose, mais aussi la glycogénogenèse correspondant au stockage de glucose sous forme de glycogène (figure 2). Enfin, nous verrons que la lipogenèse *de novo* permet de produire des acides gras à partir de glucose.



**Figure 2 : devenir du glucose dans la cellule**

Une fois dans la cellule, le glucose est transformé en pyruvate (glycolyse) qui pourra être transformé en lactate (glycolyse anaérobie) ou entrer dans la mitochondrie pour produire de l'énergie (glycolyse aérobie). Ceci nécessite l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA qui entre ensuite dans le cycle de Krebs (CK) qui permet de produire des coenzymes réduits transformés en ATP (adénosine tri-phosphate) par la chaîne respiratoire (CR). Du citrate, formé par le CK peut également sortir de la mitochondrie et former des acides gras (AG), il s'agit du processus de lipogenèse *de novo*. Enfin, du glycogène peut être synthétisé à partir du glucose 6-phosphate (G6P) par la voie de la glycogénogenèse.

### a) La glycolyse

La glycolyse est la voie principale d'utilisation du glucose : c'est une voie métabolique cytosolique, présente dans toutes les cellules, qui permet la production d'énergie sous forme d'ATP. Elle conduit à la conversion d'une molécule de glucose à 6 carbones en 2 molécules de pyruvate à 3 carbones et produit 2 molécules d'ATP.

➤ **Les différentes étapes**

On peut schématiquement diviser la glycolyse en trois étapes : le glucose est activé par phosphorylation, puis converti en 2 trioses qui seront alors transformés en pyruvate pour produire de l'énergie.

Dès son entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé par une hexokinase en consommant une molécule d'ATP, ce qui conduit à la formation du glucose 6 phosphate (G6P). Celui-ci est ensuite isomérisé puis phosphorylé par la phosphofructokinase (PFK) pour donner du fructose 1,6 bisphosphate (F-1,6-bisP) en consommant 1 ATP.

La molécule de F-1,6 bisP est ensuite clivée en 2 molécules à 3 carbones, un glycéraldéhyde-3P et un dihydroxyacétone P pouvant être converti en glycéraldéhyde-3P.

Les 2 glycéraldéhyde 3P formés vont être oxydés en pyruvate par une série de réactions permettant la production d'ATP et de NADH,H<sup>+</sup>, un coenzyme réduit.

➤ **Régulation de la glycolyse**

La glycolyse dépend de l'apport en glucose dans la cellule et de son niveau énergétique. Comme nous l'avons vu précédemment, l'entrée de glucose dans le muscle et le tissu adipeux est finement régulée par l'insuline et l'AMPK.

De plus, l'AMPK exerce des effets transcriptionnels à plus long terme en augmentant l'expression de GLUT4 (Hayashi, Hirshman et al. 1998; Holmes, Kurth-Kraczek et al. 1999) mais aussi de PGC1 $\alpha$  qui joue un rôle important dans l'induction de l'expression de GLUT4 (Jager, Handschin et al. 2007).

La glycolyse dépend aussi du niveau énergétique de la cellule c'est-à-dire du rapport ATP/AMP qui va entraîner l'activation ou non de la PFK, l'enzyme clé de cette voie. Si la concentration en AMP est élevée (niveau énergétique bas), l'AMP, un activateur allostérique de la PFK1 va entraîner une augmentation de la concentration en F-1,6-bisP ce qui va activer la production de pyruvate. De même, l'AMPK phosphoryle et active la PFK2, entraînant une augmentation du F-2,6 bisP qui, comme l'AMP active la PFK1 et donc la glycolyse (Marsin, Bertrand et al. 2000). A l'inverse, si la concentration en ATP est élevée (niveau énergétique haut), l'ATP va inhiber la PFK1 ce qui entraîne une augmentation de la concentration en G6P, qui va lui-même inhiber l'hexokinase et donc bloquer l'utilisation du glucose.

➤ **Devenir du pyruvate :**

A partir du pyruvate, il existe 2 possibilités d'orientation métabolique en fonction de l'état d'oxygénation des cellules : la formation de lactate lorsque les cellules sont en anaérobiose, ou l'oxydation du pyruvate lorsque les cellules sont en aérobie.

- ***Glycolyse anaérobiose : la formation de lactate***

En absence d'oxygène, le pyruvate produit au cours de la glycolyse est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase et nécessite un NADH. Cette réaction permet de réoxyder le NADH produit lors de la dernière étape de la glycolyse ce qui assure le flux glycolytique lors d'un apport en glucose en condition d'anaérobiose. Le lactate produit sort de la cellule, diffuse dans la circulation sanguine et rejoint le foie où il peut reformer du glucose par la néoglucogenèse (ce processus sera décrit par la suite). Le cycle du lactate, également appelé cycle de Cori, est donc un cycle inter-tissulaire où le muscle squelettique produit le lactate à partir du glucose et où le foie recycle le lactate en glucose.

- ***Glycolyse aérobie : l'oxydation du pyruvate***

En présence d'O<sub>2</sub>, le pyruvate produit au cours de la glycolyse entre dans la mitochondrie où il est oxydé et décarboxylé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), par un complexe enzymatique, la pyruvate déshydrogénase (PDH). Cette réaction va entraîner la production d'un NADH, H<sup>+</sup> et va libérer une molécule de CO<sub>2</sub>. L'acétyl-CoA généré est le principal substrat du cycle de Krebs qui produit également des coenzymes réduits. La chaîne respiratoire, qui sera décrite plus tard, permettra ensuite la réoxydation du NADH, H<sup>+</sup> et la production concomitante d'énergie sous forme d'ATP.

Ainsi, l'oxydation du pyruvate permet une production d'énergie beaucoup plus importante que la glycolyse anaérobiose : 2 molécules de pyruvate produisent 38 ATP lorsqu'ils sont oxydés contre 2 ATP par la glycolyse anaérobiose.

La PDH est régulée par phosphorylation/déphosphorylation par l'insuline et le glucagon. L'insuline, en activant une PDH-phosphatase conduit à la forme déphosphorylée active alors que le glucagon et un fort taux d'ATP et de NADH, H<sup>+</sup> (traduisant un niveau énergétique élevé de la cellule) vont phosphoryler et donc inhiber la PDH.

b) Synthèse du glycogène : glycogénogenèse

➤ **Etapas biochimiques**

La glycogénogenèse correspond au stockage du glucose sous forme d'un polysaccharide, le glycogène. Cette synthèse du glycogène se fait au niveau du cytosol, uniquement dans le foie et le muscle squelettique, grâce à la glycogène-synthase.

Le G6P est isomérisé en glucose 1 phosphate (G1P), lui-même activé par de l'UTP (uridine triphosphate) entraînant la formation d'UDP-glucose ; ces deux premières étapes consomment 2 ATP.

Une fois activés, les UDP-glucoses se lient les uns après les autres à une molécule de glycogène en cours d'élongation par des liaisons  $\alpha$ 1-4, grâce à la glycogène-synthase. Quand la chaîne linéaire atteint une vingtaine d'unités glucose, la glycosyl-4,6-transférase (ou enzyme branchante) transfère un bloc de 5 à 8 unités glucose par des liaisons  $\alpha$ 1-6, entraînant la formation d'une ramification ; la synthèse reprend ensuite jusqu'à la ramification suivante.

L'ajout de chaque molécule de glucose sur la molécule de glycogène en cours d'élongation consomme 2 ATP, il s'agit donc d'un processus endergonique.

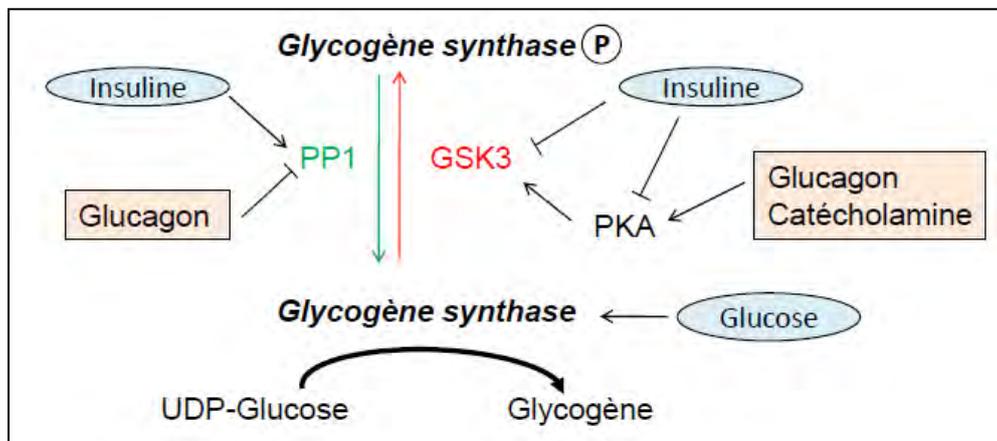
➤ **Régulation de la glycogénogenèse**

La régulation de la synthèse de glycogène (figure 3) est basée sur l'activation de la glycogène-synthase qui peut exister sous 2 formes : une active (déphosphorylée) et l'autre inactive (phosphorylée). La phosphorylation/déphosphorylation de cette enzyme est régulée par 2 enzymes : une protéine phosphatase de type 1 (PP1) et la glycogène-synthase kinase 3 (GSK3), qui sont régulées par des facteurs nutritionnels et environnementaux.

En période alimentaire, l'insuline va activer d'une part PP1 qui va déphosphoryler la glycogène-synthase et donc l'activer, et d'autre part inhiber GSK3 et la PKA ce qui maintient la glycogène-synthase sous sa forme active. Ainsi, l'insuline favorise la synthèse de glycogène, tout comme le glucose qui est un activateur allostérique de la glycogène-synthase.

En situation de jeûne, le glucagon est sécrété par les cellules  $\alpha$  du pancréas et se fixe sur son récepteur, un récepteur à 7 domaines membranaires couplé à des protéines Gs au niveau du foie. Cette liaison permet l'activation de l'adénylyl cyclase, ce qui augmente les taux intracellulaires d'AMPc et active la PKA. Celle-ci inhibe la glycogène-synthase en la

phosphorylant et il inhibe la PP1 ce qui maintient alors la glycogène-synthase sous sa forme phosphorylée inactive et inhibe la synthèse de glycogène. De même, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et le cortisol sont libérés lors d'un jeûne prolongé ou en conditions de stress, et l'AMPK, inhibent la synthèse de glycogène en inactivant la glycogène-synthase par phosphorylation (Jorgensen, Viollet et al. 2004).



**Figure 3 : régulation de la synthèse de glycogène**

En période alimentaire (entouré et en bleu), l'insuline va d'une part activer la PP1 (protéine phosphatase de type 1) activant la glycogène-synthase, et d'autre part inhiber la GSK3 (glycogène-synthase kinase 3) et la PKA (protéine kinase A) ce qui maintient la glycogène-synthase sous sa forme active. Ainsi, l'insuline favorise la synthèse de glycogène, tout comme le glucose qui est un activateur allostérique de la glycogène-synthase.

En condition de jeûne (encadré et en rose), le glucagon inhibe PP1 et active la GSK3 *via* l'activation de la PKA : la synthèse de glycogène est alors inhibée.

### c) Lipogenèse de novo

#### ➤ Etapes biochimiques

La synthèse des acides gras (AG) ou lipogenèse *de novo* se fait à partir d'acétyl-CoA et a lieu dans le foie et le tissu adipeux. Cependant, chez l'Homme, elle a surtout lieu dans le foie puisque les adipocytes humains expriment faiblement l'ATP citrate lyase, une enzyme lipogénique, par rapport aux rongeurs (Swierczynski, Goyke et al. 2000). De plus, deux facteurs de transcription lipogéniques, SREBP-1C (*sterol regulatory element-binding protein-1C*) et CREBP (*cAMP-response element-binding protein*) sont faiblement exprimés dans le tissu adipeux humain (Letexier, Pinteur et al. 2003).

L'acétyl-CoA peut avoir différentes origines : il peut provenir des glucides par la glycolyse et l'oxydation du pyruvate, mais aussi du catabolisme des acides aminés. Cette voie anabolique peut être divisée en trois étapes : la synthèse et le transport de citrate dans le cytosol, la

synthèse de malonyl-CoA et la synthèse de palmitate à 16 carbones. Pour la synthèse d'acides gras plus longs ou possédants des insaturations, une quatrième étape est nécessaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, en condition aérobie, le pyruvate formé à partir du glucose, peut être oxydé par la PDH pour former de l'acétyl-CoA dans la mitochondrie. La lipogenèse *de novo* ayant lieu dans le cytosol, l'acétyl-CoA devra donc traverser la double membrane mitochondriale. Ne pouvant pas être transporté sous cette forme, il sera préalablement transformé en citrate par condensation avec l'oxaloacétate (OAA) sous l'action de la citrate synthase ; c'est la première réaction du cycle de Krebs qui sera décrit par la suite. Le citrate, qui possède un transporteur, va dans le cytosol où il est clivé par la citrate lyase, en acétyl-CoA qui va servir pour la lipogenèse et en OAA qui est recyclé dans la mitochondrie.

Une fois dans le cytosol, l'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACC1). C'est l'étape limitante de cette voie, elle consomme un ATP.

La troisième étape de cette synthèse des AG est réalisée par un complexe multienzymatique, l'Acide Gras Synthase (AGS ou FAS pour *Fatty Acid Synthase*). L'AGS effectue la synthèse d'un premier AG à 4 carbones, le butyryl, par un cycle de quatre réactions à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Ces 2 composés vont d'abord être condensés puis décarboxylés pour produire un composé à 4 carbones et libérer une molécule de CO<sub>2</sub>. Cette étape est suivie de 3 réactions : une première réduction, une deshydratation puis une deuxième réduction. Ainsi, à la fin de ce cycle, un butyryl à 4 carbones est formé et 2 NADPH,H<sup>+</sup> ont été consommés. La synthèse du palmitate à 16 carbones est le produit de la répétition de ce cycle de quatre réactions qui, à 6 reprises, apportent 6 malonyl-CoA. Cette succession de cycles est appelée l'hélice de Wakil, chaque tour d'hélice correspondant à l'ajout successif de 2 carbones à l'AG en cours de synthèse. L'élongation s'arrête au palmityl qui est libéré par hydrolyse, sous forme de palmitate.

La synthèse de palmitate est donc un processus endergonique puisque 7 ATP et 14 NADPH,H<sup>+</sup> sont nécessaires. Les AG ainsi produits pourront être stockés sous forme de triglycérides par un processus qui sera décrit par la suite dans ce manuscrit.

➤ **Régulation de la lipogenèse *de novo***

L'importance de la lipogenèse *de novo* varie selon l'apport alimentaire : elle augmente lorsque l'apport calorique dépasse les besoins énergétiques ce qui conduit à un stockage du surplus nutritionnel sous forme de triglycérides à partir d'AG. Cette voie est régulée principalement au niveau de l'ACC qui peut-être activée par déphosphorylation par l'insuline ou inhibé par phosphorylation par l'AMPK (Carling, Zammit et al. 1987; Daval, Diot-Dupuy et al. 2005). De plus, l'ACC est activée allostériquement par le citrate et inhibée par le palmitoyl-CoA (produit final de cette voie de biosynthèse). Enfin, à plus long terme, l'expression de certaines enzymes lipogéniques peut aussi être modifiée. En effet, l'insuline stimule l'expression d'ACC alors que l'AMPK diminue l'expression d'ACC et de la FAS *via* l'inhibition de l'expression et de l'activité des facteurs de transcription tels que ChREBP (carbohydrate response element binding protein) (Kawaguchi, Osatomi et al. 2002; Foretz, Ancellin et al. 2005) et SREBP-1C (Zhou, Myers et al. 2001; Foretz, Ancellin et al. 2005).

**B. Production de glucose**

*1. Dégradation du glycogène : la glycogénolyse*

a) *Tissus impliqués*

La glycogénolyse est la réaction inverse de la glycogénogenèse et se réalise principalement dans le foie et dans les muscles, mais à des fins différentes.

Dans le foie, la présence de l'enzyme glucose-6-phosphatase (G6Pase) permet de libérer dans la circulation sanguine, le glucose issu de la dégradation du glycogène. En revanche, les muscles, ne possédant pas cette enzyme, dégradent le glycogène en G6P qu'ils utiliseront pour produire de l'énergie (voie de la glycolyse).

b) *Étapes de la glycogénolyse*

La glycogénolyse se réalise en trois étapes principales.

Tout d'abord, la glycogène-phosphorylase (GP) enlève un glucose à la molécule de glycogène puis le phosphoryle, entraînant la formation de G1P. Ainsi, chaque molécule de glucose est détachée au fur et à mesure de la chaîne linéaire mais l'hydrolyse complète du glycogène

nécessite la dégradation des nœuds de ramification du glycogène par une transférase et l' $\alpha$ -1,6-glucosidase (ou enzyme débranchante).

Le glucose-1-phosphate est ensuite isomérisé en G6P par la phospho-glucomutase puis transformé en glucose par la G6P. Cette dernière étape se fait au niveau du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques, les seules à posséder cette enzyme.

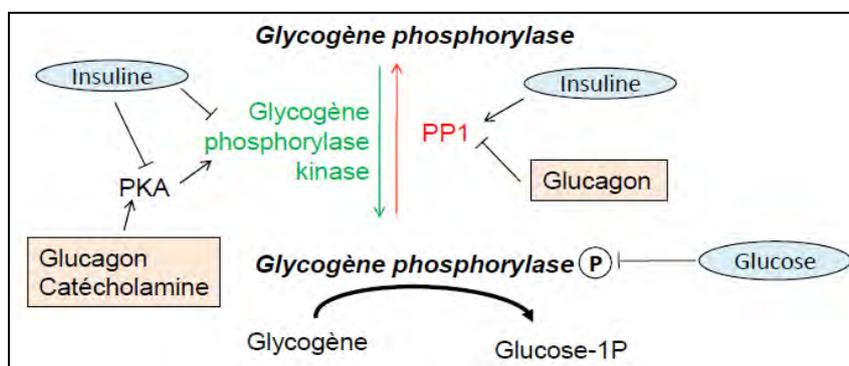
La glycogénolyse permet donc la formation de G6P sans consommation d'ATP.

### c) Régulation de la glycogénolyse

Comme pour la régulation de la synthèse de glycogène, la régulation de la glycogénolyse est basée sur le fait que la GP peut exister sous 2 formes : une active (phosphorylée) et l'autre inactive (déphosphorylée). La conversion entre ces 2 formes est sous le contrôle de deux enzymes, la glycogène phosphorylase kinase et de la protéine phosphatase 1 (PP1), qui sont régulées par des facteurs nutritionnels et environnementaux (figure 4).

En période alimentaire, l'insuline inhibe la GP en la déphosphorylant *via* PP1 et en inhibant la glycogène phosphorylase kinase. L'insuline inhibe aussi la PKA ce qui permet de la maintenir la GP sous sa forme inactive. De plus, le glucose est un inhibiteur allostérique de la GP.

En situation de jeûne, le glucagon active la PKA qui à son tour active la glycogène phosphorylase kinase et inhibe la PP1 ce qui permet d'activer la GP. Le taux bas de glucose active la glycogénolyse en levant l'inhibition allostérique de la GP. Comme pour la synthèse de glycogène, les catécholamines exercent les mêmes effets que le glucagon sur la glycogénolyse.



**Figure 4 : régulation de la dégradation du glycogène.**

En période alimentaire (entouré et en bleu), l'insuline inhibe la glycogène phosphorylase kinase directement ou *via* la PKA et active la PP1 : ceci conduit à une inhibition de la glycogénolyse par l'inhibition de la glycogène phosphorylase. De plus, le glucose est un inhibiteur allostérique de la glycogène phosphorylase.

En situation de jeûne (encadré et en rose), le glucagon active la glycogène phosphorylase kinase *via* la PKA et inhibe la PP1 : ceci conduit à l'augmentation de la glycogénolyse par l'activation de la glycogène phosphorylase.

Ainsi, le foie assure, *via* la dégradation du glycogène, le maintien de la glycémie ce qui permet de couvrir les besoins énergétiques du cerveau et des cellules glucodépendantes (neurones, hématies). Cependant, le stock de glycogène hépatique est limité et lorsque les réserves s'épuisent, la glycogénolyse sera relayée par la néoglucogenèse pour produire du glucose.

## 2. Néoglucogenèse

La néoglucogenèse correspond à la transformation du pyruvate en glucose qui se fait essentiellement dans le foie ; c'est la voie inverse de la glycolyse. Cependant, trois réactions sont irréversibles dans la glycolyse, et d'autres enzymes spécifiques de la néoglucogenèse sont alors nécessaires : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose 1,6 bisphosphatase (F-1,6 bisPase) et la glucose 6 phosphatase (G6-Pase). De plus, pour assurer la réversibilité des réactions de la glycolyse il faut également de l'énergie sous forme d'ATP et de NADH.

### a) Réactions enzymatiques

Trois substrats vont permettre de former du pyruvate, substrat de la néoglucogenèse, il s'agit de :

- l'alanine provenant de la protéolyse musculaire,
- du lactate produit par le muscle squelettique,
- du glycérol produit par l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux.

Le lactate et l'alanine sont tout d'abord transformés en pyruvate alors que le glycérol rejoint la voie de la néoglucogenèse au niveau des trioses phosphates (dihydroacétone P).

La transformation du pyruvate en glucose implique trois compartiments cellulaires : la mitochondrie, le cytoplasme et le réticulum endoplasmique.

Dans la mitochondrie, le pyruvate est carboxylé en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase en présence de  $\text{CO}_2$ , en consommant 1ATP. L'OAA est ensuite transporté dans le cytosol sous forme de malate, puis décarboxylé et phosphorylé en phosphoénolpyruvate par la PEPCK avec la consommation d'un GTP (Guanosine tri phosphate). Grâce à la réversibilité des réactions de la glycolyse, 2 molécules de phosphoénolpyruvate sont ensuite transformées en F-1,6 bisP, qui produit du fructose-6P par la fructose 1,6 bisphosphatase et sera isomérisé en G6P. La néoglucogenèse se termine dans le réticulum endoplasmique où le G6P est

hydrolysé en glucose par la G6-Pase. Le glucose est enfin libéré dans la circulation sanguine *via* le transporteur GLUT2.

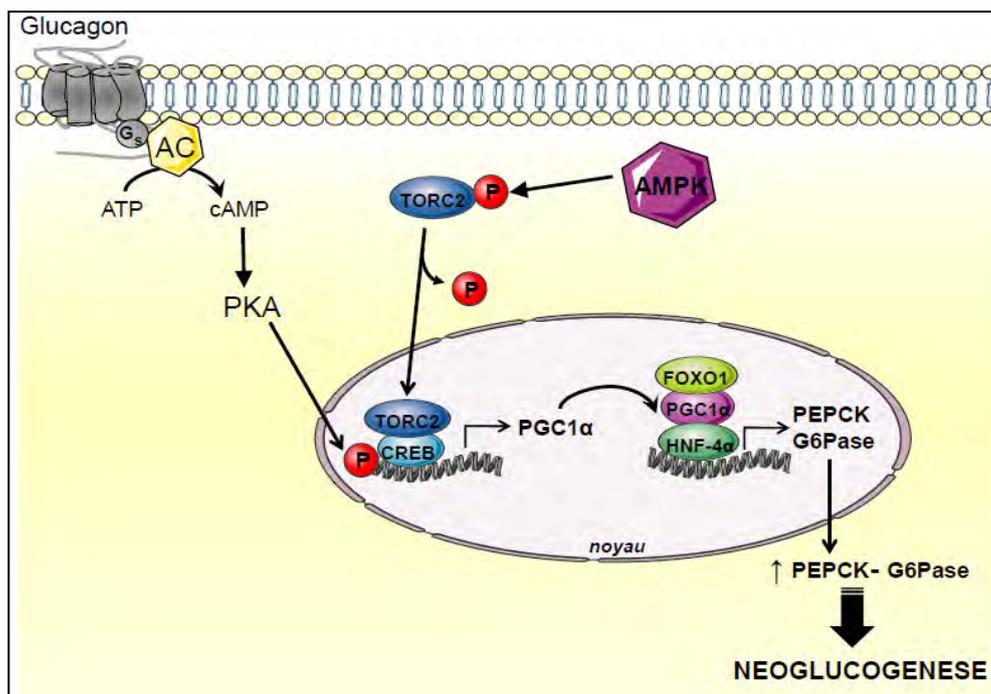
Cette voie métabolique est endergonique puisqu'elle nécessite 2NADH,H<sup>+</sup> et 6ATP pour la synthèse d'une molécule de glucose. Cette énergie est fournie par l'oxydation des lipides qui sera décrite par la suite dans ce manuscrit.

#### b) Régulation de la néoglucogenèse

La néoglucogenèse est contrôlée de manière réciproque avec la glycolyse : notamment au niveau de la phosphofructokinase (PFK) et de la F-1,6 bisPase. Si le niveau énergétique de la cellule est bas, la F-1,6 bisPase est inhibée par l'AMP pour que la glycolyse soit favorisée. A l'inverse, si la charge énergétique est importante (diminution de la quantité d'AMP), la F-1,6 bisPase est activée, la néoglucogenèse est favorisée.

De plus, le glucagon augmente l'expression de 2 enzymes clés de la néoglucogenèse : la PEPCK et la G6Pase (figure 5). En condition de jeûne, le glucagon active la PKA qui phosphoryle et active le facteur de transcription CREBP. En parallèle, le co-activateur TORC2 (*transducer of regulated CREB activity 2*) est déphosphorylé et transloqué au noyau où il induit la transcription de PGC1 $\alpha$  (Koo, Flechner et al. 2005). Celui-ci est impliqué dans l'activation de la transcription des gènes de la PEPCK et de la G6Pase, en association avec deux facteurs de transcription : HNF4 $\alpha$  (*hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* ) et FOXO1 (*forhead box transcription factor 1*).

A l'inverse, l'AMPK inhibe la néoglucogenèse *via* la diminution de l'expression de la PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) et de la G6Pase (Lochhead, Salt et al. 2000; Yamauchi, Kamon et al. 2002; Cool, Zinker et al. 2006). En effet, l'activation de l'AMPK par l'AICAR sur des hépatocytes en culture primaire inhibe par phosphorylation les facteurs de transcription HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ) et FOXO1 (forhead box transcription factor 01) (Leclerc, Lenzner et al. 2001; Barthel, Schmoll et al. 2002; Hong, Varanasi et al. 2003). De plus, l'AMPK phosphoryle TORC2 qui est alors séquestré dans le cytoplasme et ne peut donc pas activer l'expression de PGC1 $\alpha$  (figure 5). Ainsi, par l'inhibition de ces facteurs de transcription, l'AMPK diminue l'expression de la PEPCK et de la G6Pase et réduit ainsi la production hépatique de glucose.



**Figure 5 : Régulation transcriptionnelle des gènes de la néoglucogenèse.** D'après (Foretz, Guigas et al. 2006).

Le glucagon active la PKA ce qui permet l'activation du facteur de transcription CREB par phosphorylation dans le noyau. CREB recrute alors le coactivateur TORC2 déphosphorylé et permet l'expression du gène codant le coactivateur PGC-1 $\alpha$ . En association avec les facteurs de transcription HNF4 $\alpha$  et Foxo1, PGC-1 $\alpha$  active la transcription des gènes G6Pase et PEPCK ce qui active la néoglucogenèse hépatique. L'AMPK phosphoryle TORC2 qui reste alors dans le cytoplasme et ne peut donc pas induire les gènes G6Pase et PEPCK.

## II. Métabolisme lipidique

Les lipides alimentaires constituent entre 30 et 40% de l'énergie ingérée et sont essentiellement sous forme de TG. Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique qui peut contenir une ou plusieurs doubles liaisons (acides gras insaturés) ou aucune (acides gras saturés). Ces AG peuvent exister sous forme libre (AG libres également appelés AG non estérifiés) ou sous forme estérifiée ce qui correspond aux TG, la forme de mise en réserve des AG qui représente le plus grand réservoir énergétique de l'organisme.

Etant hydrophobes, les lipides doivent être transportés dans la circulation sous forme d'AG liés à des protéines plasmatiques comme l'albumine, ou de TG complexés à des apolipoprotéines comme les chylomicrons et les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (figure 6). Les chylomicrons sont synthétisés dans les entérocytes une fois les acides gras absorbés et réestérifiés, puis ils atteignent la circulation sanguine *via* le réseau lymphatique. Les VLDL peuvent aussi être synthétisés par les entérocytes mais ils sont surtout produits par le foie.

Tout comme le glucose, les acides gras peuvent être utilisés dans la cellule pour fournir de l'énergie, sinon ils sont stockés. L'oxydation des acides gras représente d'ailleurs la principale source d'énergie pour la plupart des tissus excepté dans le cerveau ou dans des cellules gluco-dépendantes (hématies). D'autres voies cellulaires peuvent, à l'inverse, produire des AG et les libérer dans la circulation sanguine.

## **A. Voies utilisatrices des AG**

### ***1. Transport des AG***

Les TG contenus dans les chylomicrons et les VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme synthétisée par les adipocytes en réponse à l'insuline puis adressée au niveau de l'épithélium vasculaire des vaisseaux irriguant le tissu adipeux, le foie, les muscles squelettiques et le cœur (Lafontan 2008). La LPL permet alors de libérer les AG issus des lipoprotéines dans l'interstitium de ces tissus. Les AG liés à l'albumine s'associent à une protéine exprimée au niveau de l'épithélium vasculaire, l'ABP (*Albumin Binding Protein*) ce qui permettrait de fixer l'albumine et de libérer l'AG. Cependant, les mécanismes impliqués dans la libération des AG dans l'espace interstitiel ne sont pas clairement identifiés actuellement (figure 6) (Kiens 2006).

#### ***a) Les transporteurs d'acides gras***

Le transport des AG à travers la membrane plasmique a longtemps été considéré comme étant une simple diffusion passive, dépendant de la concentration extracellulaire et de la demande énergétique de la cellule (Hamilton, Johnson et al. 2001; Hamilton, Guo et al. 2002). Puis, dans les années 1980, une équipe a montré que le transport des AG dans des adipocytes isolés était saturable et sensible à différents inhibiteurs de protéines de transport membranaires (phloretin) (Abumrad, Perkins et al. 1981; Abumrad, Park et al. 1984). Ceci apportait donc des arguments forts en faveur l'existence de protéines de transport des AG.

Afin de mesurer plus précisément le transport des AG, indépendamment de la demande énergétique de la cellule, Bonen et ses collaborateurs ont mis au point la préparation de vésicules de membrane plasmique issues de muscle squelettique (Bonen, Luiken et al. 1998). L'utilisation de ces vésicules a confirmé que le transport des AG est saturable et sensible à

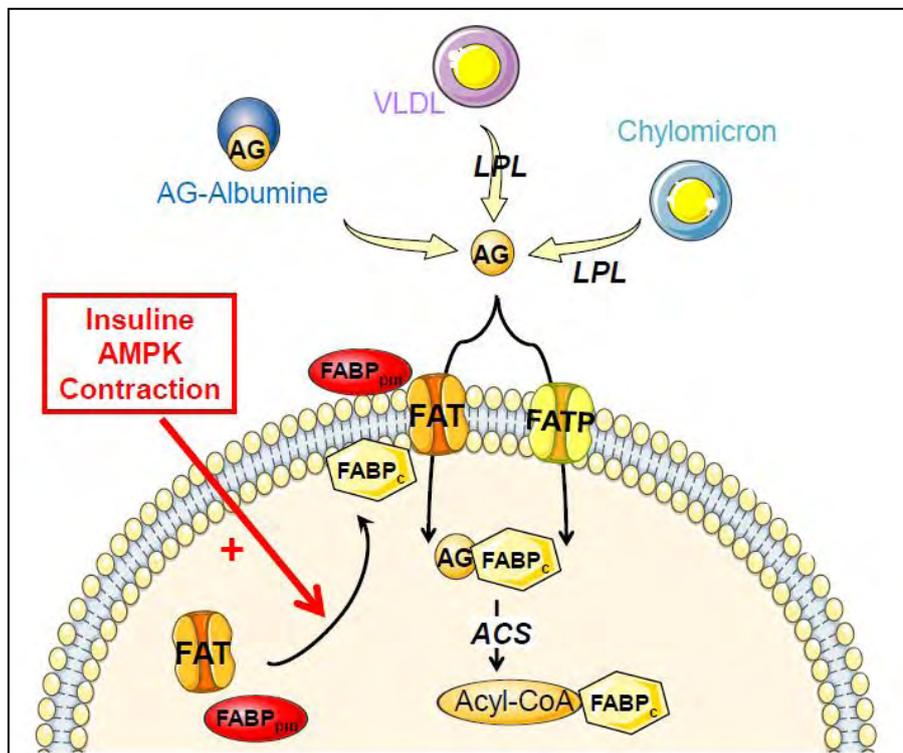
des inhibiteurs protéiques. Différents transporteurs des AG ont été identifiés : FAT (*Fatty Acid Translocase*), FABP<sub>pm</sub> (*plasma membrane-associated Fatty Acid Binding Protein*) et FATP (*Fatty Acid Transport Protein*).

Le premier transporteur des AG découvert a été FABP<sub>pm</sub> qui est exprimé dans le foie, le jejunum, le tissu adipeux et le cœur (Stremmel, Strohmeyer et al. 1985; Diede, Rodilla-Sala et al. 1992). Contrairement aux autres transporteurs que nous décrirons par la suite, FABP<sub>pm</sub> n'est pas une protéine transmembranaire, il est associé à la partie externe de la membrane plasmique (Stremmel, Strohmeyer et al. 1985). La surexpression de ce transporteur dans le muscle, *in vivo*, entraîne une augmentation du transport des AG assez faible par rapport à l'augmentation de son expression au niveau de la membrane plasmique (Clarke, Miskovic et al. 2004). Ainsi, la surexpression de FABP<sub>pm</sub> seul n'est pas suffisante pour augmenter de manière optimale le transport des AG ce qui suggère qu'il doit agir en association avec d'autres transporteurs.

Le transporteur associé à FABP<sub>pm</sub> est le transporteur FAT, identifié et cloné par l'équipe de Grimaldi en 1993 (Abumrad, el-Maghrabi et al. 1993). Il est exprimé de manière ubiquiste et est le transporteur principal du muscle squelettique. FAT est également appelé CD36 car sa séquence codante possède 85% d'homologie avec la glycoprotéine IV (ou CD36) (Abumrad, el-Maghrabi et al. 1993). L'utilisation de souris exprimant une forme mutée de FAT a permis de montrer l'importance de ce transporteur dans le transport des AG dans le muscle squelettique, le cœur et le tissu adipeux (Coburn, Knapp et al. 2000). Récemment, l'expression de ce transporteur au niveau de la membrane mitochondriale a été mise en évidence dans le muscle squelettique mais son rôle n'a pas été identifié (Bezaire, Bruce et al. 2006).

FAT interagit avec FABPc (*cytoplasmic Fatty Acid Binding Protein*) un autre transporteur des AG au niveau de la membrane plasmique interne (Spitsberg, Matitashvili et al. 1995). Ce dernier se lie aux AG une fois entrés dans la cellule, ce qui empêche la liaison des AG aux phospholipides membranaires et les oriente vers la mitochondrie. D'autres transporteurs intracellulaires ont été identifiés, comme par exemple ACBP (*Acyl-CoA Binding Protein*) ou FABP4 (*Fatty Acid Binding Protein 4*) mais les effets et la contribution de chacun de ces transporteurs n'ont pas été clairement établis.

Enfin, la famille des FATP comporte 6 isoformes (FATP1-6) qui ont des effets différents et sont également spécifiques de certains tissus. FATP1 a été découvert et cloné en 1994 par Schaffer et Lodish qui cherchaient, à partir d'une banque d'ADN complémentaires d'adipocytes, ceux qui augmentaient le transport des AG à longue chaîne (Schaffer and Lodish 1994). Ce transporteur est exprimé principalement dans le tissu adipeux et le muscle squelettique et son implication dans le transport des AG a été montrée *in vivo* sur des muscles surexprimant ce transporteur (Bonen, Chabowski et al. 2007). De même, FATP2, exprimé dans le foie, et FATP4, présent au niveau de l'intestin grêle et du tissu adipeux, participent à l'entrée des AG dans ces tissus (Bonen, Chabowski et al. 2007). FATP6 est exprimé dans le cœur et augmente le captage des AG dans ce tissu chez le rat (Gimeno, Ortegon et al. 2003). Enfin, le rôle de FATP3 et 5 dans le transport des AG reste à confirmer.



**Figure 6: Transport des AG dans la cellule et sa régulation.** D'après Bonen, Chabowski et al. 2007.

Les TG contenus dans les chylomicrons et les VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) qui permet de libérer les acides gras (AG) dans l'interstitium de différents tissus. Les AG liés à l'albumine s'associent à une protéine exprimée au niveau de l'épithélium vasculaire, l'ABP (Albumin Binding Protein) ce qui permettrait de fixer l'albumine et de libérer l'AG. Les AG libres peuvent alors entrer dans la cellule par différents transporteurs tel que FAT associé à FABPpm mais aussi *via* les FATP. La régulation du transport des AG est notamment due à la translocation de FAT et FABPpm à la membrane plasmique, ceci étant induit par l'insuline, l'AMPK et la contraction musculaire. Une fois dans la cellule, les AG transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase (ACS), s'associent à un transporteur cytoplasmique, FABPc.

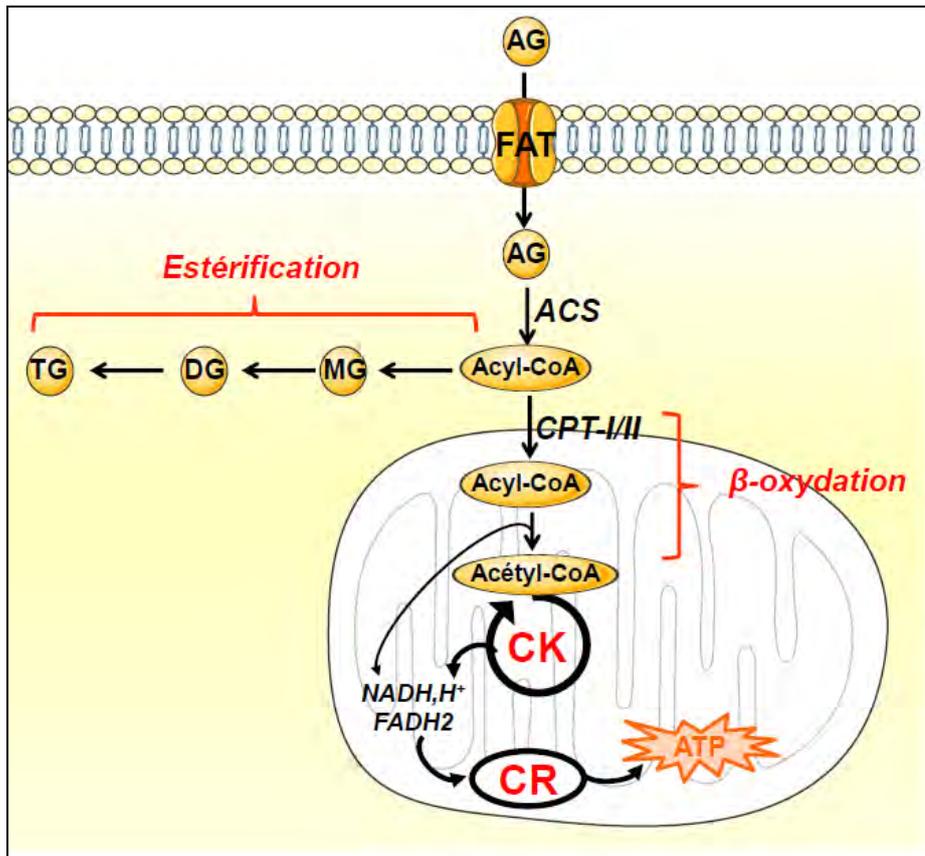
b) Régulation du transport des acides gras

L'insuline induit la synthèse de la LPL dans les adipocytes et augmente donc la disponibilité en AG à partir des chylomicrons et des VLDL.

De plus, certains transporteurs des AG sont régulables au niveau de leur expression protéique mais aussi par la translocation d'un pool cytoplasmique de transporteurs vers la membrane plasmique (MP). Tout comme la translocation de GLUT4 à la membrane, différents stimuli tels que l'insuline, l'AMPK ou la contraction musculaire, permettent d'amener FAT et FATPpm à la MP (figure 6) (Bonen, Luiken et al. 2000; Luiken, Dyck et al. 2002).

Bonen et ses collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois la translocation de FAT dans le muscle pendant la contraction musculaire. En effet, trente minutes de contraction musculaire provoquent une augmentation du transport des AG associée à une augmentation de la présence de FAT à la MP alors que pendant la phase de récupération ces deux phénomènes sont diminués (Bonen, Luiken et al. 2000). Ainsi l'augmentation de la translocation de FAT mais aussi de FABPpm, montré plus récemment, d'un pool cytoplasmique vers la MP, permet d'augmenter le transport des AG dans le muscle. Cette relocalisation de FAT à la MP est donc stimulée par la contraction musculaire mais aussi par l'insuline et l'AMPK (Glatz, Bonen et al. 2002).

Tout comme le glucose qui est activé en entrant dans la cellule, les acides gras, lorsqu'ils sont dans le cytosol, subissent une première étape d'activation en acyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'acyl-CoA synthétase (ACS) en présence de Coenzyme A et d'ATP. Ils pourront alors être soit estérifiés et stockés sous forme de TG, soit entrer dans la mitochondrie pour être oxydés et fournir de l'énergie *via* la production de coenzymes réduits et leur transformation en énergie par la chaîne respiratoire (figure 7).



**Figure 7 : devenir des AG après leur entrée dans la cellule**

Une fois dans la cellule, les AG sont activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (ACS). Ils pourront alors soit être stocké sous forme de TG, soit entrer dans la mitochondrie pour y être oxydés. Pour être stockés, les acyl-CoA vont estérifier les 3 fonctions alcool d'une molécule de glycérol donnant successivement un monoglycéride (MG), puis un diglycéride (DG) et enfin un triglycéride (TG), la forme de stockage des AG. Pour être oxydés, les acyl-CoA entrent dans la mitochondrie grâce à CPT-I et -II (carnitine palmitoyl transférase-I et -II) puis seront oxydés ( $\beta$ -oxydation) en acétyl-CoA, qui est ensuite pris en charge par le cycle de Krebs (CK). La  $\beta$ -oxydation et le CK produisent des coenzymes réduits  $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  qui permettent enfin de fournir de l'énergie (ATP) *via* la chaîne respiratoire (CR).

## 2. Stockage des acides gras

### a) Les différentes étapes

Le stockage des AG sous forme de TG a lieu principalement dans le tissu adipeux et le foie mais dans certaines conditions pathologiques, des TG peuvent être stockés dans les muscles et le cœur. Les AG activés en acyl-CoA vont estérifier les trois fonctions alcool d'une molécule de glycérol 3-phosphate (glycérol-3P). Celui-ci provient de la transformation du glucose dans tous les tissus sauf le foie qui possède une enzyme, la glycérol-kinase, capable de phosphoryler le glycérol exogène en glycérol-3-P.

La synthèse des TG, également appelée estérification des AG se fait en quatre étapes successives correspondant à trois transferts d'acyl-CoA (acétylation) et d'une déphosphorylation (figure 7). Tout d'abord, la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) permet l'acétylation du glycérol 3P qui aboutit à la formation d'acide lysophosphatidique. Celui-ci est à son tour acétylé par l'acylglycérol 3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour donner l'acide phosphatidique. Celui-ci est ensuite déphosphorylé par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP) pour donner le diacylglycérol (DG) qui conduit à la formation de TG par la diacylglycéroltransférase (DGAT).

Les TG ainsi formés sont stockés dans le cytosol, ou dans les gouttelettes lipidiques dans le cas des adipocytes. Dans le foie, ils peuvent être importés dans le peroxyosome et l'appareil de Golgi pour former des VLDL libérées dans le sang. La synthèse de VLDL est complexe, elle nécessite un assemblage coordonné entre les TG, le cholestérol estérifié et des apoprotéines.

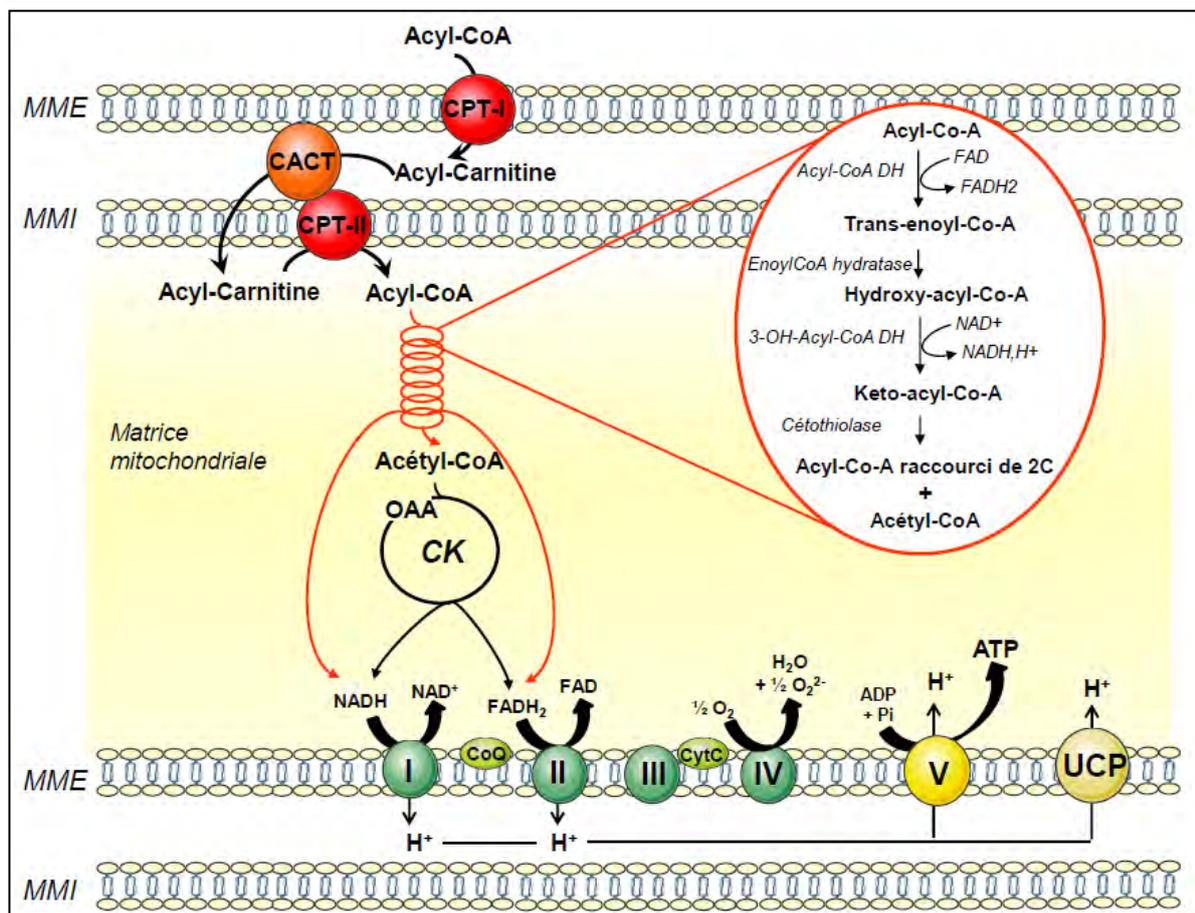
#### b) Régulation de l'estérification des AG

L'insuline augmente aussi le transport de glucose dans les adipocytes ce qui permet la synthèse de glycérol 3P.

L'AMPK est également un régulateur de l'estérification des AG puisqu'elle inhibe la GPAT (sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase) ce qui diminue la synthèse de TG dans le muscle et le foie (Muoio, Seefeld et al. 1999; Park, Kaushik et al. 2002).

### **3. L'oxydation des AG**

L'oxydation des AG correspond à la transformation d'une molécule d'acyl-CoA et plusieurs molécules d'acétyl-CoA, le nombre d'acétyl-CoA produits étant dépendant du nombre de carbones de l'acyl-CoA. Cette voie métabolique a lieu dans la matrice mitochondriale et nécessite donc le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie. Pour que l'oxydation des AG soit complète, et qu'elle permette la production d'énergie, il est nécessaire qu'elle soit couplée au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire (figures 7 et 8), étapes qui seront décrites par la suite.



**Figure 8 : oxydation des AG couplée au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire**

La membrane mitochondriale interne (MMI) étant imperméable aux acyl-CoA, ceux-ci sont transformés en acyl-carnitines par CPT-I (carnitine palmitoyl-transférase-I), une enzyme de la membrane externe (MME). Ensuite, la translocase, CACT (carnitine acylcarnitine translocase) fait passer l'acylcarnitine à travers la MMI, puis l'acylcarnitine transférase II (ou CPT-II pour carnitine palmitoyl-transférase) transfère à nouveau le coenzyme A sur le groupement acyle reformant ainsi l'acyl-CoA.

L'acyl-CoA pourra alors être transformé en acétyl-CoA par une série de cycles de 4 réactions enzymatiques. Une première oxydation de l'acyl-CoA par l'acyl-CoA-déshydrogénase (acyl-CoA-DH) va libérer l'énoyl-CoA et un coenzyme réduit, le FADH<sub>2</sub>. L'énoyl-CoA va ensuite être hydraté pour former le β-hydroxy-acyl-CoA qui va être oxydé par la β-hydroxy-acyl-CoA-déshydrogénase (β-hydroxy-acyl-CoA-DH) qui produit un autre coenzyme réduit le NADH, H<sup>+</sup> et un β-cétoacyl-CoA. Ce dernier sera clivé lors de la dernière réaction, après le carbone β, par la cététhiolase qui libère ainsi l'acyl-CoA raccourci de deux carbones et un acétyl-CoA.

L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs (CK) et produit aussi des coenzymes réduits. Ceux-ci sont pris en charge par la chaîne respiratoire constituée de complexes protéiques fixes (I, II, III, IV et V) et d'éléments mobiles le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome c (Cyt C). Le gradient de proton (H<sup>+</sup>) formé peut conduire à la formation d'ATP par le complexe V (ATP-synthase) ou être dissipé par des protéines découplantes (UCP).

a) Le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire à double membrane, nommée membrane mitochondriale interne (MMI) et externe (MME) délimitant un espace intermembranaire. La MMI étant imperméable aux acyl-CoA, ceux-ci doivent la traverser sous forme d'acylcarnitine pour pouvoir entrer dans la mitochondrie. Le transport des acyl-CoA va alors

faire intervenir 3 enzymes différentes. Cette étape est très régulée et représente l'étape limitante de l'oxydation des lipides (figure 8).

Tout d'abord, l'acylcarnitine transférase-I, plus couramment appelée CPT-I (carnitine palmitoyl-transférase-I) est une enzyme présente au niveau de la MME. Son site catalytique est situé dans le cytosol et permet de transférer un groupement carnitine sur l'acyl-CoA ce qui forme une acylcarnitine pouvant diffuser à travers la membrane.

Ensuite, une translocase (CACT pour carnitine acylcarnitine translocase) échange l'acylcarnitine contre de la carnitine non chargée à travers la MMI. L'acylcarnitine se retrouve alors dans la matrice mitochondriale, où une troisième enzyme, l'acylcarnitine transférase II (ou CPT-II pour carnitine palmitoyl-transférase) transfère à nouveau le coenzyme A sur le groupement acyle reformant ainsi l'acyl-CoA et libérant une carnitine qui pourra retourner dans l'espace intermembranaire pour un cycle suivant *via* la CACT. CPT-II est située au niveau de la matrice mitochondriale et catalyse également la formation d'acylcarnitines, à partir d'intermédiaires d'acyl-CoA en cours d'oxydation et relargués par la mitochondrie.

#### b) Les étapes de la $\beta$ -oxydation

Une fois dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA vont être oxydés : ils vont subir une succession de cycles qui vont couper l'acyl-CoA au niveau du carbone  $\beta$  ce qui va libérer un acétyl-CoA. L'acyl-CoA est alors réduit à chaque cycle de 2 carbones jusqu'au dernier cycle qui libèrera 2 acétyl-CoA. L'ensemble des cycles est appelé Hélice de Lynen et chaque cycle est composé de quatre réactions successives (figure 8). Une première oxydation de l'acyl-CoA par l'acyl-CoA-deshydrogénase va libérer l'énoyl-CoA et un coenzyme réduit, le  $\text{FADH}_2$ . L'énoyl-CoA va ensuite être hydraté pour former le  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA qui va être oxydé par la  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA-déshydrogénase qui produit un autre coenzyme réduit le  $\text{NADH}, \text{H}^+$  et un  $\beta$ -cétoacyl-CoA. Ce dernier sera clivé lors de la dernière réaction, après le carbone  $\beta$ , par la cétothiolase qui libère ainsi l'acyl-CoA raccourci de deux carbones et un acétyl-CoA.

L'acyl-CoA subira autant de cycles qu'il y a de paires de carbone restantes, c'est-à-dire, jusqu'à la dégradation complète de l'acyl-CoA en acétyl-CoA.

Chaque cycle d'oxydation libère une quantité d'énergie potentielle sous forme d'1 acétyl-CoA, 1  $\text{FADH}_2$  et 1  $\text{NADH}, \text{H}^+$ . Ainsi, une molécule de palmitate à 16 carbones est oxydée en

7 cycles et produit 8 acétyl-CoA, 7 FADH<sub>2</sub> et 7NADH,H<sup>+</sup>. Pour être disponible pour la cellule, l'énergie contenue dans ces produits de la β-oxydation devra être convertie en ATP par d'autres réactions métaboliques *via* le cycle de Krebs et les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire.

c) Régulation de l'oxydation des lipides

L'étape limitante de l'oxydation des AG correspond à leur entrée dans la mitochondrie qui est finement régulée par le malonyl-CoA au niveau de CPT-I (Zammit 1999). Il existe 2 formes de CPT-I : M-CPT-I présente dans le muscle et le tissu adipeux et plus sensible au malonyl-CoA que L-CPT-I, exprimée notamment au niveau du foie et du cœur. L'activité de CPT-I est également régulée par la fluidité membranaire qui peut modifier la conformation spatiale de l'enzyme et donc sa sensibilité aux inhibiteurs.

Le malonyl-CoA est formé à partir de l'acétyl-CoA par l'action de l'acétyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) ; mais il peut être dégradé par la réaction inverse catalysée par la malonyl-CoA décarboxylase (MCD). L'AMPK diminue les taux intracellulaires de malonyl-CoA en jouant sur ces deux enzymes. En effet, l'AMPK phosphoryle d'une part l'ACC2 ce qui l'inactive et empêche la formation de malonyl-CoA (Carling, Zammit et al. 1987) et d'autre part la MCD ce qui l'active et catalyse la dégradation du malonyl-CoA (Saha, Schwarsin et al. 2000). Ainsi, l'AMPK augmente l'oxydation des AG dans le muscle et le foie, en levant l'inhibition de CPT-I par le malonyl-CoA (Merrill, Kurth et al. 1997; Velasco, Geelen et al. 1997; Park, Gammon et al. 2002)

Les lipides eux-mêmes peuvent réguler le métabolisme des AG *via* leur liaison à des récepteurs nucléaires, les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors). Il existe 3 sous types de PPARs qui sont exprimés dans différents tissus : PPARα est abondamment exprimé dans le foie mais aussi dans les muscles squelettiques, le cœur et le tissu adipeux brun ; PPARγ est principalement présent dans le tissu adipeux blanc et PPARδ (ou β) est exprimé dans de nombreux tissus et notamment dans les muscles squelettiques et le cœur. Les PPARs s'associent aux récepteurs aux rétinoïdes (RXR) dans le noyau et régulent l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le transport des AG, leur utilisation ou leur stockage (Evans, Barish et al. 2004).

Ainsi, l'activation de PPAR $\alpha$  (Vega, Huss et al. 2000; Reddy and Hashimoto 2001) et  $\delta$  (Tanaka, Yamamoto et al. 2003) permet d'augmenter l'oxydation des lipides alors que PPAR $\gamma$  augmente la synthèse de lipides et leur stockage.

#### 4. *Le cycle de Krebs*

Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique ou cycle tricarboxylique) est un carrefour métabolique où se rejoignent les métabolismes glucidique et lipidique. En effet, l'acétyl-CoA, substrat de ce cycle, peut provenir de l'oxydation des AG, comme nous venons de le voir, mais également de l'oxydation du pyruvate.

Cette voie métabolique a lieu dans la matrice mitochondriale et se fait exclusivement en condition aérobie. C'est un ensemble coordonné de 8 réactions qui permettent d'extraire l'énergie contenue dans un acétyl-CoA en l'oxydant en 2 CO<sub>2</sub> et en produisant un ATP et des coenzymes réduits : 3NADH,H<sup>+</sup> et un FADH<sub>2</sub>. A chaque tour de cycle, un acétyl-CoA se condense avec l'oxaloacétate régénéré du cycle suivant. Cette première réaction du cycle est catalysée par la citrate synthase.

Le contrôle le plus important du cycle de Krebs est sous la dépendance du besoin en énergie. Ainsi, l'isocitrate deshydrogénase est la principale enzyme régulatrice du cycle de Krebs puisqu'elle est activée allostériquement par le NAD<sup>+</sup> et l'ATP et inhibée par le NADH,H<sup>+</sup> et l'ATP. De plus, le cycle de Krebs ne peut fonctionner que si, en aval, la chaîne respiratoire dispose d'un apport suffisant en oxygène.

Les réactions irréversibles du cycle de Krebs catalysées par la citrate synthase, l'isocitrate deshydrogénase et l' $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase peuvent être régulées en fonction de la disponibilité en substrats, du pouvoir réducteur (coenzymes réduits) et la charge énergétique. Ainsi, ces trois enzymes sont activées par l'ADP mais inhibées par le NADH, l'ATP.

#### 5. *La chaîne respiratoire*

##### a) Les phosphorylations oxydatives

La chaîne respiratoire correspond à un ensemble de cinq complexes protéiques, localisés dans la membrane interne mitochondriale (figure 8). Ces complexes vont assurer d'une part des

réactions d'oxydoréduction, permettant de transporter des électrons et de créer un gradient de proton, et d'autre part, assurer la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.

La chaîne d'oxydoréduction est constituée par 4 complexes protéiques transmembranaires fixes (CI, CII, CIII et CIV) et par des éléments mobiles qui assurent la continuité de la chaîne d'oxydoréduction en reliant les éléments fixes. Ainsi, l'ubiquinone (ou coenzyme Q) est un lipide qui relie le complexe I au III et le complexe II au III. Le cytochrome c est une protéine de transfert d'électrons qui relie le complexe III au IV.

Selon la théorie de Peter Mitchell, ces complexes vont assurer des réactions d'oxydoréduction qui vont permettre de transporter et de transférer les électrons, issus des coenzymes réduits (produits de la  $\beta$ -oxydation et du cycle de Krebs), vers l'oxygène (apporté aux tissus par la respiration) pour produire de l'eau au niveau du complexe IV. L'énergie générée par le transport des électrons sur la chaîne d'oxydoréduction permet aux complexes I, III et IV de fonctionner comme des pompes à protons et de créer un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Les protons, alors présents dans l'espace inter-membranaire, tendent à revenir dans la matrice mitochondriale sous la pression de ce gradient. Mais, compte tenu de l'imperméabilité de la membrane interne, ils ne peuvent y parvenir qu'en empruntant un canal que constitue le complexe V (ou ATP synthase) de la chaîne respiratoire. Le passage des protons par ce canal va alors fournir l'énergie nécessaire à la réaction de phosphorylation transformant l'ADP en ATP (figure 8).

Ainsi, le couplage entre les deux fonctions de la chaîne respiratoire (oxydoréduction et phosphorylation de l'ADP en ATP) permet au NADH,H<sup>+</sup> et au FADH<sub>2</sub> de former respectivement 3 et 2 molécules d'ATP.

#### d) Le découplage de la chaîne respiratoire

Cependant il existe une voie alternative à l'ATP synthase, qui permet la fuite des protons grâce à des protéines découplantes, les UCP (*uncoupling proteins*) (Brand, Chien et al. 1994; Rolfe, Hulbert et al. 1994). On parle alors de découplage de la chaîne respiratoire puisque l'ATP synthase est court-circuitée par les UCP ce qui permet de dissiper le gradient de protons sous forme de chaleur mais ne permet plus de produire de l'énergie (figure 8).

Ce phénomène a d'abord été mis en évidence par la découverte d'UCP1 exprimée au niveau du tissu adipeux brun et impliquée dans la thermogénèse (Ricquier and Kader 1976). Puis, en 1997, deux nouvelles protéines découplantes ont été découvertes, il s'agit d'UCP2, exprimée

de manière ubiquitaire (Gimeno, Dembski et al. 1997), et UCP3, surtout présente au niveau du muscle squelettique (Boss, Samec et al. 1997). Contrairement à UCP1, ces deux protéines découplantes ne semblent pas impliquées dans la fuite de protons et la thermogénèse. En effet, le rôle d'UCP2 a notamment été démontré dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline alors qu'UCP3 serait important dans la régulation de la capacité oxydative des mitochondries (Costford, Seifert et al. 2007).

### **6. Bilan énergétique du couplage entre l'oxydation des AG, le CK et la CR**

Comme nous l'avons vu précédemment l'oxydation d'une molécule de palmitate libère 8 acétyl-CoA, 7 FADH<sub>2</sub> et 7 NADH,H<sup>+</sup>. Ainsi, les coenzymes réduits, produits par l'hélice de Lynen vont fournir au final, après la chaîne respiratoire, 35 ATP soient 21 grâce aux NADH,H<sup>+</sup> et 14 par les FADH<sub>2</sub>. Les 8 acétyl-CoA produits par les cycles d'oxydation, vont eux, entrer dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP et des coenzymes réduits qui fourniront l'ATP *via* les phosphorylations oxydatives. Au total, 96 ATP seront produits soient 72 ATP *via* les 24 NADH,H<sup>+</sup>, 16 ATP grâce aux 8 FADH<sub>2</sub> et 8 ATP produits directement par le cycle de Krebs. L'oxydation d'une molécule de palmitate produit donc 131 ATP mais le gain net est de 130 ATP, un ATP étant utilisé pour l'activation de palmitate en palmitoyl-CoA dans le cytosol.

Ainsi, le rendement énergétique de l'oxydation d'une molécule de palmitate (130 ATP) est bien plus élevé que celui d'une molécule de glucose (38 ATP).

### **7. Régulation de la biogenèse mitochondriale**

La capacité oxydative des mitochondries dépend du nombre de mitochondries et de l'activation des enzymes mitochondriales. L'activation chronique de l'AMPK augmente la biogenèse mitochondriale et l'expression des enzymes mitochondriales. Ces effets de l'AMPK passent par l'activation de PGC1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$* ), un coactivateur de PPAR $\gamma$  découvert en 1998 par Puigserver et ses collaborateurs (Puigserver, Wu et al. 1998). Plus tard, il a été montré que PGC1 $\beta$  un coactivateur transcriptionnel présentant une forte homologie de structure avec celle de PGC1 $\alpha$ , permet également d'augmenter la biogenèse mitochondriale (Lin, Wu et al. 2002).

PGC1 $\alpha$  et  $\beta$  jouent un rôle essentiel dans la régulation de la biogenèse mitochondriale en interagissant avec des facteurs de transcription tels que NRF1 et 2 (*nuclear respiratory factor 1 et 2*) (Evans and Scarpulla 1989; Evans, Barish et al. 2004) et avec un récepteur nucléaire ERR $\alpha$  (*estrogen-related receptor  $\alpha$* ). L'interaction avec NRF1 et 2 et ERR $\alpha$  induit l'expression de gènes codant pour des complexes de la chaîne respiratoire mais aussi pour des protéines impliquées dans la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial telles que TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), TFB1M et TFB2M (*mitochondrial transcription factor B1 et B2*) (Wu, Puigserver et al. 1999; Huss, Kopp et al. 2002; Mootha, Lindgren et al. 2003; Huss, Torra et al. 2004).

Ainsi, l'activation de PGC1 $\alpha$  par l'AMPK contribue à la formation de nouvelles mitochondries et augmente ainsi la capacité à oxyder les AG dans le muscle mais aussi dans le tissu adipeux brun (Rossmeisl, Barbatelli et al. 2002; Villena, Carmona et al. 2002; Matejkova, Mustard et al. 2004). De manière intéressante, l'activation de PPAR $\gamma$  chez l'Homme entraîne une augmentation de l'expression de PGC1 $\alpha$  dans le tissu adipeux blanc ce qui conduit à une augmentation de la biogenèse mitochondriale (Bogacka, Xie et al. 2005). De plus, PPAR $\delta$  entraîne une modification des fibres musculaires vers un phénotype oxydatif en augmentant la biogenèse mitochondriale *via* l'activation de PGC1 $\alpha$  (Luquet, Lopez-Soriano et al. 2003; Schuler, Ali et al. 2006).

## **B. Production des AG : la lipolyse**

### ***1. Les différentes étapes***

La lipolyse correspond à l'hydrolyse des TG en AG dans les adipocytes mais aussi dans le muscle squelettique. Elle a lieu lorsque l'organisme a besoin d'énergie comme par exemple en situation de jeûne, lors d'un exercice physique prolongé ou pour la défense contre le froid.

La lipolyse se fait en trois étapes successives permettant d'enlever à chaque fois un AG du squelette glycérol ; il y a donc libération de trois AG et d'un glycérol à partir d'un TG (figure 9). Le glycérol passe alors la membrane plasmique par diffusion facilitée grâce à une aquaporine (AQP7) (Lafontan 2008). Les AG sortent également de la cellule grâce à FABP4, se lie à l'albumine pour rejoindre la circulation sanguine et sont transportés vers des organes tels le foie le cœur ou les muscles squelettiques pour y être utilisés et produire de l'énergie.

Cependant, une partie des AG sera à nouveau stockée dans l'adipocyte, on parle alors de cycle futile des AG (Lafontan 2008).

La première étape de la lipolyse adipocytaire correspond à l'hydrolyse des TG par la lipase hormono-sensible (LHS) qui détache le premier AG pour former un diglycéride (DG). Jusqu'en 2004, la LHS était considérée comme la seule enzyme capable d'hydrolyser les TG, mais l'obtention de souris déficientes pour cette enzyme a mis en évidence un système plus complexe. En effet, ces souris présentent une activité lipolytique basale persistante et une accumulation de DG dans leur tissu adipeux (Osuga, Ishibashi et al. 2000). Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'une autre enzyme permettant l'hydrolyse des TG en DG, il s'agit de l'ATGL (*Adipose Tri-Glyceride Lipase*) (Zimmermann, Strauss et al. 2004). Puis la LHS qui possède également une activité diglycéride lipase, va ensuite catalyser la deuxième réaction de la lipolyse, ce qui permet ensuite d'hydrolyser les DG et former ainsi un monoglycéride (MG) et un second AG. Enfin, la monoglycéride lipase (MGL) libère le troisième AG et le glycérol.

## 2. Régulation de la lipolyse

La régulation de l'activité de la LHS se fait par des phosphorylations sur sérine (résidus Ser 659 et 660) *via* la PKA (figure 9) (Anthonsen, Ronnstrand et al. 1998). Lorsque la LHS est sous forme phosphorylée, elle migre du cytosol vers la surface des gouttelettes lipidiques où elle aura accès aux TG pour les hydrolyser. L'accès de la LHS à ces gouttelettes lipidiques est contrôlé par des protéines, les périlipines. Lorsque la lipolyse est activée, la phosphorylation des périlipines entraîne un remodelage de la surface des gouttelettes lipidiques, autorisant ainsi l'accès à la LHS (Tansey, Sztalryd et al. 2004). Plus récemment, il a été montré que la phosphorylation des périlipines permet de libérer CGI-58 (*Comparative gene identification 58*), un co-activateur de l'ATGL lié aux périlipines en conditions basales. La liaison de CGI-58 à l'ATGL permet d'activer cette lipase et donc de catalyser l'hydrolyse des TG (Lafontan and Langin 2009).

Différentes voies de signalisation interviennent dans la régulation de la lipolyse et plus particulièrement dans la phosphorylation de la LHS.

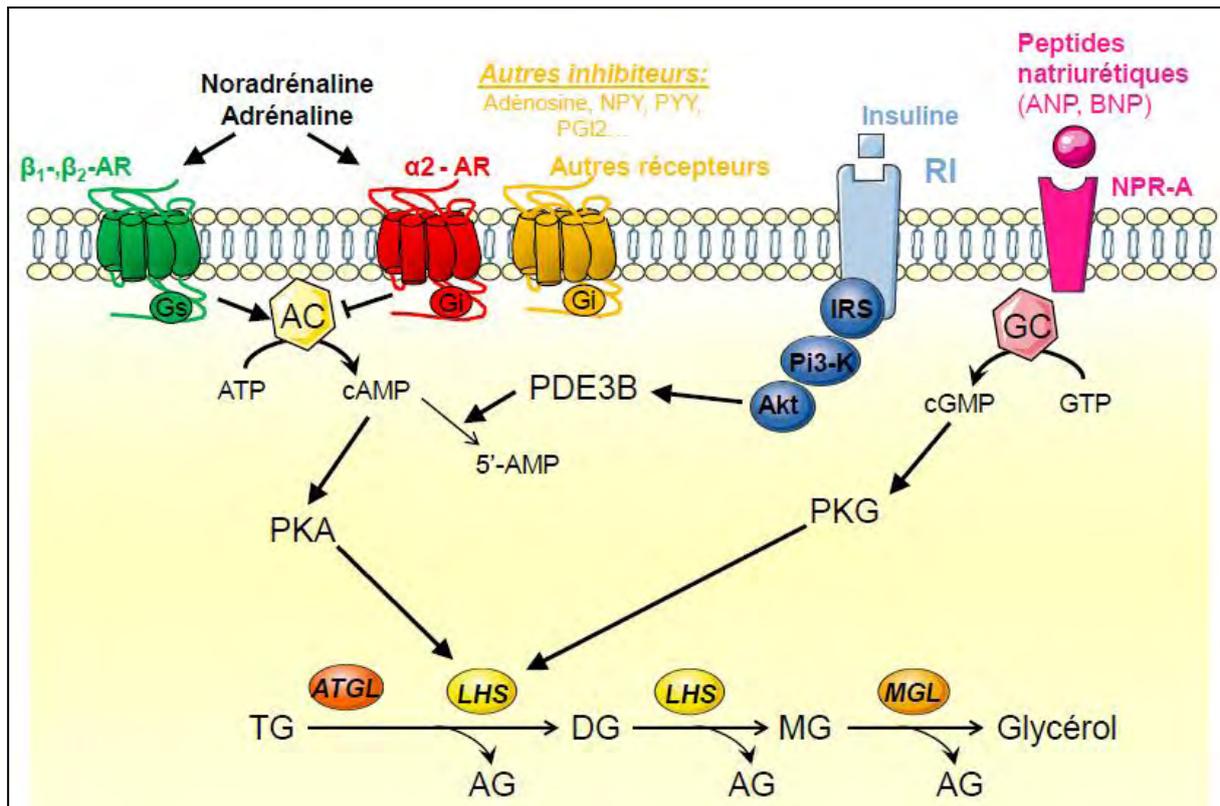
Les catécholamines sont des régulateurs importants de la lipolyse ; l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ 1, 2, 3-AR) induit un effet lipolytique alors que l'activation des récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergique inhibe la lipolyse. Ces deux récepteurs sont couplés respectivement à des

protéines G de type Gs et Gi et contrôlent ainsi les taux d'AMP cyclique (AMPc) *via* l'adénylyl cyclase. Ces variations d'AMPc régulent l'activité de la LHS par phosphorylation par la PKA (Lafontan and Langin 2009). Les adipocytes humains expriment aussi bien les  $\beta$ 1,  $\beta$ 2-AR que les  $\alpha$ 2-AR et la réponse finale est modulée en fonction du nombre de ces récepteurs (qui varie suivant la localisation anatomique des dépôts adipeux) et de l'affinité des catécholamines pour l'un ou l'autre des récepteurs.

L'insuline est la principale hormone antilipolytique. L'insuline va activer, par l'intermédiaire de sa voie de signalisation Pi3K/Akt, la phosphodiesterase-3B (PDE-3B), une enzyme responsable de la dégradation de l'AMPc. Cette diminution des taux d'AMPc entraîne une inactivation de la PKA et donc une diminution la phosphorylation de la LHS provoquant une inhibition de la lipolyse. Ainsi, en période alimentaire, les taux d'insuline élevés inhibent la lipolyse, alors que pendant la phase de jeûne ou lors d'un exercice prolongé, les catécholamines sont lipolytiques.

En 2000, une nouvelle voie lipolytique a été mise en évidence au niveau du tissu adipeux humain, il s'agit des peptides natriurétiques (Sengenès, Berlan et al. 2000). Ceux-ci agissent *via* les récepteurs membranaires NPR-A (Natriuretic peptide receptor-A, qui, après liaison avec leur ligand, induisent une augmentation intracellulaire de GMP cyclique. Ce dernier va activer la protéine Kinase G, qui, comme la PKA, phosphoryle et active la LHS (Lafontan, Moro et al. 2005).

D'autres substances régulatrices de la lipolyse ont également été identifiées au niveau des adipocytes humains (Lafontan and Langin 2009). Par exemple, l'adénosine, le peptide YY, le neuropeptide Y, l'acide nicotinique et les prostaglandines agissent sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines Gi ce qui entraîne une diminution des taux d'AMPc et une inhibition de la lipolyse. A l'inverse, certaines cytokines telles que le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) et l'IL-6 (Interleukine-6) stimulent la lipolyse mais de façon plus lente (Langin and Arner 2006).



**Figure 9 : Régulation de la lipolyse dans l'adipocyte humain.** D'après (Lafontan and Langin 2009)

La première étape de la lipolyse adipocytaire correspond à l'hydrolyse des TG par la lipase hormono-sensible (LHS) qui détache le premier AG pour former un diglycéride (DG). L'ATGL (*Adipose Tri-Glyceride Lipase*) participe aussi à cette étape. Les DG sont ensuite transformés en monoglycérides (MG) sous l'action de la LHS et la monoglycéride lipase (MGL) qui catalyse la dernière étape libérant le glycérol et le dernier AG.

L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ -AR) par les catécholamines induit un effet lipolytique alors que l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergique ( $\alpha_2$ -AR) inhibe la lipolyse. Ces deux récepteurs sont couplés respectivement à des protéines G de type Gs et Gi et contrôlent ainsi les taux d'AMP cyclique (AMPc) via l'adénylyl cyclase (AC). Ces variations d'AMP cyclique (AMPc) régulent l'activité de la LHS par phosphorylation par la PKA. D'autres molécules comme l'adénosine, le peptide YY (PYY), le neuropeptide Y (NPY) activent des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines Gi et inhibent ainsi la lipolyse. De plus, les peptides natriurétiques agissent via les récepteurs membranaires NPR-A (*Natriuretic peptide receptor-A*) et induisent une augmentation intracellulaire de GMP cyclique (GMPc) par la guanylate cyclase (GC) ce qui active la protéine Kinase G (PKG) puis la LHS. Enfin, l'insuline stimule la phosphodiestérase 3B (PDE3B) qui diminue les taux d'AMPc et inhibe ainsi la lipolyse.

En 1994, Sullivan et ses collaborateurs ont montré qu'une activation de l'AMPK par l'AICAR dans les adipocytes entraîne une inhibition de la lipolyse stimulée par des agonistes  $\beta$ -adrénergiques (Sullivan, Brocklehurst et al. 1994). Malgré des études montrant un effet lipolytique de l'AMPK (Yin, Mu et al. 2003; Koh, Hirshman et al. 2007), l'expression d'une forme inactive (DN) de l'AMPK dans des adipocytes de rat a permis de confirmer l'effet antilipolytique de l'AMPK (Daval, Diot-Dupuy et al. 2005). De plus, Gaidhu et ses

collaborateurs ont pu montrer que l'AMPK inhibe la lipolyse basale et stimulée par l'isoprotérenol sur des adipocytes isolés de tissu adipeux sous cutané et viscéral de rat (Anthony, Gaidhu et al. 2009). La même équipe a également montré qu'une activation prolongée de l'AMPK (15h) entraîne une augmentation de la lipolyse associée à l'induction de l'expression de gènes de l'oxydation des AG (Gaidhu, Fediuc et al. 2009). Ainsi, l'AMPK permettrait une adaptation du métabolisme lipidique dans les adipocytes blancs favorisant l'oxydation des AG produits par la lipolyse.

Le mécanisme par lequel l'AMPK inhibe la lipolyse n'est pas bien connu mais il semble impliquer la phosphorylation de la LHS sur le résidu serine 565 ce qui empêcherait sa translocation vers la gouttelette lipidique (Watt, Holmes et al. 2006; Anthony, Gaidhu et al. 2009). De plus, l'activation de l'AMPK serait secondaire à une augmentation de la lipolyse. En effet, la lipolyse, suivie de la ré-estérification d'une partie des AG, consomme alors de l'ATP ce qui activerait l'AMPK qui diminuerait ainsi la lipolyse (Gauthier, Miyoshi et al. 2008). Chez l'Homme, des médicaments antidiabétiques de la famille des biguanides et des thiazolidinediones permettent d'activer l'AMPK sur des adipocytes isolés humains et ceci conduit à une inhibition de la lipolyse induite par l'isoprotérenol (Bourron, Daval et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats montre qu'une activation aigüe de l'AMPK a donc des effets inhibiteurs sur la lipolyse. Il a d'ailleurs été montré récemment que pour permettre une augmentation maximale de la lipolyse, les agents lipolytiques inactivent l'AMPK *via* la PKA (Djouder, Tuerk et al. 2010).

### **III. Régulation du métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme**

#### **A. Coopération tissulaire dans l'adaptation du métabolisme à l'alternance repas/jeûne**

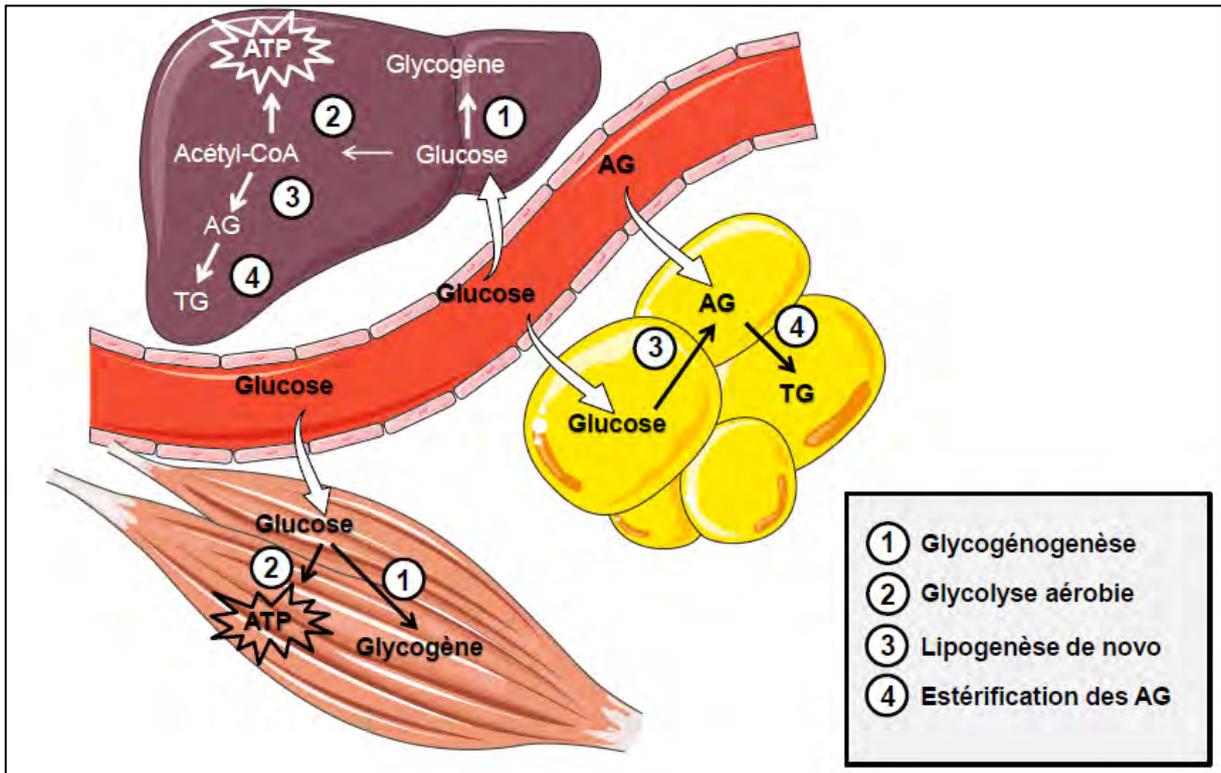
##### *1. En période post-prandiale*

###### *a) La sécrétion d'insuline*

L'insuline est sécrétée par le pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie. Le glucose sanguin entre dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans par le transporteur GLUT2 qui n'est pas saturable. Ainsi, la concentration de glucose intracellulaire reflète la glycémie. L'entrée du glucose dans la cellule  $\beta$  est immédiatement suivie de sa phosphorylation par une hexokinase spécifique, la glucokinase, puis le glucose est métabolisé ce qui augmente le rapport ATP/ADP. Ceci induit la fermeture des canaux potassiques sensibles à cette augmentation de la quantité d'ATP. Les ions  $K^+$  (potassium) cessent de sortir ce qui dépolarise la cellule  $\beta$  et entraîne l'ouverture de canaux calciques sensibles au voltage. L'entrée de calcium va alors déclencher l'exocytose de vésicules contenant l'insuline. Cette hormone est ainsi libérée dans la circulation sanguine et va agir au niveau du foie, du tissu adipeux et des muscles squelettiques (Prentki 1996).

###### *b) Flux métaboliques en période post-prandiale*

Le foie capte 1/3 du glucose alimentaire, le phosphoryle rapidement grâce à la glucokinase et le stocke sous forme de glycogène lorsque les besoins énergétiques sont satisfaits (le foie peut oxyder le glucose pour produire de l'énergie) (figure 10). Quand les possibilités de stockage sous forme de glycogène sont saturées, le foie transforme aussi le glucose en AG *via* l'acétyl CoA, puis en TG. Ainsi, dans le foie, le glucose est stocké et l'insuline inhibe la production hépatique de glucose. Au niveau du muscle squelettique, l'insuline stimule le transport de glucose et son stockage sous forme de glycogène ce qui permet la régulation de la glycémie. Selon les besoins énergétiques, les muscles peuvent aussi produire de l'énergie en oxydant le glucose *via* l'acétyl-CoA. Enfin, dans le tissu adipeux, l'insuline augmente le transport des AG et leur stockage sous forme de TG et elle stimule le transport glucose qui est transformé en AG dans la cellule (lipogénèse *de novo*).



**Figure 10 : flux métaboliques du glucose et des AG en situation post-prandiale**

En situation post-prandiale, le glucose est capté par le muscle et le foie où il sera stocké en glycogène (situation 1) ou bien utilisé pour produire de l'ATP (situation 2). De plus, dans le foie et le tissu adipeux, le glucose pourra être transformé en AG (situation 3) et stocké en TG (situation 4). Les AG circulants quant à eux vont être stockés dans le tissu adipeux (situation 4).

## 2. Lors du jeûne

### a) Sécrétion de glucagon

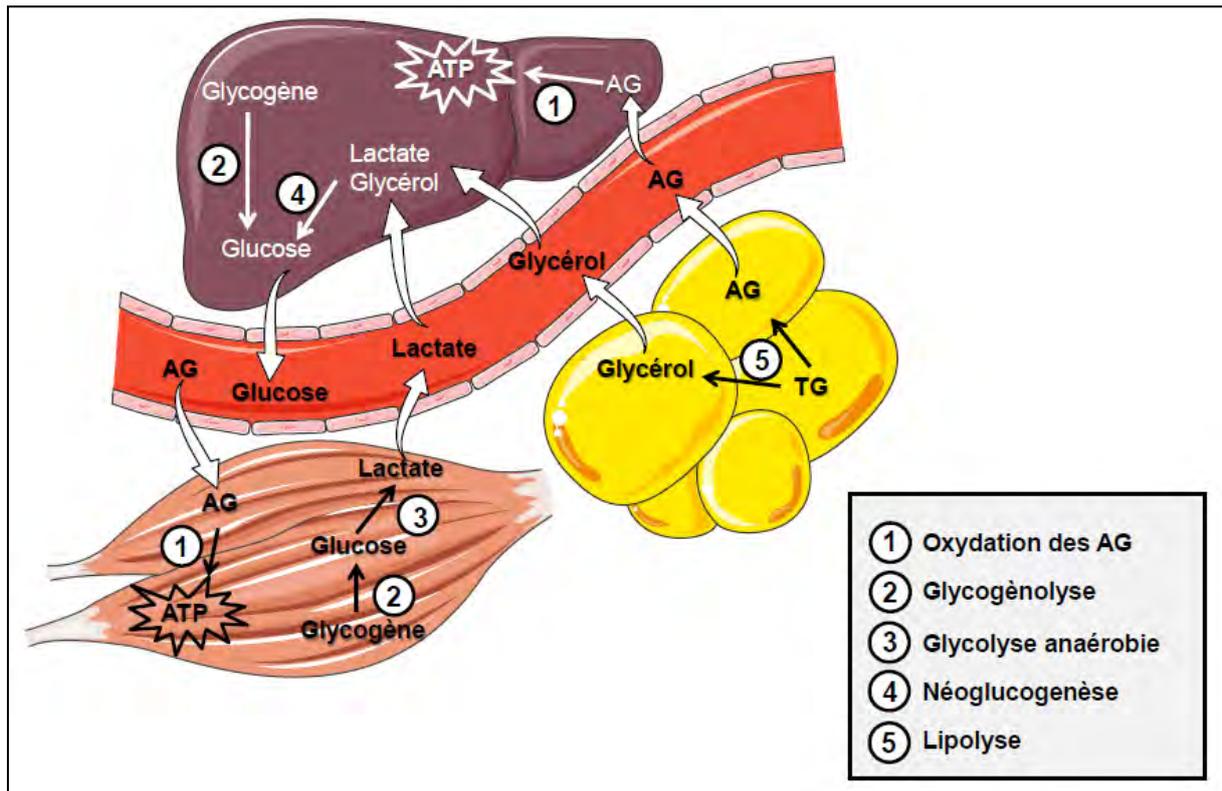
Le pancréas répond progressivement à la diminution de la glycémie en diminuant sa sécrétion d'insuline et en augmentant celle du glucagon. C'est un peptide sécrété par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans dans le sang et est véhiculé jusqu'à son tissu cible, le foie.

### b) Flux métaboliques en période de jeûne

Le foie assure le maintien de la glycémie et l'approvisionnement du cerveau en glucose puisqu'il dégrade ses stocks de glycogène libérant ainsi du glucose dans la circulation sanguine (figure 11). Avant que la réserve ne soit complètement épuisée, le foie synthétise du glucose à partir d'autres précurseurs non glucidiques (néoglucogenèse) tels que le lactate

provenant des muscles (glycolyse anaérobie) et le glycérol (provenant de la lipolyse adipocytaire). Le glucagon régule ce métabolisme glucidique hépatique en stimulant la production de glucose par la glycogénolyse et la néoglucogenèse et inhibant le stockage de glucose en glycogène.

La lipolyse dans le tissu adipeux produit non seulement du glycérol pour la néoglucogenèse hépatique mais aussi des AG utilisés par le foie et les muscles pour produire de l'énergie par la  $\beta$ -oxydation. L'utilisation des lipides réduit l'entrée du glucose ce qui permet de l'économiser pour le cerveau. Ce phénomène a été mis en évidence par Randle et ses collaborateurs en 1963 et sera décrit plus précisément dans le paragraphe suivant (Randle, Garland et al. 1963).

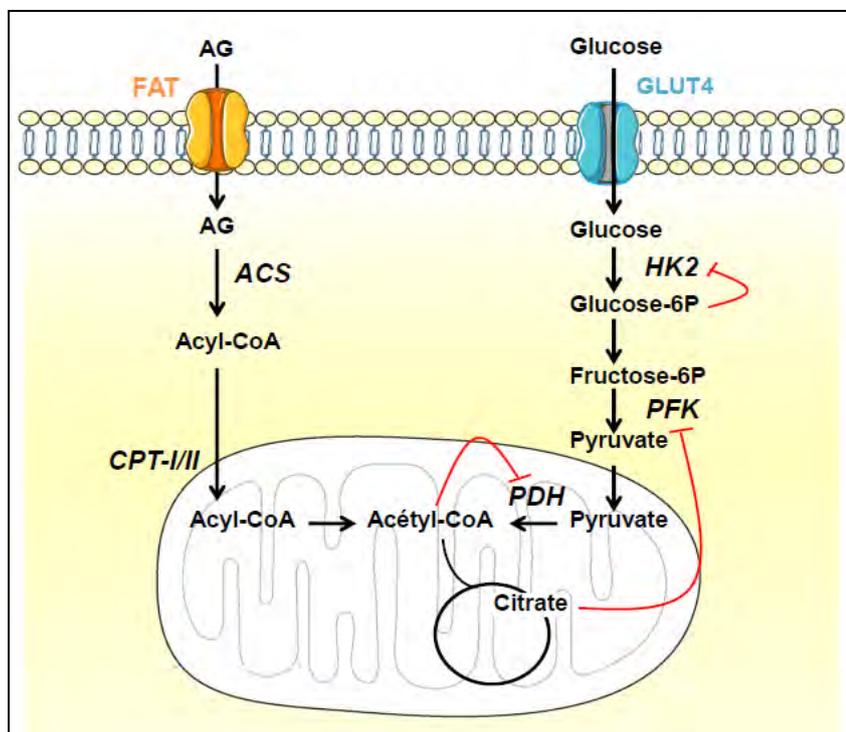


**Figure 11 : flux métaboliques du glucose et des AG en situation de jeûne**

En situation de jeûne, les AG provenant du tissu adipeux, sont relargués dans la circulation (situation 5) puis utilisés dans le muscle et le foie pour produire de l'ATP (situation 1). Le muscle et le tissu adipeux libèrent respectivement du lactate (situation 3) et du glycérol (situation 4) permettant la néoglucogenèse hépatique. Le foie peut ainsi libérer par cette voie, mais aussi par la dégradation des stocks de glycogène (situation 2), du glucose qui sera disponible pour le cerveau.

### 3. Le cycle de Randle

En 1963, Randle et ses collègues ont émis pour la première fois l'hypothèse que les AG pouvaient inhiber l'oxydation du glucose stimulée par l'insuline. En effet, ils ont montré que l'incubation de cœur de rat avec des AG, augmentait la concentration intracellulaire en G6P et glucose (Randle, Garland et al. 1963; Randle 1998). Selon leur modèle, l'utilisation des lipides comme source d'énergie entraîne des signaux métaboliques qui inhibent l'utilisation du glucose en inhibant les enzymes clés du métabolisme glucidique (figure 12). En effet, l'augmentation du ratio acétyl-CoA/CoA et NADH/NAD<sup>+</sup> dû à l'oxydation des lipides conduit à l'inactivation de la pyruvate déshydrogénase (PDH). De plus, l'accumulation de citrate, produit à partir de l'acétyl-CoA, inhibe la phosphofructokinase, augmente ainsi la concentration intracellulaire en G6P et inhibe l'hexokinase. Tout cela entraîne une accumulation de glucose intracellulaire et ainsi une inhibition de son transport dans le muscle.

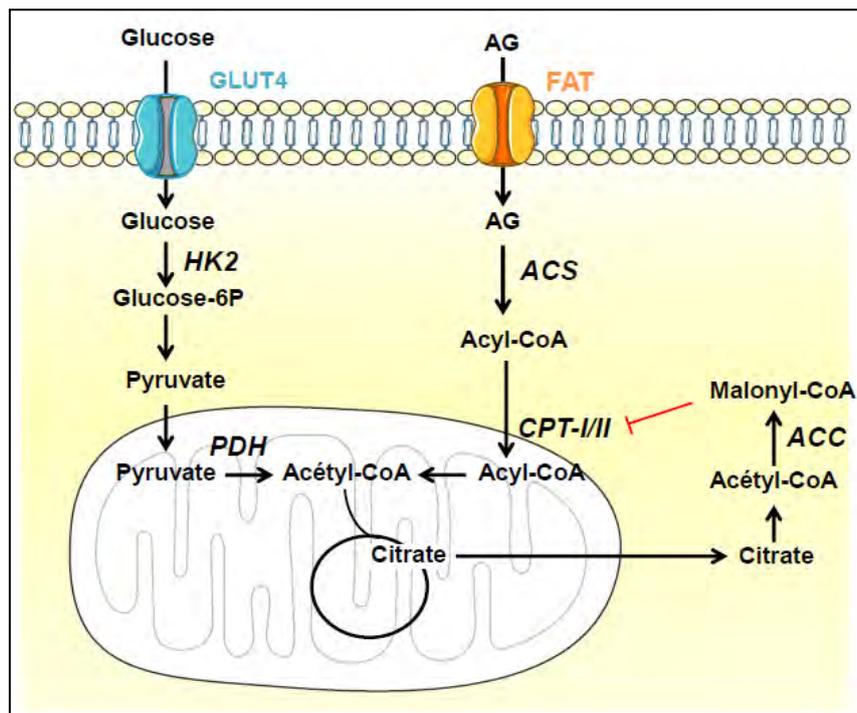


**Figure 12 : le cycle de Randle.** (Adapté de (Hue and Taegtmeyer 2009)).

Un flux important d'AG dans la cellule entraîne une augmentation de leur oxydation et donc de la production d'acétyl-CoA. Celui-ci empêche la formation d'acétyl-CoA supplémentaire à partir de pyruvate en inhibant la pyruvate déshydrogénase (PDH). De plus, le citrate formé à partir de l'acétyl-CoA inhibe la phosphofructokinase (PFK), une enzyme de la glycolyse. Ceci provoque l'accumulation de glucose 6-phosphate qui inhibe à son tour l'hexokinase 2 (HK2) et réduit l'entrée de glucose dans la cellule.

En 1977, Mac Garry et ses collaborateurs ont montré une inhibition de l'oxydation des lipides par de fortes concentrations en glucose (McGarry, Mannaerts et al. 1977), ceci correspondant à l'inverse (ou réciproque) du cycle de Randle (cycle de Randle « *reverse* » en anglais) (figure 13). Cet effet est dépendant de la quantité de glucose qui entre dans la cellule et dépend donc du tissu. Dans le foie, la glucokinase a un  $K_m$  élevé permettant au glucose d'entrer dans la cellule proportionnellement à la glycémie. Ainsi, lorsque celle-ci est élevée, une forte entrée de glucose dans les hépatocytes entraîne la formation de pyruvate puis d'acétyl-CoA (glycolyse aérobie). L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs et forme du citrate qui peut sortir de ce cycle. Le citrate sort alors de la mitochondrie, est transformé en acétyl-CoA puis en malonyl-CoA par l'ACC. Or, le malonyl-CoA est un inhibiteur de CPT1 ce qui empêche l'entrée des AG dans la mitochondrie pour qu'ils y soient oxydés.

Dans le muscle squelettique, l'inhibition de l'oxydation des AG dépend de la stimulation du transport de glucose par l'insuline ou l'AMPK. Ainsi, il a été montré qu'une infusion de glucose entraîne une hyperinsulinémie et inhibe l'oxydation du palmitate dépendante de CPT1 mais ne modifie pas l'oxydation des AG à chaîne moyenne dont l'entrée dans la mitochondrie ne nécessite pas CPT1 (Coyle, Jeukendrup et al. 1997).



**Figure 13 : réciproque du cycle de Randle.** (Adapté de (Hue and Taegtmeyer 2009)).

Un flux important de glucose dans la cellule entraîne une augmentation de son oxydation en acétyl-CoA. Ceci entraîne la production de citrate qui pourra, une fois dans le cytosol, reformer de l'acétyl-CoA puis du malonyl-CoA sous l'action de l'ACC (acétyl-CoA Carboxylase). Le malonyl-CoA inhibe alors CPT-I (carnitine palmitoyl transférase I) ce qui empêche l'entrée des Acyl-CoA dans la mitochondrie et donc inhibe leur oxydation.

Ainsi, les travaux de Randle, complétés par ceux de McGarry montrent une coopération des substrats énergétiques permettant d'oxyder le substrat majoritairement présent et d'épargner l'autre substrat énergétique en fonction de l'état nutritionnel.

La capacité à s'adapter au substrat présent (glucose lors de la phase post-prandiale et lipides en période de jeûne) a été définie en 1999 par Kelley et ses collaborateurs sous le terme de flexibilité métabolique (Kelley, Goodpaster et al. 1999).

## **B. Les effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique**

### ***1. Structure et activation de l'AMPK***

L'AMPK est une enzyme hétérotrimérique composée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  possédant une activité sérine/thréonine kinase, et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces sous-unités sont présentes sous différentes isoformes ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ ) qui permettent la formation de douze complexes possibles ( $\alpha\beta\gamma$ ) dont la prépondérance dépend des tissus. Par exemple, les cellules musculaires expriment principalement les complexes contenant la sous-unité catalytique  $\alpha_2$ , alors que les adipocytes présentent surtout la sous-unité  $\alpha_1$  (Daval, Diot-Dupuy et al. 2005; Daval, Foufelle et al. 2006).

L'AMPK est un détecteur de l'état énergétique de la cellule et est activé par une augmentation du ratio AMP/ATP, c'est-à-dire lorsque le niveau énergétique de la cellule est bas.

La phosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité catalytique est essentielle à l'activité de l'AMPK (Stein, Woods et al. 2000) et est régulée par une AMPK kinase (AMPKK) ou allostériquement par la liaison de l'AMP sur la sous-unité  $\gamma$ . En effet, l'AMP se lie à la sous-unité  $\gamma$  ce qui entraîne un changement de conformation de l'hétérotrimère et l'activation allostérique de l'AMPK (Scott, Hawley et al. 2004). Ce changement de conformation permet également de limiter l'accès aux protéines phosphatases telles que PP2A et 2C (protéine phosphatase 2A et 2C) qui inactivent l'AMPK (Suter, Riek et al. 2006). De plus, la conformation de l'hétérotrimère induite par l'AMP facilite l'accès de la sous-unité  $\alpha$  aux kinases phosphorylant l'AMPK ce qui permet la phosphorylation activatrice sur thréonine.

Il existe différentes kinases activant l'AMPK : LKB1, CaMKK  $\beta$  (*Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein Kinase kinase  $\beta$* ) et TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*).

**LKB1** est une sérine/thréonine kinase dont l'activité AMPKK a été mise en évidence pour la première fois à partir de foie de rat (Hawley, Boudeau et al. 2003; Woods, Johnstone et al. 2003). LKB1 forme un complexe trimérique avec deux autres protéines STAD et MO25 ce qui permet son activation (Boudeau, Scott et al. 2004) et entraîne une phosphorylation constitutivement active de l'AMPK. Plus tard, l'utilisation de souris invalidées pour LKB1 a permis de confirmer l'implication de cette AMPKK dans l'activation de l'AMPK (Sakamoto, McCarthy et al. 2005).

**CaMKK $\beta$**  est une kinase sensible au calcium, également capable d'activer l'AMPK. Une augmentation des taux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  conduit à l'association de la calmoduline avec le  $Ca^{2+}$ . Le complexe ainsi formé se lie à la CaMKK $\beta$  ce qui permet son activation et donc, la phosphorylation de l'AMPK. (Hawley, Pan et al. 2005; Woods, Dickerson et al. 2005).

**TAK1** et les protéines qui lui sont associées, les TAB (*TAK binding proteins*) permettent également d'activer l'AMPK (Momcilovic, Hong et al. 2006). TAK1 est activée par différents agents activateurs de l'AMPK et l'inactivation de cette kinase dans le cœur empêche la phosphorylation de l'AMPK. De plus, l'activation de l'AMPK par TAK1 pourrait être indirecte et impliquer LKB1 (Xie, Zhang et al. 2006).

## 2. Régulation de l'AMPK

De nombreux stimuli sont capables de moduler l'AMPK comme par exemple l'exercice physique (Hayashi, Hirshman et al. 1998), l'hypoxie (Mu, Brozinick et al. 2001), l'ischémie mais aussi différentes hormones ou agents pharmacologiques (Fryer, Parbu-Patel et al. 2002; Lihn, Jessen et al. 2004).

### a) Exercice physique

Tout comme l'AMPK, un exercice physique court augmente l'oxydation des AG et le transport de glucose indépendamment de la voie de signalisation de l'insuline (Merrill, Kurth et al. 1997; Kurth-Kraczek, Hirshman et al. 1999). De plus, un exercice physique régulier augmente la biogenèse mitochondriale, la capacité oxydative du muscle squelettique (Long

and Zierath 2006) et l'expression de certains gènes du métabolisme de la même façon que l'AMPK (Narkar, Downes et al. 2008). Certains ont proposé que les effets de l'exercice sur les métabolismes glucidique et lipidique seraient médiés par l'AMPK (Hayashi, Hirshman et al. 1998; Holmes, Kurth-Kraczek et al. 1999).

Cependant, une étude plus récente a montré que la contraction musculaire est toujours capable de stimuler le transport de glucose chez des souris invalidées pour les gènes codant pour l'AMPK- $\alpha 1$  et - $\alpha 2$ , suggérant ainsi que les effets de l'exercice physique seraient en partie indépendants de l'activation de l'AMPK (Jorgensen, Viollet et al. 2004).

#### b) Adipokines

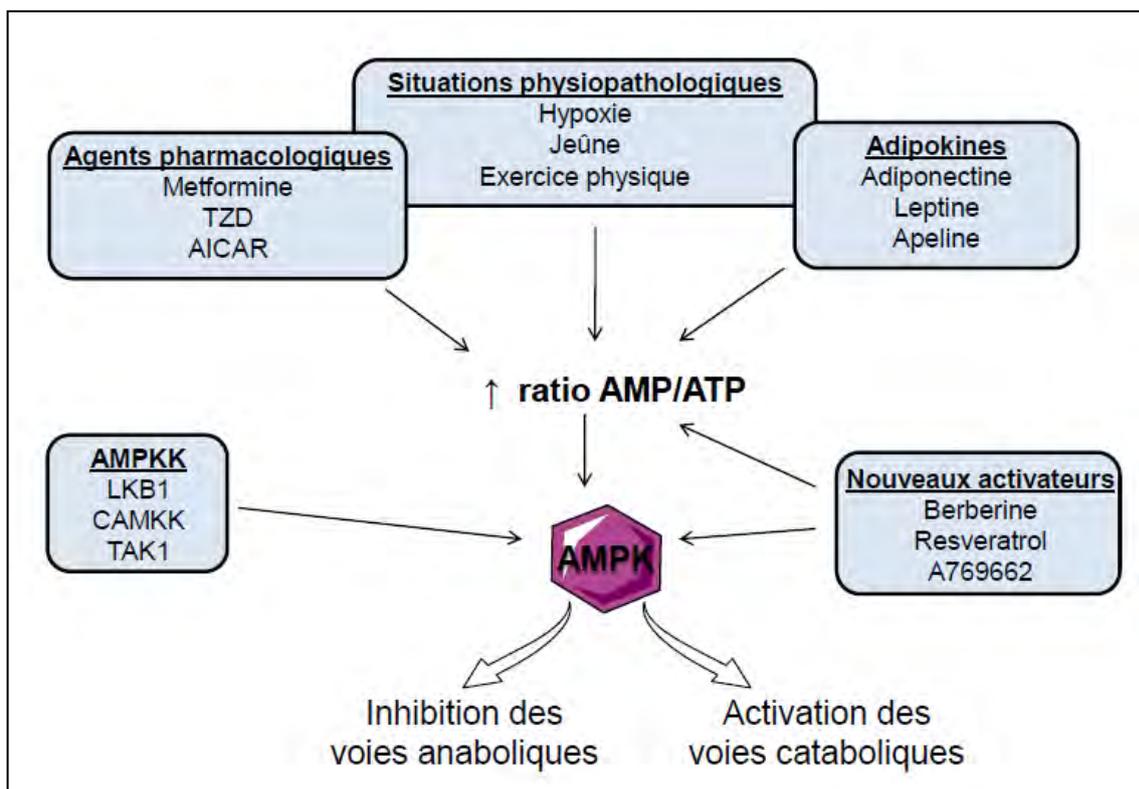
L'AMPK peut également être activée par des adipokines, c'est-à-dire des sécrétions adipocytaires telles que l'adiponectine (Yamauchi, Kamon et al. 2002), la leptine (Minokoshi, Kim et al. 2002) et plus récemment l'apeline (Dray, Knauf et al. 2008).

L'adiponectine et la leptine augmentent l'oxydation des AG dans le muscle et le foie *via* l'activation de l'AMPK (Minokoshi, Kim et al. 2002; Yamauchi, Kamon et al. 2002). De plus, l'adiponectine augmente l'utilisation de glucose par le muscle et diminue la production hépatique de glucose (Fruebis, Tsao et al. 2001; Berg, Combs et al. 2002; Matsuzawa, Funahashi et al. 2004) *via* l'activation de l'AMPK. Dans le tissu adipeux, l'adiponectine et la leptine sont également capables d'activer l'AMPK (Daval, Fougelle et al. 2006)

Notre équipe a également montré en 2008 que l'apeline active l'AMPK dans le muscle squelettique ce qui permet d'augmenter le transport de glucose (Dray, Knauf et al. 2008).

#### c) Agents pharmacologiques

Enfin, il a été montré que certains agents pharmacologiques tels que l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribo-nucleoside) ou médicaments antidiabétiques comme la metformine et les thiazolidinediones activent l'AMPK, alors que le composé C et l'araA sont connus pour l'inhiber (Hawley, Ross et al. 2010). De plus, la berberine, le resveratrol et l'A769662 ont été récemment décrits comme étant de nouveaux activateurs de l'AMPK (Hawley, Ross et al. 2010) (figure 14).



**Figure 14 : Activation de l'AMPK.** (Adapté de (Hawley, Ross et al.)).

### 3. Rôle de l'AMPK dans le métabolisme énergétique

Une fois activée, l'AMPK stimule les voies cataboliques, productrices d'énergie et inhibe les voies anaboliques, utilisatrices d'énergie ce qui permet de restaurer les taux d'ATP (Hardie and Hawley 2001; Hardie 2004; Kahn, Alquier et al. 2005).

L'AMPK est un régulateur clé du métabolisme énergétique, principalement des métabolismes glucidique et lipidique (figure 15). L'AMPK a d'abord été identifiée pour ses actions inhibitrices au niveau hépatique sur l'ACC et sur l'HMGR (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA reductase) (Carling, Zammit et al. 1987), deux enzymes limitantes du métabolisme des AG et du cholestérol respectivement. Les effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique s'observent non seulement au niveau hépatique mais aussi dans d'autres tissus périphériques tels que le tissu adipeux et le muscle et au niveau central dans l'hypothalamus.

a) Effet de l'AMPK sur le métabolisme lipidique

Un des principaux effets de l'AMPK sur le métabolisme lipidique est dû à sa capacité à réguler les taux intracellulaires de malonyl-CoA (figure 15). Celui-ci joue un rôle clé dans le métabolisme lipidique car il favorise non seulement la lipogenèse *de novo* puisqu'il est le substrat majeur de cette voie, mais il est également le principal inhibiteur de CPT-I, l'étape limitante de l'oxydation des lipides. Comme nous l'avons vu précédemment, l'AMPK diminue les taux intracellulaires de malonyl-CoA en phosphorylant d'une part l'ACC ce qui l'inactive et empêche la formation de malonyl-CoA (Carling, Zammit et al. 1987) et d'autre part la MCD ce qui l'active et catalyse la dégradation du malonyl-CoA (Saha, Schwarsin et al. 2000). Ainsi, cette diminution des taux intracellulaires de malonyl-CoA induite par l'AMPK provoque une diminution de la synthèse des AG et une augmentation de l'oxydation des AG, l'inhibition par le malonyl-CoA étant levée.

Ces effets de l'AMPK ont clairement été établis sur des modèles cellulaires ou chez le rongeur mais il existe peu d'études réalisées chez l'Homme. Toutefois, Steinberg et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'oxydation des AG sur des fibres musculaires humaines et sur des cellules musculaires humaines en culture traitées par l'AICAR ou à la leptine (Steinberg, Smith et al. 2004; Steinberg, McAinch et al. 2006).

De plus, l'AMPK augmente la biogenèse mitochondriale *via* l'activation de PGC1 $\alpha$ , et ceci permet d'augmenter la capacité oxydative des muscles squelettiques (Suwa, Nakano et al. 2003), du foie et même du tissu adipeux (Gaidhu, Fediuc et al. 2009).

L'AMPK est activée dans des conditions physiologiques comme l'exercice ou lors de la période de jeûne, lors desquelles la lipolyse est augmentée. L'activation de l'AMPK entraîne une diminution de la synthèse de TG qui est une voie anabolique mais aussi de la lipolyse, une voie catabolique. Mais, cette inhibition de la lipolyse semble contradictoire car l'AMPK est une enzyme qui favorise la libération d'énergie. Lorsque la lipolyse est importante, beaucoup d'acides gras sont libérés dans la circulation sanguine et vont vers les muscles et le foie pour y être oxydés et donc produire de l'énergie. Cependant si ces tissus ne peuvent pas prendre en charge la totalité de ces AG, ceux-ci peuvent être réestérifiés au niveau du tissu adipeux ce qui nécessite de l'énergie (activation en acyl-CoA), on parle de cycle futile des AG. L'AMP permettrait donc de limiter la lipolyse afin d'empêcher la consommation d'énergie nécessaire à leur ré-estérification (Gauthier, Miyoshi et al. 2008).

Ainsi, l'AMPK, par ses effets à court et long terme, favorise l'oxydation des lipides tout en diminuant leur stockage dans le foie et les muscles squelettiques et elle a une action antilipolytique au niveau du tissu adipeux.

b) Effet de l'AMPK sur le métabolisme glucidique

Dans le muscle squelettique, une activation *in vivo* de l'AMPK par l'AICAR augmente le transport de glucose (Merrill, Kurth et al. 1997) ainsi que la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane plasmique (Kurth-Kraczek, Hirshman et al. 1999) ; par une voie indépendante de celle de l'insuline.

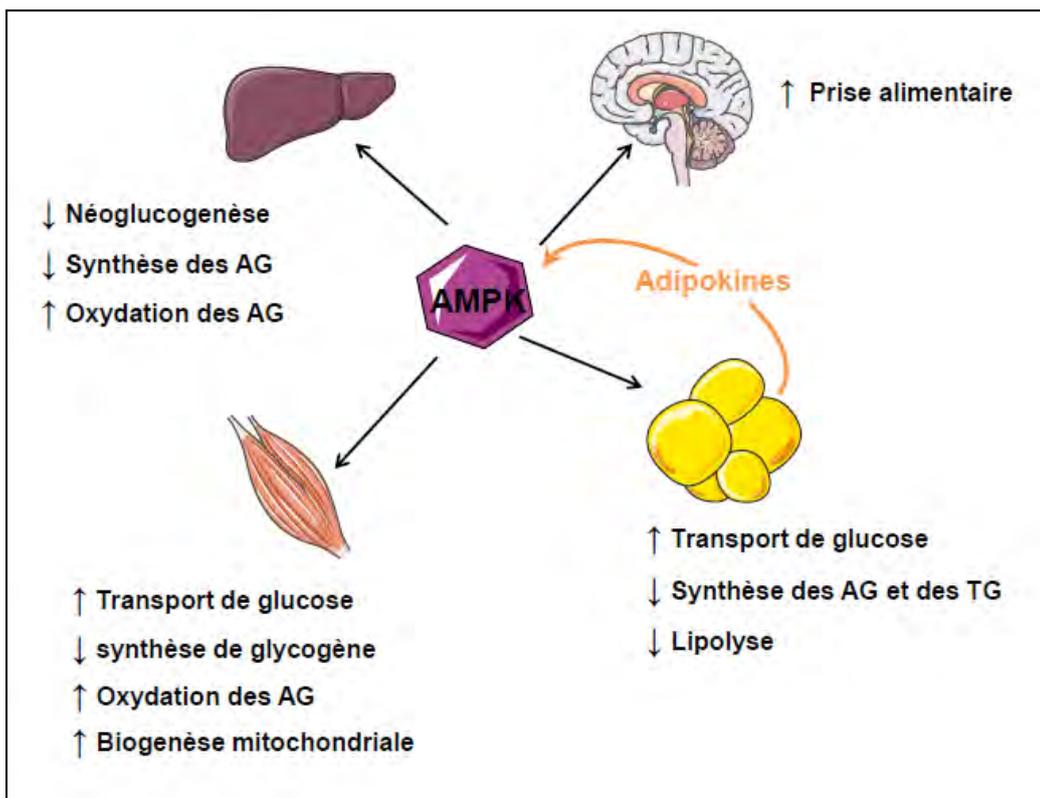
De plus, l'AMPK inhibe la synthèse de glycogène (voie consommatrice d'énergie) et elle redirige le glucose vers son oxydation ce qui va permettre de produire de l'énergie (Jorgensen, Nielsen et al. 2004; Miyamoto, Toyoda et al. 2007). Enfin, au niveau du foie, l'AMPK, diminue l'expression d'enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la PEPCCK et la G6Pase. Ainsi, l'AMPK diminue la production hépatique de glucose alors qu'au niveau du muscle elle augmente le transport de glucose et inhibe la synthèse de glycogène.

c) Effet de l'AMPK au niveau central

En plus de son rôle périphérique, l'AMPK peut réguler le métabolisme énergétique au niveau central en agissant sur la prise alimentaire ainsi que la masse corporelle *via* la transmission de signaux orexigènes ou anorexigènes (augmentent ou diminuent la prise alimentaire respectivement) dans l'hypothalamus (Xue and Kahn 2006). En effet, une injection intracérébroventriculaire de leptine, de glucose ou d'insuline réduit la prise alimentaire *via* une inhibition de l'AMPK (Andersson, Filipsson et al. 2004; Minokoshi, Alquier et al. 2004). A l'opposé, des substances orexigènes telles que l'AICAR (Andersson, Filipsson et al. 2004), l'AgRP (Agouti-related peptide) (Minokoshi, Alquier et al. 2004), l'acide  $\alpha$ -lipoïque (Kim, Park et al. 2004) ou la ghréline, une hormone d'origine intestinale (Andersson, Filipsson et al. 2004) augmentent la prise alimentaire par l'activation de l'AMPK dans l'hypothalamus (figure 15). Pour transmettre ses effets, l'AMPK semble directement agir sur l'expression du neuropeptide Y (Mountjoy, Bailey et al. 2007) ainsi que sur la phosphorylation de l'ACC et donc sur le taux de malonyl-CoA (Folmes and Lopaschuk 2007). A l'inverse, une inhibition de CPT-I dans l'hypothalamus inhibe la prise alimentaire (Obici, Feng et al. 2003).

d) Effets de l'AMPK sur la sécrétion d'adipokines

L'AMPK pourrait moduler *in vitro* la sécrétion de certaines adipokines (figure 15) telles que l'adiponectine, mais ces effets sont controversés. L'AICAR augmente l'expression de l'adiponectine par le tissu adipeux humain (Lihn, Jessen et al. 2004; Sell, Dietze-Schroeder et al. 2006), alors que la metformine inhibe l'expression et la sécrétion d'adiponectine sur une lignée de cellules adipeuses (Huypens, Quartier et al. 2005). Dans le tissu adipeux humain, l'AMPK a des effets inhibiteurs sur la sécrétion de 2 cytokines pro-inflammatoires : le TNF- $\alpha$  (Lihn, Jessen et al. 2004) ou encore l'IL-6 (interleukine-6) (Sell, Dietze-Schroeder et al. 2006).



**Figure 15: régulation des métabolismes lipidique et glucidique par l'AMPK.** D'après (Kahn, Alquier et al. 2005).

Une activation aigue de l'AMPK active l'entrée de glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux et inhibe la néoglucogenèse hépatique. L'oxydation des AG est activée en aigu dans le muscle et le foie mais aussi en chronique dans le muscle *via* une augmentation de la biogenèse mitochondriale. Au niveau du tissu adipeux, l'activation de l'AMPK diminue la lipolyse ainsi que la synthèse d'AG et de TG et modifie aussi les sécrétions adipocytaires (adipokines) pouvant en retour jouer sur l'activité de l'AMPK. Enfin, au niveau du cerveau, l'AMPK augmente la prise alimentaire.

## **Partie II : Insulino-résistance et diabète de type 2**

### **I. Le diabète de type II**

#### **A. Définition**

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, l'insuline joue un rôle important dans l'homéostasie glucidique en inhibant la production hépatique de glucose et sur le muscle squelettique où elle stimule l'entrée de 80% du glucose sanguin. Lors de l'insulino-résistance, ces voies métaboliques ne seront plus régulées par l'insuline ce qui entraîne une augmentation de la glycémie. Le pancréas va alors s'adapter en augmentant la sécrétion d'insuline permettant de normaliser la glycémie. Il s'agit de l'état pré-diabétique caractérisé par une glycémie normale et une hyperinsulinémie.

Le diabète de type 2 (DT2) se met ensuite en place lorsque le pancréas ne parvient plus à compenser cette insulino-résistance. Le DT2 se caractérise alors à la fois par une insulino-résistance mais aussi par un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques ; les patients sont ainsi hyperglycémiques et hyperinsulinémiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un patient est diabétique lorsque sa glycémie à jeun est supérieure ou égale à 7 mmol/l (1,26 g/l).

Dans les stades les plus avancés de la pathologie, la production accrue d'insuline par le pancréas va alors conduire à l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques, ce qui entraîne une diminution de l'insulinémie : c'est la phase d'insulinopénie.

Le DT2 est l'affection métabolique la plus répandue au monde. C'est un problème de santé publique aussi bien en France, où l'on dénombre environ 2,5 millions de patients qu'en Europe avec 30 millions de diabétiques, qu'aux Etats-Unis avec 15 millions de diabétiques. Sa prévalence accroît de manière exponentielle dans le monde entier et, selon les prévisions de l'OMS, le nombre de personnes diabétiques pourrait passer de 100 millions actuellement à plus de 300 millions en 2030 dans le Monde (Wild, Roglic et al. 2004).

## **B. Étiologie du diabète de type II**

### **1. Les facteurs génétiques**

La contribution des facteurs génétiques à l'étiologie du diabète de type II est importante puisque le facteur de risque de développer cette pathologie est fortement augmenté chez des sujets ayant des antécédents familiaux de diabète. En effet, le risque de développer un diabète est d'environ 30% si un des parents est diabétique et approche les 70% si les 2 parents sont diabétiques.

L'étude de la génétique du DT2 est difficile car cette pathologie est fortement influencée par des facteurs environnementaux et est différente d'un groupe ethnique à l'autre. Le criblage du génome entier à la recherche de *loci* liés au phénotype diabétique a permis de localiser plusieurs régions du génome présentant une liaison probable avec le DT2. Les gènes de susceptibilités identifiés correspondent principalement à des protéines impliquées dans la maturation des cellules  $\beta$  pancréatiques et leur fonction. Cependant, les variants de ces gènes permettent d'expliquer seulement 10% de la susceptibilité génétique au développement du DT2 (Bonfond, Froguel et al.). Ainsi, d'autres études sont nécessaires afin d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité.

### **2. Les facteurs environnementaux**

Les principaux facteurs environnementaux sont l'obésité et le manque d'activité physique (sédentarité), ces deux phénomènes étant étroitement liés. Près de 80% des individus souffrant de DT2 ont un excès pondéral et la moitié des individus présentant une obésité morbide finissent par devenir diabétiques. Le terme de « diabésité » a même été utilisé pour caractériser les cas de diabètes dus à l'obésité. Des études chez l'Homme et le rongeur ont montré qu'une perte de poids ou inversement un gain de poids est corrélé respectivement à une augmentation ou une diminution de la sensibilité à l'insuline (Sims, Danforth et al. 1973; Freidenberg, Reichart et al. 1988). Cependant, malgré un risque augmenté, tous les sujets obèses ne deviennent pas diabétiques ce qui suggère une part génétique et environnementale.

L'obésité est définie comme le développement excessif de masse grasse pouvant avoir des effets néfastes sur la santé. Les causes de l'obésité sont multifactorielles mais l'obésité et

le surpoids peuvent s'expliquer dans la majorité des cas par la combinaison d'un déséquilibre de la balance énergétique et d'une susceptibilité génétique. Ce déséquilibre de la balance énergétique est lié au mode de vie actuel caractérisé par une augmentation de l'apport calorique associé à une consommation de lipides et une diminution des dépenses énergétiques, conséquence d'une réduction de l'activité physique.

Ceci permet d'expliquer la forte prévalence de l'obésité dans le Monde. D'après les dernières estimations de l'OMS en 2005, environ 1.6 milliard de personnes sont en surpoids et au moins 400 millions d'adultes sont obèses (d'après le site internet de l'OMS : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/index.html>).

L'obésité est mesurée par le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) calculé en divisant le poids de la personne par le carré de sa taille ( $\text{kg/m}^2$ ). Selon l'OMS, une personne adulte ayant un IMC compris entre 18,5 et 25 est considérée comme ayant un poids normal et entre 25 et 30  $\text{kg/m}^2$  comme étant en surpoids. Une personne est obèse lorsque son IMC est supérieur à 30  $\text{kg/m}^2$  et un IMC dépassant 40  $\text{kg/m}^2$  caractérise une obésité sévère dite morbide. Cependant l'utilisation de l'IMC comporte certaines limites puisqu'il ne tient pas compte de la masse osseuse et musculaire et ne donne aucune indication quant à la répartition de la masse adipeuse dans l'organisme.

Chez l'Homme, on distingue plusieurs localisations anatomiques du tissu adipeux : le tissu adipeux sous cutané et le tissu adipeux profond ou viscéral. Le diabète est surtout corrélé à une augmentation de l'adiposité viscérale mesurée par le rapport tour de taille/tour de hanches. Une répartition abdominale des graisses est définie lorsque ce rapport est supérieur à 0,85 chez la femme et 0,9 chez l'homme. Ceci constitue le principal facteur prédisposant au DT2 et est associé à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (Despres, Lamarche et al. 1995).

Ainsi, l'obésité et le diabète s'inscrivent généralement dans le cadre plus large du syndrome métabolique qui correspond à un ensemble de perturbations métaboliques qui augmente le risque cardiovasculaire des diabétiques. Le syndrome métabolique est défini par l'association d'une obésité abdominale associée à 2 facteurs de risque cardiovasculaire parmi : une hypertriglycémie, diminution du HDL cholestérol, hypertension artérielle et une glycémie à jeun élevée ( $> 5.6\text{mM/L}$  ou  $1\text{g/L}$ ) (Eckel, Alberti et al.).

Bien que le tissu adipeux viscéral ne constitue que 20% de la masse adipeuse totale son rôle est prépondérant dans la gestion post-prandiale des lipides à cause de son activité

lipolytique et de sa localisation anatomique (drainage par le système porte). En effet, les AG provenant du tissu adipeux viscéral sont destinés en priorité au foie du fait de la vascularisation portale alors que ceux issus du tissu adipeux sous-cutané iront plutôt vers les muscles. De plus, les adipocytes sous-cutanés sont plus sensibles à l'insuline que les adipocytes viscéraux, qui sont plus sensibles aux catécholamines (Arner 2005). Par contre, lors d'une augmentation de l'adiposité viscérale, la lipolyse est augmentée du fait d'une augmentation de la réponse aux catécholamines au niveau de ce tissu. Les AG libérés vont directement vers le foie et participent à la synthèse accrue de VLDL hépatiques et donc à l'augmentation des TG circulants (Arner 2005).

### **C. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'insulino-résistance**

Des altérations de la voie de signalisation de l'insuline à différents niveaux vont participer à la mise en place de l'insulino-résistance.

#### **1. Internalisation et recyclage du récepteur**

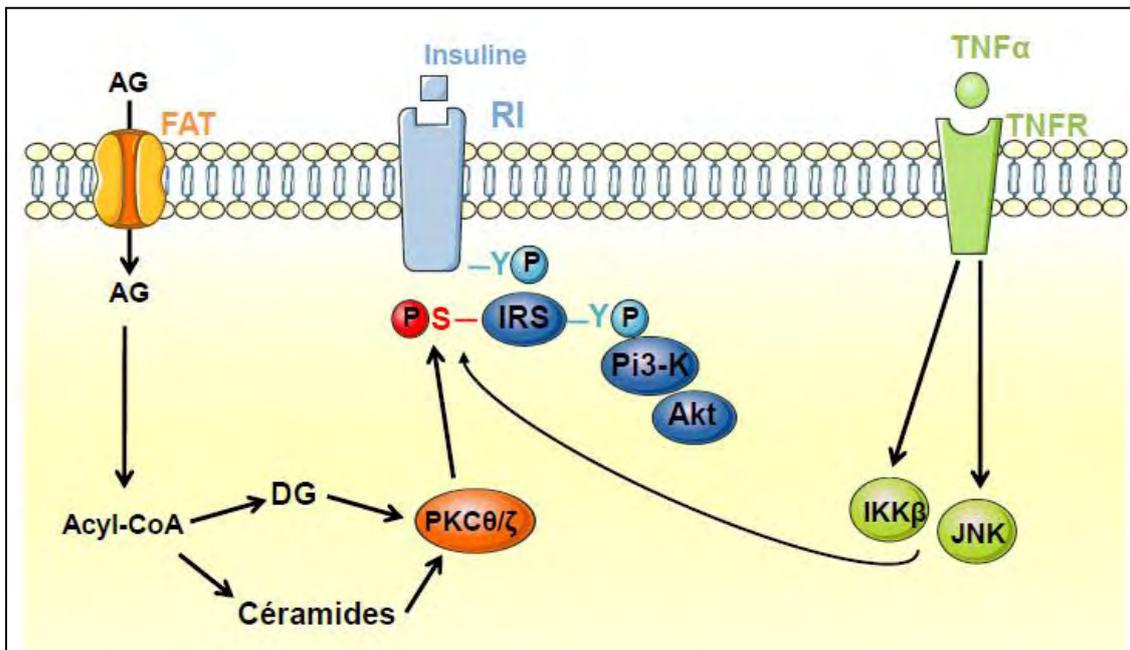
La fin du signal insulinique implique l'internalisation du complexe insuline/récepteur dans les endosomes, l'insuline sera alors dégradée tout comme certains récepteurs alors que d'autres seront recyclés. En conditions physiologiques, les récepteurs nouvellement synthétisés, permettent de restaurer un nombre normal de récepteurs à la membrane plasmique. Cependant, en présence d'hyperinsulinisme persistant (observé dès les premiers stades de l'insulino-résistance), les cycles d'internalisation/recyclage peuvent aboutir à une diminution du nombre de récepteurs à la surface. Ainsi, ce processus de contrôle négatif du signal, participe de façon secondaire à l'installation de la résistance à l'insuline (Capeau 2003).

#### **2. Les tyrosines phosphatases**

En conditions physiologiques, le contrôle négatif du signal nécessite aussi la déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et des protéines IRS. Ceci fait intervenir des protéines spécifiques, les tyrosines phosphatases (PTPases). Une augmentation de l'activité PTPase a été observée chez des patients diabétiques, ce qui participerait à la résistance de ces tissus à l'insuline (Capeau 2003).

### 3. Phosphorylations en sérine/thréonine

La phosphorylation de résidus sérine et thréonine sur le récepteur ou l'IRS1 entraîne une inhibition du signal insulinaire. En effet, contrairement aux phosphorylations sur tyrosines du récepteur et d'IRS, les résidus sérine et thréonine phosphorylés ne permettent pas la liaison et l'activation des protéines présentes en aval comme la Pi3K. Ces phosphorylations mettent fin à l'activation du récepteur en condition physiologique mais lorsqu'elles sont augmentées anormalement, elles participent à la mise en place de l'insulino-résistance (Zick 2004). Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler les IRS en sérine/thréonine : la kinase IKK- $\beta$  (*inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B kinase*), la Jun kinase (JNK) et la PKC $\theta$  (Capeau 2003; Zick 2004) (figure 16).



**Figure 16 : Inhibition de la voie de l'insuline par les DG, les céramides et le TNF $\alpha$ .** D'après (Capeau 2003).

Un flux important d'AG dans la cellule peut entraîner l'accumulation de céramides et de DG qui activent les PKC  $\theta$  et  $\zeta$ . Celles-ci phosphorylent IRS1 sur des résidus sérine (P-S) entraînant son inactivation et l'inhibition de l'action de l'insuline. De plus, le TNF $\alpha$ , après liaison à son récepteur (TNFR), active deux kinases, IKK $\beta$  et JNK qui inactivent également la voie de l'insuline par phosphorylation inhibitrice d'IRS1.

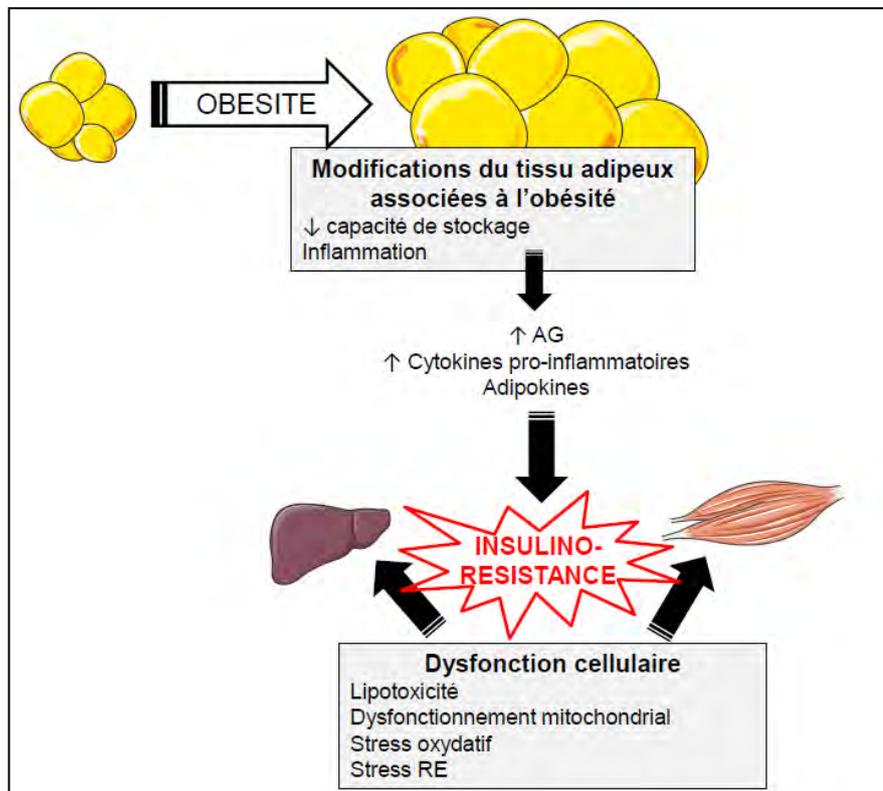
En condition d'hyperinsulinémie, l'insuline peut activer IKK- $\beta$  et JNK et inhiber ainsi sa voie de signalisation. De plus, des cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , et l'IL-1 $\beta$  activent également ces deux kinases (Aguirre, Uchida et al. 2000; Hirosumi, Tuncman et al. 2002).

Enfin, les PKC $\theta$  et  $\zeta$  peuvent être activées par les lipides (DG, céramides et acyl-CoA) lorsqu'ils sont stockés dans les muscles et le foie ceci entraînant l'inhibition du signal insulinique. On parle alors de lipotoxicité, un phénomène qui sera décrit plus loin.

## II. De l'obésité à la résistance à l'insuline

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'impact de modifications du tissu adipeux lors de l'obésité (inflammation, augmentation de la libération d'AG et modification de la sécrétion d'adipokines) sur la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle squelettique.

Puis nous aborderons le rôle de certains dysfonctionnements intracellulaires dans le muscle sur la sensibilité à l'insuline (Figure 17).



**Figure 17 : De l'obésité à la résistance à l'insuline**

L'obésité est associée à une diminution de la capacité de stockage du tissu adipeux et une inflammation de bas niveau. Ceci entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'AG, une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une modification des adipokines sécrétées (qualitativement et quantitativement) qui participent à la mise en place de l'insulino-résistance du muscle et du foie. De plus, des dysfonctionnements cellulaires comme la lipotoxicité, un dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif ou bien encore le stress du réticulum endoplasmique (RE) jouent également un rôle important dans la mise en place de l'insulino-résistance dans ces tissus.

## **A. Modifications du tissu adipeux associées à l'obésité et conséquences sur le muscle**

### ***1. Libération excessive d'AG par le tissu adipeux et lipotoxicité musculaire***

#### ***a) Augmentation des lipides plasmatiques***

En période post prandiale, le tissu adipeux possède une grande capacité de stockage des TG dans la vacuole lipidique, celle-ci pouvant représenter 95% du volume cellulaire. A l'inverse, lors du jeûne ou pendant l'exercice physique, le tissu adipeux est capable de mobiliser ses réserves pour libérer des AG. On parle de plasticité du tissu adipeux qui peut donc stocker ou libérer les lipides.

En condition d'obésité, l'excès de tissu adipeux est associé à l'insulino-résistance. Paradoxalement, la lipoatrophie, c'est-à-dire la quasi-absence de tissu adipeux et de leptine circulante, est associée à une accumulation importante de lipides dans les tissus périphériques et à une insulino-résistance, chez l'Homme (Ganda 2000) et chez l'animal (Shimomura, Hammer et al. 1998; Kim, Gavrilova et al. 2000). Chez des souris transgéniques ne possédant pas de tissu adipeux, cette insulino-résistance peut être reversée par la transplantation de tissu adipeux (Gavrilova, Marcus-Samuels et al. 2000), les TG stockés dans le foie et le muscle étant redirigés vers le tissu adipeux transplanté.

Ces observations soulignent l'importance du tissu adipeux dans le maintien de la sensibilité à l'insuline en situation physiologique. En effet, le tissu adipeux peut être vu comme un « tampon métabolique » permettant de capter rapidement les AG provenant de l'alimentation (Frayn 2002). Mais la capacité de stockage des TG par les adipocytes n'est pas infinie et la phase d'hypertrophie des adipocytes, due au stockage de TG, pourrait être suivie d'une hyperplasie, c'est-à-dire la différenciation de nouveaux adipocytes (Faust, Johnson et al. 1978). Cependant plus récemment, l'équipe de P.Arner a remis en cause cette théorie en montrant que le nombre d'adipocytes est déterminé à l'enfance et reste stable à l'âge adulte avec un renouvellement d'environ 10% par an (Spalding, Arner et al. 2008). Ainsi, en période post-prandiale, la capacité tampon du tissu adipeux est dépassée, les lipides resteront alors dans la circulation sanguine puis seront captés par des tissus non adipeux.

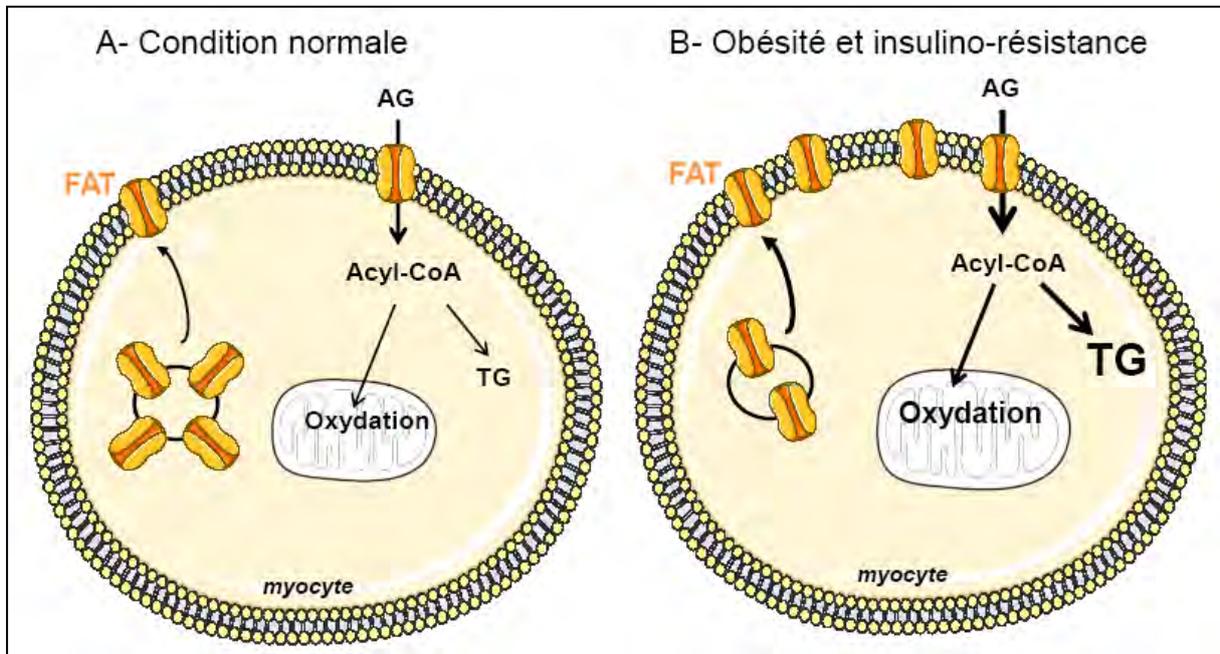
D'autre part, la capacité de l'insuline à inhiber la lipolyse (Riemens, Sluiter et al. 2000; DeFronzo 2004; Blaak 2005) et à augmenter l'activité de la LPL (Ong and Kern 1989) est altérée dans un contexte d'obésité associé à l'insulino-résistance. Ceci entraîne alors une diminution de la clairance des AG par le tissu adipeux.

L'ensemble de ces données montre que la perte de cette capacité des adipocytes à capter correctement l'excès de lipides alimentaires mais aussi l'insulino-résistance du tissu adipeux entraînent une augmentation des AG et TG circulants. Ces lipides plasmatiques seront alors captés et stockés dans les muscles squelettiques, le foie, le pancréas et le cœur et seront à l'origine du phénomène de lipotoxicité dans ces tissus non adipeux (figure 17). Dans les chapitres suivants, seul le stockage ectopique au niveau du muscle squelettique sera abordé.

*b) Augmentation du flux d'AG dans le muscle*

L'étude de la clairance d'AG radiomarqués par différents tissus a permis de mettre en évidence une augmentation de l'entrée des AG dans le muscle de rats insulino-résistants pouvant être responsable de l'accumulation excessive de lipides (Hegarty, Cooney et al. 2002). Puis, ces résultats ont été confirmés *ex vivo* sur le muscle de sujets obèses et diabétiques (Aguer, Mercier et al. 2010; Bonen, Parolin et al. 2004) et dans des modèles d'obésité chez le rongeur (Luiken, Arumugam et al. 2001; Han, Chabowski et al. 2007). Cette augmentation du transport des AG a été associée à une augmentation de la translocation de FAT à la membrane plasmique.

Une étude plus récente a montré qu'une augmentation du transport des AG dans le muscle est associée à une augmentation de leur oxydation et stockage chez des rats obèses (Holloway, Benton et al. 2009) (Figure 18). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'accumulation de TG dans le muscle est due à un flux trop important d'AG qui excède la capacité oxydative des mitochondries malgré son augmentation. En d'autres termes, lors de l'obésité, il y a un déséquilibre entre l'entrée excessive d'AG dans le muscle et leur oxydation, entraînant un stockage accru de ces AG sous forme de TG.



**Figure 18 : métabolisme lipidique dans le muscle en condition normale (A) ou lors de l'obésité et de l'insulino-résistance (B).** D'après (Holloway, Benton et al. 2009).

En condition normale (A), les AG sont transportés par les transporteurs FAT transloqués à la membrane puis sont répartis entre l'oxydation et le stockage en TG. Par contre, en condition d'obésité et d'insulino-résistance (B), le transport des AG est augmenté à cause d'une plus forte translocation de FAT à la membrane. De plus, malgré une augmentation de l'oxydation de ces AG, le stockage des TG est fortement augmenté dans les myocytes.

### c) *Lipotoxicité*

En 1963, Randle et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence une compétition entre les substrats énergétiques (glucose et lipides) pour leur oxydation. En effet, comme nous l'avons décrit dans la première partie, une augmentation de l'apport en AG dans le muscle entraîne une augmentation de leur oxydation ce qui inhibe la glycolyse et conduit à une accumulation intracellulaire de G6P, qui inhibe l'hexokinase 2. Ainsi, l'hypothèse de Randle constitue le premier mécanisme de lipotoxicité proposant une altération de l'utilisation du glucose lors d'un apport important en lipides.

Depuis une dizaine d'années, une forte corrélation négative a été largement démontrée entre le contenu intramusculaire en triglycérides (IMTG), mesuré par spectroscopie à résonance magnétique, et la sensibilité à l'insuline (Krssak, Falk Petersen et al. 1999; Perseghin, Scifo et al. 1999; Kelley and Goodpaster 2001).

Une augmentation des taux plasmatiques d'AG par infusion de lipides et d'héparine pour activer la LPL, provoque une accumulation de lipides dans le muscle (Brechtel, Dahl et al. 2001), une diminution de la tolérance au glucose (Felber and Golay 2002) et une diminution

de la sensibilité à l'insuline *in vivo* (Roden, Price et al. 1996) chez des sujets sains. De plus, dans ces expériences, Roden et ses collaborateurs ont montré que la concentration en G6P dans le muscle est diminuée après 3h d'infusion de lipides. Ainsi, l'insulino-résistance est associée à une diminution du transport de glucose et non à une altération de la glycolyse, ce qui remet en question l'hypothèse de Randle.

Plus tard, des lipides plus métaboliquement actifs que les TG ont été incriminés dans la mise en place de la résistance à l'insuline, il s'agit des acyl-CoA à longue chaîne, des céramides et des diglycérides (DG). En effet, une infusion de lipides pendant plusieurs heures provoque une résistance à l'insuline associée à une augmentation de céramides et de DG (Yu, Chen et al. 2002; Holland, Brozinick et al. 2007). Ces lipides inhibent la voie de signalisation de l'insuline en réduisant les phosphorylations activatrices d'IRS sur tyrosine et en phosphorylant IRS sur thréonine et sérine (phosphorylation inhibitrices) ce qui conduit à la diminution du transport de glucose stimulé par l'insuline.

#### ➤ **Implication des diglycérides**

La diacylglycerol acyl transferase (DGAT) 1 est l'enzyme qui permet d'ajouter un AG au DG pour former un TG. Les souris surexprimant DGAT1 dans le muscle squelettique (MCK-DGAT1) accumulent des TG dans leur muscle tout en ayant un faible contenu en DG et sont protégés de la mise en place de l'insulino-résistance induite par les lipides (Liu, Shi et al. 2009). Ainsi, une forte accumulation de TG dans le muscle peut être associée à une sensibilité à l'insuline normale, comme cela a été également observé chez des athlètes entraînés, on parle alors de « paradoxe des athlètes », (Goodpaster, He et al. 2001; Dube, Amati et al. 2008). En effet, chez l'homme, l'exercice entraîne une diminution du contenu en DG et une augmentation des IMTG due notamment à une augmentation de l'expression de DGAT1, et ceci est associé à et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Schenk and Horowitz 2007). De plus, chez ces athlètes, contrairement à des sujets insulino-résistants, l'augmentation de TG est associée à une augmentation de la capacité oxydative mitochondriale, ce qui leur permet de mobiliser ces lipides lors de besoins énergétiques. Comme nous le verrons par la suite, chez des sujets obèses et diabétiques, les lipides captés vont être dirigés vers le stockage sous forme de TG mais aussi de DG. Par ailleurs, une diminution de l'expression de la diacylglycerol kinase  $\delta$  (DGK $\delta$ ), une enzyme permettant de diminuer les taux de DG dans le muscle a été observée chez des patients diabétiques

(Chibalin, Leng et al. 2008). Dans cette même étude, les auteurs montrent qu'une diminution de l'activité de DGK $\delta$  chez la souris est associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences montrent bien que les DG sont des intermédiaires lipidiques délétères impliqués dans la mise en place de l'insulino-résistance.

Chez le rongeur, il a été montré que la résistance à l'insuline induite par un régime hyperlipidique (Schmitz-Peiffer, Browne et al. 1997) ou une infusion de lipides et héparine pendant 5h (Griffin, Marcucci et al. 1999), est associée à une accumulation intracellulaire de DG dans le muscle et une activation spécifique de PKC $\theta$ . Plus tard, une autre étude (Yu, Chen et al. 2002) a mis en évidence que la résistance à l'insuline induite par les lipides était due à une diminution de la phosphorylation sur des résidus tyrosine d'IRS1 mais aussi une augmentation de la phosphorylation sur sérine (résidu 307) d'IRS1 empêchant l'interaction d'IRS1 avec le récepteur à l'insuline et bloquant ainsi sa voie de signalisation (Aguirre, Werner et al. 2002). L'importance de l'activation de la PKC $\theta$  et des phosphorylations d'IRS1 sur sérine dans la mise en place de l'insulino-résistance a été confirmée par l'utilisation de souris transgéniques. En effet, des souris invalidées pour la PKC $\theta$  sont protégées de l'insulino-résistance induite par une infusion de lipides (Kim, Fillmore et al. 2004). Plus récemment, des résultats semblables ont été obtenus chez des souris ayant une mutation d'un résidu sérine sur IRS1 remplacé par une alanine rendant impossible la phosphorylation d'IRS1 sur sérine (Morino, Neschen et al. 2008).

Enfin, chez l'homme, Itani et ses collaborateurs ont rapporté une activation de PKC $\beta$ 2 et PKC $\delta$  après une infusion de lipides (Itani, Ruderman et al. 2002) et chez des patients diabétiques (Itani, Pories et al. 2001). Une augmentation de la phosphorylation d'IRS1 sur sérine a également été montrée dans le muscle de patients insulino-résistants (Morino, Petersen et al. 2005). Comme mentionné précédemment, les JNK ou IKK  $\beta$  pourraient être impliquées dans la phosphorylation d'IRS1 sur sérine induite par ces PKC.

### ➤ Implication des céramides

Les céramides sont des lipides intracellulaires issus de l'association entre un palmitoyl-CoA et une sérine par une série de réactions dont l'étape limitante est catalysée par la SPT-1 (sérine palmitoyl transférase-1). Comme les DG, une augmentation de l'accumulation de céramides est associée à l'obésité et au diabète chez l'Homme et le rongeur

(Muio and Newgard 2008). De plus, différents agents diabétogènes tels que les AG et le TNF $\alpha$  stimulent l'accumulation de céramides soit par l'augmentation de palmitoyl-CoA, le précurseur de cette synthèse, soit par l'induction de SPT-1 (Linn, Kim et al. 2001; Meyer and de Groot 2003; Summers and Nelson 2005). L'implication des céramides dans la mise en place de l'insulino-résistance chez des rongeurs diabétiques a été montrée par l'inhibition de leur synthèse par un traitement par la myriosine (un inhibiteur de SPT-1) (Ussher, Koves et al. 2010 ; Holland, Brozinick et al. 2007). Ce traitement qui restaure un contenu en céramides semblable aux animaux non diabétiques permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline. De plus, les céramides activent la PKC $\zeta$  qui inhibe la voie de transduction de l'insuline au niveau d'Akt même si certaines études ont montré une inhibition d'IRS1 et de la Pi3K (Chavez, Holland et al. 2005).

## 2. Inflammation du tissu adipeux

Le lien entre l'inflammation et l'insulino-résistance a été mis en évidence pour la première fois en 1993 par les travaux d'Hotamisligil et ses collaborateurs. En effet, cette équipe a montré que l'expression du TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, est augmentée dans les adipocytes d'animaux obèses (Hotamisligil, Shargill et al. 1993). De plus, la neutralisation du TNF- $\alpha$  par des récepteurs solubles au TNF- $\alpha$  entraîne une diminution de l'insulino-résistance chez ces animaux.

Par la suite, plusieurs expériences ont montré une augmentation d'autres marqueurs de l'inflammation tels que l'IL6 (Mohamed-Ali, Goodrick et al. 1997) et la protéine C réactive (CRP) (Yudkin, Stehouwer et al. 1999) chez des patients obèses et diabétiques. De plus, dans un contexte d'obésité, les adipocytes hypertrophiés sécrètent une chimiokine, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) qui recrute des macrophages dans le tissu adipeux et provoque une inflammation de bas niveau (Sartipy and Loskutoff 2003; Weisberg, McCann et al. 2003). Les raisons de ce recrutement de macrophages sont mal connues, cependant, il a été proposé que la sécrétion de chimiokines par les adipocytes résulterait d'un stress dû à l'hypertrophie de ces cellules (Wellen and Hotamisligil 2003). Les macrophages du tissu adipeux entretiennent un cercle vicieux puisqu'ils produisent également des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) contribuant à la mise en place de l'insulino-résistance. En effet, le blocage de l'infiltration macrophagique permet d'améliorer l'insulino-résistance dans différents modèles animaux (Kanda, Tateya et al. 2006; Weisberg, Hunter et al. 2006).

L'inhibition de la voie de l'insuline par ces médiateurs inflammatoires implique deux principales protéines kinases : JNK et IKK $\beta$  qui inhibent IRS-1 par phosphorylation sur sérine. De plus, il a été montré en 1998 que de fortes doses d'agents anti-inflammatoires tels que l'aspirine sont capables d'améliorer l'insulino-résistance chez des sujets diabétiques en inhibant IKK $\beta$  (Yin, Yamamoto et al. 1998). Cette protéine kinase peut inhiber la voie de l'insuline directement en phosphorylant IRS-1 sur sérine (Yin, Yamamoto et al. 1998), ou en activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui stimule la production de médiateurs de l'inflammation tels que le TNF- $\alpha$  ou l'IL6 (Shoelson, Lee et al. 2003).

Ainsi, les adipocytes mais aussi les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux, secrètent des médiateurs inflammatoires tels que le TNF $\alpha$  et l'IL6 qui participent à la mise en place de l'insulino-résistance dans le tissu adipeux lui-même mais aussi dans le muscle et le foie.

### 3. Adipokines et sensibilité à l'insuline

Pendant longtemps, le tissu adipeux a été considéré comme un tissu de stockage des AG sous forme de TG et capable de libérer des AG en cas de besoin énergétique. La découverte de la production de leptine par les adipocytes en 1994 (Zhang, Proenca et al. 1994) a permis de mettre en évidence la fonction endocrine du tissu adipeux (Kershaw and Flier 2004). Il est maintenant clairement établi que le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreux facteurs, appelée adipokines, dont des hormones et des cytokines intervenant dans de nombreux processus physiopathologiques.

En conditions physiologiques, la sécrétion de certaines adipokines comme l'adiponectine et la leptine par les adipocytes (seules adipokines dont nous allons détailler le rôle dans cette partie), permet de contrôler la sensibilité à l'insuline et la prise alimentaire. En revanche, lors d'une résistance à l'insuline associée à l'obésité, le spectre de sécrétion d'adipokines est modifié : les taux plasmatiques d'adiponectine sont diminués alors que ceux de leptine mais aussi de cytokines pro-inflammatoires sont augmentés (Figure 17).

#### a) La leptine

La leptine est un peptide de 16kDa produit et sécrété principalement par les adipocytes du tissu adipeux blanc mais la présence de leptine a été décrite dans plusieurs autres types cellulaires. Cette hormone est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques notamment la régulation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et du métabolisme

énergétique (Zhou, Shimabukuro et al. 1997). La concentration plasmatique de leptine dépend de la masse adipeuse et de l'apport énergétique. En effet, les taux plasmatiques de leptine sont diminués lors d'un jeûne de 24 à 48 h chez l'Homme et le rongeur alors qu'ils sont augmentés après un repas chez l'animal et seulement après plusieurs repas hypercaloriques chez l'Homme (Saladin, De Vos et al. 1995). De plus, l'obésité est associée à une augmentation des taux plasmatiques de leptine.

Le premier récepteur (ObR) à la leptine a été cloné en 1995 (Tartaglia, Dembski et al. 1995) et actuellement, six isoformes du récepteur ont été identifiées (ObRa à ObRf). Le récepteur ObRa est la forme la plus exprimée en périphérie alors que ObRb est fortement présent au niveau central mais également dans certains tissus périphériques (rein, foie, muscles) (Hoggard, Mercer et al. 1997). La fixation de la leptine sur son récepteur (OB-R) entraîne la phosphorylation du domaine intracellulaire par une protéine JAK. Différentes protéines de la famille STAT (en particulier STAT 3) viennent alors se fixer sur cette région phosphorylée, ce qui permet leur activation et relocalisation vers le noyau où elles induisent la transcription de certains gènes. D'autres kinases telles que MAPK, PI3K, AMPK peuvent également être activées par d'autres domaines intracellulaires du récepteur à la leptine (Muio and Lynis Dohm 2002; Sweeney 2002).

➤ **Effet de la leptine au niveau du système nerveux central**

Une infusion intracérébroventriculaire de leptine entraîne une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Dobbins, Szczepaniak et al. 2003). La leptine agit au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus où elle inhibe l'action de neurones orexigènes (AgRP et NPY) et augmente l'activité de neurones anorexigènes (POMC). De plus, la leptine augmente la dépense énergétique, notamment au niveau du tissu adipeux brun *via* l'activation du système nerveux sympathique.

La leptine, produite en périphérie, traverse la barrière hémato-encéphalique pour exercer ses effets centraux. Ainsi, une augmentation de la production de leptine induite par l'apport énergétique permet d'informer le système nerveux central du statut énergétique de l'organisme et entraîne une inhibition de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Friedman and Halaas 1998).

➤ **Effet de la leptine sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline**

Dans le muscle squelettique, la leptine administrée de manière aiguë ou chronique, permet de diriger les AG vers leur oxydation plutôt que leur stockage, et stimule l'hydrolyse des TG (Muio, Dohm et al. 1997; Steinberg and Dyck 2000; Steinberg, Bonen et al. 2002). Ces effets aigus et chroniques sont dus au moins en partie à une stimulation directe de l'AMPK (Minokoshi, Kim et al. 2002; Steinberg, Rush et al. 2003). De plus, la leptine diminue la translocation des transporteurs FAT et FABPpm à la membrane plasmique chez des animaux en régime standard (Steinberg, Dyck et al. 2002). Ainsi, un traitement chronique par la leptine diminue l'entrée d'AG dans la cellule et stimule l'hydrolyse des TG stockés dans le muscle et leur oxydation ce qui conduit à une diminution du contenu intramusculaire en TG (Shimabukuro, Koyama et al. 1997; Steinberg, Bonen et al. 2002). De plus, un traitement chronique par la leptine stimule le transport de glucose induit par l'insuline chez le rongeur nourri par un régime hyperlipidique (Yaspelkis, Singh et al. 2004).

Ainsi, la leptine permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline en limitant l'accumulation ectopique de lipides (Shimabukuro, Koyama et al. 1997; Zhou, Shimabukuro et al. 1997). En effet, différents modèles de rongeurs invalidés pour la leptine (souris *ob/ob*) ou pour le récepteur ObRb (souris *db/db* ou rats *fa/fa*) sont caractérisés par une obésité sévère et une résistance à l'insuline. De plus, chez des animaux lipodystrophiques ayant des taux plasmatiques de leptine faibles, une administration de leptine réduit le contenu en lipides dans les tissus et améliore la sensibilité à l'insuline (Colombo, Cutson et al. 2002; Petersen, Oral et al. 2002). De même, une administration chronique de leptine a les mêmes effets chez des rats Zucker diabétiques (Shimabukuro, Koyama et al. 1997).

➤ **Résistance périphérique à la leptine et obésité**

L'obésité est associée à de forts taux de leptine dans la circulation sanguine ce qui suggère une résistance à la leptine au niveau périphérique et central (Lonnqvist, Arner et al. 1995). En effet, des rongeurs nourris par un régime hyperlipidique présentent des taux circulants de leptine élevés (Ahren, Mansson et al. 1997; Lin, Chavez et al. 1998) ainsi que des réponses métaboliques diminuées en réponse à des injections périphériques de leptine (Van Heek, Compton et al. 1997). Ainsi, le foie (Wang, Obici et al. 2001) et les muscles squelettiques (Steinberg and Dyck 2000) développent une résistance à la leptine induite par le régime hyperlipidique chez le rongeur. Plus récemment, une diminution de réponse à la

leptine a été observée sur des muscles isolés de personnes obèses (Steinberg, Parolin et al. 2002).

Les mécanismes conduisant à cette résistance à la leptine ne sont pas clairement identifiés et font intervenir différents acteurs. En effet, il a été montré récemment que le récepteur à la leptine était diminué chez des animaux nourris en régime hyperlipidique pendant dix semaines (Morris and Chen 2009) ainsi que chez des personnes obèses. Cependant, deux autres études n'ont pas trouvé de modification de l'expression de ce récepteur dans le muscle de personnes obèses (Guerra, Santana et al. 2007; Guerra, Fuentes et al. 2008).

De plus, l'expression de SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*), un inhibiteur post-récepteur de la voie de signalisation de la leptine est augmentée dans le muscle squelettique chez l'Homme (Steinberg, McAinch et al. 2006) et le rongeur (Steinberg, Smith et al. 2004). La surexpression de SOCS3 dans des myotubes humains empêche l'activation de l'AMPK induite par la leptine (Steinberg, McAinch et al. 2006).

#### b) Adiponectine

L'adiponectine est une adipokine de 30 kDa, découverte en 1995 (Scherer, Williams et al. 1995; Nakano, Tobe et al. 1996) et abondamment produite par le tissu adipeux et sa concentration plasmatique est de 5 à 30 µg/ml, ce qui représente 0.01% des protéines plasmatiques totales. Contrairement à la leptine, les taux circulants d'adiponectine sont diminués dans un contexte d'obésité (Arita, Kihara et al. 1999) et de diabète chez l'Homme et le rongeur (Weyer, Funahashi et al. 2001).

La protéine native s'assemble pour former des trimères qui s'associent *via* des ponts disulfures. Ainsi, des formes d'adiponectine de plus ou moins haut poids moléculaire sont retrouvées dans la circulation sanguine en fonction du nombre de trimères associés (Pajvani, Hawkins et al. 2004). L'adiponectine comporte un domaine globulaire carboxy-terminal qui peut être clivé, on parle alors d'adiponectine globulaire (Fruebis, Tsao et al. 2001; Maeda, Shimomura et al. 2002).

Deux récepteurs à l'adiponectine ont été clonés en 2003 : AdipoR1 et AdipoR2 (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Le récepteur AdipoR1, principalement exprimé au niveau du muscle squelettique, a une forte affinité pour le domaine globulaire de l'adiponectine. Le récepteur AdipoR2 principalement exprimé au niveau du foie peut lier la forme de haut poids

moléculaire et la forme globulaire de l'adiponectine avec une affinité moyenne. La voie de signalisation de l'adiponectine est peu connue. APPL1 (*adaptator protein, phosphotyrosine interaction, pleckstrin homology domain and leucine zipper containing 1*), un adaptateur protéique se liant à des phosphotyrosines, a été récemment identifié comme étant un médiateur de la voie de signalisation de l'adiponectine dans différents tissus dont le muscle (Mao, Kikani et al. 2006). Cette protéine active différentes kinases dont Akt, LKB1 et l'AMPK (Chandrasekar, Boylston et al. 2008). APPL2, une protéine comportant 54% d'homologie avec APPL1, se lie à APPL1 et empêche sa liaison avec le récepteur AdipoR1 et inhibe donc la voie de signalisation de l'adiponectine (Wang, Xin et al. 2009).

➤ **Effets de l'adiponectine sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline**

Un traitement aigu avec l'adiponectine augmente l'oxydation des AG et le transport de glucose *via* la phosphorylation de l'AMPK et l'inhibition d'ACC dans des muscles oxydatifs et glycolytiques (Tomas, Tsao et al. 2002; Mullen, Smith et al. 2007) et sur les lignées cellulaires C2C12 et L6 (Ceddia, Somwar et al. 2005). De plus, l'adiponectine diminue la synthèse des AG et augmente l'oxydation des AG dans le foie (Yamauchi, Kamon et al. 2001).

L'administration chronique d'adiponectine augmente la biogenèse mitochondriale et l'expression de différentes enzymes impliquées dans l'oxydation des lipides dans le muscle (Civitarese, Ukropcova et al. 2006). Ces effets sont dépendants de l'activation de l'AMPK et de PPAR $\alpha$  (Civitarese, Ukropcova et al. 2006; Yoon, Lee et al. 2006). Ainsi, tout comme la leptine, l'adiponectine stimule l'oxydation des AG et réduit le stockage de TG dans le muscle ce qui conduit, au moins en partie, à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Yamauchi, Kamon et al. 2001; Maeda, Shimomura et al. 2002). De plus, 4 heures après une injection d'adiponectine, la production hépatique de glucose est inhibée ce qui permet de diminuer la glycémie *in vivo* *via* l'activation de l'AMPK (Yamauchi, Kamon et al. 2002).

➤ **Résistance à l'adiponectine et obésité**

En plus d'une diminution des taux plasmatiques d'adiponectine dans un contexte d'obésité chez l'Homme et le rongeur, la réponse à cette adipokine est également altérée. En effet, la capacité de l'adiponectine à stimuler l'oxydation des AG est diminuée dans des

myotubes issus de patients obèses et diabétiques (Chen, McAinch et al. 2005) mais aussi sur des fibres musculaires de personnes obèses par rapport à des sujets sains (Bruce, Mertz et al. 2005). De plus, l'adiponectine n'induit plus la phosphorylation d'ACC et n'augmente plus l'oxydation des AG dans le muscle de souris obèses et insulino-résistantes (Mullen, Smith et al. 2007). La résistance à l'adiponectine semble apparaître très rapidement et précède les effets délétères d'un régime hyperlipidique sur la sensibilité à l'insuline. En effet, après seulement trois jours de régime hyperlipidique, l'effet stimulateur de l'adiponectine sur l'oxydation des AG est perdu alors que l'accumulation de lipides délétères et la perte de réponse à l'insuline apparaissent respectivement après deux et quatre semaines de régime hyperlipidique (Mullen, Pritchard et al. 2009).

La diminution de l'expression du récepteur AdipoR1 observée dans le muscle chez l'Homme (Civitarese, Jenkinson et al. 2004; Chen, McAinch et al. 2005) et le rongeur (Mullen, Pritchard et al. 2009) pourrait contribuer à la résistance à l'adiponectine dans un contexte d'obésité et d'insulino-résistance. Cependant d'autres études plus récentes n'ont pas observé de modification de l'expression de ce récepteur entre des individus obèses et des personnes normo-pondérales (Kuoppamaa, Skrobuk et al. 2008). Ainsi la diminution de l'expression du récepteur AdipoR1 dans le muscle ne semble pas être la cause primaire de la résistance à l'adiponectine mais pourrait apparaître secondairement, dans des stades plus avancés d'obésité et d'insulino-résistance.

## **B. Mécanismes intracellulaires conduisant à l'insulino-résistance dans le muscle**

Différents mécanismes intracellulaires sont impliqués dans la mise en place de l'insulino-résistance dans le muscle comme la lipotoxicité, que nous avons décrit précédemment, mais aussi le stress du réticulum endoplasmique (RE), le stress oxydant, et une dysfonction mitochondriale (figure 17). Nous allons aborder maintenant le stress oxydant et la dysfonction mitochondriale qui ont été observés au niveau du muscle squelettique. Le stress du RE, décrit surtout au niveau du foie, ne sera pas détaillé.

### ***1. Dysfonction mitochondriale : cause ou conséquence de l'insulino-résistance ?***

Une altération de la mitochondrie a été aussi évoquée comme pouvant entraîner l'accumulation de lipides délétères impliqués dans la mise en place de l'insulino-résistance.

Nous allons voir dans cette partie que le rôle de ce dysfonctionnement mitochondrial en tant que cause ou conséquence de la résistance à l'insuline n'est actuellement pas clair (Petersen and Shulman 2006).

a) La dysfonction mitochondriale : une cause de l'insulino-résistance

Il y a une dizaine d'années, plusieurs équipes ont suggéré le rôle d'une diminution de la capacité oxydative mitochondriale dans la mise en place de la résistance à l'insuline (Kelley, Goodpaster et al. 1999; Simoneau, Veerkamp et al. 1999; Kim, Hickner et al. 2000; Petersen, Dufour et al. 2004; Morino, Petersen et al. 2005; Ritov, Menshikova et al. 2005) Leurs travaux ont rapporté une diminution de l'oxydation des lipides associée à une diminution de l'activité d'enzymes du métabolisme oxydatif chez des sujets obèses et insulino-résistants.

En 2002, l'équipe de Kelley a été la première à observer chez des patients diabétiques, une modification de la morphologie mitochondriale dans le muscle squelettique, c'est-à-dire une diminution de leur taille et une augmentation du nombre de mitochondries altérées (He, Watkins et al. 2001; Kelley, He et al. 2002). De plus, dans cette même étude, les auteurs ont rapporté une diminution de l'activité d'enzymes du cycle de Krebs (citrate synthase) et de la chaîne respiratoire (NADH : O<sub>2</sub> oxydoréductase) chez ces mêmes patients suggérant un dysfonctionnement intrinsèque mitochondrial.

L'étude du profil d'expression génique par microarray, a montré une diminution de l'expression génique d'enzymes clés du métabolisme oxydatif dans le muscle de patients diabétiques (Mootha, Lindgren et al. 2003; Patti, Butte et al. 2003), la majorité de ces gènes étant sous le contrôle du co-activateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$  dont l'expression est également diminuée chez ces patients.

Au vu de ce lien entre une altération de la fonction mitochondriale et la mise en place de la résistance à l'insuline, plusieurs auteurs ont mesuré la fonction mitochondriale *in vivo* par spectroscopie à résonance magnétique (Schrauwen-Hinderling, Kooi et al. 2007). Cette technique non invasive permet, à l'aide de traceurs radiomarqués tels que le <sup>13</sup>C et le <sup>31</sup>P, de mesurer respectivement l'activité du cycle de Krebs et la synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire. Ainsi, Petersen et ses collaborateurs ont montré une diminution d'environ 40% de ces 2 paramètres chez des sujets insulino-résistants âgés par rapport à des sujets jeunes de même indice de masse corporelle (IMC) (Petersen, Befroy et al. 2003). En 2004, cette même

équipe a montré une diminution de 30% de la synthèse d'ATP et une augmentation de 80% du contenu en TG dans le muscle chez des patients diabétiques par rapport à des sujets sains, de même âge et de même IMC (Petersen, Dufour et al. 2004). La capacité oxydative mitochondriale peut aussi être évaluée *in vivo* après un exercice physique en mesurant la vitesse de resynthèse de la phospho-créatine, par spectroscopie à résonance magnétique, pendant la phase de récupération (Schrauwen-Hinderling, Kooi et al. 2007; Phielix, Schrauwen-Hinderling et al. 2008). Une diminution d'environ 45% de la capacité oxydative mitochondriale a ainsi été mesurée chez des patients diabétiques (Schrauwen-Hinderling, Kooi et al. 2007) et prédiabétiques (Phielix, Schrauwen-Hinderling et al. 2008) sans modifications des IMTG.

La capacité oxydative mitochondriale est non seulement déterminée par la capacité intrinsèque de chaque mitochondrie, mais aussi par le nombre de mitochondries et l'apport en substrats énergétiques au muscle. Pour déterminer plus précisément la capacité intrinsèque mitochondriale, la respiration mitochondriale a été mesurée *ex vivo* dans le muscle de patients diabétiques. Une étude a montré que la respiration mitochondriale, en présence d'ADP (activité de l'ATP synthase) sur des fibres musculaires perméabilisées, était comparable chez des patients diabétiques par rapport à des sujets sensibles à l'insuline (Boushel, Gnaiger et al. 2007). Cependant une diminution du nombre de mitochondries a été observée. Ainsi, la respiration mitochondriale est diminuée lorsqu'elle est rapportée au poids du muscle et ce à cause d'une diminution du nombre de mitochondries et non de la capacité intrinsèque mitochondriale. De même, une diminution du nombre de mitochondries dans le muscle de sujets insulino-résistants a également été mise en évidence par microscopie électronique (Kelley, He et al. 2002; Morino, Petersen et al. 2005) ou par la mesure d'activité enzymatique .

En revanche, deux autres équipes ont montré une diminution de la respiration mitochondriale sur des mitochondries isolées de muscles de patients diabétiques (Mogensen, Sahlin et al. 2007) ou sur fibres musculaires perméabilisées (Phielix, Schrauwen-Hinderling et al. 2008), sans modification du nombre de mitochondries, suggérant un défaut intrinsèque mitochondrial.

Ainsi, une diminution du nombre et/ou de l'activité des mitochondries diminue la capacité du muscle à oxyder les AG, entraînant l'accumulation de lipides délétères responsables de l'insulino-résistance (Lowell and Shulman 2005; Morino, Petersen et al. 2006). De plus, il est important de souligner que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline

par différentes approches comme l'exercice physique (Rimbert, Boirie et al. 2004; Ostergard, Andersen et al. 2006; Toledo, Menshikova et al. 2007) ou la restriction calorique (Larson-Meyer, Heilbronn et al. 2006; Civitarese, Carling et al. 2007), est associée à une meilleure fonction mitochondriale.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'un dysfonctionnement mitochondrial pourrait être à l'origine de la mise en place de la résistance à l'insuline, et ce, à cause notamment de l'accumulation de lipides délétères. Cependant, nous allons voir dans la partie suivante qu'une altération de la fonction mitochondriale peut être une conséquence plutôt qu'une cause de l'insulino-résistance.

b) La dysfonction mitochondriale : une conséquence de l'insulino-résistance

➤ **Dissociation entre la dysfonction mitochondriale et l'insulino-résistance**

Des études récentes ont remis en cause le lien entre un dysfonctionnement mitochondrial et la résistance à l'insuline chez l'Homme et le rongeur.

Tout d'abord, l'étude d'une population diabétique d'origine indo-asiatique a mis en évidence que l'insulino-résistance pouvait être associée à une augmentation de la capacité oxydative mitochondriale (augmentation du nombre de mitochondries et de l'activité des enzymes de l'oxydation des lipides). De plus, l'oxydation des AG n'est pas modifiée voire augmentée chez des patients obèses (Bandyopadhyay, Yu et al. 2006; Holloway, Thrush et al. 2007; Mogensen, Sahlin et al. 2007) et dans différents modèles d'insulino-résistance chez le rongeur suggérant que d'autres mécanismes sont responsables de l'accumulation de TG dans le muscle (Garcia-Roves, Huss et al. 2007; Holloway, Thrush et al. 2007; Turner, Bruce et al. 2007; Koves, Ussher et al. 2008). En accord avec ces résultats, aucune modification de la fonction mitochondriale n'a été observée chez des patients diabétiques par rapport à des sujets de même âge et IMC et sensibles à l'insuline (De Feyter, van den Broek et al. 2008).

D'autres études ont montré que des animaux nourris par un régime hyperlipidique présentaient une augmentation de la capacité oxydative mitochondriale (activité enzymatique et expression protéique) associée à une insulino-résistance (Turner, Bruce et al. 2007; de Wilde, Mohren et al. 2008; Hancock, Han et al. 2008). En effet, Turner et ses collaborateurs ont mis en évidence que des souris nourries avec un régime riche en lipides pendant 5 ou 20 semaines deviennent insulino-résistantes malgré une augmentation de la capacité oxydative

mitochondriale (Turner, Bruce et al. 2007). Une autre étude a montré que 8 semaines de régime hyperlipidique ne modifient pas la capacité oxydative intrinsèque des mitochondries mais augmente l'expression de PGC1 $\alpha$  et des complexes de la chaîne respiratoire suggérant une augmentation de la densité mitochondriale. En accord avec ces résultats, Hancock a montré que 4 à 5 semaines de régime hyperlipidique entraînaient une augmentation de la densité mitochondriale *via* une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  et de PGC1 $\alpha$  (Hancock, Han et al. 2008). De plus, cette amélioration du métabolisme mitochondrial n'est pas associée à une diminution des IMTG dans le muscle (Hoeks, Briede et al. 2008).

Enfin, Bonnard et ses collaborateurs ont montré qu'un mois de régime riche en lipides et glucides était suffisant pour induire une intolérance au glucose chez la souris sans modification de la fonction mitochondriale (Bonnard, Durand et al. 2008). Cependant, quand les souris sont nourries par ce régime pendant 16 semaines, une altération de la structure et de la fonction mitochondriale a été observée en association avec une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). De plus, la production d'ERO induite par le glucose ou les lipides *in vitro* sur des cellules musculaires entraîne une altération mitochondriale pouvant être bloquée en traitant avec des antioxydants.

Cependant, Sparks et ses collaborateurs ont montré que des souris nourries par un régime hyperlipidique pendant 3 semaines présentaient une diminution de l'expression de gènes impliqués dans les phosphorylations oxydatives mitochondriales (Sparks, Xie et al. 2005). Ces auteurs ont également montré que la consommation d'un régime riche en lipides pendant 3 jours chez l'Homme entraînait une diminution de l'expression de PGC1 $\alpha$ . Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par la durée de ce régime hyperlipidique ou sa composition entre les différentes études.

Hormis cette dernière étude, l'ensemble des résultats montre que les rongeurs ont la capacité d'adapter la capacité oxydative mitochondriale à une augmentation de la prise de lipides mais une dysfonction mitochondriale peut apparaître lors de la prise de régime hyperlipidique pendant de longues périodes. L'accumulation de lipides dans le muscle et la mise en place de l'insulino-résistance semblent précéder l'apparition de dysfonction mitochondriale. Celle-ci apparaît alors comme une conséquence et non une cause de l'accumulation excessive de lipides. Cependant, cette dysfonction mitochondriale (diminution du nombre et/ou de l'activité d'enzymes des mitochondries) induite par les lipides conduit progressivement à la détérioration de la capacité oxydative mitochondriale et à l'accumulation de lipides délétères dans le muscle. Il semblerait qu'un cercle vicieux s'installe puisque

l'accumulation de lipides entraînerait à la fois des effets délétères pour la voie de transduction de l'insuline mais aussi une altération de la fonction mitochondriale qui, à son tour, joue un rôle dans l'étiologie de l'insulino-résistance (figure 19).

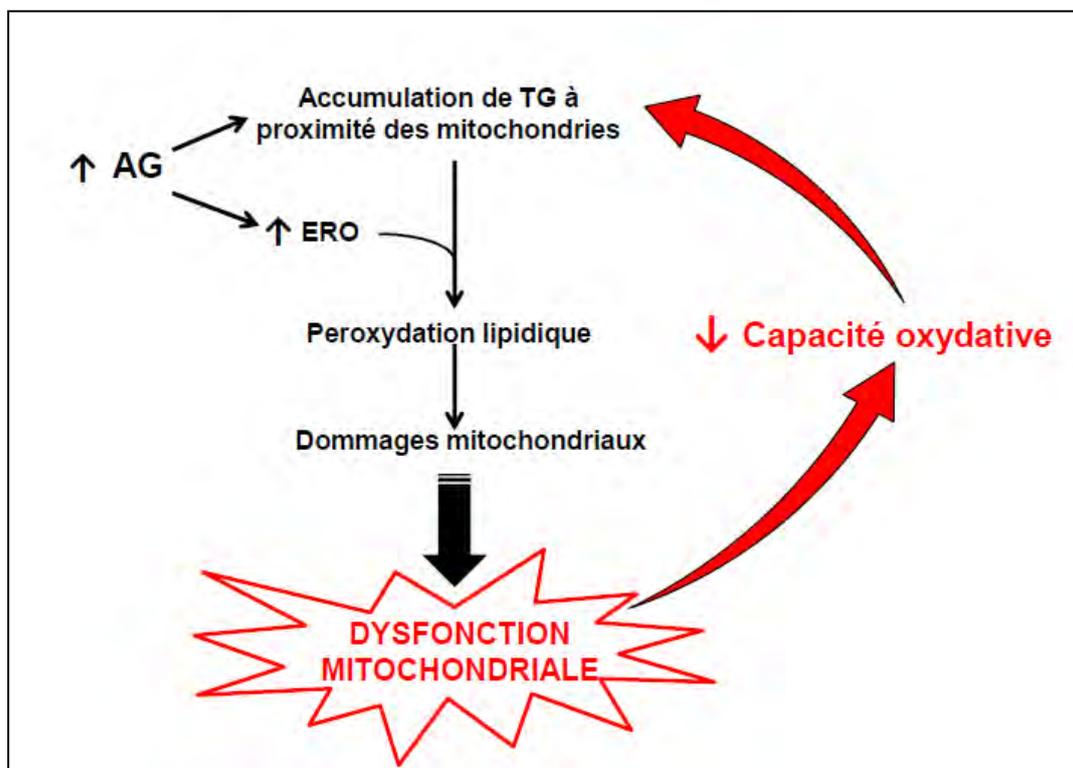
➤ **Cause du dysfonctionnement mitochondrial : le stress oxydant**

A côté de son rôle dans la production d'énergie, la mitochondrie est également une source majeure de production d'ERO. Ces ERO telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou les radicaux libres (superoxyde ou hydroxyde) peuvent interagir avec l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des dommages oxydatifs, il s'agit du stress oxydant. Dans les cellules musculaires, lors d'un apport important de lipides et en condition de faible demande énergétique (dans un contexte d'obésité et de diabète), certains AG sont transportés par diffusion passive dans la mitochondrie (Ho, Duclos et al. 2002). Ces AG s'accumulent au niveau de la membrane interne mitochondriale et sont alors très sensibles à l'action des ERO conduisant à la production de lipides peroxydés. Or, une augmentation de ces lipides peroxydés a été observée chez des sujets obèses et diabétiques (Russell, Gastaldi et al. 2003) ce qui laisse penser qu'ils pourraient causer des dommages au niveau de la structure mitochondriale et une diminution de la capacité oxydative chez ces patients (Kelley, He et al. 2002). De plus, cette hypothèse est en accord avec la dysfonction mitochondriale induite par un régime hyperlipidique associée à une augmentation de la production d'ERO (Bonnard, Durand et al. 2008).

La génération de ces ERO est importante lorsque le transport d'électron par la chaîne respiratoire est ralenti par un fort gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale (Schrauwen and Hesselink 2004). Une diminution de ce gradient de protons par le découplage mitochondrial pourrait alors diminuer la production d'ERO (Korshunov, Skulachev et al. 1997) et maintenir la fonction mitochondriale. Ainsi, l'équipe de P. Schrauwen a suggéré qu'UCP3 pouvait être impliquée dans la protection des mitochondries contre les dommages induits par les lipides par deux mécanismes (Schrauwen and Hesselink 2004). D'une part, UCP3 pourrait exporter les AG non métabolisables en dehors de la mitochondrie pour éviter leur attaque par les ERO. D'autre part, UCP3 pourrait dissiper le gradient de protons et ainsi limiter la production d'ERO. Cet effet bénéfique d'UCP3 a été confirmé chez des souris surexprimant UCP3 puisqu'elles présentent une diminution de la production d'ERO induite par l'âge dans le muscle squelettique (Nabben, Hoeks et al. 2008).

UCP3 semble donc impliqué dans la protection de la lipotoxicité mitochondriale en diminuant la production d'ERO.

Les ERO ne sont pas seulement des médiateurs du stress oxydant, mais ils participent aussi à l'inhibition de la transduction du signal insulinique. En effet, le stress oxydant active différentes kinases telles que JNK, PKC, IKK- $\beta$  et NF- $\kappa$ B (Bloch-Damti and Bashan 2005). Le traitement d'animaux obèses et diabétiques par des antioxydants permet d'améliorer l'action de l'insuline et l'homéostasie glucidique (Houstis, Rosen et al. 2006). De plus, chez l'Homme et le rongeur, l'insulino-résistance est associée à une augmentation de la production d' $H_2O_2$  mitochondriale et une diminution des taux de glutathion, un antioxydant capable de neutraliser  $H_2O_2$  (Anderson, Lustig et al. 2009). La diminution de la production d'ERO par des traitements antioxydants préserve la sensibilité à l'insuline *in vitro*, sur des myotubes (Hoehn, Salmon et al. 2009) et chez des souris nourries par un régime hyperlipidique (Anderson, Lustig et al. 2009; Hoehn, Salmon et al. 2009).



**Figure 19: Lipotoxicité mitochondriale.** Adapté d'après (Schrauwen, Schrauwen-Hinderling et al.).

Lors d'une augmentation du flux d'AG dans les cellules musculaires, les AG entraînent une accumulation de TG à proximité des mitochondries et une augmentation de la production d'ERO (espèces réactives de l'oxygène). Il y a alors peroxydation de ces lipides entraînant des dommages mitochondriaux et la dysfonction mitochondriale. La capacité oxydative est alors diminuée provoquant une plus forte accumulation de TG dans ces cellules.

## 2. *Surcharge mitochondriale*

### a) *Oxydation incomplète et acylcarnitines*

Des études récentes ont mesuré par spectroscopie de masse un grand nombre d'intermédiaires lipidiques de 5 classes chimiques différentes (acylcarnitines, acides organiques, acides aminés, acyl-CoA à longue chaîne et acides gras libres) dans le plasma et dans des homogénats de tissus (Bain, Stevens et al. 2009). Cette technique, utilisée jusqu'ici pour détecter des maladies génétiques mitochondriales, a permis de mettre en évidence une augmentation de différentes formes d'acylcarnitines, correspondant à l'oxydation incomplète des lipides, chez des animaux obèses et intolérants au glucose (animaux transgéniques ou rendus insulino-résistants par un régime hyperlipidique) (Koves, Li et al. 2005; Koves, Ussher et al. 2008). Les acylcarnitines sont formées à partir des différentes formes d'acyl-CoA produits lors des différents cycles de dégradation des AG. Chaque acyl-CoA en cours d'oxydation peut se lier à de la carnitine par une carnitine acyltransférase (CPT-II) présente notamment dans les mitochondries pour former l'espèce d'acylcarnitine correspondante. Les acylcarnitines formées peuvent sortir de la matrice mitochondriale par la CACT et pourront ensuite sortir de la cellule pour rejoindre la circulation sanguine. On dit que ces acylcarnitines sont des marqueurs de l'oxydation incomplète des acides gras, car ces intermédiaires lipidiques ne sont pas totalement dégradés en CO<sub>2</sub> (produit par le cycle de Krebs à partir de l'acétylCoA formé par la  $\beta$ -oxydation).

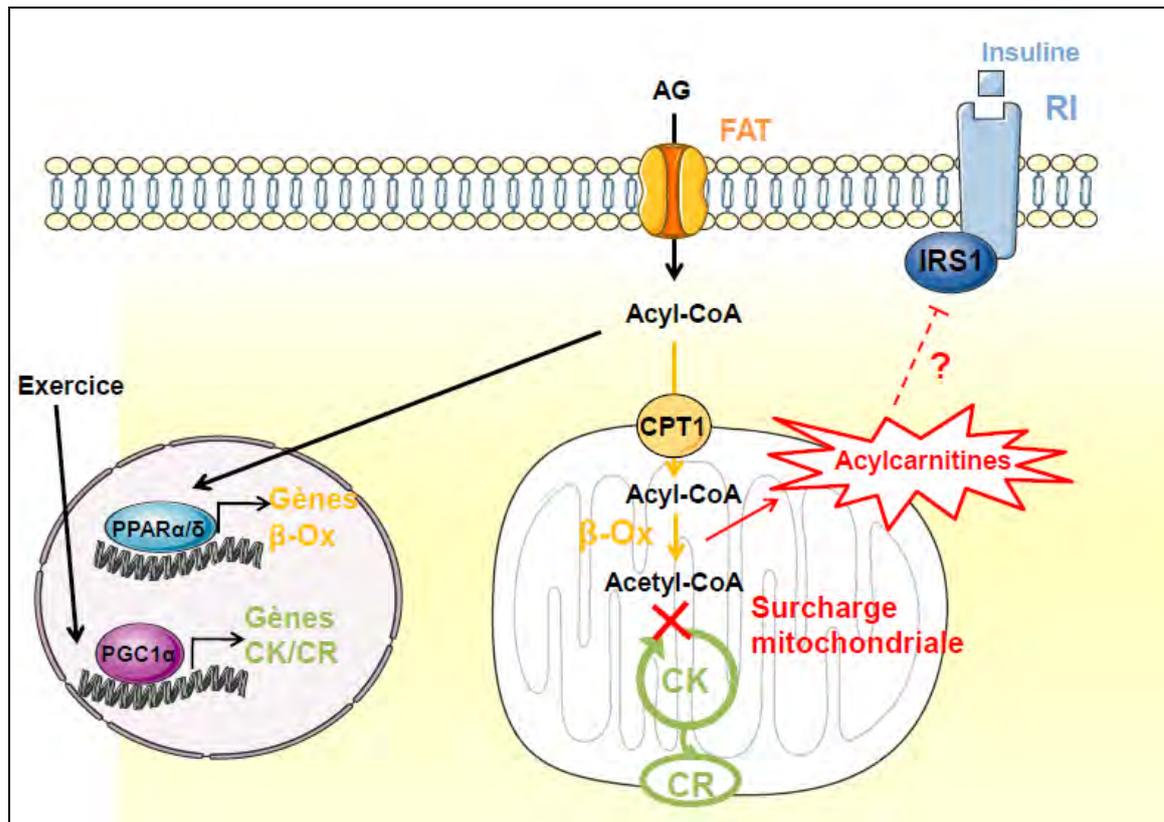
### b) *Implication des acylcarnitines dans l'insulino-résistance*

Le concept selon lequel des modifications des taux d'acylcarnitines pouvaient être associés à l'insulino-résistance a été évoqué pour la première fois par l'équipe de Newgard en 2004 (An, Muoio et al. 2004). Ainsi, plusieurs études de cette équipe ont mis en évidence que différentes formes d'acylcarnitines étaient anormalement élevées chez des rats obèses et diabétiques à l'état nourri par rapport à des rats contrôles (An, Muoio et al. 2004; Koves, Li et al. 2005; Koves, Ussher et al. 2008). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par la mesure de l'oxydation complète et incomplète des acides gras sur des mitochondries isolées des muscles de ces rongeurs. En effet, l'oxydation incomplète des AG est fortement augmentée par rapport à l'oxydation complète chez des animaux obèses par rapport aux animaux contrôles.

De plus, les rats nourris par régime standard ont une moindre production d'acylcarnitines lors de la transition de l'état à jeun à nourri contrairement aux rats en régime hyperlipidique (Koves, Ussher et al. 2008). Ceci suggère que les mitochondries des animaux obèses ne peuvent pas s'adapter au substrat présent selon le statut nutritionnel, on parle d'inflexibilité métabolique (Kelley, Goodpaster et al. 1999).

Enfin, trois semaines d'exercice entraînent une diminution des taux d'acylcarnitines et ceci est associé à une augmentation de l'expression de PGC1 $\alpha$  et d'une restauration de la tolérance au glucose (Koves, Li et al. 2005). Le rôle de PGC1 $\alpha$  dans ces effets a été testé *in vitro* sur des myocytes en cultures surexprimant ou pas cette protéine. Tout comme sur des mitochondries isolées de muscles de rat en régime gras, les myocytes exposés à des concentrations croissantes d'AG présentent une augmentation de l'oxydation incomplète. La surexpression de PGC1 $\alpha$  permet d'augmenter l'oxydation complète des AG sans modifier l'oxydation incomplète. Ainsi, dans un contexte où PGC1 $\alpha$  est faiblement exprimé, un apport important en AG active les gènes cibles des PPAR impliqués dans le transport et l'oxydation des AG sans augmenter ceux impliqués dans le cycle de Krebs ou la chaîne respiratoire (Patti, Butte et al. 2003). Une étude plus récente a montré une diminution des taux des intermédiaires du cycle de Krebs dans le muscle d'animaux insulino-résistants suggérant que l'activité du cycle de Krebs n'est pas suffisante pour prendre en charge tout l'acétyl-CoA produit ce qui entraîne une augmentation de l'oxydation incomplète des AG (Koves, Ussher et al. 2008). Par contre, l'activation de PGC1 $\alpha$  permettrait de coordonner ces différentes voies métaboliques en augmentant l'activité du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire afin de permettre l'oxydation complète des AG (figure 20). Les effets bénéfiques de l'exercice dans cette étude pourraient alors s'expliquer par une activation de PGC1 $\alpha$  (Koves, Li et al. 2005).

Ainsi, la coordination de régulateurs transcriptionnels tels que les PPARs et PGC1 $\alpha$  permet de coupler la  $\beta$ -oxydation et les voies métaboliques en aval pour prendre en charge un flux important de lipides. Selon Koves et ses collaborateurs, lors de l'insulino-résistance, il y a une « surcharge mitochondriale », c'est-à-dire que la capacité mitochondriale (et plus particulièrement le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire) est dépassée par un flux d'acides gras trop important entraînant une accumulation d'acylcarnitines.



**Figure 20 : surcharge mitochondriale et résistance à l'insuline.** D'après (Muio and Newgard 2008).

Lors d'un flux important de lipides dans les cellules musculaires, les AG activent PPAR $\alpha$  et  $\delta$  permettant d'augmenter les gènes de la  $\beta$ -oxydation ( $\beta$ -Ox). L'oxydation des AG est alors augmentée sans induction des voies de signalisation en aval, à savoir, le cycle de krebs (CK) et la chaîne respiratoire (CR). Il y a donc une surcharge mitochondriale entraînant la formation d'acylcarnitines qui pourraient inhiber la voie de l'insuline. Par ailleurs, l'induction des gènes du CK et de la CR, et de manière générale, l'augmentation de la biogenèse mitochondriale par l'exercice physique par exemple, permet de coordonner les voies métaboliques dans les mitochondries et d'empêcher cette surcharge mitochondriale.

Par la suite, d'autres études ont aussi montré une corrélation négative entre les taux d'acylcarnitines plasmatiques et musculaires et la tolérance au glucose. En effet, des rats nourris avec un régime enrichi en lipides et en acides aminés deviennent résistants à l'insuline et ont des taux élevés d'acylcarnitines paires et impaires (Newgard, An et al. 2009). Chez l'Homme, plusieurs travaux montrent également qu'une augmentation des acylcarnitines est associée à l'insulino-résistance et au diabète (Adams, Hoppel et al. 2009; Huffman, Shah et al. 2009; Newgard, An et al. 2009).

A l'heure actuelle, la voie de signalisation par laquelle ces acylcarnitines pourraient inhiber la voie de l'insuline n'est pas connue. Muio et ses collaborateurs ont suggéré que ces acylcarnitines pourraient activer des protéines kinases telles que PKC, IKK- $\beta$  et JNK

entraînant l'inhibition d'IRS-1 (Muio and Newgard 2008). De plus, les ERO pourraient aussi être impliquées dans ce phénomène de surcharge mitochondriale. En effet, la  $\beta$ -oxydation produit des coenzymes réduits sous forme de FADH<sub>2</sub> et NADH,H<sup>+</sup> qui sont pris en charge pour produire de l'ATP. Lorsque l'apport en lipides est important mais que la demande énergétique est faible (faible consommation d'ATP), le ratio ATP/ADP augmente ce qui réduit le flux de protons par l'ATP synthase et ralentit alors le transport des électrons par la chaîne respiratoire. Ceci va favoriser à la fois la production d'ERO, pouvant inhiber la voie de l'insuline mais cela va aussi augmenter le ratio NADH/NAD, pouvant inhiber différentes enzymes du cycle de Krebs.

L'ensemble de ces résultats montre une association entre les taux d'acylcarnitines et l'insulino-résistance mais d'autres études sont nécessaires pour montrer un lien de cause à effet ainsi que les voies de signalisation impliquées.

c) Implication de l'oxydation des lipides sur la sensibilité à l'insuline

Comme nous venons de le voir, les résultats de Muio montre qu'une augmentation de l'oxydation des AG et plus particulièrement de l'oxydation incomplète est délétère, ceci étant en accord avec l'hypothèse de Randle selon laquelle une oxydation excessive des acides gras provoque l'insulino-résistance (Randle, Garland et al. 1963; Randle 1998).

➤ **Effet délétère de l'oxydation des lipides sur la sensibilité à l'insuline**

Deux études ont montré qu'une altération de l'activité de la chaîne respiratoire induite par la délétion de protéines mitochondriales telles que AIF (*apoptosis-inducing factor*) (Pospisilik, Knauf et al. 2007) ou Tfam (*mitochondrial transcription factor A*) (Wredenberg, Freyer et al. 2006), entraîne une amélioration de la tolérance au glucose et protège les souris de l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique. Ces résultats sont également en accord avec la théorie de Randle (Randle, Garland et al. 1963; Randle 1998) puisqu'une diminution de l'utilisation des lipides est en faveur d'une entrée de glucose dans le muscle et améliore donc la tolérance au glucose.

Un autre modèle de souris transgéniques n'exprimant pas ACC2 (enzyme permettant la synthèse de malonyl-CoA) est caractérisé par une augmentation de l'oxydation des AG, due à une diminution des taux de malonyl-CoA. Ces souris ne présentent pas de modification de la

tolérance au glucose, de la dépense énergétique ni de la prise de poids (Hoehn, Turner et al. 2010). Cependant, un autre modèle de souris invalidées pour le gène ACC2 présentent une augmentation de l'oxydation des AG et de la dépense énergétique empêchant l'accumulation délétère de lipides et sont protégées de l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique (Abu-Elheiga, Matzuk et al. 2001; Choi, Savage et al. 2007).

Enfin, l'invalidation de MCD (enzyme permettant la synthèse d'acétyl-CoA à partir de malonyl-CoA) chez la souris entraîne à l'inverse une diminution de l'oxydation des AG (due à une augmentation de malonyl-CoA) ce qui améliore la sensibilité à l'insuline (Bouzakri, Austin et al. 2008; Koves, Ussher et al. 2008).

Ces études montrent donc qu'une augmentation de l'oxydation des AG altère la sensibilité à l'insuline alors qu'une diminution de la l'activité de la chaîne respiratoire améliore la sensibilité à l'insuline. Cependant ces résultats doivent être interprétés avec prudence puisqu'ils ont été obtenus sur des modèles transgéniques et certaines compensations peuvent se mettre en place, comme l'activation de l'AMPK. En effet, une diminution de la fonction mitochondriale entraîne une modification du statut énergétique de la cellule ce qui active l'AMPK et augmente le transport de glucose dans la cellule.

### ➤ Notion d'inflexibilité métabolique

En 1977, Mac Garry et ses collaborateurs ont montré que de fortes concentrations en glucose pouvaient inhiber l'oxydation des lipides *via* la synthèse de malonyl-CoA, un inhibiteur de CPT1 (McGarry, Mannaerts et al. 1977), ceci correspondant à la réciproque de l'hypothèse de Randle.

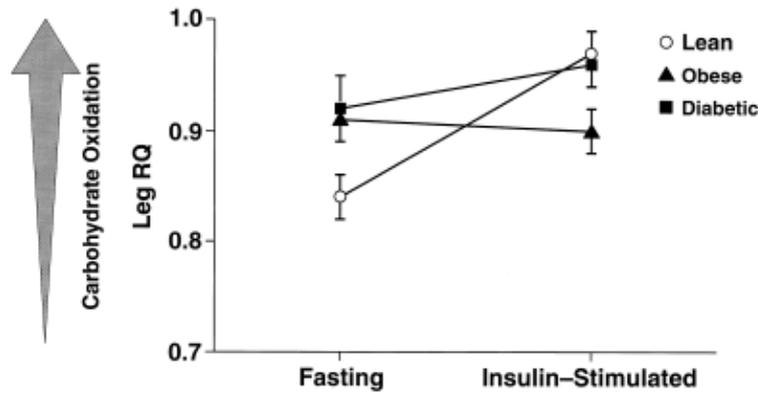
Une augmentation de la concentration en malonyl-CoA dans le muscle a été montrée sur différents modèles d'obésité chez le rongeur en association avec une augmentation des taux de TG dans le muscle (Ruderman, Saha et al. 2003; Saha and Ruderman 2003). En accord avec ces résultats, les souris invalidées pour le gène codant ACC2 ont une diminution de malonyl-CoA dans le muscle (Abu-Elheiga, Matzuk et al. 2001; Choi, Savage et al. 2007) associée à une augmentation de l'oxydation des AG et à une protection contre l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique.

Cependant, chez l'Homme, la relation entre le malonyl-CoA et l'IR est moins claire. Différentes équipes ont montré une augmentation des taux de malonyl-CoA associés à une diminution de l'oxydation des AG lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique

(Rasmussen, Holmback et al. 2002; Ruderman, Cacicedo et al. 2003). Or, les taux de malonyl-CoA dans le muscle sont comparables chez des sujets sains, obèses ou diabétiques (Bavenholm, Kuhl et al. 2003). L'axe malonyl-CoA est donc important dans la régulation de l'oxydation des AG mais son implication dans l'insulino-résistance n'a pas été clairement montrée chez l'Homme.

Ainsi, Randle et McGarry s'accordent sur le fait que les lipides sont impliqués dans la mise en place de l'insulino-résistance mais les mécanismes proposés divergent. Selon l'hypothèse de Randle, une augmentation de l'oxydation des AG serait à l'origine de l'insulino-résistance alors que selon Mac Garry, une inhibition de l'oxydation des AG par le malonyl-CoA entraîne une accumulation de lipides inhibant l'action de l'insuline (Puigserver and Spiegelman 2003). De plus, comme nous l'avons vu, les données de la littérature sont divergentes en ce qui concerne l'association de l'obésité et l'oxydation des AG.

Kelley et ses collaborateurs ont alors proposé le concept d'inflexibilité métabolique, c'est-à-dire, l'incapacité du muscle de sujets obèses et insulino-résistants à s'adapter au substrat énergétique présent en fonction du statut nutritionnel (Kelley, Goodpaster et al. 1999; Kelley and Mandarino 2000). Les auteurs ont mesuré le quotient respiratoire au niveau de la jambe en situation de jeûne ou lors d'une stimulation à l'insuline (figure 21). Chez des sujets sains, les lipides sont utilisés en période de jeûne mais pas chez des sujets obèses ou diabétiques. De plus, l'infusion d'insuline augmente l'utilisation du glucose chez les sujets sains mais pas chez des patients obèses ou diabétiques. Enfin, une diminution de la capacité à augmenter l'oxydation des AG lors d'un apport important de lipides (régime hyperlipidique) pourrait conduire à l'insulino-résistance induite par l'accumulation de lipides dans le muscle (Galgani, Moro et al. 2008).



**Figure 21 : inflexibilité métabolique.** D'après (Kelley and Mandarino 2000)

Le quotient respiratoire (RQ) au niveau de la jambe chez des sujets sains (○) ou obèses (▲) ou diabétiques (■) en condition de jeûne ou après stimulation à l'insuline a été mesuré par calorimétrie indirecte. Le RQ est plus faible (meilleure utilisation des lipides) à jeun chez les sujets sains que chez les patients obèses ou diabétiques. De plus l'insuline augmente le RQ chez les sujets sains mais pas chez les patients obèses ou diabétiques. Ainsi, ces patients ne peuvent pas adapter l'utilisation des substrats énergétiques en fonction de l'état nutritionnel contrairement aux sujets sains, on parle alors d'inflexibilité métabolique.

L'insulino-résistance n'est pas due à une augmentation ou à une diminution de l'oxydation des lipides mais plutôt à la capacité du muscle à utiliser un substrat énergétique donné en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme. Ainsi, la nécessité d'augmenter ou de diminuer l'oxydation des AG pour améliorer la sensibilité à l'insuline n'est pas claire et dépend du statut énergétique de l'organisme. Il apparaît tout de même qu'un flux trop important de lipides dans la mitochondrie est délétère sans régulation coordonnée des voies métaboliques mitochondriales ( $\beta$ -oxydation, cycle de Krebs et respiration mitochondriale).

### III. Traitements du diabète de type 2

#### A. Mesures hygiéno-diététiques

Des approches non pharmacologiques telles que des changements d'habitudes alimentaires, la pratique régulière d'une activité physique sont proposées en première intention dans le traitement du diabète de type 2. Une large étude clinique a été menée aux Etats-Unis chez des patients présentant un fort risque d'apparition de DT2 a permis d'évaluer l'efficacité de l'exercice physique associé à une restriction calorique par rapport à des patients traités avec la metformine (un médicament anti-diabétique qui sera décrit plus tard), ou un

placébo (Knowler, Barrett-Connor et al. 2002). Les résultats ont montré que l'incidence du T2D est réduite de 58% chez ce dernier groupe de patients contre 31% chez ceux ayant reçu le traitement pharmacologique. Ces résultats montrent bien que l'application des règles hygiéno-diététiques permet de réduire ou d'empêcher l'apparition de DT2 chez des patients prédiabétiques.

## **1. Restriction calorique et perte de poids**

### *a) Restriction calorique*

L'obésité est fortement associée au DT2 puisque 80% des patients diabétiques sont obèses, ou en surpoids important. On considère que réduire de 5 à 10 % le poids corporel permet d'atteindre une bonne amélioration des paramètres métaboliques. La restriction calorique doit s'accompagner de modifications de la qualité des nutriments et en particulier d'une réduction des apports lipidiques. En effet, la ration alimentaire devra être composée de 30 à 35 % de lipides (1/3 monoinsaturés, 1/3 polyinsaturés, 1/3 saturés) de 50 et 55 % de glucides et 10 à 20% de protéines.

Ainsi, chez des personnes obèses ou en surpoids, une restriction calorique associée à une modification de la composition du régime permet d'améliorer la tolérance au glucose, d'augmenter la sensibilité à l'insuline et de diminuer le taux de mortalité dû au DT2 (Larson-Meyer, Heilbronn et al. 2006; Weiss, Racette et al. 2006).

### *b) Chirurgie bariatrique*

La chirurgie bariatrique consiste à restreindre l'absorption des aliments ce qui permet de diminuer l'apport calorique journalier et entraîne alors une perte de poids.

Pour cela, différentes interventions existent et visent soit à entraîner la sensation de satiété plus rapidement en réduisant le volume de l'estomac (réduction gastrique) ou la vitesse de vidange de l'estomac (pose d'un anneau gastrique) soit à diminuer l'absorption des nutriments *via* la réduction du volume de l'estomac et la création d'un système de dérivation du tube digestif modifiant le circuit alimentaire, il s'agit du « bypass gastrique ». Ainsi, les aliments ne passent plus par l'estomac et la partie supérieure du tube digestif, ils vont directement dans la partie moyenne de l'intestin grêle.

Ces techniques entraînent une perte de poids associée à une diminution de l'hyperglycémie chez des patients obèses et diabétiques (Rubino, Schauer et al.). Les premières études cliniques ont montré que des patients diabétiques ayant subi une réduction gastrique présentent des taux d'hémoglobine glyquée plus faibles que des patients traités par des agents pharmacologiques (Dixon, O'Brien et al. 2008) suggérant une meilleure efficacité de ce type d'intervention thérapeutique par rapport aux traitements conventionnels. De plus, le bypass gastrique semble plus efficace que la réduction gastrique pour améliorer la glycémie chez des patients diabétiques ayant subi une chirurgie bariatrique (Rubino, Schauer et al.). Cependant, ce type de chirurgie est récent et l'efficacité de la chirurgie bariatrique dans la rémission ou le retardement de la progression du diabète devra être confirmé par des études cliniques à plus long terme.

## **2. Activité physique**

Une activité physique modérée et régulière entraîne des adaptations métaboliques permettant d'améliorer le contrôle de la glycémie et de retarder l'apparition du diabète de type 2. L'activité physique a des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline du foie et des muscles squelettiques (ce qui permet un meilleur contrôle de la glycémie) mais aussi sur des perturbations métaboliques du syndrome métabolique (dyslipidémie et risque cardiovasculaire) associées au DT2 (Sigal, Kenny et al. 2004; Hayes and Kriska 2008). En effet, l'exercice physique permet d'améliorer le profil lipidique et de diminuer le poids, le pourcentage de masse grasse ainsi que la pression sanguine et le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires. Ces effets bénéfiques sont en partie expliqués par l'activation de l'AMPK pendant l'exercice, au niveau des muscles squelettiques mais aussi du foie et du tissu adipeux (Ruderman, Park et al. 2003). Ces effets sont indépendants de la voie de l'insuline (Musi, Fujii et al. 2001). En effet, l'amélioration du contrôle de la glycémie pendant l'exercice physique chez des patients diabétiques est dû à une augmentation du transport de glucose dans le muscle et une diminution de la production hépatique de glucose (Segal, Edano et al. 1991). De plus, la contraction musculaire active l'AMPK (Hayashi, Hirshman et al. 1998; Long and Zierath 2006; Reznick, Zong et al. 2007) et est associée à une amélioration du transport de glucose dans le muscle et de la sensibilité à l'insuline (Fisher, Gao et al. 2002). Ces résultats suggèrent que les effets bénéfiques de l'exercice sur la sensibilité à l'insuline

pourraient passer par l'activation de l'AMPK. Or, le transport de glucose stimulé par la contraction musculaire est normal ou partiellement diminué chez des souris surexprimant une forme inactive de l'AMPK $\alpha$ 2 dans le muscle squelettique et chez des souris invalidées pour l'AMPK- $\alpha$ 1 et - $\alpha$ 2 (Jorgensen, Viollet et al. 2004; Fujii, Hirshman et al. 2005). Ainsi, l'exercice physique active différentes voies de signalisation permettant de réguler le transport de glucose et l'inhibition d'une de ces voies n'est pas suffisante pour altérer le captage de glucose par le muscle.

En plus de ses effets aigus, l'activité physique répétée permet d'améliorer l'action de l'insuline sur le muscle squelettique de patients obèses et insulino-résistants (Hawley and Lessard 2008). En parallèle, l'exercice physique augmente la biogenèse mitochondriale et favorise le couplage oxydation des lipides et cycle de Krebs ce qui pourrait participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Irrcher, Adihetty et al. 2003; Koves, Li et al. 2005). En effet, l'exercice physique régulier entraîne une adaptation des muscles caractérisée par une augmentation du nombre de mitochondries et la conversion de fibres musculaires en faveur des fibres oxydatives ce qui pourrait améliorer la tolérance au glucose (Holloszy and Coyle 1984; Tanner, Barakat et al. 2002; Turcotte and Fisher 2008). De plus, une heure d'exercice physique 5 jours par semaine pendant 8 semaines empêche l'apparition d'hyperglycémie, améliore la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique et retarde l'apparition du dysfonctionnement des cellules  $\beta$  associé au DT2 chez des rats ZDF (Pold, Jensen et al. 2005).

L'exercice augmente l'expression de l'adiponectine circulante et l'expression génique de son récepteur dans le muscle ce qui pourrait participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline induite par l'activation de l'AMPK au cours de l'exercice (Bluher, Bullen et al. 2006).

Ainsi, les effets aigus et à plus long terme de l'activité physique sont associés à une augmentation de l'activation de l'AMPK et une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Ces mesures hygiéno-diététiques permettent donc d'améliorer la sensibilité à l'insuline mais elles sont parfois difficile à mettre en place et à maintenir à long terme, d'où l'intérêt de développer des molécules mimant ces effets bénéfiques. De plus, l'efficacité de la restriction calorique et de l'activité physique peut devenir insuffisante et des traitements par des anti-diabétiques oraux sont mis en place.

## **B. Les médicaments anti-diabétiques**

On distingue différentes classes de médicaments anti-diabétiques qui ont pour objectif thérapeutique d'obtenir un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) inférieur à 6% (les taux normaux sont compris entre 4 et 6%) pour prévenir l'apparition des complications liées au T2D (Nathan, Buse et al. 2009). Ces médicaments peuvent être classés en différentes catégories en fonction de leur mode d'action ; on distingue ainsi les agents insulinosécréteurs, les médicaments insulinosensibilisateurs mais aussi les inhibiteurs de l'alpha glucosidase. Dans les stades avancés du diabète, lors de la phase d'insulinopénie, l'insuline peut être également utilisée seule ou en association avec un antidiabétique oral tel que la metformine.

### **1. Les inhibiteurs des alpha-glucosidases**

L'acarbose est un tétrasaccharide d'origine bactérienne qui agit par inhibition compétitive et réversible des alpha-glucosidases intestinales, enzymes de la bordure en brosse de l'intestin qui hydrolysent les polysaccharides en monosaccharides absorbables tels que le glucose ou le fructose. Ceci entraîne une diminution de la dégradation des glucides et donc une diminution de l'absorption intestinale de glucose ce qui permet de diminuer l'hyperglycémie post-prandiale (Nathan, Buse et al. 2009).

### **2. Les agents insulinosécréteurs**

#### *a) les sulfamides (ou sulfonylurées) et les glinides*

Les sulfonylurées et les glinides agissent exclusivement sur les cellules  $\beta$  du pancréas, en stimulant la sécrétion d'insuline, on parle alors d'agents insulinosécréteurs. Ces médicaments se fixent sur les canaux potassiques ATP-sensibles des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et ils induisent leur fermeture ce qui dépolarise de la cellule par entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et stimule la sécrétion d'insuline. L'efficacité de ce traitement dépend donc de la capacité résiduelle du pancréas à sécréter de l'insuline et n'a pas d'effet direct sur la sensibilité à l'insuline (Nathan, Buse et al. 2009). Les sulfonylurées et les glinides sont souvent employés en association avec la metformine ou les thiazolidinediones.

b) Les analogues du GLP-1 et les gliptines

L'intestin participe au contrôle de l'homéostasie énergétique en libérant, sous l'effet de l'arrivée du bolus alimentaire, 2 peptides appelés incrétines (GLP-1 et le GIP) qui vont augmenter la sécrétion d'insuline de façon dépendante de la glycémie. Chez la plupart des patients T2D, la sécrétion de GLP1 par l'intestin en réponse aux stimuli nutritionnels est réduite. En revanche, l'effet du GLP-1 sur la sécrétion de l'insuline est conservé.

La demi-vie des incrétines étant faible, deux stratégies thérapeutiques ont été développées. En effet, des analogues non hydrolysables du GLP-1 ont été synthétisés comme l'exenatide et plus récemment le liraglutide. Ces composés sont des agonistes du récepteur au GLP-1, ils sont injectables et résistent naturellement à l'enzyme responsable de sa dégradation, la DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV). Les gliptines constituent la deuxième stratégie qui consiste à inhiber la DPP-IV, ce qui permet de limiter la dégradation du GLP-1 endogène. Trois gliptines sont actuellement employées, il s'agit de la sitagliptine, la vildagliptine et plus récemment, la saxagliptine.

L'efficacité de ces différentes molécules dans le traitement de DT2 a été mise en évidence et ceci, *via* une augmentation de la sécrétion d'insuline permettant de normaliser la glycémie mais aussi, par une amélioration du fonctionnement, du nombre et du volume des cellules  $\beta$  pancréatiques (Nathan, Buse et al. 2009). Contrairement aux analogues du GLP-1, les gliptines entraînent peu d'effets indésirables au niveau gastro-intestinal.

### 3. Les agents insulino-sensibilisateurs

a) Les biguanides : la Metformine

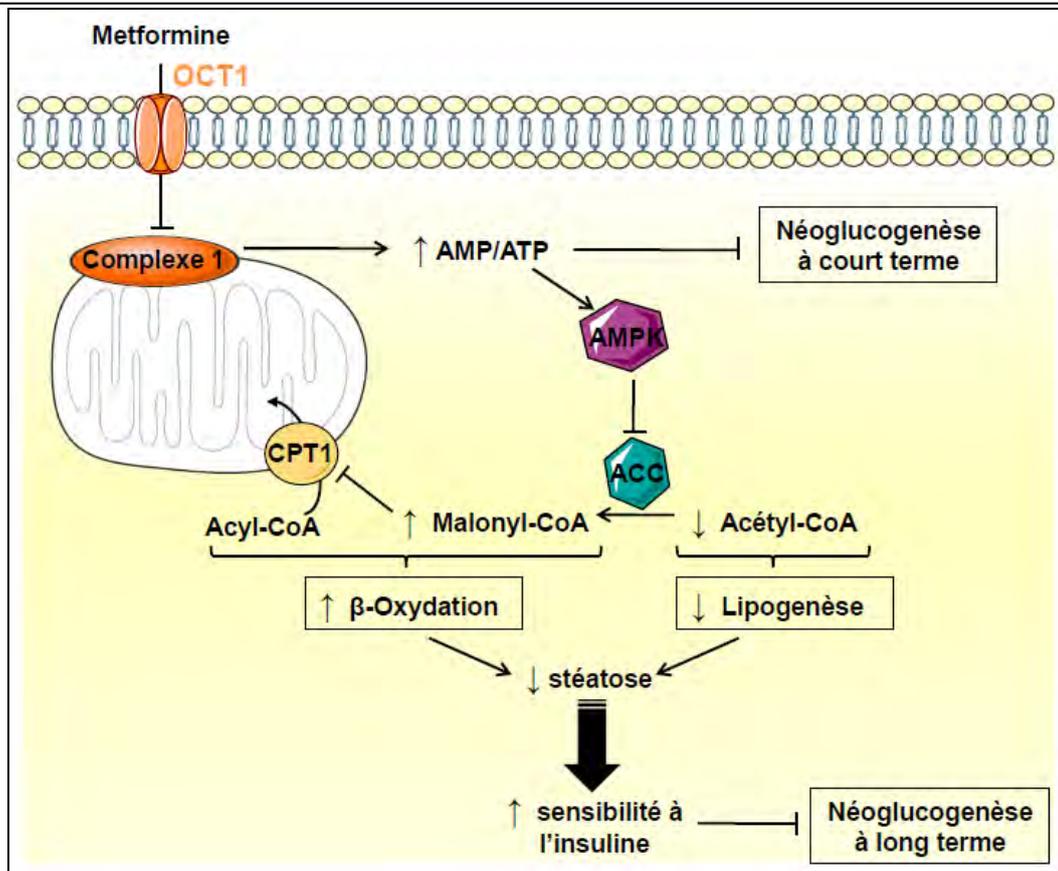
Depuis l'arrêt de la commercialisation de la phenformine, responsable d'acidose lactique, il ne reste plus qu'un seul représentant de la classe des biguanides, la metformine qui est indiquée en première intention dans le traitement du DT2.

La metformine permet de réduire la glycémie basale et post-prandiale en diminuant la production hépatique de glucose (inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse) et en augmentant l'utilisation périphérique du glucose surtout au niveau musculaire. Son mode d'action moléculaire n'est pas bien connu mais il est cependant reconnu actuellement que la

metformine entre dans la cellule *via* le transporteur de cations OCT1 (*organic cations transporter 1*) puis active l'AMPK dans le muscle et le foie (Zhou, Myers et al. 2001; Shu, Sheardown et al. 2007). Ainsi, au niveau du muscle squelettique, la metformine augmente l'utilisation de glucose chez des patients diabétiques ce qui s'accompagne d'une amélioration de la tolérance au glucose (Musi, Hirshman et al. 2002). De plus, un traitement de 14 jours à la metformine augmente l'expression de PGC1 $\alpha$  ainsi que l'activité d'enzymes mitochondriales suggérant une amélioration de la capacité oxydative mitochondriale (Suwa, Egashira et al. 2006).

Au niveau du foie, la metformine inhiberait la néoglucogénèse *via* l'activation de l'AMPK par LKB1 et une inhibition des gènes d'enzymes clés de cette voie (Shaw, Lamia et al. 2005). Cependant, ces résultats ont été remis en cause très récemment par l'utilisation de souris invalidées pour le gène codant pour l'AMPK spécifiquement dans le foie (Foretz, Hebrard et al. 2010). Ainsi, les auteurs ont pu montrer que la metformine inhibe la production hépatique de glucose indépendamment de l'activation de l'AMPK. Or, il y a dix ans, deux équipes ont montré que la metformine active indirectement l'AMPK *via* l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant une augmentation du ratio AMP/ATP (El-Mir, Nogueira et al. 2000; Owen, Doran et al. 2000). Foretz et ses collaborateurs ont alors proposé que la metformine pourrait inhiber la néoglucogénèse hépatique *via* cette inhibition du complexe I mitochondrial mais sans activer l'AMPK (figure 22). En effet, la néoglucogénèse est un processus très consommateur d'énergie et la diminution de l'apport d'ATP, dû à l'inhibition de la chaîne respiratoire, apparaît alors comme la cause de l'inhibition du flux néoglucogénique (Foretz, Hebrard et al. 2010).

Bien que l'AMPK ne semble pas impliquée dans les effets à court terme de la metformine, ceci n'exclut pas qu'elle joue un rôle important dans les effets à long terme de cet agent anti-diabétique. En effet, plusieurs études ont montré que la metformine active l'AMPK dans les hépatocytes ce qui diminue d'une part l'activité d'ACC et majore l'oxydation des AG et, réduit d'autre part l'expression d'enzymes lipogéniques (Lin, Yang et al. 2000). Ainsi, l'AMPK à long terme permet de réduire l'accumulation de lipides dans le foie ce qui limite le phénomène de lipotoxicité et contribue ainsi à l'amélioration de la transduction du signal insulinique.



**Figure 22 : Effets à court et long terme de la metformine sur la néoglucogénèse hépatique.** D'après (Foretz, Hebrard et al. 2010).

La metformine inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire entraînant une augmentation du ratio AMP/ATP dans les hépatocytes. La néoglucogénèse étant un processus consommateur d'énergie, la diminution d'ATP induite par la metformine provoque une inhibition de cette voie à court terme. De plus, cette déplétion en énergie active l'AMPK qui inhibe l'ACC (acétyl-CoA carboxylase) permettant de diminuer les taux de malonyl-CoA et donc d'augmenter l'oxydation des AG. De plus, l'inhibition d'ACC réduit la lipogenèse *de novo*. L'augmentation de l'oxydation des AG et la diminution de la lipogenèse *de novo* conduit à une diminution de la stéatose hépatique ce qui améliore la sensibilité à l'insuline. La néoglucogénèse *de novo* (effet long terme) pourra être à nouveau inhibée.

Enfin, il est important de remarquer qu'à côté de ses effets antidiabétiques, la metformine aurait aussi un effet anti-tumoral. En effet, en 2005, la découverte de l'implication du suppresseur de tumeur LKB1 dans le mode d'action de la metformine a ouvert de nouvelles perspectives pour cette molécule dans le traitement du cancer (Shaw, Lamia et al. 2005). Par la suite, il a été montré que la metformine inhibe la prolifération cellulaire sur cellules cancéreuses MCF7 et ceci, *via* l'activation de l'AMPK (Zakikhani, Dowling et al. 2006). De plus, l'équipe de F. Bost a pu démontrer que la metformine inhibe la prolifération de cellules humaines de cancer de la prostate en bloquant le cycle cellulaire en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Cette même étude montre qu'un traitement chronique quotidien par la metformine permet de diminuer la croissance tumorale *in vivo* chez la souris (Ben Sahra, Laurent et al. 2008).

b) Les thiazolidinédiones

Les thiazolidinediones (TZD), dont les principaux représentants sont la rosiglitazone, la pioglitazone et la troglitazone, appartiennent à la classe des molécules insulino-sensibilisatrices. En raison de risques cardiovasculaires potentiels, la Rosiglitazone a été retirée du marché en France et en Europe en septembre 2010.

Les TZD sont des agonistes sélectifs des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et ils permettent d'induire l'expression génique de molécules régulant la différenciation des adipocytes et le métabolisme adipocytaire. Ainsi, les TZD augmentent la différenciation adipocytaire (Schoonjans, Staels et al. 1996) et augmentent la masse adipeuse. Des études du métabolisme des AG *in vivo* à l'aide de palmitate radiomarqué ont permis de montrer qu'un traitement de 3 semaines à la rosiglitazone améliore la capacité du tissu adipeux à capter et à stocker les AG (Oakes, Thalen et al. 2001). De plus, le traitement entraîne une diminution de la concentration plasmatique en TG due à un meilleur captage par le tissu adipeux des TG contenus dans les VLDL et une diminution de la production hépatique de glucose. Ainsi, les TZD favorisent le stockage des AG dans le tissu adipeux empêchant alors le stockage ectopique des lipides dans le foie et les muscles squelettiques ce qui permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline.

Les TZD entraînent également une augmentation de la sécrétion d'adiponectine par le TA ce qui active l'AMPK dans le foie et diminue la production hépatique de glucose (Kubota, Terauchi et al. 2006). En effet, les effets métaboliques et insulino-sensibilisateurs des TZD pourraient passer par l'activation de l'AMPK *via* l'adiponectine, l'activation de l'AMPK par la rosiglitazone étant diminuée chez des souris déficientes en adiponectine (Nawrocki, Rajala et al. 2006).

De plus, un traitement par la rosiglitazone chez la souris permet d'améliorer la biogenèse mitochondriale altérée lors du diabète dans le tissu adipeux (Wilson-Fritch, Nicolero et al. 2004; Choo, Kim et al. 2006; Rong, Qiu et al. 2007). Chez l'Homme, les mêmes effets ont été observés dans le tissu adipeux sous cutané après un traitement de 12 semaines par la pioglitazone (Bogacka, Xie et al. 2005).

Dans le muscle squelettique, un traitement de 7 jours par la rosiglitazone entraîne une augmentation de l'oxydation des AG dans le muscle chez le rat (Benton, Holloway et al. 2008). Chez l'Homme, un traitement de 8 semaines à la rosiglitazone améliore la sensibilité à l'insuline sans augmentation de la fonction mitochondriale (Schrauwen-Hinderling, Mensink et al. 2008).

Enfin, des études cliniques ont montré que les TZD améliorent la fonction des cellules  $\beta$  à long terme et permettraient de retarder l'apparition de T2D (Campbell 2004; Gerstein, Yusuf et al. 2006).

### **C. AMPK : cible d'intérêt dans le traitement du diabète**

L'AMPK est activée par 2 classes d'antidiabétiques, la metformine et les TZD mais aussi par des adipokines ayant des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline comme l'adiponectine, la leptine et l'apeline (que nous décrivons en détail plus tard dans ce manuscrit).

L'inactivation du gène de l'AMPK- $\alpha 2$  aggrave l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline induite par un régime hyperlipidique ce qui suggère un rôle clé de l'AMPK- $\alpha 2$  dans le métabolisme musculaire et des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline (Viollet, Andreelli et al. 2003).

#### **1. Effets d'un traitement aigu et chronique activant l'AMPK**

L'AMPK participe également à l'adaptation métabolique des muscles squelettiques à l'entraînement. En effet, une surexpression de l'AMPK dans le muscle permet d'augmenter la proportion de fibres musculaires de type IIa/x, d'induire l'expression de PGC1 $\alpha$  et d'améliorer l'activité de marqueurs mitochondriaux (Rockl, Hirshman et al. 2007). Une activation chronique de l'AMPK par l'exercice physique ou l'AICAR permet d'activer PGC1 $\alpha$  ce qui augmente l'activité d'enzymes mitochondriales et améliore la capacité oxydative des mitochondries musculaires (Suwa, Nakano et al. 2003).

De plus, un traitement par l'AICAR pendant 4 semaines permet d'améliorer l'endurance chez des souris non entraînées (Narkar, Downes et al. 2008) ceci étant associé à une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme oxydatif. Ces données suggèrent que l'activation de l'AMPK mime les effets de l'exercice physique régulier qui, comme nous l'avons précédemment, sont associés à une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Ainsi, des traitements *in vivo* par l'AICAR ont montré que l'activation de l'AMPK améliore les différents paramètres métaboliques sur différents modèles de résistance à l'insuline chez le rongeur (Bergeron, Previs et al. 2001; Buhl, Jessen et al. 2002; Iglesias, Ye et al. 2002; Song,

Fiedler et al. 2002; Pold, Jensen et al. 2005). En effet, une simple injection d'AICAR permet de diminuer rapidement la glycémie en inhibant la synthèse hépatique de glucose et en augmentant le transport de glucose dans les muscles (Bergeron, Previs et al. 2001; Iglesias, Ye et al. 2002; Song, Fiedler et al. 2002). Une activation aigüe de l'AMPK entraîne également une augmentation de l'oxydation des lipides et une diminution du contenu en TG intramusculaires ce qui est associé à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Ruderman, Cacicedo et al. 2003). De plus, 24 h après une simple injection d'AICAR, la sensibilité à l'insuline est améliorée et ceci est associé à une augmentation du transport de glucose et de son incorporation en glycogène en réponse à l'insuline (Iglesias, Ye et al. 2002). L'augmentation du transport de glucose induite par l'exercice ou l'activation de l'AMPK passe par une voie de signalisation indépendante de celle de l'insuline et est conservée chez des patients diabétiques (Koistinen, Galuska et al. 2003).

Ainsi, l'activation de l'AMPK dans le muscle semble donc être une méthode efficace pour augmenter l'utilisation de glucose dans le muscle en contournant la voie de l'insuline, inefficace chez des patients diabétiques.

Une administration d'AICAR pendant 8 semaines empêche l'apparition d'hyperglycémie, améliore la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique et retarde l'apparition du dysfonctionnement des cellules  $\beta$  associé au DT2 chez des rats ZDF (Pold, Jensen et al. 2005). De plus, 7 semaines de traitement par l'AICAR permet également d'améliorer le profil lipidique en diminuant les taux plasmatiques de TG et AG chez des rats insulino-résistants (Buhl, Jessen et al. 2002). Chez le rongeur, une activation chronique de l'AMPK par l'administration d'AICAR ou la prise de  $\beta$ -GPA ( $\beta$ -guanidinopropionic acid : un analogue de la créatine qui diminue les taux intracellulaire de phosphocréatine et d'ATP) mime les effets de l'entraînement physique et améliore l'endurance des animaux traités (Narkar, Downes et al. 2008). En effet, ce traitement chronique entraîne une augmentation de l'expression de GLUT4 et HK2 ainsi que des marqueurs de la biogenèse mitochondriale (Holmes, Kurth-Kraczek et al. 1999; Winder, Holmes et al. 2000; Bergeron, Ren et al. 2001; Buhl, Jessen et al. 2002; Zong, Ren et al. 2002). Cet effet est aboli chez des souris déficientes pour l'AMPK- $\alpha 2$  ou surexprimant une forme inactive de l'AMPK- $\alpha 2$  dans le muscle (Holmes, Lang et al. 2004; Jorgensen, Wojtaszewski et al. 2005). En parallèle, l'AMPK augmente les taux de NAD<sup>+</sup> cellulaires et l'activité de SIRT1 ce qui entraîne la désacétylation et l'activation de PGC1 $\alpha$  (Canto and Auwerx 2009). Or, PGC1 $\alpha$  est requis pour augmenter

l'expression de GLUT4 et des gènes mitochondriaux induite par l'AMPK (Jager, Handschin et al. 2007).

Ainsi, l'activation aiguë ou chronique de l'AMPK a des effets bénéfiques sur les métabolismes glucidique et lipidique dans le muscle et le foie permettant d'améliorer les perturbations métaboliques associées au DT2 et au syndrome métabolique. L'utilisation d'activateurs de cette kinase apparaît alors comme une nouvelle stratégie d'intérêt dans le traitement du DT2.

## 2. Les nouveaux activateurs de l'AMPK

Différents activateurs de l'AMPK tels que des agents pharmacologiques utilisés dans le traitement de DT2 (metformine et TZD) (Zhou, Myers et al. 2001; Ye, Dzamko et al. 2006) et des adipokines (leptine, adiponectine) (Shimabukuro, Koyama et al. 1997; Yamauchi, Kamon et al. 2002) ont été testés sur des modèles animaux de diabète et ont montré des résultats prometteurs. Récemment, de nouveaux activateurs de l'AMPK ayant des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique ont été mis en évidence. Il s'agit soit de produits naturels comme la berbérine et le resvératrol, soit de produits développés (A-769662).

Tout d'abord, la berbérine est un alcaloïde isolé d'une plante médicinale chinoise (rhizoma coptidis) dont les propriétés antihyperglycémiques ont été mises en évidence (Turner, Li et al. 2008). La berberine entraîne une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui augmente le ratio AMP/ATP et active l'AMPK. Ceci permet d'améliorer l'action de l'insuline chez des animaux obèses et diabétiques (Turner, Li et al. 2008; Yin, Gao et al. 2008).

Le resvératrol (RSV), un polyphénol présent notamment dans le raisin, permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et d'empêcher les désordres métaboliques induits par la prise de régime hypercalorique (Lagouge, Argmann et al. 2006; Zang, Xu et al. 2006; Milne, Lambert et al. 2007). Le resvératrol est un activateur de l'AMPK *in vitro* et *in vivo* (Baur, Pearson et al. 2006; Zang, Xu et al. 2006) *via* l'activation de LKB1 par SIRT1 (sirtuin 1) (Hou, Xu et al. 2008). SIRT 1 est une désacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup> qui permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline dans le foie, de diminuer les besoins énergétiques de l'organisme (Sun, Zhang et al. 2007) et de contrôler la mobilisation des lipides (Picard,

Kurtev et al. 2004). Le RSV protège également de l'accumulation de lipides dans le foie de souris diabétiques (Zang, Xu et al. 2006), augmente le nombre de mitochondries et active PGC1 $\alpha$  par désacétylation grâce à SIRT1 (Baur, Pearson et al. 2006; Rodgers and Puigserver 2007).

Enfin, l'A-769662 est un activateur direct et spécifique de l'AMPK (Cool, Zinker et al. 2006). En effet, l'A-769662 se lie directement au site de liaison de l'AMP mais, contrairement à l'AMP ou au ZMP produit par l'AICAR, il est spécifique de l'AMPK puisqu'il ne peut pas se lier sur d'autres enzymes sensibles à l'AMP. Un traitement à court terme chez des rats normaux entraîne une diminution du quotient respiratoire suggérant une augmentation de l'oxydation des AG. De plus, un traitement de 5 jours à l'A-769662 diminue la glycémie, la concentration plasmatique des TG et la prise de poids chez des souris *ob/ob*.

### 3. Intérêt de l'activation de l'AMPK dans le traitement du DT2

Nous venons de voir que l'AMPK exerce des effets bénéfiques dans la régulation du métabolisme énergétique dans un contexte de résistance à l'insuline, puisqu'elle permet de contrôler la glycémie en jouant sur le foie et les muscles squelettiques. De plus l'activation de l'AMPK exerce des effets à long terme sur la régulation de gènes clés du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale. Ainsi, l'AMPK représente une cible d'intérêt dans la prévention et le traitement du DT2. Il est maintenant important de déterminer s'il est nécessaire d'activer continuellement l'AMPK ou si des activations intermittentes mimant les effets de l'exercice physique sont suffisantes pour atteindre l'efficacité maximale de l'AMPK sur le métabolisme énergétique.

Cependant, les fonctions de l'AMPK sont variées et certains effets de l'AMPK sur d'autres tissus, notamment au niveau du système nerveux central, doivent être attentivement étudiés. En effet, une activation de l'AMPK dans l'hypothalamus entraîne une augmentation de la prise alimentaire (Minokoshi, Alquier et al. 2004). Il semble donc important que les activateurs de l'AMPK, administrés par voie orale, soient efficaces à faible concentration sur des organes spécifiques cibles (foie et muscles) mais pas dans l'hypothalamus.

De plus, les effets de l'AMPK sur le pancréas ont été moins étudiés, cependant l'activation de l'AMPK semble être bénéfique dans ce tissu. En effet, un traitement par l'AICAR pourrait améliorer la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques et diminuer l'apoptose (Riboulet-Chavey, Diraison et al. 2008) mais ces résultats sont controversés (Kefas, Heimberg et al. 2003). De

plus, l'activation de l'AMPK par diverses molécules (AICAR, metformine, TZD et berberine) entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline (Salt, Johnson et al. 1998). Cet effet de l'AMPK pourrait être bénéfique puisque l'activation de cette enzyme diminue la sécrétion d'insuline témoignant d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Carr, Brand et al. 2003). Ainsi, la diminution de la sécrétion d'insuline pourrait contrecarrer la glucotoxicité et empêcher la perte de fonction puis l'apoptose des cellules  $\beta$  qui apparaît progressivement entre l'état pré-diabétique et diabétique (Butler, Janson et al. 2003). Enfin, une infusion d'AICAR chez le rat pré-diabétique empêche l'apparition de l'hyperglycémie et préserve les cellules  $\beta$  (Pold, Jensen et al. 2005). Ainsi, l'AMPK empêche ou ralentit l'apparition de l'hyperinsulinémie et l'apoptose des cellules  $\beta$  dans les différents degrés d'insulino-résistance.

Peu d'études concernant l'activation de l'AMPK ont été réalisées chez l'Homme mais récemment, une injection d'AICAR par voie intraveineuse a été effectuée chez des patients diabétiques. Les effets observés se situent au niveau du foie, où l'activation de l'AMPK inhibe la production hépatique de glucose, diminuant ainsi la glycémie et augmente l'oxydation des lipides ce qui permet de réduire les taux plasmatiques d'AG (Boon, Bosselaar et al. 2008). De plus, une infusion d'AICAR ne semble pas activer l'AMPK musculaire chez des sujets volontaires sains (Cuthbertson, Babraj et al. 2007) ou des patients diabétiques (Boon, Bosselaar et al. 2008) ce qui pose la question de la dose nécessaire permettant une activation de l'AMPK musculaire.

Enfin, il est important de souligner que pour envisager une nouvelle thérapie par un agent activateur de l'AMPK, celui-ci devra présenter une efficacité supérieure ou égale aux agents antidiabétiques déjà existants. La metformine étant le médicament de première intention dans le traitement du diabète de type 2, il serait avantageux qu'un nouvel activateur de l'AMPK soit combinable ou ait un effet additif à celui de la metformine. Pour le savoir, différentes études cliniques doivent être maintenant réalisées pour comparer l'efficacité des différents activateurs de l'AMPK.

## **Partie III : le système Apeline/APJ**

### **I. Découverte du système Apeline/APJ**

#### **A. Le récepteur APJ**

##### **1. *Découverte et caractéristiques d'APJ***

En 1993, le gène codant pour un nouveau récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G a été identifié par O'Dowd et ses collaborateurs sur le chromosome 11 humain (O'Dowd, Heiber et al. 1993). N'ayant pas de ligand connu, il a été qualifié de récepteur orphelin et nommé APJ. APJ présente 30% d'homologie de séquence avec le récepteur de type 1 à l'angiotensine (AT1) cependant il ne lie pas l'angiotensine II. Il a même été montré récemment qu'APJ peut se lier à AT1 et former un hétérodimère (Chun, Ali et al. 2008). La liaison de l'angiotensine sur son récepteur ATI entraînerait la formation du dimère AT1/APJ ce qui empêcherait la liaison de l'apeline sur APJ et limiterait ainsi ses effets (Barnes, Japp et al.).

Le récepteur APJ a ensuite été identifié dans de nombreuses autres espèces dont la souris et le rat avec qui le récepteur APJ humain possède 91 et 89% d'homologie respectivement (Carpene, Dray et al. 2007). A l'heure actuelle, un seul récepteur à l'apeline a été mis en évidence.

##### **2. *Localisation***

L'ARNm codant pour APJ a été retrouvé dans plusieurs régions du système nerveux central (SNC) chez le rat comme le noyau supraoptique (NSO) et le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus mais aussi, au niveau de l'hypophyse et de l'épiphyse (De Mota, Lenkei et al. 2000; Lee, Cheng et al. 2000; O'Carroll, Selby et al. 2000) (tableau 1) . Plus tard, Medhurst a confirmé ces résultats en immunohistochimie et a montré que le récepteur de l'apeline est aussi largement exprimé au niveau du cortex cérébral, des ganglions de la base, du thalamus et de la formation réticulée (Medhurst, Jennings et al. 2003). Chez l'Homme, l'ARN messager codant pour le récepteur de l'apeline a également été mis en évidence au niveau du SNC mais

plus particulièrement au niveau de la moelle épinière et des corps calleux (Matsumoto, Hidaka et al. 1996; Edinger, Hoffman et al. 1998; Medhurst, Jennings et al. 2003). La distribution de la protéine n'a pas encore été déterminée chez l'Homme.

Le récepteur APJ est également présent dans de nombreux tissus périphériques et il est le plus fortement exprimé dans les poumons, le cœur et les reins chez le rongeur (Katugampola, Maguire et al. 2001). Chez l'Homme, le récepteur APJ est globalement dans les mêmes tissus mais contrairement au rongeur, son expression est maximale au niveau de la rate et du placenta. De plus, APJ est également présent en plus faibles quantités dans la plupart des tissus tels que le cœur, le foie, les poumons, les reins et le pancréas (Medhurst, Jennings et al. 2003).

	APJ			Apeline		
	Rat	Souris	Homme	Rat	Souris	Homme
Cerveau	++	+	+++	+	+++	++
Cervelet	+		+	+		+
Hypophyse	+		+	+		++
Moelle épinière	+++	++	+	++		++
Rate	-	+	+++	-	+	
Thymus		+	+		-	
Cœur	++	+++	+	++	++	+
Cellules endothéliales	++					
Poumons	+++	++	++	+++	++	+
Estomac	+		+	+		-
Intestin grêle	+		++	+		-
Colon	+		++	+		
Foie	+	+		-	-	-
Pancréas	-		+	-		+
Reins	+	+	+	+	+	+
Testicules	+	+	+	+	++	+
Ovaires	+	+	+	+	+	
Placenta	++		++			+++
Glande mammaire	+			++		
Muscle squelettique	++	++	+	+	+	-
Tissu adipeux	++			+		

**Tableau 1 : distribution tissulaire de l'expression en ARNm de l'apeline et du récepteur APJ chez le rat, la souris et l'Homme.** Adapté d'après (Klein et al. 2005).

## **B. L'apeline**

### **1. *Découverte de l'apeline***

En 1998, le ligand endogène du récepteur APJ a été découvert par Tatemoto et ses collaborateurs (Tatemoto, Hosoya et al. 1998). Ce ligand a été isolé à partir d'extraits d'estomac bovin et criblé par sa capacité à acidifier le milieu extracellulaire de cellules CHO transfectées avec le récepteur APJ, témoignant d'une interaction ligand/récepteur. Après purification, l'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de la séquence N-terminale de ce peptide. Puis l'étude de banques génomiques a montré qu'il existait une homologie de séquence codante pour une préproprotéine de 77 acides aminés chez l'Homme, le rat et le bovin (Lee, Cheng et al. 2000). Ce peptide a été nommé apelin pour « *APJ endogenous ligand* ». Le gène codant pour la préproapeline est localisé sur le chromosome X dans le génome humain et ce prépropeptide possède une homologie de séquence de 82% avec le rat (Carpene, Dray et al. 2007).

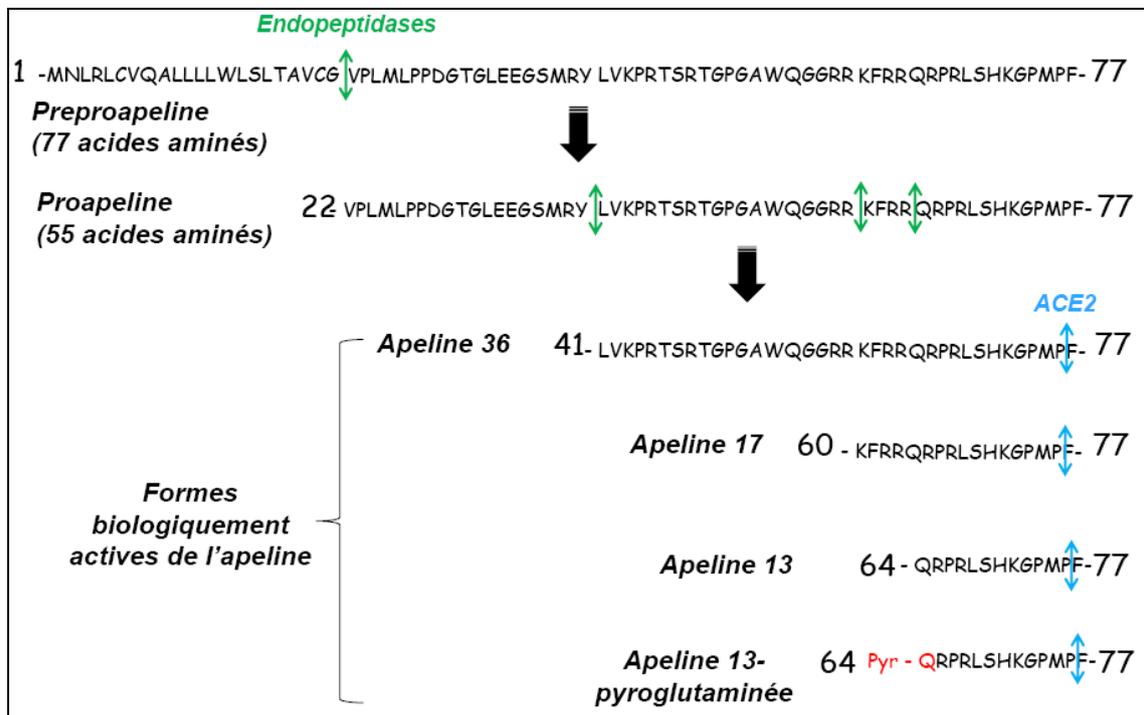
### **2. *Les différentes formes d'apeline***

La préproapeline possède des paires d'acides aminés basiques (Arg-Arg ou Arg-Lys) correspondant à des sites possibles de clivage par des endopeptidases (Habata, Fujii et al. 1999). Le premier site de clivage identifié se situe au niveau du 22<sup>ème</sup> acide aminé N-terminal et le clivage par des endopeptidases entraîne la libération de la proapeline de 55 acides aminés. Les 22 acides aminés N-terminaux semblent constituer une séquence signal pour la sécrétion du peptide (Habata, Fujii et al. 1999).

La proapeline est clivée à son tour au niveau d'autres sites riches en arginine et lysine ce qui produit différentes formes d'apeline : l'apeline 36, 17 et 13 correspondant respectivement aux 36, 17 et 13 acides aminés C-terminaux. De plus, l'apeline 13 peut être modifiée post-traductionnellement par la transformation de la glutamine en position N-terminale en pyroglutamine, formant l'apeline 13-pyroglutaminée (apeline 13-pyr) ; ceci permet de stabiliser l'apeline et de la protéger des dégradations par les peptidases (Van Coillie, Proost et al. 1998). Ces différentes formes d'apeline, déjà mises en évidence par Tatemoto lors de la découverte de l'apeline, sont toutes des agonistes du récepteur APJ (Tatemoto, Hosoya et al. 1998). L'extrémité C-terminale est très conservée dans plusieurs

espèces animales (rat, souris, bœuf, Homme) et notamment les 17 derniers acides aminés carboxy-terminaux qui sont identiques chez ces espèces.

Il a été montré que la préproapeline peut s'associer en dimères stabilisés par des ponts disulfures dans le cœur chez la souris (Lee, Saldivia et al. 2005). Cependant, l'absence de cystéines sur les fragments matures de l'apeline suggère que ce peptide est présent sous forme monomérique.



**Figure 23 : Maturation de l'apeline**

La préproapeline (77 acides aminés) est clivée en proapeline par des endopeptidase au niveau de sites riches en acides-aminoés basiques (flèche verte). La proapeline (55 acides aminés) est ensuite clivée en différentes formes d'apeline biologiquement actives : l'apeline 36, l'apeline 17 et l'apeline 13. L'apeline 13 peut être modifiée post-traductionnellement par la transformation de la glutamine en position N-terminale en pyroglutamine (apeline 13-pyroglutaminée : notée en rouge sur le schéma). Enfin, les différentes formes actives d'apeline peuvent être inactivées par le clivage de la phénylalanine C-terminale par l'ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*).

Les différentes isoformes décrites sont présentes *in vivo* mais peuvent être présentes en différentes quantités selon les tissus. En effet, Kawamata a montré que l'apeline 36 est plutôt retrouvée au niveau des poumons, des testicules et de l'utérus (Kawamata, Habata et al. 2001) alors que l'apeline 13-pyr est la forme prédominante au niveau du cœur chez l'Homme (Maguire, Klein et al. 2009). Dans le plasma, les formes prédominantes sont l'apeline 13-pyr et l'apeline 17 (De Mota, Reaux-Le Goazigo et al. 2004; Miettinen, Magga et al. 2007; Azizi, Iturrioz et al. 2008). Le dosage des différentes formes d'apeline donne des concentrations

d'apeline très variables selon les techniques utilisées d'une étude à l'autre (dosage enzymatique ou chromatographie liquide haute performance (HPLC)) (De Mota, Reaux-Le Goazigo et al. 2004; Miettinen, Magga et al. 2007; Azizi, Iturrioz et al. 2008). Très récemment, une équipe française a mis au point une technique basée sur la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse permettant la quantification plus précise des différentes formes d'apeline (Mesmin, Dubois et al.). Cependant, alors que les formes synthétiques d'apeline sont très bien détectées par cette méthode, aucune forme d'apeline n'a pu être quantifiée dans le plasma de sujets sains. Ces résultats indiquent que les différentes formes d'apeline circulantes sont certainement présentes en faible quantité chez des sujets sains et leur quantification nécessite une amélioration des limites de détection par cette technique.

### **3. Inactivation de l'apeline**

La voie de dégradation de l'apeline n'est pas bien connue mais plusieurs études se sont intéressées au rôle de la phénylalanine C-terminale de l'apeline 13 et 36 et de son clivage par l'ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*) (Vickers, Hales et al. 2002). L'apeline 13 mutée au niveau de cette phénylalanine (substitution de la phénylalanine C-terminale par une alanine) pourrait agir comme un antagoniste en bloquant l'effet hypotenseur de l'apeline 13 chez le rat (Lee, Saldivia et al. 2005). De plus, cette apeline mutée n'a plus d'effet *in vitro* sur la lignée cellulaire CHO transfectée par le récepteur APJ de rat (De Mota, Lenkei et al. 2000). Cependant, d'autres études ont montré que le clivage ou la mutation de la phénylalanine n'inactive pas ces peptides qui peuvent toujours se lier au récepteur et être fonctionnels *in vitro* sur des lignées cellulaires exprimant le récepteur APJ humain (Fan, Zhou et al. 2003; Medhurst, Jennings et al. 2003; El Messari, Iturrioz et al. 2004). De plus, l'apeline 13-pyr ne possédant pas de phénylalanine en position C-terminale a une affinité et une activité comparables à la forme non clivée sur tissu humain *in vitro* suggérant que le clivage par ACE2 n'est pas une étape inactivatrice chez l'Homme (Maguire, Kleinz et al. 2009).

### **4. Expression de l'apeline**

Comme son récepteur, l'apeline est largement exprimée aussi bien au niveau du SNC qu'en périphérie et son profil d'expression est proche de celui d'APJ (tableau 1). En effet, chez l'Homme et le rongeur, l'ARNm de l'apeline est présent dans différentes régions du

SNC dont le cortex, la moelle épinière et l'hypophyse (Lee, Cheng et al. 2000; Medhurst, Jennings et al. 2003). Le peptide est fortement exprimé dans l'épiphysse, l'hypophyse, le noyau arqué et dans l'hypothalamus au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires (Reaux, Gallatz et al. 2002; De Mota, Reaux-Le Goazigo et al. 2004).

En périphérie, l'ARNm de l'apeline est présent dans la majorité des tissus surtout dans les poumons, la glande mammaire et le cœur (Habata, Fujii et al. 1999; O'Carroll, Selby et al. 2000; Kawamata, Habata et al. 2001; Medhurst, Jennings et al. 2003). Le même profil de distribution tissulaire a été obtenu pour le peptide (Kawamata, Habata et al. 2001). Chez l'Homme, l'ARNm de l'apeline est très exprimé dans le placenta, les poumons et les reins (Medhurst, Jennings et al. 2003). Par contre, l'apeline est plus faiblement exprimée dans le système cardiovasculaire où le peptide est présent uniquement dans les cellules endothéliales vasculaires du coeur (Kleinz and Davenport 2004).

### **C. Interaction apeline /APJ**

#### ***1. Caractéristiques de la liaison apeline/APJ***

L'apeline 13-pyr radiomarquée à l'iode a été utilisée dans plusieurs études afin de caractériser et quantifier le récepteur APJ sur des tissus humains. Sur le cœur, l'apeline se lie avec une forte affinité ( $K_D$  inférieur à 1 nM) sur une seule population de récepteurs (Katugampola, Maguire et al. 2001), mais ceci n'exclut pas l'existence de deux sous-types de récepteurs ayant la même affinité. La densité des récepteurs APJ est relativement faible dans le cœur ( $B_{max}$  de l'ordre du fmol/mg de protéines). Des études de binding sur des lignées cellulaires ont montré une meilleure affinité de l'apeline 13 par rapport à l'apeline 36 (Hosoya, Kawamata et al. 2000; Kawamata, Habata et al. 2001).

L'efficacité des différentes formes varie en fonction des systèmes expérimentaux et de l'effet étudié. L'apeline 13-pyr apparait comme un puissant inhibiteur de l'adenylyl cyclase *in vitro* et est plus efficace que l'apeline 36 (l' $EC_{50}$  de l'apeline 13-pyr étant en moyenne quatre fois plus faible que celui de l'apeline 36) (Tatemoto, Hosoya et al. 1998; Habata, Fujii et al. 1999; Kawamata, Habata et al. 2001; Medhurst, Jennings et al. 2003). Par contre, l'apeline 13-pyr et l'apeline 36 ont la même efficacité sur le tonus vasculaire et la contractilité cardiaque sur des tissus humains *in vitro* (Maguire, Kleinz et al. 2009).

Dans l'ensemble, l'affinité mais aussi l'efficacité de l'apeline sont inversement proportionnelles à la taille du peptide (Hosoya, Kawamata et al. 2000). Enfin, après la liaison de l'apeline sur son récepteur celui-ci est rapidement internalisé (De Mota, Lenkei et al. 2000).

## 2. Voies de signalisation

La recherche des rôles du système apeline/APJ a permis de mettre en évidence les différentes voies de signalisation mises en jeu. L'activation du récepteur APJ par l'apeline entraîne une diminution de la production d'AMPC induite par la forskoline sur des cellules CHO surexprimant APJ suggérant que ce récepteur est couplé à des protéines G inhibitrices ( $G_i$ ) (Habata, Fujii et al. 1999). Ceci a été confirmé par l'inhibition de l'action de l'apeline par la toxine pertussique, un inhibiteur spécifique des protéines  $G_{i/o}$  (Hosoya, Kawamata et al. 2000; Masri, Lahlou et al. 2002). Puis, Masri et ses collaborateurs ont montré sur des cellules CHO surexprimant APJ, que l'apeline 13 active la protéine kinase ERK (*Extracellular Regulatory Kinase*) via la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_i$  et l'activation de PKC atypique ( $\zeta$  ou  $\lambda$ ) mais de manière indépendante de Ras (Masri, Lahlou et al. 2002). Deux ans plus tard, la même équipe a identifié un nouvel acteur moléculaire de la voie de transduction de l'apeline sur les CHO mais aussi sur des cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) exprimant APJ de manière endogène (Masri, Morin et al. 2004). En effet, ils ont pu montrer que l'apeline 13-pyr active la p70 S6 kinase (p70S6K) sur différents résidus thréonine et sérine et ceci, via la voie ERK mais aussi la voie Pi3K/PKB.

Enfin, la mise en évidence des rôles de l'apeline sur le système cardiovasculaire a permis de montrer que l'apeline active la eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) mais aussi la PLC (phospholipase C) (Tatemoto, Takayama et al. 2001; Hashimoto, Kihara et al. 2007).

## II. Les principaux rôles du système apeline/APJ

Plusieurs rôles de l'apeline ont été identifiés notamment au niveau du système cardiovasculaire où l'apeline favorise la vasodilatation des vaisseaux et augmente la force de contraction du cœur (effet inotrope positif). De plus, l'apeline a des effets au niveau du système nerveux central puisqu'elle est impliquée dans la régulation de l'homéostasie

hydrique et la prise alimentaire. Plus récemment, de nouveaux effets de l'apeline au niveau du tractus gastrointestinal ont été mis en évidence.

## **A. Rôle de l'apeline dans le système cardiovasculaire**

### ***1. Effet vasculaire de l'apeline***

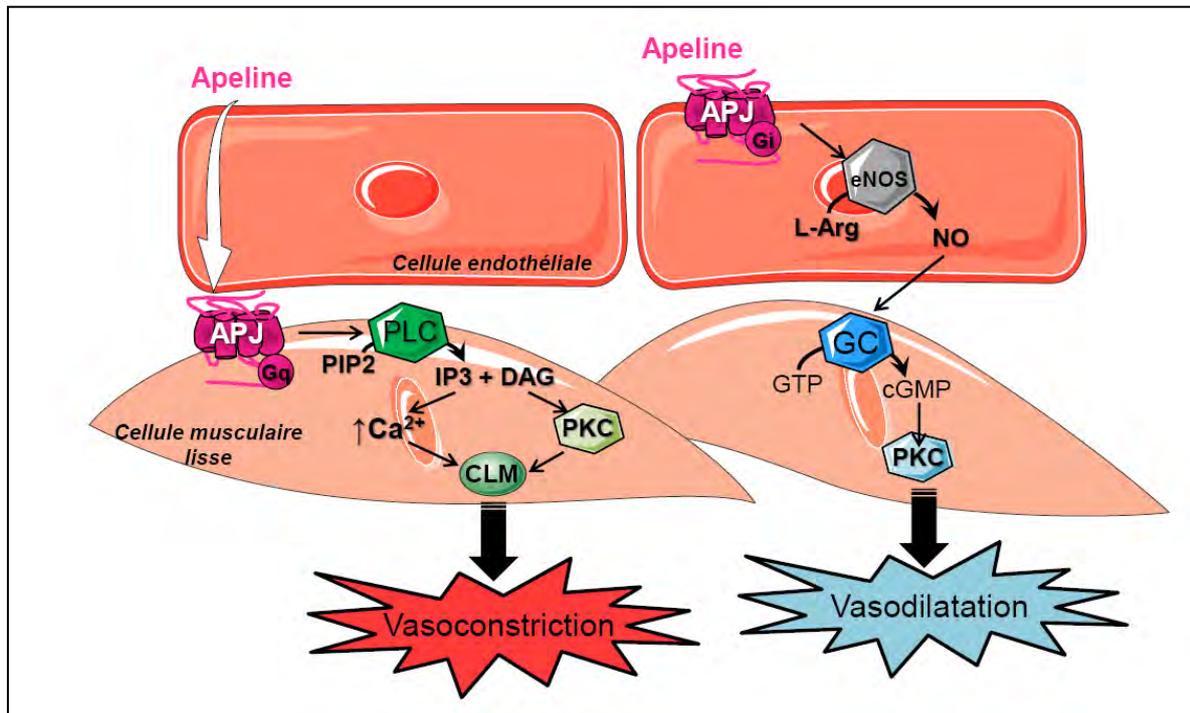
#### ***a) Effets vasculaires de l'apeline en conditions physiologiques***

##### **➤ Effet sur le tonus vasculaire**

En 2000, Lee et ses collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois un effet de l'apeline sur le tonus vasculaire. En effet, une injection d'apeline 13 par voie intraveineuse (iv) diminue rapidement les pressions diastoliques et systoliques chez le rat anesthésié (Lee, Cheng et al. 2000). Ces résultats ont par la suite été confirmés et ont mis en évidence une meilleure capacité de l'apeline 13 à diminuer la pression artérielle moyenne par rapport à l'apeline 36 (Tatemoto, Takayama et al. 2001). De plus, chez des souris transgéniques invalidées pour APJ, l'effet hypotenseur de l'apeline et la phosphorylation de la eNOS sont supprimés. En revanche, la PAM n'est pas différente de souris sauvages mais les souris APJ-/- ont une réponse à l'angiotensine II augmentée (Ishida, Hashimoto et al. 2004).

Ces effets hypotenseurs sont dus à la synthèse et la libération de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales *via* l'activation de la NO-synthase endothéliale (eNOS) par l'apeline (Tatemoto, Takayama et al. 2001) (figure 23). Le NO produit peut alors diffuser et provoquer la relaxation des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire par l'activation de la guanylyl cyclase soluble permettant la production de GMP cyclique ; il y a alors vasodilatation (Tatemoto, Takayama et al. 2001; Ishida, Hashimoto et al. 2004). Cependant l'apeline peut aussi provoquer une vasoconstriction *via* un effet direct sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Kleinz and Davenport 2005). En effet, le récepteur APJ est présent sur ces cellules et son activation par l'apeline permet de phosphoryler les chaînes de myosine, acteurs essentiels de la contraction musculaire (Hashimoto, Kihara et al. 2006). Ceci implique l'augmentation des taux intracellulaires de  $Ca^{2+}$  ainsi que l'activation de la PKC *via* la PLC. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* puisqu'une injection iv ou intracérébroventriculaire (icv) entraîne une augmentation de la pression artérielle moyenne

(Kagiyama, Fukuhara et al. 2005). Malgré cet effet, l'effet vasodilatateur est prépondérant (Japp and Newby 2008).



### Figure 24 : Effet de l'apeline sur le tonus vasculaire

L'apeline entraîne la libération de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales *via* l'activation de la NO-synthase endothéliale (eNOS). Le NO active la guanylyl cyclase (GC) dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire ce qui entraîne leur relaxation *via* la production de GMP cyclique (GMPc). Cependant l'apeline peut aussi provoquer une vasoconstriction *via* un effet direct sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux. En effet, l'apeline permet de phosphoryler les chaînes de myosine, acteurs essentiels de la contraction musculaire l'augmentation des taux intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> ainsi que l'activation de la PKC *via* la PLC.

Chez l'Homme, l'apeline augmente la constriction de la veine saphène dépourvue de cellules endothéliales *ex vivo* mais provoque la dilatation des artères hépatiques et mésentériques possédant elles, des cellules endothéliales. Ceci confirme bien que l'effet vasodilatateur implique la présence de cellules endothéliales. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la eNOS sur des artères hépatiques ne réprime pas entièrement l'effet vasodilatateur induit par l'apeline, suggérant l'implication d'un autre acteur moléculaire (Japp and Newby 2008). Enfin, la première étude *in vivo* a pu être réalisée chez l'Homme en 2008 (Japp, Cruden et al. 2008). En effet, l'injection d'apeline 13-pyr ou d'apeline 36 dans la veine dorsale de la main chez des sujets sains ne semble pas modifier le tonus veineux mais induit une vasodilatation artérielle dépendante du NO.

➤ **Effet angiogénique**

L'apeline est aussi un puissant facteur angiogénique (Kasai, Shintani et al. 2004; Cox, D'Agostino et al. 2006) et un activateur de la prolifération cellulaire (cellules endothéliales et cellules des muscle lisses), un mécanisme indispensable dans les processus d'angiogénèse (Kasai, Shintani et al. 2004; Masri, Morin et al. 2004; Li, Li et al. 2008) (Kasai 2004 ; Masri 2004 ; Li 2008). En effet, Kasai et ses collaborateurs ont montré en 2004 que l'apeline 13 augmente la prolifération et la migration de cellules rétinienne (RF/6A). Ces résultats ont par la suite été retrouvés sur des cellules endothéliales HUVEC ainsi que sur une lignée de cellules endothéliales issues de la microvasculature de cerveau de souris (bEnd.3) (Masri, Morin et al. 2004; Cox, D'Agostino et al. 2006). Comme nous l'avons décrit précédemment, Masri et ses collaborateurs ont montré que l'apeline stimule la voie ERK impliquée dans la prolifération cellulaire. Ainsi, l'apeline active ERK et augmente la prolifération des cellules endothéliales HUVEC (Masri, Morin et al. 2004).

Les phénomènes permettant de contrôler le système apeline/APJ au cours de l'angiogénèse ont été peu décrits mais plusieurs études se sont intéressées à l'hypoxie (faible apport en oxygène pour les cellules). En effet, en condition d'hypoxie, les cellules peuvent percevoir le manque d'oxygène et sécréter différentes molécules impliquées dans l'angiogénèse. Ainsi, l'hypoxie est capable, *via* l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia Inductible Factor-1 $\alpha$* ), d'augmenter la synthèse d'apeline au niveau des adipocytes en culture (Glassford, Yue et al. 2007), des cardiomyocytes (Ronkainen, Ronkainen et al. 2007) et des entérocytes (Han, Wang et al. 2008). Puis, le rôle majeur de l'hypoxie dans la régulation de la synthèse d'apeline au cours de l'angiogénèse a été confirmé. En effet, l'inactivation de HIF-1 $\alpha$  dans des cellules endothéliales en culture entraîne une perte de l'augmentation de la synthèse d'apeline en réponse à l'hypoxie (Eyries, Siegfried et al. 2008).

b) Effets vasculaires de l'apeline en conditions physiopathologiques

➤ **Dysfonction endothéliale et hypertension**

L'apeline permet de reverser la dysfonction endothéliale associée au DT2 sur des anneaux d'aorte isolés de souris *db/db* obèses et diabétiques (Zhong, Huang et al. 2007). En effet, l'apeline diminue l'effet vasoconstricteur dû à une augmentation de la réponse à l'angiotensine et augmente la réponse vasodilatatrice réduite en réponse à l'acétylcholine.

Chez des rats spontanément hypertendus, la diminution de l'hypertension par l'exercice physique régulier (Zhang, Ren et al. 2006) ou le traitement par l'acide trans rétinoïque (Zhong, Yu et al. 2007), est associée à une augmentation de l'expression de l'apeline et de son récepteur dans le cœur et l'aorte. De plus, l'apeline inhibe les effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II sur des anneaux de veine porte isolée de rat, et ceci *via* un effet dépendant du NO (Gurzu, Petrescu et al. 2006).

#### ➤ **Athérosclérose**

De plus, dans un modèle d'athérosclérose chez la souris (ApoE -/-), une infusion d'apeline permet de diminuer l'athérogénèse et contrecarre les effets néfastes de l'angiotensine II (accélération de l'athérosclérose) (Chun, Ali et al. 2008). Cependant, dans ce même modèle d'athérosclérose, l'inactivation de l'APJ réduit la formation de lésions associées à l'athérosclérose, suggérant alors une implication du système apelinergique dans la progression de cette pathologie (Hashimoto, Kihara et al. 2007). Les résultats opposés obtenus dans ces 2 études sont difficiles à expliquer, mais les différences pourraient être en partie dues à l'utilisation de régimes alimentaires différents. De plus, l'apelinémie est diminuée chez des patients atteints de dyslipidémie (Tasci, Dogru et al. 2007) alors que le traitement de cette pathologie par des statines (diminution du LDL-cholestérol) augmente les taux plasmatiques d'apeline (Tasci, Erdem et al. 2009).

Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour savoir si le système apeline/APJ est anti-athérogène et quelle est son implication dans les dyslipidémies.

#### ➤ **Angiogénèse tumorale et angiogénèse du tissu adipeux**

La tumorigénèse est un phénomène physiopathologique au cours duquel l'angiogénèse est un phénomène très important. Plusieurs équipes se sont alors intéressées au rôle joué par l'apeline dans la tumorigénèse. En effet, l'expression de l'apeline et de son récepteur est augmentée au niveau des vaisseaux du cerveau chez des patients atteints de tumeurs cérébrales (Kalin, Kretz et al. 2007). Puis, une autre équipe a mis en évidence l'implication de l'apeline dans la croissance tumorale à l'aide de cellules de tumeurs mammaires surexprimant ce peptide. La greffe de ces cellules chez la souris entraîne une augmentation de la quantité de vaisseaux entourant la tumeur montrant ainsi le rôle de l'apeline dans l'angiogénèse tumorale (Sorli, Le Gonidec et al. 2007).

Des résultats obtenus dans l'équipe, par O. Kunduzova, ont montré que l'apeline augmente l'angiogénèse dans le tissu adipeux, ceci pouvant avoir un impact dans le développement anormal de la masse grasse lors de l'obésité (Kunduzova, Alet et al. 2008).

Ainsi, l'inhibition des effets pro-angiogéniques de l'apeline apparaît comme une stratégie thérapeutique d'intérêt visant à limiter le développement tumoral. L'élaboration d'antagonistes du récepteur APJ pourrait par exemple permettre de maîtriser la croissance tumorale mais aussi le développement du tissu adipeux au cours de l'obésité.

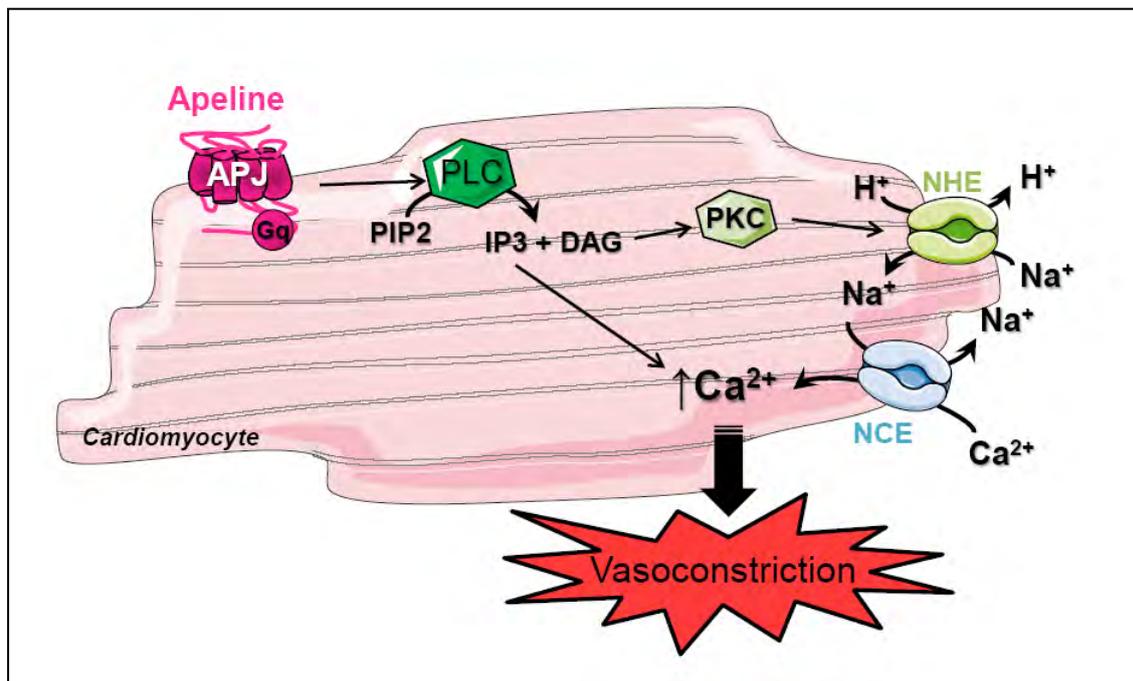
## **2. Effet cardiaque de l'apeline**

### ***a) Apeline et physiologie cardiaque***

En 2002, l'apeline est apparue comme un des plus puissants agents inotrope positif. En effet, Szokodi et ses collaborateurs ont montré que l'apeline augmente la contractilité cardiaque *in vitro* et *in vivo* chez le rat (Szokodi, Tavi et al. 2002). De faibles doses d'apeline augmentent la contractilité de cœur isolé et perfusé *ex vivo* (Szokodi, Tavi et al. 2002) et permettent le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction cardiaque (Farkasfalvi, Stagg et al. 2007). De plus, un traitement aigu par l'apeline entraîne une augmentation de la contractilité cardiaque et cet effet s'accompagne d'une augmentation du débit cardiaque sans hypertrophie du ventricule gauche lors d'un traitement de 14 jours chez la souris normale (Ashley, Powers et al. 2005).

Cet effet inotrope positif est spécifique de l'apeline puisqu'en présence d'antagonistes de l'angiotensine, de l'endothéline, des catécholamines ou d'inhibiteurs de la eNOS, l'effet de l'apeline persiste (Szokodi, Tavi et al. 2002). Cette même étude a également mis en évidence l'implication de la PLC (phospholipase C) et de la PKC dans cet effet ainsi que les cotransporteurs sodium/proton (NHE) et sodium/calcium (NCX) (figure 24). En effet, il a été proposé que l'apeline stimule la PLC produisant alors d'une part du diacylglycérol qui active la PKC, permettant l'entrée de calcium dans la cellule *via* l'activation successive de NHE et NCX et d'autre part de l'inositol tri phosphate (IP3) permettant la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Ainsi, l'apeline permet d'augmenter les taux intracellulaires de calcium ainsi que le pH intracellulaire ce qui stimule la contraction du cœur (Japp revue 2008). Il est important de remarquer que l'apeline stimule la PLC qui est une voie dépendante

de l'activation des protéines Gq. Le récepteur APJ serait donc couplé aux protéines Gi mais aussi Gq.



### Figure 25 : Effet de l'apeline sur la contraction cardiaque

L'apeline active la PLC (phospholipase C) ce qui entraîne la formation d'IP3 (inositol tri phosphate) et de DAG (diacylglycérol). Celui-ci active la PKC permettant de stimuler les cotransporteurs sodium/proton (NHE) et sodium/calcium (NCE) conduisant à une augmentation du calcium intracellulaire et une diminution du pH. D'autre part l'IP3 permet la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Ainsi, l'apeline permet d'augmenter les taux intracellulaires de calcium ce qui stimule la contraction du cœur.

L'étude de souris invalidées pour l'apeline ou APJ a confirmé l'implication de ce système dans la physiopathologie cardiaque. En effet, des cardiomyocytes issus du ventricule de ces souris présentent une altération des sarcomères (structure permettant la contraction musculaire) ce qui diminue la contractilité (Charo, Ho et al. 2009).

Les souris invalidées pour l'apeline présentent une morphologie et une fonction cardiaque basale normale mais une diminution de la capacité d'exercice physique (évaluée par la consommation maximale d'O<sub>2</sub>). A partir de l'âge de 6 mois, elles développent progressivement une diminution de la contractilité cardiaque et une hypertrophie du ventricule gauche en fin de systole. De plus, ces souris développent une insuffisance cardiaque sévère après une surcharge en pression par rapport aux souris sauvages (Kuba, Zhang et al. 2007).

#### b) Apeline et pathologies cardiaques

➤ **Régulation de l'expression du système apeline/APJ et des taux plasmatiques d'apeline**

Dans un modèle d'hypertrophie cardiaque chez le rat, le système apeline/APJ est augmenté ou maintenu mais il diminue fortement lors de l'apparition de l'insuffisance cardiaque (Iwanaga, Kihara et al. 2006). Chez l'Homme, l'expression d'APJ au niveau du cœur est diminuée chez des patients insuffisants cardiaques à la suite d'une cardiomyopathie dilatée alors que l'expression d'APJ est maintenue lorsque l'insuffisance cardiaque est d'origine ischémique (Foldes, Horkay et al. 2003). Ceci est sans doute dû à l'induction de l'expression d'APJ en réponse à une hypoxie locale (Ronkainen, Ronkainen et al. 2007).

De plus, chez l'Homme, les taux d'apeline plasmatique sont augmentés dans les stades précoces de l'insuffisance cardiaque (hypertrophie du ventricule gauche) (Chen, Ashley et al. 2003) mais sont diminués dans les stades plus tardifs de la pathologie (Chen, Ashley et al. 2003; Chong, Gardner et al. 2006; Miettinen, Magga et al. 2007).

Des traitements tels que la resynchronisation chronique (Francia, Salvati et al. 2007) ou la pose d'un dispositif d'assistance du ventricule gauche (Chen, Ashley et al. 2003) chez des patients insuffisants cardiaques entraîne une augmentation des taux circulants d'apeline. Ainsi, l'amélioration de la fonction cardiaque s'accompagne d'une augmentation de l'apelinémie.

➤ **Effet bénéfique d'un traitement à l'apeline**

Dans un modèle d'insuffisance cardiaque induit par l'isoprotérenol chez le rat, la dysfonction du ventricule gauche est réversée par l'administration d'apeline (Jia, Pan et al. 2006). De plus, chez le rat atteint d'infarctus du myocarde et de cardiomyopathie provoquée par la ligature des artères coronaires, une injection d'apeline augmente la contraction cardiaque malgré la diminution de l'expression de son récepteur (Chandrasekaran, Dar et al. 2008). *Ex vivo*, l'apeline stimule aussi la contraction cardiaque en augmentant de 36% l'afflux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  sur des cœurs de rats rendus insuffisants cardiaques par une exposition de 16 semaines à l'hypoxie (Dai, Ramirez-Correa et al. 2006). De plus, lors de l'infarctus du myocarde, le système apeline/APJ est augmenté et permettrait d'améliorer le flux sanguin coronaire et la contractilité. Ceci permet de réduire la taille de l'infarctus et met donc en évidence un rôle cardioprotecteur de l'apeline (Simpkin, Yellon et al. 2007).

Cette année l'équipe de Newby a pu montrer que injection d'apeline 13-pyr ou d'apeline 36 entraîne une vasodilatation périphérique et coronaire et augmente le débit cardiaque chez des

sujets sains mais aussi chez des patients présentant une insuffisance cardiaque (Japp, Cruden et al.).

L'ensemble de ces données montre que l'apeline augmente la contractilité cardiaque sans entraîner d'hypertrophie du ventricule gauche en condition physiologique mais aussi lors de l'insuffisance cardiaque. L'apeline apparaît ainsi comme une cible thérapeutique d'intérêt chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque.

## **B. Rôles de l'apeline au niveau du système nerveux central**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'apeline et son récepteur sont présents au niveau du NSO et du NPV de l'hypothalamus. L'équipe de C. Llorens-Cortès a mis en évidence en 2001 que le récepteur APJ était co-localisé avec les récepteurs de la vasopressine (V1a et V1b) (Reaux, De Mota et al. 2001). De plus, cette même équipe a montré la co-localisation de l'apeline et d'APJ avec la vasopressine sur les neurones magnocellulaires du NSO et du NPV (De Mota, Reaux-Le Goazigo et al. 2004; Reaux-Le Goazigo, Morinville et al. 2004). Ainsi, ces deux noyaux hypothalamiques étant impliqués dans la régulation de l'équilibre hydrique et de la prise alimentaire, un rôle du système apeline/APJ dans ces deux fonctions a été envisagé.

### ***1. Régulation de l'équilibre hydrique***

Lors d'une diminution de la volémie ou d'une modification de l'osmolarité plasmatique, différentes structures cérébrales sont activées et transmettent des signaux vers le NSO et le NPV, deux noyaux hypothalamiques capables de synthétiser la vasopressine (ou ADH pour *Anti-Diuretic Hormone*) qui est libérée par l'hypophyse postérieure. Cette hormone agit au niveau rénal où elle se lie sur les récepteurs V2 situés sur les tubules du tube collecteur. La liaison de la vasopressine sur ses récepteurs entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc conduisant à la translocation à la membrane plasmique, de canaux hydriques, les aquaporines. Ceci permet alors une réabsorption de l'eau vers l'interstitium rénal.

La co-localisation vasopressine/apeline au niveau des neurones magnocellulaires et l'association des deux récepteurs au niveau des mêmes cellules a conduit l'équipe de C. Llorens-Cortès à étudier le rôle de l'apeline sur la libération de vasopressine. Ainsi, ils ont pu observer qu'une injection icv d'apeline 13-pyr provoque une diminution des taux plasmatiques de vasopressine chez des souris privées d'eau pendant 24 h. De même, une injection icv d'apeline 17 permet de limiter l'augmentation de vasopressine induite par la privation d'eau pendant 48 h (Reaux, De Mota et al. 2001).

La déshydratation entraîne également une augmentation de l'expression de l'apeline (Reaux-Le Goazigo, Morinville et al. 2004) et de son récepteur (O'Carroll and Lolait 2003) et diminue l'expression de la vasopressine dans les noyaux magnocellulaires de rat (Reaux-Le Goazigo, Morinville et al. 2004). Un stress osmotique entraîne des effets opposés sur l'apeline et la vasopressine plasmatiques chez l'Homme. En effet, une augmentation de l'osmolarité plasmatique ou une déprivation en eau pendant 24 h augmentent les taux plasmatiques de vasopressine tout en diminuant ceux d'apeline et inversement (De Mota, Reaux-Le Goazigo et al. 2004; Azizi, Iturrioz et al. 2008). De plus, l'apeline diminue l'activité des neurones vasopressinergiques du NSO ce qui diminue les taux de vasopressine et augmente la diurèse (De Mota, Reaux-Le Goazigo et al. 2004). Alors que l'effet de l'apeline sur la diurèse a été bien caractérisé, le rôle de l'apeline dans la prise hydrique n'est pas clair. En effet, Reaux et ses collaborateurs ont montré chez des rats privés d'eau pendant 24 h qu'une injection d'apeline 13-pyr entraîne une nette diminution de la prise hydrique (Reaux, De Mota et al. 2001). Cependant, deux autres équipes ont montré que l'apeline provoque une augmentation de la prise hydrique dépendante de la dose injectée (Lee, Cheng et al. 2000; Taheri, Murphy et al. 2002). Enfin, d'autres travaux ne trouvent aucun effet de l'apeline sur la prise hydrique (Mitra, Katovich et al. 2006). Les auteurs expliquent ces différences par le choix des animaux, leur statut hydrique ou encore la précision de la zone du cerveau où l'apeline est injectée.

En plus de ces effets centraux, l'apeline agit également au niveau de la microvasculature rénale (Hus-Citharel, Bouby et al. 2008). Il a été montré que les souris invalidées pour le récepteur APJ présentent une perturbation de l'homéostasie des fluides (Roberts, Newson et al. 2009) et une réponse au stress hydrique altérée (Roberts, Pope et al.). En effet, ces souris ont une prise hydrique diminuée et ne peuvent pas diminuer la diurèse et concentrer leur urine de la même manière que les souris sauvages en réponse à une déprivation en eau de 24 h (Roberts, Newson et al. 2009).

## 2. Régulation de la prise alimentaire

Comme pour la prise hydrique, les travaux concernant la prise alimentaire sont assez controversés. En 2002, Taheri et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'injection icv de différentes doses d'apeline 13 (3, 10 et 30 nmol d'apeline) et ils ont mesuré la prise alimentaire pendant 24 h chez le rat à jeun ou nourri pendant la nuit (correspondant à la période alimentaire chez les rongeurs). L'injection icv de 30 nmol d'apeline augmente la prise alimentaire entre 2 et 4 heures après l'administration du peptide chez le rat à jeun mais n'a pas d'effet à l'état nourri (Taheri, Murphy et al. 2002). De plus, une administration chronique en icv d'apeline pendant 10 jours (1µg/jour) augmente de 15% la prise alimentaire à partir du 4<sup>ème</sup> jour de traitement et ceci s'accompagne d'une augmentation du poids corporel (Valle, Hoggard et al. 2008).

A l'opposé, d'autres études ont montré qu'une injection centrale d'apeline provoquait une diminution de la prise alimentaire (O'Shea, Hansen et al. 2003; Sunter, Hewson et al. 2003; Clarke, Whitaker et al. 2009). En effet, lors de l'administration icv d'apeline 13, chez le rat, une réduction de 10% de la prise alimentaire a pu être observée entre 2 et 4 heures après l'administration du peptide (O'Shea, Hansen et al. 2003). Cet effet est toujours observé 24 heures après l'injection à l'état nourri mais aussi après 24 heures de jeûne (Sunter, Hewson et al. 2003). De plus, les auteurs ont également étudié l'effet de l'apeline injectée par voie iv et ils n'ont pas observé de différence significative de la prise alimentaire 24 heures après l'injection à l'état nourri ou à jeun. De même, un traitement de 14 jours à l'apeline injectée par voie intrapéritonéale (ip) n'entraîne pas de modification de la prise alimentaire, malgré une augmentation de la concentration du peptide dans l'hypothalamus (Higuchi, Masaki et al. 2007). Enfin, plus récemment, une étude a montré que l'apeline 13 diminue la prise alimentaire chez des rats nourris en régime normal mais n'a plus d'effet chez des animaux mis en régime gras (Clarke, Whitaker et al. 2009). Cet effet pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression d'APJ au niveau du SNC chez les rats en régime gras traités par l'apeline.

L'ensemble de ces travaux montre que l'apeline est bien impliquée dans la régulation de la prise alimentaire mais les discordances entre les différentes études ne nous permettent pas encore de conclure quant à un effet orexigène ou anorexigène de l'apeline.

### **C. Rôle de l'apeline dans le système gastro-intestinal**

L'apeline a été impliquée non seulement dans la physiologie gastrointestinale mais aussi dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Han, Wang et al. 2007) et dans la cirrhose hépatique (Principe, Melgar-Lesmes et al. 2008).

L'apeline est exprimée au niveau de la muqueuse de l'estomac suggérant qu'elle pourrait être produite par différents types cellulaires de cette muqueuse (Wang, Anini et al. 2004). De plus, l'activation d'APJ stimule la prolifération de cellules épithéliales gastriques et active la production de cholecystokinine (CCK) par des cellules entéroendocrines murines *in vitro* (Wang, Anini et al. 2004). La production d'apeline est augmentée dans les MICI chez le rongeur et chez l'Homme ce qui pourrait contribuer à la réparation de l'épithélium intestinal par son effet sur la prolifération cellulaire (Han, Wang et al. 2007).

Le système apelinergique a également été impliqué dans la cirrhose hépatique puisque l'expression de l'apeline et d'APJ sont augmentés dans un modèle de fibrose chez le rat et le traitement chronique par un antagoniste du récepteur APJ entraîne une diminution de la fibrose (25%) et de l'angiogénèse (40%) hépatiques (Principe, Melgar-Lesmes et al. 2008).

La découverte de l'implication de l'apeline au niveau du tractus digestif est récente et des études sont nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de l'apeline dans les pathologies gastrointestinales.

## **III. Régulation du système apeline/APJ au cours de l'obésité et du diabète**

### **A. Régulation de l'apeline adipocytaire**

#### ***1. Effet de l'insuline***

En 2005, l'apeline a été identifiée par notre équipe comme étant une nouvelle adipokine puisqu'elle est exprimée et sécrétée par l'adipocyte chez l'Homme et la souris (Boucher, Masri et al. 2005). De plus, l'apeline est augmentée parallèlement à la différenciation adipocytaire dans la lignée 3T3-F442A et il existe une forte régulation de l'expression et de la sécrétion de l'apeline adipocytaire par l'insuline, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Boucher, Masri et al. 2005). En effet, l'apeline adipocytaire est augmentée dans différents modèles

murins d'obésité associés à une hyperinsulinémie. Lors de la mise à jeun et après la réalimentation des souris, le profil d'expression de l'apeline dans l'adipocyte est superposable à celui des taux plasmatiques d'insuline. De même, dans un modèle murin de diabète de type 1 (absence d'insuline par un traitement par la streptozotocine), une baisse de l'expression de l'apeline adipocytaire est observée. Sur des cultures d'adipocytes de la lignée murine 3T3-F442A, le traitement par l'insuline a pour conséquence une augmentation des ARNm et de la sécrétion d'apeline. Enfin, chez l'Homme, l'insuline augmente également l'expression de l'apeline sur des cultures primaires d'adipocytes humains, mais aussi *in vivo* après un clamp hyperinsulinémique euglycémique (Dray, Debard et al.).

## 2. Autres régulateurs

**Le TNF $\alpha$**  – Dans un contexte d'obésité l'apeline adipocytaire et plasmatique est augmentée et dans un contexte de résistance à l'insuline, le TNF $\alpha$  joue un rôle important au niveau du tissu adipeux. Ainsi, notre équipe s'est intéressée à l'effet du TNF $\alpha$  sur l'expression et la sécrétion de l'apeline par les adipocytes *in vivo* et *in vitro* (Daviaud, Boucher et al. 2006). Une injection de TNF $\alpha$  chez la souris augmente l'expression adipocytaire d'apeline d'un facteur 3 et ceci s'accompagne d'une augmentation de l'apelinémie. Cet effet du TNF $\alpha$  est direct puisque les mêmes résultats ont été obtenus sur la lignée adipocytaire 3T3-F442A et la voie de signalisation impliquée met en jeu différentes kinases telles que la Pi3K, la JNK et les MAPK. De plus, cette étude a permis de montrer qu'*in vivo*, chez la souris, l'apeline augmente proportionnellement au TNF $\alpha$  lors de l'obésité. Chez l'Homme, l'expression adipocytaire de TNF $\alpha$  et d'apeline sont corrélées positivement dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral chez des individus normopondéraux mais aussi chez des sujets obèses (Daviaud, Boucher et al. 2006). Ainsi, comme l'insuline, le TNF $\alpha$  augmente l'expression et la sécrétion d'apeline ce qui peut paraître surprenant étant donné que le TNF $\alpha$  inhibe la voie de transduction de l'insuline. Cependant, au cours de l'insulino-résistance induite par l'obésité et avec la mise en place d'un état inflammatoire au sein du tissu adipeux, le TNF $\alpha$  alors sécrété pourrait prendre le relais de l'insuline pour maintenir des taux élevés d'apeline.

Il est important de remarquer que l'expression de l'apeline est augmentée dans d'autres tissus en situation inflammatoire. En effet, l'expression de l'apeline est induite par d'autres médiateurs inflammatoires comme l'IL6 et l'interféron- $\gamma$  au niveau de l'intestin

(Han, Wang et al. 2008) et les taux plasmatiques d'apeline sont corrélés avec des marqueurs de l'inflammation (CRP, PAI-1) chez des patients atteints de maladies coronariennes (Malyszko, Malyszko et al. 2008). D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre le lien entre l'apeline et l'inflammation.

**L'hypoxie** - Des études réalisées sur la lignée 3T3L1 rapportent que l'hypoxie (1% d'O<sub>2</sub>) provoque une augmentation de l'expression de l'apeline de plus de 25 fois et ceci est associé à une sécrétion multipliée par 4 dans le milieu (Glassford, Yue et al. 2007). Les auteurs de cette étude ont montré que cet effet passe par l'activation du facteur de transcription HIF. De plus, cette étude ainsi que les travaux menés par O. Kunduzova dans notre équipe ont mis en évidence que l'induction de l'expression adipocytaire de l'apeline par l'insuline est dépendante de la présence de HIF-1 $\alpha$  (Kunduzova, Alet et al. 2008).

De plus, l'hypoxie augmente également l'expression de l'apeline et d'APJ sur des cardiomyocytes de rat mis en culture (Zeng, Zhang et al. 2009).

**PGC1 $\alpha$**  - Comme nous l'avons vu précédemment, PGC1 $\alpha$  est un facteur de transcription qui interagit avec des récepteurs nucléaires, les PPAR afin d'activer l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et la biogenèse mitochondriale (Puigserver, Wu et al. 1998). Or, PGC1  $\alpha$  est principalement exprimé dans les muscles oxydatifs et le tissu adipeux brun. Cependant, sa surexpression dans le tissu adipeux blanc a permis à l'équipe de D. Langin de montrer qu'il est aussi capable de stimuler l'oxydation des AG dans ces cellules (Tiraby, Tavernier et al. 2003). De plus, en collaboration avec notre équipe, les travaux d'A. Mazzucotelli ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion d'apeline par des adipocytes en culture primaire surexprimant PGC1 $\alpha$ , mais aussi *in vivo*, lors de l'exposition au froid (4°C) de souris permettant d'augmenter l'expression de PGC1 $\alpha$  par le tissu adipeux blanc (Mazzucotelli, Ribet et al. 2008).

**La vitamine C** - Un traitement quotidien avec de fortes doses de vitamine C (750 mg/kg de poids corporel) entraîne une diminution de l'expression de l'apeline adipocytaire chez des rats obèses ainsi qu'une diminution du poids corporel (Garcia-Diaz, Campion et al. 2007). Or, l'expression adipocytaire d'apeline est diminuée lors de la perte de poids chez l'Homme (Castan-Laurell, Vitkova et al. 2008) ; ainsi, l'effet de la vitamine C pourrait être indirect, secondaire à la perte de poids.

**L'acide eicosapentanoïque (AEP)** - L'AEP est un acide gras polyinsaturé de la famille des oméga-3 ayant des effets bénéfiques dans un contexte d'obésité et d'insulino-résistance. L'AEP a la capacité de réguler la production d'adipokines telles que l'adiponectine et la leptine *in vitro* et *in vivo* (Perez-Matute, Perez-Echarri et al. 2007). Une étude récente a mis en évidence que l'AEP augmente l'expression et la sécrétion d'apeline dans la lignée adipocytaire 3T3L1. Cet effet est additif à celui de l'insuline et il semblerait que l'AEP puisse réguler la sécrétion d'apeline par des modifications post-traductionnelles (Lorente-Cebrian, Bustos et al.). Il sera important d'étudier si, *in vivo*, l'AEP a les mêmes effets qu'*in vitro* sur l'expression d'apeline, et quelle est l'implication de cette régulation dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline associée à un traitement par l'AEP chez le rat (Perez-Matute, Perez-Echarri et al. 2007).

**L'hormone de croissance (GH)** - L'expression et la sécrétion de l'apeline sont également augmentées par l'hormone de croissance sur la lignée adipocytaire 3T3-L1 et cet effet passe par la voie Pi3K/PKB (Kralisch, Lossner et al. 2007). Or, il a été montré que des patients ayant des taux excessifs de GH sont insulino-résistants (Rizza, Mandarino et al. 1982), ce qui pourrait renforcer le rôle de l'apeline dans ce contexte pathologique.

**Les glucocorticoïdes** - Wei et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'un traitement de 24 h par la dexaméthasone diminue l'expression adipocytaire d'apeline (Wei, Hou et al. 2005). Or, il a été montré que des patients présentant une obésité viscérale produisent plus de cortisol que ceux dont le tissu adipeux sous-cutané se développe principalement (obésité gynoïde) (Bjorntorp 1995). Ainsi il serait intéressant d'étudier s'il existe des différences territoriales quant à la sécrétion d'apeline entre le tissu adipeux viscéral ou sous-cutané chez des patients présentant une obésité androïde ou gynoïde.

### **B. Régulation de l'apelinémie lors de l'obésité et du DT2**

Les concentrations plasmatiques d'apeline sont augmentées chez des sujets obèses et hyperinsulinémiques (Boucher, Masri et al. 2005; Castan-Laurell, Vitkova et al. 2008) ainsi que chez des personnes souffrant d'une obésité morbide (IMC de 48kg/m<sup>2</sup>) (Heinonen, Laaksonen et al. 2009).

Plusieurs équipes ont montré une augmentation de l'apelinémie chez des sujets obèses et diabétiques (Dray, Debard et al. ; Soriguer, Garrido-Sanchez et al. 2009), mais aussi chez des patients non obèses, en surpoids, avec une intolérance au glucose ou un DT2 (Li, Yang et al. 2006). Récemment, notre équipe a aussi montré que les taux plasmatiques d'apeline sont corrélés positivement à l'insulinémie et au pourcentage d'hémoglobine glyquée (HbA1c) (Dray, Debard et al.). Cependant, deux études ont décrit qu'à l'inverse, les taux plasmatiques d'apeline sont diminués chez des sujets obèses et ayant un diabète non traité, comparativement à des sujets obèses non diabétiques (Erdem, Dogru et al. 2008; Zhang, Shen et al. 2009). Chez des femmes atteintes d'un diabète gestationnel, aucune différence significative n'a été observée comparativement à des femmes ayant une tolérance normale au glucose (Telejko, Kuzmicki et al.). Enfin, une étude de polymorphisme effectuée en Chine sur 3700 sujets (1892 DT2 et 1800 témoins) décrit une forte association entre un variant du gène de l'apeline et la glycémie à jeun (Zhang, Hu et al. 2009).

La perte de poids à la suite d'un régime hypocalorique diminue les taux d'apeline chez des femmes ayant une obésité modérée (Castan-Laurell, Vitkova et al. 2008) mais pas de façon significative chez des patients atteints de syndrome métabolique (Heinonen, Laaksonen et al. 2009). La chirurgie bariatrique entraîne une diminution significative des taux plasmatiques d'apeline uniquement chez les patients atteints d'obésité morbide qui étaient intolérants au glucose ou diabétiques avant la chirurgie (Soriguer, Garrido-Sanchez et al. 2009). Par ailleurs, les traitements anti-diabétiques, tels que la rosiglitazone ou la metformine en monothérapie améliorent la glycémie et augmentent l'apelinémie (Kadoglou, Tsanikidis et al.).

L'ensemble de ces études souligne que l'obésité en soi n'est sans doute pas le déterminant principal d'une augmentation de l'apelinémie. En effet, même si les taux plasmatiques d'apeline sont souvent corrélés à l'IMC, ils le sont aussi avec les concentrations plasmatiques en TG, glucose (Li, Yang et al. 2006), TNF $\alpha$  (Daviaud, Boucher et al. 2006) et avec l'HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) (Castan-Laurell, Vitkova et al. 2008; Soriguer, Garrido-Sanchez et al. 2009).

Ainsi, il existe un lien étroit entre l'apeline et l'insulino-résistance ou le DT2, ce qui permet d'envisager un rôle de l'apeline dans le métabolisme énergétique.

## **IV. Rôle de l'apeline dans le métabolisme énergétique**

### **A. Effet de l'apeline sur le métabolisme glucidique**

#### **1. *Effet de l'apeline sur la sécrétion pancréatique d'insuline***

En 2005, Sorhede et ses collaborateurs ont montré que l'apeline inhibe la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur des îlots de Langerhans isolés (Sorhede Winzell, Magnusson et al. 2005; Guo, Li et al. 2009). En effet, l'injection d'apeline 36 par voie intraveineuse entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline au cours d'un test de tolérance au glucose chez des souris en régime standard ou hyperlipidique. Cependant, une injection iv d'apeline 13-pyr (200 pmol/kg) trente minutes avant un test de tolérance au glucose ne modifie pas l'insulinémie (Dray, Knauf et al. 2008). Ceci suggère que l'effet de l'apeline sur la sécrétion d'insuline est dépendant de la forme d'apeline injectée et de la dose. Cet effet est direct puisque l'apeline 36 diminue la sécrétion d'insuline en réponse à une concentration élevée de glucose (16,7 mM) sur des îlots isolés de pancréas de souris. Il met en jeu une diminution des taux d'AMPc dans la cellule *via* l'activation de la PDE3B induite par la Pi3K (Guo, Li et al. 2009). De plus, une réponse biphasique a été observée puisque l'inhibition de la sécrétion d'insuline par l'apeline est maximale à la concentration de 100 nM et à plus forte concentration, l'apeline n'a plus d'effet (Sorhede Winzell, Magnusson et al. 2005; Guo, Li et al. 2009). Ceci laisse suggérer que chez des sujets obèses, l'apeline (en concentration plus élevée) n'aurait pas d'effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline.

#### **2. *Effet de l'apeline sur l'utilisation du glucose et la sensibilité à l'insuline***

##### **a) Effet de l'apeline sur le transport de glucose dans un contexte physiologique**

L'apeline administrée par voie intraveineuse diminue la glycémie chez des souris C57Bl6/J normopondérales et améliore la tolérance au glucose lors d'une hyperglycémie provoquée (Dray, Knauf et al. 2008). La dose d'apeline injectée est faible (200 pmol/kg), elle correspond à un doublement des taux plasmatiques d'apeline et n'a aucune conséquence sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque. Lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique alors que la production hépatique de glucose est complètement inhibée,

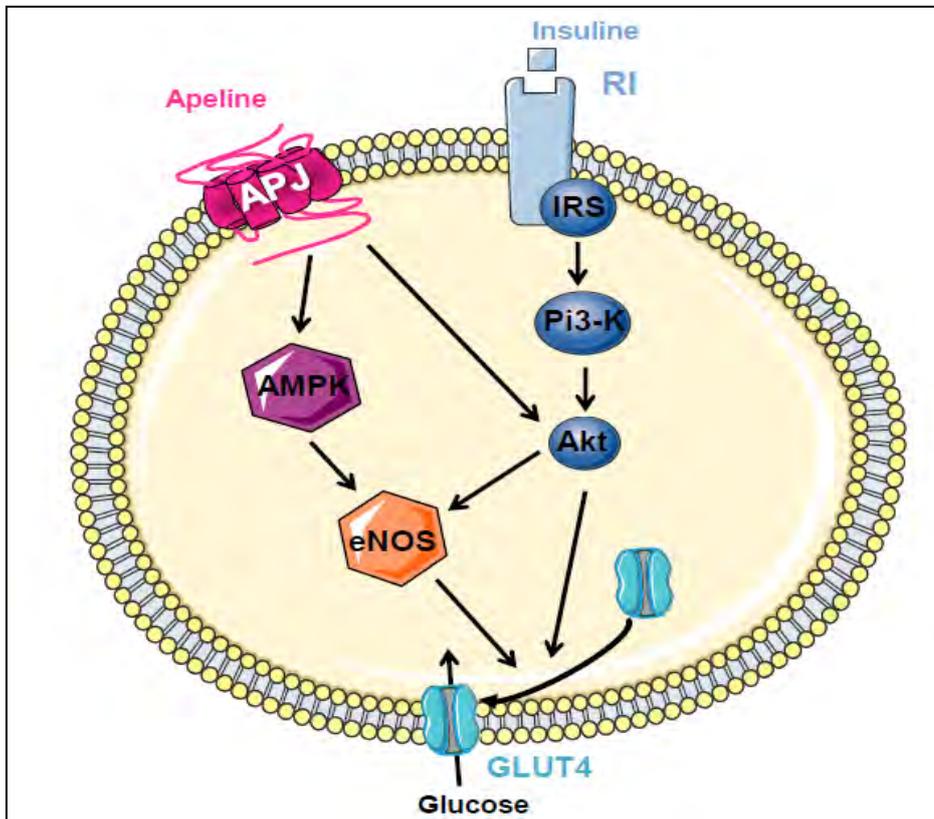
l'apeline permet d'augmenter l'utilisation du glucose à l'échelle de l'organisme entier. Ce glucose est en fait capté par les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Le foie ne semble pas être une cible directe de l'apeline car le récepteur APJ y est peu exprimé en conditions basales. Afin de vérifier qu'il s'agissait d'un effet direct de l'apeline, des études *in vitro* sur le muscle isolé, organe majeur impliqué dans l'utilisation du glucose, ont été réalisées. Les résultats obtenus ont démontré que l'apeline stimule directement le transport de glucose et son effet peut s'additionner à celui de l'insuline, suggérant l'implication d'une voie de signalisation différente de celle de l'insuline et qui pourrait impliquer l'AMPK (Dray, Knauf et al. 2008).

Des études *in vitro* sur muscle isolé ont montré que l'apeline phosphoryle l'AMPK et son activation est nécessaire pour l'effet de l'apeline sur le transport de glucose. De plus, *in vivo*, chez des souris exprimant une forme inactive de l'AMPK spécifiquement dans les muscles, la stimulation de l'utilisation du glucose par l'apeline au cours d'un clamp est supprimée dans les muscles mais reste augmentée dans le tissu adipeux où l'AMPK est active (Dray, Knauf et al. 2008). Ainsi, l'apeline phosphoryle et active l'AMPK dans le muscle squelettique ce qui permet d'augmenter le transport de glucose et contribue à une meilleure utilisation du glucose à l'échelle de l'organisme (figure 25). Plus récemment, les effets de l'apeline sur le transport de glucose, *via* l'activation de l'AMPK, ont été retrouvés sur la lignée myocytaire C2C12 (Yue, Jin et al.).

La eNOS, une autre cible moléculaire en aval de l'AMPK et pouvant intervenir dans le transport musculaire de glucose a ensuite été étudiée (Kapur, Bedard et al. 1997). Or il avait été montré que l'apeline pouvait activer la eNOS dans les cellules endothéliales (Tatemoto, Takayama et al. 2001) et c'est également le cas dans le muscle squelettique. L'étude de souris invalidées pour la eNOS a permis de mettre en évidence l'implication de la eNOS dans la stimulation du transport de glucose induit par l'apeline *in vivo* et *ex vivo* sur muscle isolé (figure 25) (Dray, Knauf et al. 2008).

Enfin, la voie intracellulaire impliquée dans la stimulation du transport de glucose rejoint finalement celle de l'insuline au niveau d'Akt qui est phosphorylé par l'apeline (figure 25).

Ainsi, ces résultats montrent que l'apeline active non seulement l'AMPK qui stimule à son tour la eNOS mais aussi Akt ; l'ensemble conduisant à une augmentation du transport de glucose dans le muscle squelettique.



**Figure 26 : Voie de signalisation de l'apeline conduisant à une augmentation du transport de glucose.**

L'apeline stimule le transport de glucose dans le muscle *via* l'activation de l'AMPK, de la eNOS et d'Akt. L'apeline pourrait activer l'AMPK qui stimulerait la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique *via* la eNOS. De plus, l'AMPK active Akt au niveau de la voie de signalisation de l'insuline permettant aussi d'augmenter l'entrée de glucose dans les cellules musculaires.

Les effets de l'apeline passent donc, au moins en partie, par une voie indépendante de celle de l'insuline. Ceci s'avère d'autant plus intéressant dans une situation d'insulino-résistance où la voie de signalisation de l'insuline est altérée. L'équipe a alors cherché à savoir si cet effet de l'apeline était conservé chez des souris rendues obèses et insulino-résistantes par un régime hyperlipidique.

#### b) Effet de l'apeline dans une situation d'insulinorésistance

Une injection i.v. d'apeline au cours d'un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale, améliore la tolérance au glucose chez ces souris. De plus, au cours d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, les souris obèses et insulino-résistantes ont une moindre utilisation du glucose par les tissus insulino-sensibles comme les muscles et le tissu adipeux mais l'ajout d'apeline au cours du clamp augmente cette utilisation (Dray, Knauf et al. 2008). Ainsi

l'apeline, en traitement aigu, est efficace chez des souris obèses et insulino-résistantes et permet une meilleure utilisation du glucose. Cette amélioration de la sensibilité à l'insuline a été également retrouvée lors d'une infusion d'apeline pendant deux semaines chez des souris *db/db* (Yue, Jin et al.). Cet effet d'un traitement chronique par l'apeline s'accompagne d'une diminution de l'insulinémie, d'une augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine sans modification du poids corporel. Dans cette même étude, les souris invalidées pour le gène codant l'apeline présentent une insulinémie plus élevée et une résistance à l'insuline exacerbée lors d'un régime riche en lipides et en glucides. Cette étude ne précise pas s'il s'agit d'un effet direct de l'apeline mais montre de manière intéressante que la perte de sensibilité à l'insuline est restaurée par une infusion d'apeline exogène pendant 2 ou 4 semaines.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent qu'un traitement aigu par voie iv, ou chronique par l'infusion d'apeline en sous-cutané améliore l'entrée du glucose dans le muscle et améliore la sensibilité à l'insuline chez des animaux insulino-résistants. L'apeline, dont les concentrations plasmatiques augmentent lors avec l'obésité, serait bénéfique et permettrait de retarder l'apparition de l'insulino-résistance. De plus, une injection d'apeline exogène étant toujours efficace dans un contexte où l'apelinémie est déjà élevée (obésité et insulino-résistance), il semblerait qu'il n'y ait pas de résistance à l'apeline (figure 26).

## **B. Effet de l'apeline sur le métabolisme lipidique**

### ***1. Effet de l'apeline sur l'adiposité et la dépense énergétique***

Un rôle de l'apeline dans le métabolisme lipidique a été mis en évidence en 2007 par Higuchi et ses collaborateurs (Higuchi, Masaki et al. 2007). En effet, dans cette étude, un traitement quotidien de 14 jours par l'apeline 13 (0.1  $\mu\text{mol/kg/jour}$ ) chez des souris normopondérales provoque une perte de poids corporel caractérisée par une diminution du poids de différents dépôts de tissu adipeux blanc (viscéral, sous-cutané, mésentérique). Cet effet est associé à une baisse du contenu en triglycérides des adipocytes et à une réduction de la taille de ces cellules. Chez des souris nourries par un régime riche en lipides, on observe une tendance à la perte de poids associée à une réduction significative du poids du tissu adipeux viscéral (Higuchi, Masaki et al. 2007). Les résultats obtenus montrent que le

traitement par l'apeline diminue l'insulinémie sans modifier la glycémie chez les souris en régime standard ou en régime gras. De plus, la concentration en TG plasmatiques est également diminuée dans les deux modèles de souris alors que les AG plasmatiques ne sont diminués que chez les souris en régime gras. Par ailleurs, le traitement par l'apeline augmente la concentration plasmatique d'adiponectine mais diminue celle de la leptine chez les souris normopondérales ; ceci pouvant être secondaire à la perte de masse grasse. Une amélioration de la tolérance au glucose a également été observée chez les souris normopondérales mais n'a pas été mesurée chez des souris en régime standard (Higuchi, Masaki et al. 2007).

Enfin, les auteurs ont mesuré l'effet aigu de l'apeline sur le quotient respiratoire (indicateur de l'utilisation des glucides ou des lipides comme substrat énergétique) et sur la consommation d'oxygène ( $VO_2$  : reflet de la dépense énergétique) par calorimétrie indirecte, 6 heures après une injection ip d'apeline chez des souris en régime standard. Les résultats obtenus sont en faveur d'une meilleure utilisation des lipides (le quotient respiratoire est diminué) et d'une augmentation de la dépense énergétique (augmentation de la consommation d'oxygène). De plus, la température rectale de ces animaux est augmentée. Ces résultats sont à associer à une augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP1 dans le tissu adipeux brun ce qui serait en accord avec une stimulation de la thermogénèse et de la dépense énergétique par l'apeline (Higuchi, Masaki et al. 2007). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de l'apeline dans le métabolisme lipidique au niveau du tissu adipeux blanc mais aussi dans les tissus oxydatifs tels que le tissu adipeux brun et les muscles squelettiques (figure 26) (Higuchi, Masaki et al. 2007).

## ***2. Effet de l'apeline sur la biogénèse mitochondriale***

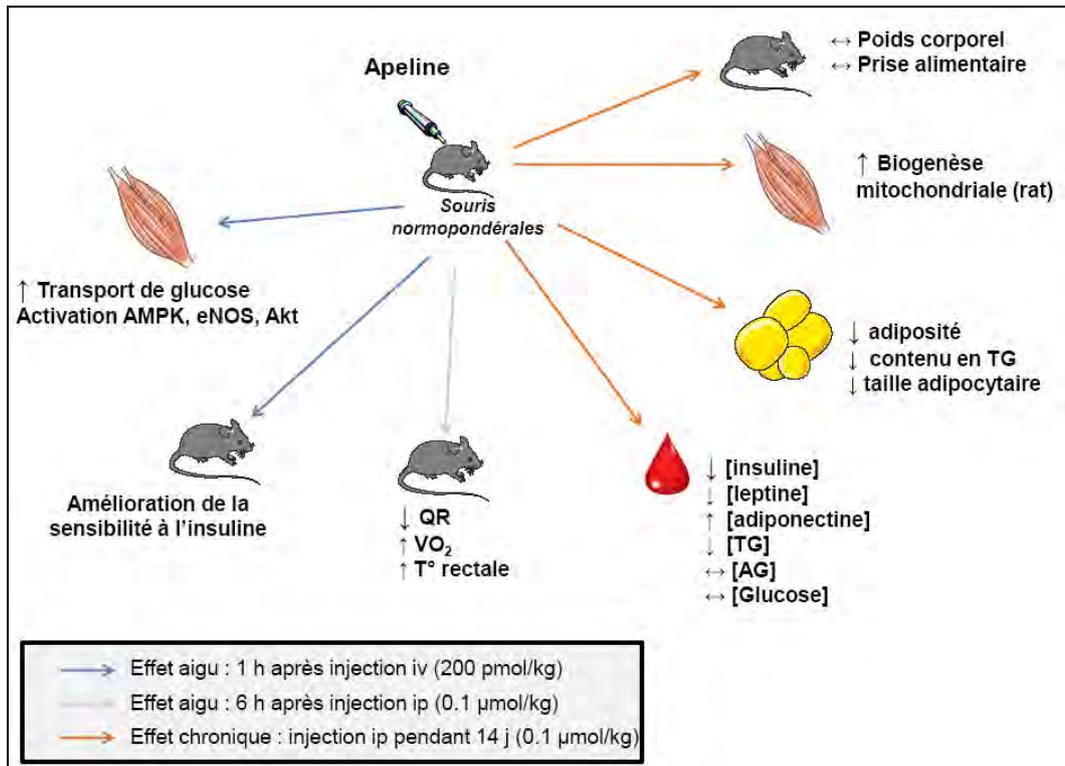
Une augmentation de l'expression d'UCP3, protéine intervenant dans la biogénèse mitochondriale, a également été mesurée par Higuchi dans le muscle de souris en régime standard (Higuchi, Masaki et al. 2007). Ces résultats sont à rapprocher d'une étude récente montrant une augmentation du contenu en mitochondries dans le muscle chez le rat en régime normal, traité en chronique de la même façon qu'Higuchi (Frier, Williams et al. 2009). En effet, l'activité de la  $\beta$ -HAD (impliquée dans la  $\beta$ -oxydation), de la citrate synthase (enzyme du cycle de Krebs) et de la cytochrome oxydase (activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) est augmentée suggérant une meilleure capacité oxydative dans le

triceps brachial (muscle glycolytique) mais pas dans le soléaire (muscle oxydatif). Ceci est associé à une augmentation de l'expression protéique des complexes I et IV de la chaîne respiratoire ainsi que des protéines chaperonnes impliquées dans l'assemblage de ces complexes (HSP60, HSP70 et mtHSP70). Ainsi, le traitement par l'apeline augmente la biogenèse mitochondriale et cet effet semble dû à une augmentation de l'expression de PGC1- $\beta$  dans le triceps brachial. Par contre, de manière surprenante, l'expression de l'AMPK et de PGC1 $\alpha$ , habituellement impliqué dans la biogenèse mitochondriale, n'est pas augmentée. PGC1 $\alpha$  et  $\beta$  sont des cofacteurs de transcription qui induisent la biogenèse mitochondriale mais les stimuli responsables de leur activation sont différents : PGC1 $\alpha$  est activé par le froid et l'exercice physique mais pas PGC1 $\beta$  dont les stimuli sont peu connus (Mortensen, Plomgaard et al. 2007).

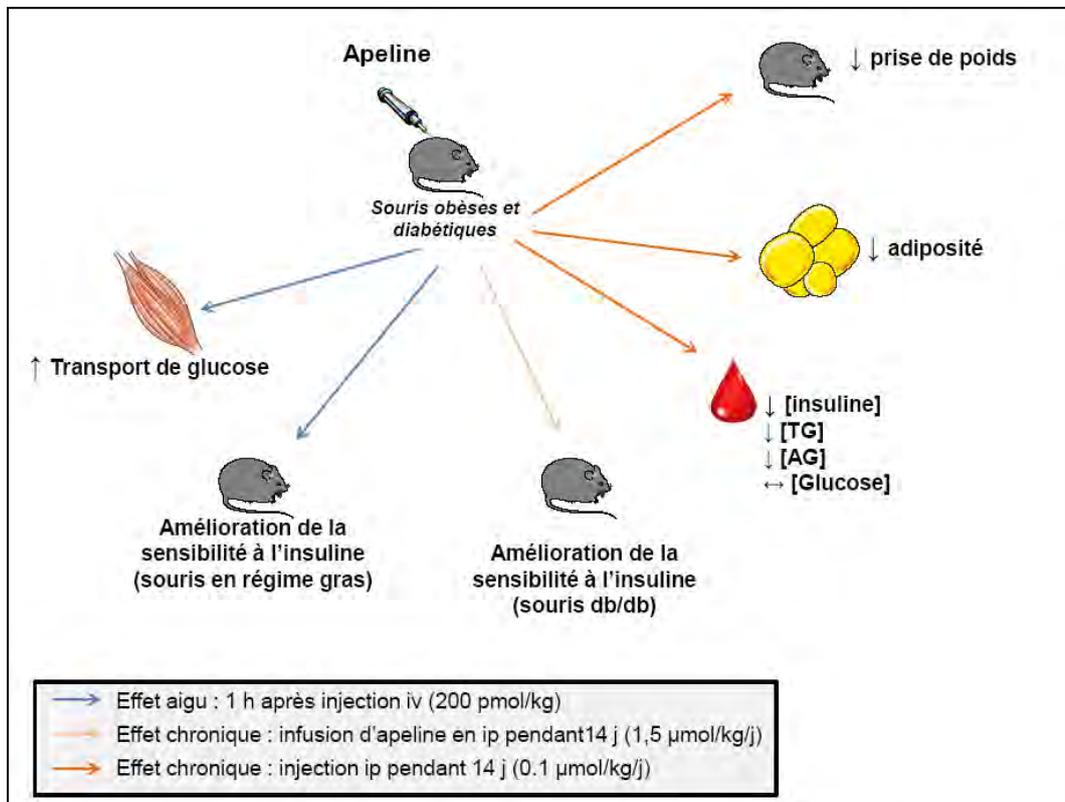
L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de l'apeline sur l'utilisation des lipides et la biogenèse mitochondriale mais aucune mesure des voies métaboliques impliquées (oxydation des AG et respiration mitochondriale) n'a été mesurée directement (figure 26). De plus, les travaux d'Higuchi et de Frier montrent des effets d'un traitement chronique par l'apeline principalement sur des souris ou rats en régime normal. Il sera donc intéressant et important de savoir quel est le rôle de l'apeline dans un contexte physiopathologique d'insulino-résistance caractérisé par une accumulation ectopique de lipides dans le muscle et une dysfonction mitochondriale.

Ainsi, l'apeline pourrait, parallèlement à ses effets sur le métabolisme glucidique, agir sur le métabolisme lipidique pour améliorer la sensibilité à l'insuline dans un contexte d'insulino-résistance.

A-



B-



**Figure 27 : Effet métaboliques de l'apeline administrée par différents types de traitements chez des souris normopondérales (A) ou obèses et diabétiques (B).**

Les différents traitements effectués en aigu ou en chronique modifient différents paramètres soit chez des souris normopondérales (A) ou obèses et insulino-résistantes (B).

QR : quotient respiratoire ; VO<sub>2</sub> : volume d'O<sub>2</sub> inspiré ; T° rectale : température rectale.



# ***RESULTATS***



## **I. Objectifs de la thèse**

En débutant ce travail, le rôle de l'apeline sur le métabolisme glucidique venait d'être décrit (Dray, Knauf et al. 2008) ainsi que les effets d'un traitement chronique sur l'adiposité et l'expression d'UCP3 dans le muscle de souris en condition physiologique (Higuchi, Masaki et al. 2007). Ayant mis en évidence dans l'équipe que l'apeline active l'AMPK, une enzyme clé du métabolisme glucidique mais aussi lipidique, on pouvait alors se demander si l'apeline pouvait exercer d'autres effets, notamment sur l'oxydation des lipides. De plus, comme l'apeline améliore la sensibilité à l'insuline, l'étude du métabolisme lipidique dans un contexte d'insulino-résistance apparaissait importante.

**Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de l'apeline dans le métabolisme lipidique dans le tissu adipeux et le muscle dans un contexte physiologique mais aussi lors de la résistance à l'insuline.**

Ce travail est articulé autour de deux axes d'étude.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un traitement aigu par l'apeline sur les fonctions métaboliques du tissu adipeux humain.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'effet d'un traitement chronique par l'apeline *in vivo* sur le métabolisme lipidique et la sensibilité à l'insuline dans un contexte d'insulino-résistance.

## **II. Effet de l'apeline sur le métabolisme énergétique du tissu adipeux humain**

Les travaux de C. Dray dans l'équipe ont mis en évidence une augmentation de l'entrée du glucose dans le tissu adipeux blanc en réponse à une injection iv d'apeline, lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique aussi bien chez la souris en régime standard qu'en régime hyperlipidique (Dray, Knauf et al. 2008). Ainsi l'apeline semble agir également sur le métabolisme énergétique du tissu adipeux. De plus, sachant que l'AMPK est activée en réponse à l'apeline dans le muscle squelettique (Dray, Knauf et al. 2008), et que la stimulation de l'AMPK dans le tissu adipeux augmente le transport de glucose et régule la lipolyse (Daval, Foufelle et al. 2006), nous avons privilégié l'étude de ces deux fonctions. Ces effets ont été étudiés d'abord en parallèle sur le tissu adipeux de souris en régime normal et sur du tissu adipeux humain issu de dermolipectomies abdominales (en provenance du service de chirurgie plastique de l'hôpital de Rangueil de Toulouse). Nous ne pouvons pas utiliser la lignée 3T3-F442A ou une autre lignée adipoocytaire pour mettre en évidence ces effets puisque celles-ci n'expriment pas le récepteur APJ. Les résultats obtenus sur les adipocytes isolés de souris sont tout à fait similaires à ceux obtenus sur les adipocytes humains et ce sont donc ces résultats qui ont fait l'objet de l'article n°1.

**Article 1 : Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo : article accepté dans « Journal of Molecular Endocrinology »**

# Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue *ex vivo*

C Attané<sup>1,2</sup>, D Daviaud<sup>1,2</sup>, C Dray<sup>1,2</sup>, R Dusaulcy<sup>1,2</sup>, M Masseboeuf<sup>1,2</sup>, D Prévot<sup>1,2</sup>, C Carpéné<sup>1,2</sup>, I Castan-Laurell<sup>1,2</sup> and P Valet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U858, F-31432 Toulouse, France

<sup>2</sup>Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil (I2MR), Université de Toulouse, UPS, IFR150, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

(Correspondence should be addressed to I Castan-Laurell at Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil (I2MR), Université de Toulouse, UPS, IFR150; Email: isabelle.castan@inserm.fr)

## Abstract

Apelin is a peptide present in different cell types and secreted by adipocytes in humans and rodents. Apelin exerts its effects through a G-protein-coupled receptor called APJ. During the past years, a role of apelin/APJ in energy metabolism has emerged. Apelin was shown to stimulate glucose uptake in skeletal muscle through an AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent pathway in mice. So far, no metabolic effects of apelin have been reported on human adipose tissue (AT). Thus, the effect of apelin on AMPK in AT was measured as well as AMPK-mediated effects such as inhibition of lipolysis and stimulation of glucose uptake. AMPK and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation were measured by western blot to reflect the AMPK activity. Lipolysis and glucose uptake were measured, *ex vivo*, in response to apelin on isolated adipocytes and explants from AT of the subcutaneous region of healthy subjects (body mass index:  $25.6 \pm 0.8$  kg/m<sup>2</sup>,  $n=30$  in total). APJ mRNA and protein are present in human AT and isolated adipocytes. Apelin stimulated AMPK phosphorylation at Thr-172 in a dose-dependent manner in human AT, which was associated with increased glucose uptake since C compound (20  $\mu$ M), an AMPK inhibitor, completely prevented apelin-induced glucose uptake. However, in isolated adipocytes or AT explants, apelin had no significant effect on basal and isoprenaline-stimulated lipolysis. Thus, these results reveal, for the first time, that apelin is able to act on human AT in order to stimulate AMPK and glucose uptake.

*Journal of Molecular Endocrinology* (2010) **46**, 1–9

## Introduction

Apelin is a peptide, identified as the endogenous ligand of APJ, a ubiquitously expressed G-protein-coupled receptor (Tatemoto *et al.* 1998). Apelin is synthesized as a 77 amino acid prepropeptide, which is cleaved in different fragments including apelin-36, apelin-17, apelin-13, and the posttranslationally [Pyr1]apelin-13 with a conversion of the N-terminal glutamate to pyroglutamate preventing enzymatic breakdown and thus preserving biological activity (Tatemoto *et al.* 1998). Prior to be revealed as an adipocyte-secreted factor (adipokine), apelin was known not only to exert several central and peripheral effects on different tissues such as the regulation of the cardiovascular, immune, and gastrointestinal functions but also on fluid homeostasis, angiogenesis, proliferation of different cell types, and embryonic development (Kleinz & Davenport 2005). Recently, we have demonstrated that *i.v.* injection of apelin, at physiological dose, was able to decrease glycemia in mice (Dray *et al.* 2008). Moreover, during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp, an increased glucose uptake was observed in adipose tissue (AT) and skeletal muscle (Dray *et al.* 2008). Apelin-stimulated

glucose transport in soleus muscle was dependent on AMP-activated protein kinase (AMPK) activation (Dray *et al.* 2008). A similar stimulation of AMPK by apelin has also been described in cultured C2C12 myotubes (Yue *et al.* 2009). Taken together, these independent observations support a physiological role of apelin in glucose metabolism. Recent data have also highlighted an important role for apelin in lipid metabolism. Higuchi *et al.* (2007) showed that prolonged treatment of apelin (daily *i.p.* injection of apelin for 2 weeks) decreased the triglycerides content of AT and the weight of different fat depots in chow-fed and obese mice. In addition, changes in uncoupling protein-1 (UCP-1) expression in brown AT as well as changes in UCP-3 expression in skeletal muscle were observed after apelin treatment but no metabolic effects were studied (Higuchi *et al.* 2007).

In humans, different studies have reported changes in plasma apelin concentration and variations of apelin expression in different tissues between physiological and pathological situations (Carpéné *et al.* 2007). Insulin has been shown to be one of the main regulating factors of apelin expression and secretion (Boucher *et al.* 2005). Circulating apelin levels as well as AT expression increase in obese and hyperinsulinemic subjects (Boucher *et al.*

2005, Castan-Laurell *et al.* 2008). Plasma apelin levels are also raised in morbidly obese (Heinonen *et al.* 2005) and type 2 diabetic (Soriguer *et al.* 2009) subjects. Nonobese patients with impaired glucose tolerance or with type 2 diabetes also exhibited higher concentrations of apelin when compared with control subjects (Li *et al.* 2006). The high apelin concentrations can be modulated by weight loss. Indeed, it was shown that diet-induced weight loss reduces plasma apelin levels in women with moderate obesity (Castan-Laurell *et al.* 2008), but not significantly in patients with metabolic syndrome (Heinonen *et al.* 2009). Bariatric surgery leads to a significant decrease in plasma apelin in morbidly obese subjects with impaired fasting glucose or type 2 diabetes before surgery (Soriguer *et al.* 2009). Moreover, the combination of two antidiabetics such as metformin and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes improves glycemic profile and allows an increase in plasma apelin concentrations (Kadoglou *et al.* 2010). Altogether these studies suggest that the increased levels of apelin might be, in early stage of metabolic disease, a compensatory mechanism delaying the onset of insulin resistance.

So far, to our knowledge, metabolic effects of apelin on human AT and the effect of apelin on AMPK activity in AT have not been published. Adipocytes are involved in lipid storage (lipogenesis) through lipid and glucose uptake but also in triglyceride breakdown (lipolysis) into fatty acids and glycerol (Lafontan 2008). Thus, we measured lipolysis and glucose uptake in AT (subcutaneous abdominal fat depot) from healthy subjects in response to increasing concentrations of apelin-13. The following results show that apelin stimulates AMPK and glucose uptake but had no effect on lipolysis in the conditions used.

## 03 Materials and methods

### Subjects

The study was performed according to the Declaration of Helsinki, and human AT was collected according to the guidelines and approval of the Ethical Committee of Rangueil Hospital in Toulouse from healthy women undergoing abdominal dermolipectomy for plastic surgery (body mass index:  $25.6 \pm 0.8$  kg/m<sup>2</sup>, age:  $43.2 \pm 2.7$  years,  $n = 30$  in total, each tissue was either attributed to one or several protocols). All of them were drug free and healthy. No clinical data from these patients were available.

### Human AT preparation

Human subcutaneous AT was either digested by collagenase (type II, Sigma–Aldrich Co.) in order to get isolated adipocytes or minced into very small pieces (1–2 mg) to get explants. The explants were washed two

times in PBS at 37 °C, centrifuged for 10 min at 850 g at room temperature in order to remove the connective tissue, and the medium was discarded. Isolated adipocytes were obtained after mincing AT in 5 ml of DMEM (Gibco, Invitrogen) supplemented with 1 mg/ml collagenase and 1% albumin (BSA) for 30 min at 37 °C under shaking. Digestion was followed by filtration through a 150 µm screen and the floating adipocytes were separated from the medium containing the stroma vascular fraction and washed twice in DMEM.

### APJ mRNA expression in human AT

Total RNAs (1 µg) were isolated from either AT using RNeasy Lipid Tissue kits (Qiagen) or isolated adipocytes using RNeasy kit (Qiagen). They were then reverse transcribed using random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed as previously described (Boucher *et al.* 2005). Briefly, real-time PCR was performed on 12.5 ng cDNA with both sense (hAPJ sense: GCCCTTGCTTTCTGAAAATCA) and antisense (hAPJ reverse: GGACAGTTAAAGGATGTGCATAGGA) oligonucleotides (Eurogentec, France) in a final volume of 20 µl using SYBR Green qPCR Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgium). Fluorescence was monitored and analyzed in a GeneAmp 7500 detection system instrument (Applied Biosystems, Warrington, UK). In parallel, analysis of the 18S ribosomal RNA was performed using the ribosomal RNA control Taqman Assay kit (Applied Biosystems) to normalize gene expression.

### Immunohistochemical study of APJ

AT was fixed overnight in a paraformaldehyde 4% solution, then hydrated, and paraffin-embedded. AT sections were blocked with 1% BSA in Tris buffer for 1 h at room temperature. Sections were then incubated with APJ monoclonal (anti-human) antibody (R&D Systems) overnight at 4 °C (1:25 dilution). Control sections were stained with IgG mouse serum used at the same dilution than APJ antibody. As a secondary antibody, alkaline phosphatase (DakoCytomation, Denmark) was used at 1:100 dilution. Antigen visualization was achieved with an alkaline phosphatase system (BCIP/NBT Substrate System, Dako) added with Levamisole (DakoCytomation) in order to suppress nonspecific staining.

### Glucose uptake

AT explants were preincubated for 10 min in Krebs–Henseleit (KH) buffer, pH 7.4, containing BSA (2 mg/ml) and 20 mM Hepes. Explants were then incubated for 45 min in the presence or absence of different concentrations of [Pyr1]apelin-13 (BACHEM

distribution services) or 100 nM insulin (Sigma–Aldrich Co.). [Pyr1]apelin-13 has been chosen as a stable biological active apelin isoform (Kleinz & Davenport 2005). In order to test the involvement of AMPK, C compound was added 20 min before apelin. For glucose transport, explants were transferred to another vial containing KH medium supplemented with 0.1 mM 2-deoxyglucose (2-DG) and D-[<sup>3</sup>H]-2-DG (0.25 µCi/ml) for 10 min. All the incubations were carried out at 37 °C under a 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Explants were then washed two times in PBS under shaking and then lysed by using Precellys 24 automated biological sample lyser with CK-14 beads vials (Ozyme, France) in 500 µl NaOH (1 N). The infranatant was recovered for further extraction and 500 µl HCl (1 N) was added to each sample in order to restore pH neutrality. The total amount of D-[<sup>3</sup>H]-2-DG was quantified after addition of a perchloric acid (6%) solution. In an other vial, D-[<sup>3</sup>H]-2-DG 6-phosphate was precipitated by the use of zinc sulfate (0.3 M) and barium hydroxide (0.3 M). The amount of 2-DG internalized was calculated by the difference between the radioactivity found in total 2-DG and nonphosphorylated 2-DG found in the supernatants.

Glucose uptake by isolated adipocytes was measured as previously described (Iglesias-Osma *et al.* 2005). Briefly, adipocytes (1:10 dilution) were incubated with 1 µM of apelin or 100 nM insulin as a positive control for 45 min at 37 °C and 0.4 µCi 2-DG were added at a final concentration of 0.1 mM for 10 min. Assays were stopped with 100 µM cytochalasin B and aliquots of cell suspension were centrifuged in microtubes containing di-isononyl phthalate, which allowed to separate adipocytes from the buffer and to count the radioactive intracellular 2-DG.

### Lipolysis

Lipolysis was realized in Krebs–Ringer–Hepes buffer (KRHB with 2% BSA). In all, 100 µl AT microexplants or adipocytes (1:10 dilution) were incubated in 1 ml KRHB for 1 h at 37 °C under gentle shaking in the presence of different concentrations of apelin or in 1 µM isoprenaline (a β-adrenergic agonist) as a positive control. The reaction was stopped once the tubes were on ice. Glycerol released in the medium was measured in 30 µl aliquot using the Glycerol-Free Reagent kit (Sigma) while nonesterified fatty acids (NEFA) were measured in 15 µl of the medium by the WAKO NEFA kit (WAKO Chemicals).

### Western blots

AT explants were lysed as described above (Precellys) and loaded (50 µg protein per lane) on 10% SDS–PAGE gel and transferred to nitrocellulose membrane (Schleicher-Schuell). Membranes were blotted with

anti-phospho-AMPKα-Thr-172 or anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC)-Ser79 antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) used at 1:1000 dilution in Tris-buffered saline containing 5% BSA and Tween-20 at 0.01%. As a secondary antibody, anti-rabbit-HRP was used (1:3000 dilution). Membranes were probed with β-actin for total proteins. Immunoreactive proteins were detected using the ECL Plus (GE Healthcare, UK) and quantified by Image Quant TL software (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden).

### Statistical analysis

Data are presented as means ± S.E.M. Analysis of differences between the groups was performed with one-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni's or Dunnett's test, when appropriate and *P* < 0.05 was considered to be significant.

## Results

### Expression of APJ receptors in human AT

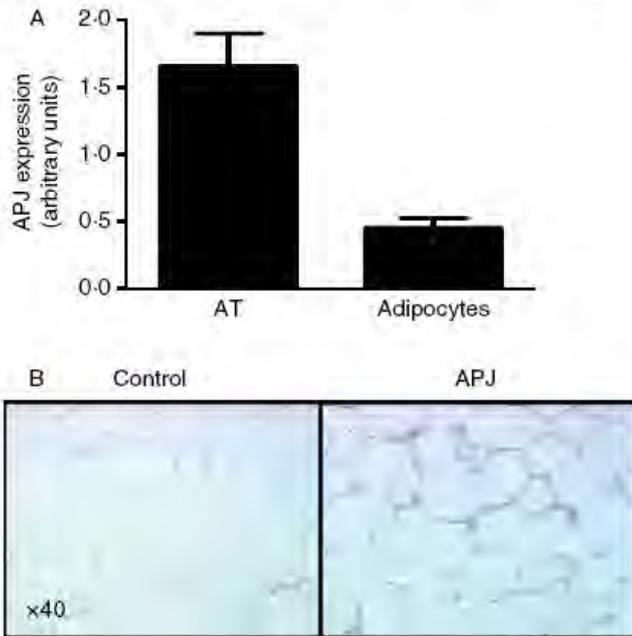
We have previously shown that *APJ* mRNAs were present in human AT (Castan-Laurell *et al.* 2008, Dray *et al.* 2010). In this study, we further delineated the presence of both *APJ* mRNA and protein in isolated adipocytes compared to the entire AT. As shown in Fig. 1, *APJ* mRNA levels were lower in isolated adipocytes than in AT. APJ proteins were also visualized in human AT since a positive immunostaining was observed in the periphery of adipocytes compared to control.

### Effect of apelin on AMPK

AMPK has been revealed as a target of apelin signaling in muscle (Dray *et al.* 2008, Yue *et al.* 2009), thus the effect of apelin on AMPK activation was studied in human AT. Time-course studies in AT explants revealed that 10 nM apelin induced the phosphorylation of AMPK that was maximal at 10 min (Fig. 2A). In total, 2 mM 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) incubated for 60 min was used as a positive control. Moreover, apelin stimulated, in parallel, the phosphorylation of AMPK and ACC, its downstream target enzyme, in a dose-dependent manner with a significant effect at 10 nM (Fig. 2B). Thus, apelin activates AMPK in human AT. Metabolic effects mediated by apelin involving AMPK were then studied.

### Effect of apelin on lipolysis

Both glycerol and NEFA releases were measured as final products of triglyceride hydrolysis after 1 h incubation with different agents. Isoprenaline (a β-adrenergic



**Figure 1** Expression of APJ, the apelin receptor, in human AT. (A) mRNA levels of APJ in entire adipose tissue (AT) and isolated adipocytes. Results are mean  $\pm$  s.e.m. of eight independent experiments. (B) Representative immunostaining without (control) or with anti-APJ antibody (APJ) in human AT.

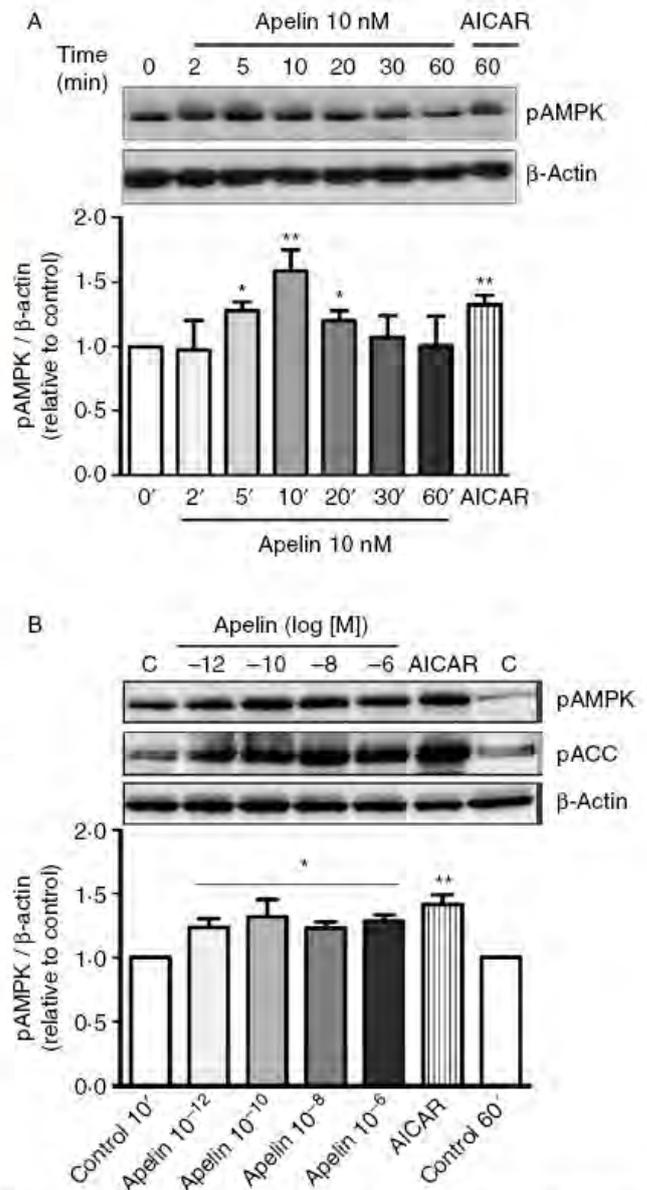
agonist) was used at 1  $\mu$ M as a control of maximal lipolytic activation and AICAR was used at 2 mM as an activator of AMPK (Gaidhu *et al.* 2009). Isoprenaline stimulated the basal release of glycerol and NEFA from AT explants whereas AICAR decreased basal lipolysis (Fig. 3A). However, apelin, whatever the concentrations used, had no significant effect on basal and isoprenaline-stimulated lipolysis (Fig. 3A). In addition, in isolated adipocytes, apelin at 10 nM and 1  $\mu$ M did not have significant effect on lipolysis. When added at the same time along with isoprenaline, apelin did not modify the response of the  $\beta$ -adrenergic agonist, while 100 nM insulin was antilipolytic (Fig. 3B).

### Effect of apelin on glucose uptake

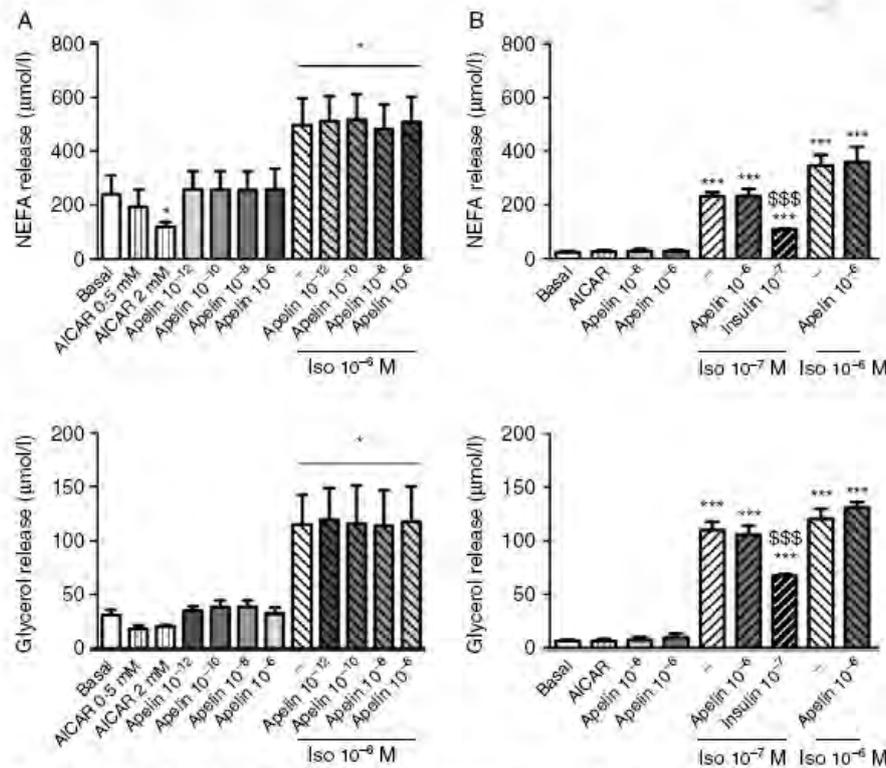
Insulin, as a positive control, stimulated glucose uptake in human AT explants (Fig. 4A). Apelin stimulated glucose uptake in a dose-dependent manner, with a significant effect at 10 nM, but to a lower extent compared to insulin (1.56-fold with 10 nM apelin versus 2.0-fold with 100 nM Insulin). On isolated adipocytes, apelin had a weak effect (basal:  $0.16 \pm 0.04$  pmol/g protein; apelin 1  $\mu$ M:  $0.23 \pm 0.06$  pmol/g protein,  $n=7-10$ ). The involvement of AMPK in apelin-stimulated glucose transport was underlined by the use of C compound, a selective AMPK inhibitor. C compound (20  $\mu$ M) prevented apelin-induced glucose uptake in human AT explants (Fig. 4B).

### Discussion

In this study, we provide evidence that acute apelin treatment of human AT from healthy subjects stimulates AMPK phosphorylation and glucose uptake but has no effect on lipolysis. Thus, this study reveals, for the first time, an activation of AMPK by apelin in AT and



**Figure 2** Apelin stimulates AMPK phosphorylation. (A) Representative blot of *in vitro* time-course study of Thr-172 AMPK phosphorylation in the presence of apelin (10 nM) or AICAR (2 mM), used as a positive control and incubated for 60 min.  $\beta$ -Actin was used to evaluate total proteins,  $n=4$ . The graph shows the quantified data, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  versus control. (B) Dose-response of apelin, at the indicated concentrations (incubation time: 10 min for apelin, 60 min for AICAR), on AMPK and ACC phosphorylation compared to control (C).  $\beta$ -Actin was used to evaluate total proteins. The graph shows the quantified data,  $n=4$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  versus control.



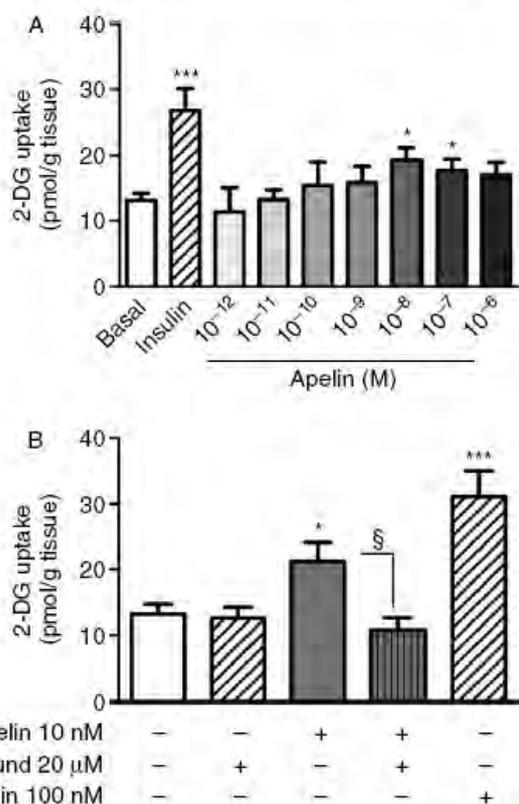
**Figure 3** Effect of apelin on lipolysis in human AT explants (A) and isolated adipocytes (B). NEFA (top) and glycerol (bottom) releases upon basal lipolysis (BAS, white columns), under stimulation with AICAR alone at the indicated concentrations, apelin alone at the concentrations indicated or in combination with 0.1 or 1 μM isoprenaline (shaded columns). Results are the mean ± s.e.m. of six independent experiments for AT explants and four independent experiments for isolated adipocytes. \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001, \$\$*P*<0.01, \$\$\$*P*<0.001 for insulin+isoprenaline versus isoprenaline alone.

functional metabolic effects of apelin on humans. These results are in line with our previous study performed in mice indicating that i) *ex vivo*, in soleus skeletal muscle, apelin stimulated AMPK and glucose uptake (Dray *et al.* 2008) and that ii) *in vivo*, apelin perfusion during a euglycemic-hyperinsulinemic clamp stimulated glucose uptake in AT.

Lipolysis is one of the main metabolic functions of AT. An upstream step controlling this process is the intracellular levels of cAMP. Apelin has been shown to reduce forskolin-stimulated cAMP production in different cell line overexpressing APJ receptors through a pertussis-toxin-sensitive G-protein (Masri *et al.* 2002, Bai *et al.* 2008). Thus, an antilipolytic effect of apelin was expected but no modification of basal or isoprenaline-stimulated lipolysis was observed in the conditions used. Moreover, apelin has been shown to activate AMPK in skeletal muscle (Dray *et al.* 2008) while AMPK also regulates energy metabolism in AT (Daval *et al.* 2006). However, depending on the studies, it has been shown that in rodents, activation of AMPK could lead either to inhibition or stimulation of lipolysis (Yin *et al.* 2003, Hutchinson *et al.* 2005, Daval *et al.* 2006, Omar *et al.* 2009). Very recently, it was shown that protein

kinase A, once activated by lipolytic agents, inactivates AMPK to promote efficient lipolysis (Djouder *et al.* 2010). AMPK activation is thus viewed as a consequence of ongoing re-esterification of fatty acids that consume energy (Gauthier *et al.* 2008, Djouder *et al.* 2010) and in fine AMPK activation restrains hydrolysis of triglycerides (lipolysis). Acute treatment (1 h) with AICAR has been shown to decrease both NEFA and glycerol release in rat adipocytes (Gaidhu *et al.* 2009). In this study, AICAR decreased both NEFA and glycerol release in agreement with the results reported by Gaidhu *et al.* (2009). Apelin incubated during the same period did not acutely inhibit lipolysis in basal conditions or during isoprenaline-stimulated lipolysis. This could be due to the less sustained effect of apelin on AMPK phosphorylation. These results are thus different from those obtained with biguanides and thiazolidinediones that activate AMPK and inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes (Bowron *et al.* 2010). Although apelin shares with those antidiabetic drugs, a decrease in glycemia, and activation of AMPK, apelin might not act on acute lipolysis.

Among the other metabolic functions of AT involving AMPK, we focused on glucose uptake. In this study,



**Figure 4** Apelin stimulates glucose uptake through AMPK activation. (A) AT explants were stimulated either with 100 nM insulin or with the indicated concentrations of apelin as indicated in section 'Materials and methods'. Results are the mean  $\pm$  s.e.m. of 7–12 independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$  versus control (C). (B) Effect of 20  $\mu$ M C compound on basal and apelin-stimulated glucose uptake in AT explants. Insulin was used as a positive control. Values are the mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 7$ . \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$  versus basal. § $P < 0.05$  for apelin 10 nM versus apelin 10 nM + C compound.

apelin had a modest effect on glucose uptake in human AT explants and isolated adipocytes. Insulin, at physiological concentrations, stimulated glucose transport in human AT explants twofold above basal, which is in agreement with previous studies performed on human isolated adipocytes (Iglesias-Osma *et al.* 2005, Wanecq *et al.* 2009) or differentiated cultured adipocytes (Hauner *et al.* 1998). It should be noticed that conversion of glucose into fatty acids (*de novo* lipogenesis) especially in AT is much lower in humans compared to rodents (Zelewski & Swierczyński 1990). We choose to work first on AT explants with the aim to reproduce the conditions used for glucose transport *ex vivo* in muscle (Dray *et al.* 2008). It has been shown that functional activities are maintained in human AT explants (Moustaïd *et al.* 1995, Viguier *et al.* 2002). Moreover, the effects of apelin were similar in AT explants and isolated adipocytes.

Only a few studies have demonstrated the role of AMPK in glucose uptake in adipose cells, and the mechanisms leading to AMPK activation in adipocytes

remain poorly understood. The use of AICAR, as a pharmacological tool to activate this kinase, has not given conclusive results regarding its physiological role (Salt *et al.* 2000, Sakoda *et al.* 2002). Indeed, over-expression of a dominant negative form of AMPK in cultured adipocytes was shown to abolish AMPK activation without affecting AICAR-induced glucose transport (Sakoda *et al.* 2002). However, adiponectin, an insulin-sensitizing adipokine, was shown to increase glucose uptake in primary rat adipocytes through AMPK activation and this effect was abrogated in the presence of AMPK inhibitors (Wu *et al.* 2003). Similar results were obtained in this study with apelin. The effect of C compound, in blocking apelin-stimulated glucose uptake as well as the phosphorylation of ACC, strongly suggests a role of AMPK and thus an insulin-independent pathway for the effects of apelin. Yet, it is not known whether glucose uptake by adiponectin or apelin is dependent on glucose transporter-4 (GLUT-4) translocation. GLUT-4 is essential for insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle and AT. Moreover, *GLUT-4* mRNA levels in human AT are detected mostly in mature adipocytes compared to the stroma vascular fraction or nonadipocyte cells (Vitkova *et al.* 2007). Consequently, the GLUT-4-dependent effects are mainly due to adipocyte response. Activation of AMPK in different cell types could lead to translocation of GLUT-4 transporters (Mu *et al.* 2001, Li *et al.* 2004), but not in all the reports (Lemieux *et al.* 2003, Breen *et al.* 2008). Moreover, studies performed in cultured 3T3-L1 preadipocytes or in C2C12 myoblasts demonstrated that AMPK is also implicated in GLUT-1-mediated glucose uptake (Abbud *et al.* 2000). Hence, apelin could activate AMPK and glucose uptake through different GLUTs depending on the cell type (preadipocytes or adipocytes) involved.

In conclusion, these results show that apelin stimulates glucose uptake in human AT but to a less extent than insulin. Given that apelin is produced and secreted by AT, a local action of apelin could affect differently AT metabolic functions compared to insulin action. It will be of interest to depict these effects in obese subjects. Moreover, we also described AMPK activation by apelin in AT. Since the activation of AMPK is viewed as a therapeutic approach in obesity-associated disorders (type 2 diabetes) and since only few compounds have been described to activate AMPK in this tissue, apelin/APJ system could be a promising target with potential beneficial effects in humans.

#### Declaration of interest

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

## Funding

This work was supported by the INSERM and Paul Sabatier University.

## References

- Abbud W, Habinowski S, Zhang JZ, Kendrew J, Elkairi FS, Kemp BE, Witters LA & Ismail-Beigi F 2000 Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of GLUT1-mediated glucose transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **380** 347–352. (doi:10.1006/abbi.2000.1935)
- Bai B, Tang J, Liu H, Chen J, Li Y & Song W 2008 Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **40** 311–318. (doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00403.x)
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpenne C *et al.* 2005 Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* **146** 1764–1771. (doi:10.1210/en.2004-1427)
- Bourron O, Daval M, Hainault I, Hajduch E, Servant JM, Gautier JF, Ferr  P & Fougelle F 2010 Biguanides and thiazolidinediones inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes through activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* **53** 768–778. (doi:10.1007/s00125-009-1639-6)
- Breen DM, Sanli T, Giacca A & Tsiani E 2008 Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374** 117–122. (doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.104)
- Carp n  C, Dray C, Attan  C, Valet P, Portillo MP, Churruc  I, Milagro FI & Castan-Laurell I 2007 Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *Journal of Physiology and Biochemistry* **63** 358–373. (doi:10.1007/BF03165767)
- Castan-Laurell I, Vitkova M, Daviaud D, Dray D, Kovacicova M, Kovacova Z, Hejnova J, Stich V & Valet P 2008 Effect of hypocaloric-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and AP. *European Journal of Endocrinology* **158** 905–910. (doi:10.1530/EJE-08-0039)
- Daval M, Fougelle F & Ferr  P 2006 Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *Journal of Physiology* **574** 55–62. (doi:10.1113/jphysiol.2006.111484)
- Djouder N, Tuerk RD, Suter M, Salvioni P, Thali RF, Scholz R, Vaahromeri K, Auchi Y, Rechsteiner H, Brumsholz RA *et al.* 2010 PKA phosphorylates and inactivates AMPK  to promote efficient lipolysis. *EMBO Journal* **29** 469–481. (doi:10.1038/emboj.2009.339)
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Bul on M, Cani PD, Attan  C, Guign  C, Carp n  C *et al.* 2008 Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metabolism* **8** 437–445. (doi:10.1016/j.cmet.2008.10.003)
- Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, Attan  C, Wanecq E, Guign  C, Bost F *et al.* 2010 Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **298** E1161–E1169. (doi:10.1152/ajpendo.00598.2009)
- Gaidhu MP, Fediuc S, Anthony NM, So M, Mirpourian M, Perry RL & Ceddia RB 2009 Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *Journal of Lipid Research* **50** 704–715. (doi:10.1194/jlr.M800480.JLR200)
- Gauthier MS, Miyoshi H, Souza SC, Cacicedo JM, Saha AK, Greenberg AS & Ruderman NB 2008 AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *Journal of Biological Chemistry* **283** 16514–16524. (doi:10.1074/jbc.M708177200)
- Hauner H, R hrig K, Spelleken M, Liu LS & Eckel J 1998 Development of insulin-responsive glucose uptake and GLUT4 expression in differentiating human adipocyte precursor cells. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **22** 448–453. (doi:10.1038/sj.ijo.0800606)
- Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Paakkonen M, Pirinen E, Alhava E, Akerman K & Herzig KH 2005 Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regulatory Peptides* **130** 7–13. (doi:10.1016/j.regpep.2005.05.003)
- Heinonen MV, Laaksonen DE, Karhu T, Karhunen L, Laitinen T, Kainulainen S, Rissanen A, Niskanen L & Herzig KH 2009 Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases* **19** 626–633. (doi:10.1016/j.numecd.2008.12.008)
- Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T & Yoshimatsu H 2007 Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* **148** 2690–2697. (doi:10.1210/en.2006-1270)
- Hutchinson DS, Chernogubova E, Dallner OS, Cannon B & Bengtsson T 2005  -Adrenoceptors, but not  -adrenoceptors, stimulate AMP-activated protein kinase in brown adipocytes independently of uncoupling protein-1. *Diabetologia* **48** 2386–2395. (doi:10.1007/s00125-005-1936-7)
- Iglesias-Osma MC, Bour S, Garcia-Barrado MJ, Visentin V, Pastor MF, Testar X, Marti L, Enrique-Tarancon G, Valet P, Moratinos J *et al.* 2005 Methylamine but not mafenide mimics insulin-like activity of the semicarbazide-sensitive amine oxidase-substrate benzylamine on glucose tolerance and on human adipocyte metabolism. *Pharmacology Research* **52** 475–484. (doi:10.1016/j.phrs.2005.07.008)
- Kadoglou NP, Tsanikidis H, Kapelouzou A, Vrabas I, Vitta I, Karayannacos PE, Liapis CD & Sailer N 2010 Effects of rosiglitazone and metformin treatment on apelin, visfatin, and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **59** 373–379. (doi:10.1016/j.metabol.2009.08.005)
- Kleinz MJ & Davenport AP 2005 Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology and Therapeutics* **107** 198–211. (doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.001)
- Lafontan M 2008 Advances in adipose tissue metabolism. *International Journal of Obesity* **32** (Supplement 7) S39–S51. (doi:10.1038/ijo.2008.237)
- Lemieux K, Konrad D, Klip A & Marette A 2003 The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases   and   in skeletal muscle. *FASEB Journal* **17** 1658–1665. (doi:10.1096/fj.02-1125com)
- Li J, Hu X, Selvakumar P, Russell RR, Cushman SW, Holman GD & Young LH 2004 Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **287** E834–E841. (doi:10.1152/ajpendo.00234.2004)
- Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H & Li K 2006 Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **114** 544–548. (doi:10.1055/s-2006-948309)
- Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B & Audigier Y 2002 Apelin (65–77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290** 539–545. (doi:10.1006/bbrc.2001.6230)
- Moustaid N, Jones BH & Taylor JW 1995 Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *Journal of Nutrition* **126** 865–870.
- Mu J, Brozinick JT, Valladares O, Bucan M & Birnbaum MJ 2001 A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Molecular Cell* **7** 1085–1094. (doi:10.1016/S1097-2765(01)00251-9)
- Omar B, Zmuda-Trzebiatowska E, Manganiello V, G ransson O & Degerman E 2009 Regulation of AMP-activated protein kinase by

- cAMP in adipocytes: roles for phosphodiesterases, protein kinase B, protein kinase A, Epac and lipolysis. *Cellular Signalling* **21** 760–766. (doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.015)
- Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Onishi Y, Katagiri H, Abe M, Fukushima Y, Shojima N *et al.* 2002 Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **282** E1239–E1244. (doi:10.1152/ajpendo.00455.2001)
- Salt IP, Connell JM & Gould GW 2000 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **49** 1649–1656. (doi:10.2337/diabetes.49.10.1649)
- Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ & Garcia-Fuentes E 2009 Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obesity Surgery* **19** 1574–1580. (doi:10.1007/s11695-009-9955-y)
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C *et al.* 1998 Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251** 471–476. (doi:10.1006/bbrc.1998.9489)
- Viguerie N, Millet L, Avizou S, Vidal H, Larrouy D & Langin D 2002 Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 630–634. (doi:10.1210/jc.87.2.630)
- Vitkova M, Klimcakova E, Kovacikova M, Valle C, Moro C, Polak J, Hanacek J, Capel F, Viguerie N, Richterova B *et al.* 2007 Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92** 2330–2335. (doi:10.1210/jc.2006-2668)
- Wanecq E, Prévot D & Carpéné C 2009 Lack of direct insulin-like action of visfatin/Nampt/PBEF1 in human adipocytes. *Journal of Physiology and Biochemistry* **65** 351–360. (doi:10.1007/BF03185930)
- Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R & Goldstein BJ 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. (doi:10.2337/diabetes.52.6.1355)
- Yin W, Mu J & Birnbaum MJ 2003 Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **278** 43074–43080. (doi:10.1074/jbc.M308484200)
- Yue P, Jin H, Aillaud-Manzanera M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T & Tsao PS 2009 Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **298** E59–E67. (doi:10.1152/ajpendo.00385.2009)
- Zelewski M & Swierczyński J 1990 Comparative studies on lipogenic enzyme activities in the liver of human and some animal species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **95** 469–472. (doi:10.1016/0305-0491(90)90004-D)

Received in final form 5 October 2010

Accepted 9 November 2010

Made available online as an Accepted Preprint 9 November 2010

## **Discussion de l'article 1**

Cette étude a permis de mettre en évidence pour la première fois une activation de l'AMPK par l'apeline dans le tissu adipeux humain. Cette stimulation rapide et transitoire de l'AMPK est suivie d'une activation du transport de glucose dans le tissu adipeux mais ne semble pas avoir d'effet sur la lipolyse basale ou stimulée par l'isoprénaline.

### **➤ Effet de l'apeline sur le transport de glucose**

Le glucose, une fois transporté dans les adipocytes, est converti soit en acétyl-CoA, un précurseur de la lipogenèse *de novo*, soit en glycérol-3-phosphate qui permet la synthèse des TG en s'associant aux acides gras. Ainsi, une augmentation de l'entrée de glucose dans le tissu adipeux par l'apeline pourrait favoriser le stockage de TG, mais ceci n'a pas pu être mesuré car cette voie métabolique est très faible chez l'Homme. Des résultats préliminaires dans l'équipe n'ont pas permis de mettre en évidence de modification de la lipogenèse *de novo* basale ou stimulée par l'insuline en réponse à l'apeline sur des adipocytes isolés de souris.

Le glucose dans la cellule pourrait alors servir de substrat énergétique permettant de fournir de l'ATP à la cellule *via* la glycolyse anaérobie. Il sera donc important d'étudier le devenir du glucose dans le tissu adipeux pour mieux comprendre s'il est utilisé pour fournir de l'énergie ou pour produire des AG qui seront stockés en TG.

### **➤ Effet de l'apeline sur la lipolyse**

Il a été montré que le récepteur APJ est couplé à des protéines  $G_i$  et son activation par l'apeline entraîne une diminution des taux d'AMPc *via* une inhibition de l'adénylate-cyclase (Hosoya, Kawamata et al. 2000). Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, une diminution des taux d'AMPc entraîne une inhibition de la lipolyse. De plus, nous avons montré que l'apeline active l'AMPK dans le tissu adipeux humain. Or, il a été montré qu'un traitement d'1 h par l'AICAR active l'AMPK et inhibe la lipolyse sur des adipocytes isolés de rat (Anthony, Gaidhu et al. 2009; Gaidhu, Fediuc et al. 2009). Au vu de l'ensemble de ces données, nous nous attendions à une diminution de la lipolyse par l'apeline.

Or, aucun effet de l'apeline n'a pu être mis en évidence sur des explants de tissu adipeux humains, ni sur des adipocytes isolés. Ceci peut s'expliquer tout d'abord par le fait que l'activation de l'AMPK par l'apeline est rapide et transitoire par rapport à l'AICAR qui active l'AMPK après une heure d'incubation. De plus, il a été montré récemment que des médicaments anti-diabétiques de la famille des biguanides et des thiazolidinediones activent l'AMPK et inhibent la lipolyse avec des cinétiques de traitement différentes (Bourron, Daval et al.). En effet, ces effets sont observés avec la pioglitazone et la rosiglitazone après une heure de traitement alors que la metformine n'a cet effet qu'après 4 heures d'incubation. De plus, un effet biphasique de l'AICAR a été observé sur la lipolyse lors d'une cinétique de traitement allant de 1 à 15 heures sur des adipocytes isolés (Gaidhu, Fediuc et al. 2009). En effet, des traitements de 1 à 2 heures à l'AICAR activent faiblement l'AMPK et inhibent la lipolyse alors qu'une incubation de 4 à 15 h à l'AICAR augmente l'activation de l'AMPK et induit la lipolyse.

Ainsi, il semble important de mesurer les effets de traitements plus longs par l'apeline sur l'activation de l'AMPK et la lipolyse.

De manière générale, l'apeline a des effets métaboliques beaucoup plus marqués *in vivo* qu'*in vitro* que ce soit au niveau du muscle (transport de glucose et activation de l'AMPK) qu'au niveau du tissu adipeux (transport de glucose et lipolyse) (Dray, Knauf et al. 2008). Il sera donc également intéressant d'étudier l'effet de l'apeline sur la lipolyse *in vivo*. En effet, un traitement chronique par l'apeline diminue la masse adipeuse chez la souris (Higuchi, Masaki et al. 2007). Ce traitement diminue le poids de différents dépôts adipeux ainsi que le contenu en TG et la taille des adipocytes et ceci pourrait s'expliquer par une augmentation de la lipolyse et/ou une diminution la lipogénèse *de novo* des AG. De plus, une augmentation de la lipolyse (augmentation des taux plasmatiques d'AG) a été observée 15 heures après une injection d'AICAR chez le rat (Gaidhu, Fediuc et al. 2009).

Ainsi, la combinaison à la fois d'un traitement aigu avec l'apeline sur plusieurs heures et *in vivo* devrait permettre de mieux appréhender l'effet de l'apeline sur la lipolyse. De plus, puisqu'au cours d'un traitement chronique par l'apeline, le contenu en TG du tissu adipeux est diminué, la mesure de la lipolyse ou des acteurs moléculaires impliqués permettrait d'expliquer les résultats obtenus par Higuchi.

### **III. Effets de l'apeline sur le métabolisme lipidique dans le muscle squelettique**

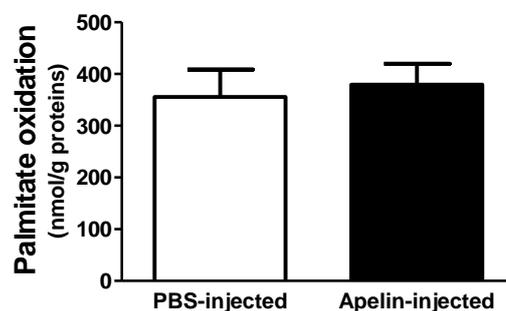
Les lignées cellulaires de myocytes ne possèdent pas non plus le récepteur APJ. Par conséquent, nous avons étudié les effets d'un traitement *in vivo* (ip ou iv) par l'apeline chez la souris sur le métabolisme lipidique dans le muscle soléaire.

#### **A. Mesure du métabolisme lipidique musculaire chez la souris normopondérale**

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les effets aigus de l'apeline sur le métabolisme glucidique, mis en évidence par les travaux de C. Dray dans l'équipe, étaient associés à une modification du métabolisme lipidique (Dray, Knauf et al. 2008). En effet, un traitement aigu par l'apeline active dans le muscle l'AMPK, une enzyme régulant à la fois sur le métabolisme glucidique (augmentation du transport de glucose) mais aussi sur le métabolisme lipidique (augmentation de l'oxydation des AG). Pour cela, différents types de traitements ont été effectués afin de mesurer l'oxydation du palmitate.

Tout d'abord, *ex vivo*, dans les mêmes conditions expérimentales que la mesure du transport de glucose où le muscle soléaire isolé de souris normopondérales est pré-incubé avec l'apeline pendant 30 minutes, puis le palmitate radiomarqué ajouté pendant les trente minutes suivantes, l'apeline ne modifie pas l'oxydation du palmitate ( $388 \pm 91$  versus  $401 \pm 92$  sur les muscles incubés avec l'apeline).

Nous avons alors injecté l'apeline par voie iv à la même dose (200 pmol/kg) que pour l'étude du métabolisme glucidique (Dray, Knauf et al. 2008), puis l'oxydation du palmitate a été mesurée sur le muscle soléaire isolé, 1 heure après l'injection. Ce traitement aigu à l'apeline n'entraîne pas de modification de l'oxydation du palmitate sur le muscle soléaire (figure 27).

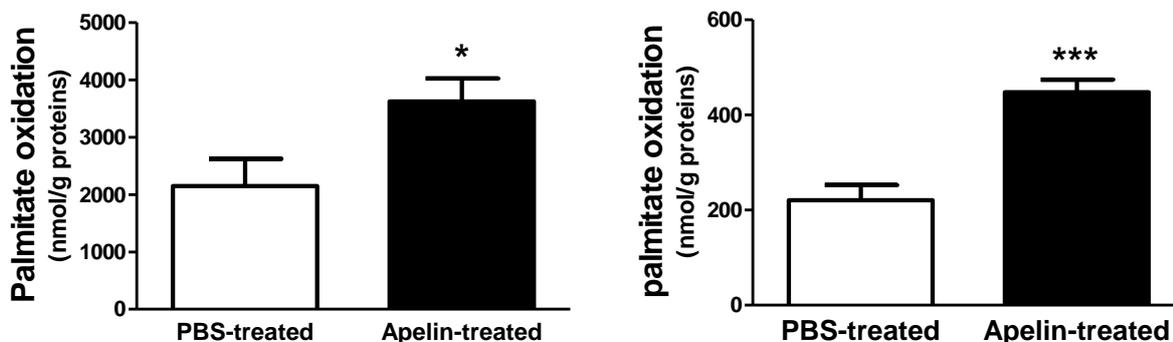


**Figure 28 : Oxydation du palmitate sur le muscle soléaire une heure après une injection iv d'apeline (200pmol/kg) ou de PBS chez des souris de poids normal.** Les valeurs représentées sont des moyennes  $\pm$  esm. n= 7-10.

Higuchi et ses collaborateurs ont mis en évidence une diminution du quotient respiratoire et une augmentation de la dépense énergétique 6 heures après une injection d'apeline (Higuchi, Masaki et al. 2007). Ces résultats suggèrent que l'apeline augmente l'utilisation des lipides, mais cet effet est plus long à se mettre en place que l'induction du transport de glucose par l'apeline. L'oxydation des AG a donc été mesurée 6 heures après une injection iv d'apeline mais nous n'avons pas observé de modification ( $1185 \pm 211$  versus  $1550 \pm 299$  nmol palmitate oxydé/g protéines pour les souris traitées à l'apeline ; non significatif).

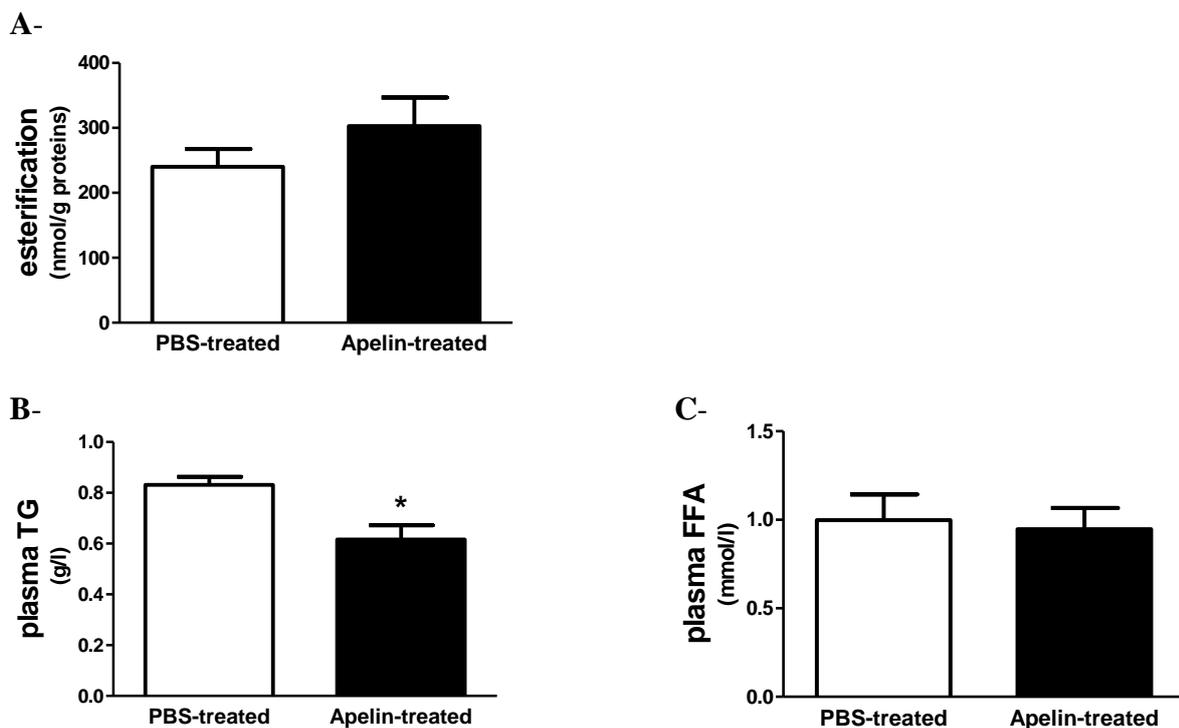
Par contre, un traitement chronique par l'apeline entraîne une augmentation de l'oxydation du palmitate dans le muscle soléaire des souris traitées. En effet, des souris normopondérales ont été traitées quotidiennement à l'apeline injectée par voie ip à la même dose que celle utilisée par Higuchi ( $0,1 \mu\text{mol/kg/j}$ ) pendant 8 ou 28 jours. L'oxydation du palmitate a été mesurée sur des souris à jeun pour le traitement de 8 jours alors que les souris étaient en condition nourrie pour le traitement de 28 jours (figure 28). Les souris à jeun traitées au PBS ont une oxydation des AG beaucoup plus élevée que les souris à l'état nourris. De plus, l'effet de l'apeline est plus marqué chez les souris à l'état nourri et traitées pendant 28 j (stimulation par l'apeline de 1.68 pour 8 jours de traitement et de 2 pour 28 jours de traitements).

Ainsi, pour la suite de nos travaux, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un traitement de 28 jours à l'apeline sur des souris nourries.



**Figure 29 : Effet d'un traitement chronique par l'apeline pendant 8 jours (à gauche) ou 28 jours (à droite) sur l'oxydation du palmitate dans le muscle soléaire isolé.** Les valeurs représentées sont des moyennes  $\pm$  esm. n = 4 - 6. \*  $p \leq 0.05$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Parallèlement à l'augmentation de l'oxydation du palmitate, l'apeline ne modifie pas son stockage (estérification) dans le muscle soléaire (figure 29A) de souris. De plus, nous avons pu montrer qu'un traitement de 28 j à l'apeline diminue la concentration plasmatique de TG (figure 29A) sans modifier les AG circulants (figure 29C) comme lors d'un traitement de 14 jours utilisé dans les travaux d'Higuchi (Higuchi). Comparativement à cette étude, nous n'avons pas observé de modification du poids des souris traitées à l'apeline, ni de diminution du poids des dépôts adipeux contrairement aux résultats obtenus par Higuchi (Higuchi, Masaki et al. 2007).



**Figure 30 : Effet d'un traitement chronique par l'apeline pendant 28 jours sur l'estérification du palmitate dans le muscle soléaire isolé (A) et sur la concentration plasmatique en TG (B) et AG (C) à la fin du traitement. Les valeurs représentées sont des moyennes  $\pm$  esm. n = 6. \*  $p \leq 0.05$ .**

Ainsi, un traitement chronique de 28 jours par l'apeline favorise l'utilisation des AG plutôt que leur stockage dans le muscle squelettique chez des souris en régime standard. Ce même traitement à l'apeline pourrait s'avérer bénéfique si l'utilisation des lipides est maintenue dans un contexte d'insulino-résistance. Ainsi, nous avons étudié les conséquences d'un

traitement chronique par l'apeline sur le métabolisme lipidique musculaire ainsi que sur la sensibilité à l'insuline chez des souris obèses et insulino-résistantes.

## **B. Effet d'un traitement chronique par l'apeline chez des souris obèses et insulino-résistantes**

Pour étudier l'effet d'un traitement chronique par l'apeline dans un contexte d'insulino-résistance, des souris ont été nourries par un régime riche en lipides dès la 10<sup>ème</sup> semaine d'âge puis, lorsque ces souris étaient insulino-résistantes (après environ 14 semaines de régime), elles ont été traitées avec l'apeline pendant 28 jours.

Deux protocoles différents de traitement chronique par l'apeline ont été mis en place. Le premier a consisté à injecter l'apeline ou son véhicule (PBS) quotidiennement par voie ip comme décrit précédemment. Par la suite, nous avons testé un autre mode de traitement, à savoir une infusion chronique d'apeline par une minipompe Alzet<sup>®</sup> implantée dans la cavité péritonéale et délivrant en continu l'apeline ou le PBS dans la cavité abdominale pendant 28 j. En parallèle, des souris en régime standard du même âge que les souris nourries par le régime hyperlipidique ont également été traitées ou non à l'apeline, lors de ces deux protocoles de traitement.

### ***1. Traitement quotidien par voie ip***

Le métabolisme énergétique a été étudié à la fois *in vivo* par la mesure de l'utilisation des substrats par calorimétrie indirecte, et *ex vivo*, par la mesure de l'oxydation des AG et de leur stockage dans le muscle soléaire isolé. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'accumulation de dérivés lipidiques tels que les DG et les céramides est délétère pour la voie de signalisation de l'insuline. De plus, l'oxydation incomplète des AG entraîne une augmentation de différentes formes d'acylcarnitines dans le muscle et ceci est associé à la mise en place de l'insulino-résistance (Koves, Ussher et al. 2008). Ainsi, nous avons mesuré l'oxydation complète et incomplète du palmitate dans le muscle soléaire, mais aussi le contenu en acylcarnitines ainsi que la quantité de DG et de céramides stockés dans ce muscle. Enfin, le transport basal de glucose ou stimulé à l'insuline ainsi que des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont été effectués pour évaluer la sensibilité à l'insuline.

En parallèle à cette étude, le métabolisme énergétique a également été évalué sur des souris invalidées pour l'apeline et nourries par un régime hyperlipidique. Yue et ses collaborateurs ont montré récemment que ces souris, nourries par un régime hyperlipidique, présentent une insulino-résistance exacerbée par rapport à des souris sauvages (Yue, Jin et al.). Cependant, dans cette étude, aucune mesure du métabolisme énergétique n'ayant été effectuée, nous avons mesuré l'utilisation des substrats *in vivo* et *ex vivo*.

**Article 2 : Apelin treatment increases fatty acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice.** (article en soumission)

## **Apelin treatment increases fatty acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice**

Attané C<sup>1,2</sup>, Foussal C<sup>1,2</sup>, Le Gonidec S<sup>1,2</sup>, Benani A<sup>3</sup>, Daviaud D<sup>1,2</sup>, Wanecq E<sup>1,2</sup>, Guzman-Ruiz<sup>4</sup> R, Dray C<sup>1,2</sup>, Bezaire V<sup>1,2</sup>, Rancoule C<sup>1,2</sup>, Kuba K<sup>5</sup>, Ruiz-Gayo M<sup>4</sup>, Levade T<sup>1,2</sup>, Penninger J<sup>5</sup>, Burcelin R<sup>1,2</sup>, Pénicaud L<sup>3</sup>, Valet P<sup>1,2</sup> and Castan-Laurell I<sup>1,2</sup>

1. Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, I2MR Inserm U858.
2. Université Paul Sabatier, IFR150 BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4
3. Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 6265-CNRS 13241-INRA, Université de Bourgogne 21000 Dijon
4. Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación, University of CEU-San Pablo 28668 Madrid
5. IMBA, Institute of Molecular Biotechnology, Dr. Bohr-Gasse 3, 1030 Vienna, Austria

### **Corresponding author:**

Isabelle Castan-Laurell, I2MR, IFR 150, 1 Ave J. Poulhès

BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France.

Email: [isabelle.castan@inserm.fr](mailto:isabelle.castan@inserm.fr)

tel: (33) 5 61 32 56 35, fax: (33) 5 61 32 56 23

**Abstract :**

In obese and insulin-resistant mice both acute and chronic apelin treatment has been shown to improve insulin sensitivity. However, whether apelin affects lipid metabolism during obesity-related insulin resistance has not yet been addressed. The aim of the present study was thus to determine the impact of chronic apelin treatment on lipid utilization with focus on fatty acid oxidation (FAO) in skeletal muscle. In vivo experiments demonstrated that high-fat diet (HFD)-induced obese and insulin-resistant mice treated chronically with apelin (0.1  $\mu\text{mole/kg/d}$ ) had decreased fat mass, plasma levels of triglycerides, glycemia, were protected from hyperinsulinemia and had improved glucose and insulin tolerance compared to HFD PBS-treated mice. The respiratory exchange ratio was significantly lower during the feeding period compared to control mice, suggesting an enhanced utilization of lipids. Ex vivo experiments in soleus muscle of HFD fed mice confirmed that chronic apelin treatment increased the complete oxidation of [ $^{14}\text{C}$ ] palmitate but also the oxidative capacity of the mitochondrial respiratory chain. In addition, citrate synthase activity as well as the expression of oxidative markers such as PGC1 $\alpha$ , UCP3 and CPT1 were increased. Finally, the chronic apelin-induced oxidative capacity led to decreased levels of acylcarnitines and enhanced insulin-stimulated glucose uptake in soleus muscle of HFD fed mice. Thus, by promoting complete lipid utilization in muscle of insulin-resistant mice through mitochondrial biogenesis and a tighter matching between FAO and the Krebs cycle, chronic apelin could contribute to the observed amelioration of insulin sensitivity.

## **Introduction**

Apelin is a circulating peptide, present in different tissues but also produced and secreted by human and mouse adipocytes (Boucher, Masri et al. 2005). Apelin was identified as the endogenous ligand of the ubiquitously expressed G-protein coupled receptor named APJ (Tatemoto, Hosoya et al. 1998). The apelin/APJ system exerts a large number of physiological roles including regulation of fluid homeostasis, cardiovascular, immune and gastrointestinal functions (for review (Carpene, Dray et al. 2007)). Recently, a role of apelin/APJ in energy metabolism has also emerged. Acute and chronic apelin treatment has been shown to regulate glucose homeostasis (Yue, Jin et al. ; Dray, Knauf et al. 2008). Beneficial effects of acute intravenous injection of apelin were observed in chow-fed mice on glucose uptake especially in skeletal muscle through an AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent pathway (Yue, Jin et al.). Interestingly, obese and insulin-resistant mice, exhibiting higher plasma apelin concentration than chow-fed mice (Dray, Debard et al.), benefit from an acute apelin treatment since glucose tolerance was improved and glucose uptake increased in muscles during an euglycemic-hyperinsulinemic clamp (Yue, Jin et al.). Chronic apelin treatment ameliorates also insulin sensitivity in young db/db mice (Yue, Jin et al.). Conversely, apelin KO mice develop insulin resistance especially when fed a high-fat diet (HFD) (Yue, Jin et al.). Altogether, these studies support a physiological role for apelin in the regulation of glucose homeostasis.

Chronic apelin treatment also decreases lipid storage in adipose tissue since a reduction of triglycerides in different fat depots has been observed in both chow- and HFD-fed mice (Higuchi, Masaki et al. 2007). Paradoxically, acute apelin has been shown very recently to inhibit lipolysis in isolated adipocytes of wild-type mice (Yue, Jin et al.). The fate of lipids mobilized by chronic apelin treatment in obese and insulin resistant mice is thus still

unclear. Particularly, the role of apelin on fatty acid oxidation (FAO) has not yet been addressed.

In order to understand the impact of apelin on lipid metabolism, the study was designed on both in vivo and ex vivo approaches in obese and insulin resistant mice chronically treated (or not) with apelin. Our data show that in obese and insulin resistant mice, chronic apelin treatment improved in vivo insulin sensitivity, decreased fat mass and that the main whole body substrate oxidized were lipids. Ex vivo, in muscle of insulin resistant mice, apelin treatment increased complete FAO and oxidative phosphorylation through complexes II and V activity and their protein levels. Moreover, the increased citrate synthase activity as well as the up-regulated expression of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) co-activator-1  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), support an activation of mitochondrial biogenesis. Finally, in insulin resistant muscle of apelin-treated mice, acylcarnitines levels were decreased and insulin-stimulated glucose uptake was increased. Thus, chronic apelin treatment has a beneficial effect both in vivo and on skeletal muscle metabolism during insulin resistance by promoting complete lipid utilization through mitochondrial biogenesis and a tighter matching between FAO and the Krebs cycle.

## RESULTS

**Effect of chronic apelin treatment in vivo in HFD fed mice.** HFD fed mice were obese and insulin resistant before apelin treatment compared to normal chow (ND) fed mice (table 1). HFD apelin-treated mice do not exhibit modification of total body weight compared to PBS-treated HFD mice but had significantly reduced adiposity and plasma levels of triglycerides (TG) whereas FFA levels were not modified (table 1). They had significant lower blood glucose at the end of the treatment and were protected from the increased insulinemia observed in PBS-treated HFD mice (figure 1A). Moreover, chronically apelin-treated mice were significantly more responsive to glucose and insulin at the end of the treatment suggesting that apelin treatment improves whole body insulin sensitivity (figure 1B, 1C). In order to determine whether this improvement of insulin sensitivity was due to a change in substrate utilization, indirect calorimetry was performed at the end of the apelin treatment.

During the 24h experiment, food intake (HFD PBS-treated:  $2.99 \pm 0.3$  g vs HFD apelin-treated:  $2.68 \pm 0.45$  g) and physical activity (HFD PBS-treated:  $91 \pm 15$  vs HFD apelin-treated:  $72 \pm 19$  Beam brks/day) were not modified between HFD PBS- and apelin-treated mice. Oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) and energy expenditure tended to increase with apelin whereas VCO<sub>2</sub> values were similar (table 1). However, HFD apelin-treated mice clearly exhibited a lower RER especially during the feeding period (dark cycle) compared to HFD PBS-treated mice (figure 2A, 2B), indicative of a higher utilization of lipid as an oxidative fuel to provide energy. These results were confirmed by calculating lipid and glucose oxidation in the same experiments. During the feeding period, the amount of lipid oxidized was increased while the amount of glucose oxidized was decreased in HFD apelin-treated mice (figure 1C).

In order to determine the impact of apelin on whole-body substrate utilization *per se*, indirect calorimetry was performed on apelin-deficient (apelin<sup>-/-</sup>) mice fed a HFD. Apelin<sup>-/-</sup>

mice were shown to have increased fat mass (Yue, Jin et al.) and to be insulin resistant when exposed to high-fat chow and high-sucrose-drinking water for 3 weeks (Yue, Jin et al.). In the present study, apelin<sup>-/-</sup> mice fed a HFD for 12 weeks also had increased fat mass ( $39.41 \pm 1.71$  g n= 9 vs  $35.05 \pm 0.88$  g in WT HFD mice n= 12, P< 0.001) and were insulin resistant (AUC for ITT:  $8814.2 \pm 256.7$  vs  $6200 \pm 439.6$  AU in WT HFD mice n= 12, P< 0.0001). The RER of HFD apelin<sup>-/-</sup> mice was not decreased during the light period and was similar to HFD WT mice during the dark period (figure 3A, 3B). This translated to increased glucose oxidation and decreased lipid oxidation during the light period in HFD apelin<sup>-/-</sup> mice compared to HFD WT mice (Figure 3C).

**Effect of chronic apelin treatment in HFD mice on ex vivo skeletal muscle lipid metabolism.** Since more lipids were used in whole body organism of HFD apelin-treated mice, lipid metabolism in skeletal muscle was studied. Increased levels of TG in muscle (IMTG) and diacylglycerol (DAG) are thought to induce insulin resistance (for review see (Kim, Wei et al. 2008)). Indeed, muscle homogenates of HFD compared to ND mice contained higher levels of DAG (values ND:  $11.98 \pm 2.74$  nmole/mg protein, n= 5; values HFD:  $84.03 \pm 10.97$  nmole/mg protein, n= 7) and IMTG (values ND:  $163.7 \pm 41.4$  nmole/mg protein, n= 5; values HFD:  $182.3 \pm 23.2$  nmole/mg protein, n= 7). However, apelin treatment in HFD mice was unsuccessful in reducing the amount of IMTG and DAG when compared to PBS-treatment (figure 4A). Apelin treatment also had no effect on the rate of palmitate incorporation into TG (figure 4B). To further investigate the fates of lipids, both complete and incomplete oxidation of [<sup>14</sup>C]palmitate were assessed in HFD insulin resistant mice. Chronic apelin treatment significantly increased complete oxidation of [<sup>14</sup>C]palmitate to CO<sub>2</sub> when compared to PBS treatment (figure 4C). This effect was abolished in HFD apelin<sup>-/-</sup> mice

( $243.5 \pm 9.6$  vs  $198.4 \pm 59.9$  nmol CO<sub>2</sub> released / g protein in apelin<sup>-/-</sup> mice, n= 3-4).

Interestingly, incomplete oxidation, corresponding to radiolabelled incorporation into acid soluble metabolites (ASM), was not significantly increased by chronic apelin treatment (figure 4C). Altogether, these results show that apelin treatment promotes complete FAO rather than accumulation of TG or partially oxidized fatty acids in skeletal muscle of obese and insulin resistant mice.

Of note, the HFD alone did not significantly affect complete FAO compared to ND ( $160 \pm 14$  nmol vs  $166 \pm 22$  CO<sub>2</sub> released /g protein in ND mice). However in apelin-treated ND fed mice, the complete oxidation was also increased compared to control ( $166 \pm 22$  vs  $261 \pm 39$  14 nmol CO<sub>2</sub> released / g protein n= 10, P< 0.05 in apelin-treated mice). This effect was dependent on AMPK activation since it was abolished in muscle of inactivated AMPK mice (DN AMPK) when chronically treated with apelin, ( $164 \pm 23$  vs  $156 \pm 23$  nmol CO<sub>2</sub> released / g protein, n= 6-10 in DN-AMPK apelin-treated mice).

**Effect of chronic apelin treatment in HFD mice on muscle mitochondrial activity.** To get further insight toward the effect of apelin in mitochondrial energy metabolism during insulin resistance, mitochondrial respiration was first assessed on freshly permeabilized muscle fibers. The state 2, corresponding to the activation of the complex 2 by succinate, was increased in soleus of HFD apelin-treated mice, indicating that the respiratory capacity was increased for coenzymes derived from FAO which reach complex II (Figure 5A). Moreover, the state 3 respiration, driven by further addition of saturating concentration of ADP, was also significantly increased in HFD apelin-treated mice (Figure 5A). This shows that the capacity of the oxidative phosphorylation was increased after apelin treatment. Protein expression of the five complexes of the respiratory chain was then measured and significant increases of complex II, III and V were observed in HFD apelin-treated mice (figure 5B). In addition, an

increase of citrate synthase activity, a quantitative marker of intact mitochondria content, was also found in muscle homogenates of HFD apelin-treated mice compared to control ( $2.62 \pm 0.02$  vs  $2.91 \pm 0.07$   $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  proteins.,  $n= 7-9$   $P < 0.001$ ). The increased mitochondrial respiratory function, together with its enzymatic content, suggests mitochondrial biogenesis in response to chronic apelin treatment. To verify this hypothesis, expression of different genes involved in this process was thus measured by qPCR (figure 5C) in soleus muscle. PGC1 $\alpha$ , a transcriptional co-activator mediating mitochondrial biogenesis (Lin, Handschin et al. 2005) was significantly increased in muscle of HFD apelin-treated mice. UCP3, known to increase with muscle mitochondrial content and enhanced FAO (Jones, Baar et al. 2003), was also significantly increased as well as the expression of CPT1 $\beta$ , the enzyme catalyzing the rate-limiting step in mitochondrial FAO. The up-regulation of PGC1 $\alpha$  expression in response to apelin treatment strongly suggests that mitochondrial biogenesis was increased in skeletal muscle from insulin resistant mice.

**Chronic apelin treatment in HFD mice improves muscle insulin sensitivity.**

Acylcarnitines represent by-products of substrate catabolism arising from incomplete FAO and ranging in size from 2 to 22 carbons. Increased acylcarnitines levels have been shown to be associated with obesity and insulin resistance (Mihalik, Goodpaster et al. ; Koves, Ussher et al. 2008). Acylcarnitines can cross the mitochondrial membrane and thus skeletal muscle could be a major reservoir for these species (Koves, Ussher et al. 2008). Long-chain acylcarnitines were elevated in homogenates of soleus muscle from HFD insulin-resistant mice compared to ND control mice (figure 6A). Interestingly, in HFD apelin-treated mice, acylcarnitines levels, especially C16:1 and C18:1 species, were reduced when compared to HFD PBS-treated mice. These results may explain the lack of increase incomplete oxidation observed in HFD apelin-treated mice (Figure 4C).

Since chronic apelin treatment increased complete but not incomplete FAO, we hypothesized that the resulting lower levels of acylcarnitine in muscle would correlate with improved insulin sensitivity. We measured glucose uptake stimulated by insulin in soleus muscle. As expected, insulin weakly stimulated glucose uptake (1.46 fold) in isolated muscle of HFD mice (figure 6B) compared to ND mice of the same age ( $462 \pm 41$  vs  $248 \pm 20$  pmol/mg protein/min in HFD mice,  $n = 5$ ). In isolated muscle of apelin-treated mice, insulin-stimulated glucose uptake was significantly increased by 2.4 fold (Figure 6B). Thus, the increased insulin sensitivity previously observed in vivo (Figure 1C) in response to apelin treatment was also observed at the skeletal muscle level and correlated with lower levels of acylcarnitines.

## **Discussion**

Insulin resistance is a major metabolic abnormality leading to type 2 diabetes. There is considerable interest in the discovery of insulin-sensitizing agents and in the development of new strategies or better treatment. The present study shows for the first time that chronic apelin treatment, in skeletal muscle of obese and insulin-resistant mice, increases complete FAO and mitochondrial respiratory capacity. These processes appear to be attributed to an increase in mitochondrial biogenesis displayed as increased protein content of mitochondrial complexes II and V, increased UCP3 and CPT1 expression as well as increased citrate synthase activity; the overall being driven by increased PGC1 $\alpha$  expression. The influx of lipid in the mitochondria was associated with decreased acylcarnitine levels suggesting a tighter coupling between beta-oxidation and the Krebs cycle. Such a tighter coupling appears important to improve insulin sensitivity. Indeed, apelin treatment in obese and insulin-resistant mice improved insulin-stimulated glucose transport in muscle. Increased FAO in muscle and decreased total adiposity could contribute to the overall improvement of insulin sensitivity observed with chronic apelin treatment.

The desired fate of fatty acids in skeletal muscle to reduce insulin resistance is a matter of debate. Most studies suggest that insulin resistance develops as a consequence of diminished FAO. Instead of being addressed to the mitochondria, fatty acids are esterified and accumulate as DAG involved in the induction of insulin resistance (Morino, Petersen et al. 2006; Turner and Heilbronn 2008). More recently, it has also been suggested that excessive rather than reduced FAO is linked to insulin resistance and that an overload of fatty acids in the mitochondria could exert insulin-desensitizing effects (Koves, Ussher et al. 2008) through lipid-induced mitochondrial stress. This is thought to result from high rates of incomplete FAO during which partially degraded fatty acids accumulate as acylcarnitines. Increased levels of acylcarnitines have already been proposed as markers of insulin resistance (Koves,

Ussher et al. 2008). Altogether, these studies indicate that the development of insulin resistance can be limited by increasing complete FAO and decreasing incomplete FAO. In the present study, HFD did not significantly modify FAO compared to age-matched ND control mice but apelin treatment increased only complete oxidation. These results suggest that in muscle of HFD insulin-resistant mice treated with apelin, the lipids available to mitochondria do not exceed the capacity for their oxidation.

Impaired fuel oxidation could be attributed to mitochondrial dysfunction, a key factor contributing to insulin resistance (Morino, Petersen et al. 2006). Several factors have been shown to contribute to mitochondrial dysfunction including genetic factors, age, hyperglycemia, and fatty acid overload (Kim, Wei et al. 2008). Interestingly in this study, the oxidative phosphorylation (OXPHOS) in mitochondria of HFD apelin-treated muscle was increased suggesting that apelin treatment decreases insulin resistance-associated mitochondrial dysfunction. The oxidative capacity of mitochondria can be determined in different means such as the expression level of OXPHOS subunits, the number and size of mitochondria. Here, apelin treatment was shown to increase protein expression of complexes II, III and V likely as a consequence of increased mitochondrial biogenesis. It was previously shown that rats fed a standard chow and treated with apelin for two weeks had increased mitochondrial content and PGC1 $\beta$  expression in tricep muscle (Frier, Williams et al. 2009). PGC1 proteins are transcriptional co-activators, considered key regulators of mitochondrial biogenesis and function (Lin, Handschin et al. 2005; Muoio and Koves 2007). Insulin resistance associated to obesity has been shown to decrease of PGC1 $\alpha$  expression (Mootha, Lindgren et al. 2003; Patti, Butte et al. 2003; Koves, Li et al. 2005). The present study shows that apelin treatment of insulin-resistant mice increased PGC1 $\alpha$  expression in an oxidative muscle. Different studies have shown that PGC1 $\alpha$  plays an important role in regulating mitochondrial biogenesis and increased PGC1 $\alpha$  expression in muscle has also been reported

to coincide with a shift from incomplete to complete FAO (Koves, Li et al. 2005; Muoio and Koves 2007). In other words, increased PGC1 $\alpha$  expression enables tighter coupling between  $\beta$ -oxidation and the tricarboxylic acid cycle.

CPT1, the enzyme responsible for the rate-limiting entry of FA into the mitochondria, plays an important role in the FAO regulation. A physiological overexpression of CPT1 in skeletal muscle was shown to increase FAO and to prevent HFD-induced fatty acid esterification into intracellular lipids (Bruce, Hoy et al. 2009). This resulted in enhanced muscle insulin sensitivity (Bruce, Hoy et al. 2009) independently of changes in intracellular lipid content (Perdomo, Commerford et al. 2004). Thus, the observed increase in CPT1 expression in response to chronic apelin treatment most likely promotes the entry of fat into the mitochondria and subsequent oxidation. Increased UCP3 expression has also been associated to a better use of lipids. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels (just over 2-fold) has been shown to decrease RER and to increase mouse skeletal muscle capacity for FA transport and oxidation (Bezaire, Spriet et al. 2005). UCP3 was then proposed as a FA anion exporter leading to highest rates of FAO (Bezaire, Spriet et al. 2005) but a more recent study shows that UCP3 has a role in mitochondrial adaptation of FAO to fasting (Seifert, Bezaire et al. 2008). In the present study, UCP3 expression was significantly increased in muscle of HFD apelin-treated mice. Up-regulation of UCP3 expression in skeletal muscle has been observed after chronic apelin treatment in chow-fed mice (Higuchi, Masaki et al. 2007). Increased expression of both CPT1 and UCP3 could contribute directly, or indirectly through increased mitochondrial biogenesis, to enhanced FAO.

In this study, accentuated FAO was not only observed in skeletal muscle but also when measured *in vivo*. The experiments of indirect calorimetry show a decreased RER during the dark period (corresponding to feeding period) in HFD apelin-treated mice and thus a better use of lipids. Interestingly, in HFD apelin<sup>-/-</sup> mice, the RER was increased during the

light period compared to WT HFD mice suggesting that these mice are unable to use more lipids during this period. This could contribute to the increased adiposity observed in apelin<sup>-/-</sup> mice. By contrast, a better oxidation of lipids in vivo in HFD apelin-treated mice during the dark period could be in line with the observed decreased adiposity. In addition to increased FAO, imbalance in energy intake versus expenditure could also contribute to the reduced obesity of apelin-treated mice. However, this does not seem to be the case since food intake, energy expenditure and physical activity were not significantly different between HFD PBS- and apelin-treated mice during indirect calorimetry experiment.

Several events could thus contribute to the improved insulin sensitivity seen in HFD apelin-treated mice. It is already known that apelin<sup>-/-</sup> mice are insulin resistant, a condition which can be reversed by a two-week apelin treatment (Yue, Jin et al.). Our results are in agreement with those findings. Indeed, we observed not only an overall insulin sensitivity but also an increased insulin-stimulated glucose uptake in soleus muscle. Moreover, chronic apelin treatment prevented hyperinsulinemia and reduced hyperglycemia in HFD mice. Plasma TG levels were decreased at the end of treatment in agreement with the data of Higuchi et al (Higuchi, Masaki et al. 2007). Thus, apelin treatment could affect insulin sensitivity secondary to decreased adiposity but also by acting directly on skeletal muscle. It is likely that chronic apelin treatment improves insulin-stimulated glucose uptake as a result of increased FAO and limited accumulation of fatty acid intermediates. Total DAG and IMTG levels were not modified after apelin treatment in obese and insulin resistant mice. Improved insulin action in muscle has been observed after exercise intervention without modification of DAG levels (Bruce, Kriketos et al. 2004). As previously suggested, the oxidative capacity in muscle might be a better predictor of insulin sensitivity than TAG or DAG content (Bruce, Kriketos et al. 2004). Finally, long chain species of acylcarnitines were decreased in muscle of apelin-treated mice. Even if their mode of action is not well known, lower levels of

acylcarnitines were shown to be accompanied by the reversal of HFD-induced glucose intolerance (Koves, Li et al. 2005).

In conclusion, chronic apelin treatment triggers an amelioration of both lipid and glucose metabolism. Even though obese and insulin-resistant mice have enhanced plasma apelin compared to ND mice, adding a bolus of exogenous apelin is beneficial. Since mitochondrial dysfunction is now considered a central event in whole body metabolic dysregulation with regards to type 2 diabetes, apelin treatment appears as an attractive therapeutic tool. Chronic apelin treatment optimizes muscle mitochondrial performance through increased mitochondrial biogenesis and a tighter matching between FAO and the Krebs cycle.

## **Methods**

**Animals.** Mice were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM). C57Bl6/J wild type mice were obtained from Harlan (Gannat, France). Apelin-deficient mice were kindly provided by the laboratory of Pr. Penninger (Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna Austria) and mice deficient in muscle AMPK activity (DN AMPK), were kindly provided by the laboratory of Pr. Birnbaum (University of Pennsylvania Medical School, Philadelphia, USA). Mice were housed conventionally in a constant temperature (20-22°C) and humidity (50-60%) animal room, with a 12/12h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) and free access to food and water. The C57Bl6/J mice were fed a normal chow diet (ND) from weaning until 10-week-old and then either maintained on ND (control group) or fed a HFD containing 20% protein, 35% carbohydrate and 45% fat (Research Diet, NJ). HFD-fed mice were followed at regular intervals with measure of body weight and blood parameters (glucose and insulin) until they were obese and insulin resistant. Apelin treatment began after the onset of insulin resistance in 23 weeks-old males. Mice were injected daily with intraperitoneal (ip) injection of apelin (0.1 mmole/kg/day) as previously described (Higuchi, Masaki et al. 2007) for 28 days. Age-matched control mice were PBS-injected during the same period. DN AMPK mice were also treated daily with ip injection of PBS or apelin (0.1 mmole/kg/day) for a period of 28 days. All mice were sacrificed 24h after the last apelin ip injection in a fed state. Plasma apelin concentrations, measured after a bolus of ip apelin (0.1 mmole/kg) in HFD mice, were increased just over 2.5 fold 10 min after injection.

**Body fat mass composition.** To determine fat and lean mass, mice were placed in a clear plastic holder without anesthesia or sedation and inserted into the EchoMRI-3-in-1 system

from Echo medical systems (Houston, TX, USA). Total body fat and lean mass were measured before (day 0) and at the end of the treatment (day 28) in apelin and PBS-injected mice and whole body fat gain was calculated.

**Plasma measures.** Plasma FFA and TG were determined in the fed state at the end of the treatment (day 28) in 5µl of plasma collected from the tail blood, by an enzymatic colorimetric technique with the Wako NEFA kit (Wako Chemicals) and the PAP 150 Kit respectively (Biomerieux). Plasma insulin concentrations were determined at the end of the treatment in the fasted state in 5µl of plasma collected from tail blood using an ELISA Kit (Merckodia, Uppsala, Sweden). Fasted glycemia was measured on blood from the tail vein with a gluco-meter (Accu-check Actine, Roche).

**Glucose and insulin tolerance tests.** These tests were performed before the treatment to assess insulin resistance and one week before the end of the treatment. Mice were fasted for 6 hr during the dark period and were then ip injected with glucose (1g/kg) and blood glucose levels from the vein tail were monitored over time using an Accu-check II glucometer (Roche Diagnostics) as previously described (4). For insulin tolerance test (ITT), mice were injected with insulin (0.75 U/kg) and blood glucose levels were measured as in GTT.

**Whole body indirect calorimetry.** Indirect calorimetry was performed between the third and the fourth week of treatment following 24h of acclimatization. VO<sub>2</sub> and carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>) were measured (oxylet, Panlab-Bioseb, Vitrolles, France) in individual mice at 25 min interval during a 24h period. The respiratory exchange ratio (RER = VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) was measured. Energy expenditure (EE in kcal/day/kg<sup>0.75</sup> = 1.44 x VO<sub>2</sub> x (3.815 + 1.232 x RER), glucose oxidation (in g/min/kg<sup>0.75</sup> = [(4.545\*VCO<sub>2</sub>)-(3.205\*VO<sub>2</sub>)]/1000)

and lipids oxidation (in  $\text{g/min/kg}^{0.75} = [1.672 \cdot (\text{VO}_2 - \text{VCO}_2)]/1000$ ) were calculated. Ambulatory activities of the mice were monitored by an infrared photocell beam interruption method (sedacom, Panlab-Bioseb).

**Palmitate oxidation and esterification.** Palmitate oxidation was determined as previously described in whole soleus muscle (Smith, Bruce et al. 2005; Bruce and Febbraio 2007). Muscles were harvested during sacrifice at the end of the treatment (fed state). The muscle were placed in 20 ml glass reaction vial containing 2.5 ml of warmed ( $37^\circ\text{C}$ ), pre-gazed (95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ , pH 7.4), modified Krebs-Henseleit buffer containing 1.5% FA-free BSA, 5mM glucose, 1mM palmitate and  $0.5\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{14}\text{C}$ ]palmitate (Perkin Elmer) for 60 min. At the end of the incubation, muscle was removed and placed in a tube containing 800 $\mu\text{l}$  of lysis buffer. A 0.5ml microtube containing 300 $\mu\text{l}$  of benzethonium hydroxide (Sigma) was placed in the vial to capture the  $^{14}\text{CO}_2$ . The incubation buffer was then acidified with 1ml of 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and the vial was quickly sealed with parafilm. After 120 minutes, the microtube was removed and placed in a scintillation vial and the radioactivity, corresponding to complete oxidation, was counted (cytoscint. MP Biomedicals).

To determine the incomplete oxidation, ASM and palmitate incorporation into intramuscular lipid pools were measured. Soleus muscle was homogenized with Precellys (Ozyme, France) in 800 $\mu\text{l}$  of lysis buffer. 500 $\mu\text{l}$  of this homogenate were placed into glass tubes containing 2.5 ml of 2:1 chloroform-methanol (vol:vol). Samples were then shaken for 10 min and 1.2 ml of 2M KCl-HCL was added. Samples were still shaken for 10 min and centrifuged at 2500g for 10min. The aqueous phase (500 $\mu\text{l}$ ) was quantified by liquid scintillation to determine the ASM production.

In order to measure palmitate esterification, organic phase was then transferred in a clean tube and 200 $\mu\text{l}$  of this phase were evaporated under a stream of  $\text{N}_2$  and redissolved in 44 $\mu\text{l}$  of lipid

mix (40µl chloroform-methanol (2 : 1), lipid standard (mono-, di-, triglycerides mix, Sigma chemical and 1µl of oleic acid) to facilitate identification of lipid bands on the silica gel plates. 20µl of each sample were spotted onto a silica gel plate which was placed in a sealed tank containing solvent (60:40:3 heptane-isopropyl ether-acetic acid) for 40 min. Plates were then removed and placed in another tank containing iodine to reveal the individual lipid bands. These bands were scraped into vials for liquid scintillation counting.

**O<sub>2</sub> consumption measurement on mitochondria.** Oxygen consumption was measured on fresh permeabilized fibers prepared from soleus skeletal muscle, at the end of the treatment, using a respirometer (Oxygraph-2k; Oroboros instruments, Innsbruck, Austria) as previously described (Knauf, Cani et al. 2008; Benani, Barquissau et al. 2009). Measurements were taken at 30°C with continuous stirring (750 rpm) in a saline buffered medium (pH 7.1) containing 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 mM sucrose and 1 g/l BSA. Complex I was blocked by addition of 5 µM rotenone. Thereafter, state 2 of respiration was obtained after addition of 10 mM succinate. State 3 of respiration was obtained after further addition of 10 mM ADP. Oxygen consumption for each state was calculated using DataGraph software.

**Citrate synthase assay.** In order to quantify mitochondria density, citrate synthase activity was measured on frozen soleus muscle as previously described (Bezaire, Bruce et al. 2006). Briefly, muscle were homogenized (10mg of tissue/500µl of buffer) on ice with a potter in buffer containing 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.05% BSA (pH 7.3 at 4°C) and then centrifuged (800g for 10 min). A small volume of supernatant (10 µl) was then plated and assay buffer was added (150µl of 100 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) as well as DNTB, 2 µl of 30

mM acetyl CoA. The reaction was initiated by the addition of 10  $\mu$ l of 10 mM oxaloacetic acid and the 96 well plates were read at 412 nm for 5 minutes.

**Determination of skeletal muscle acylcarnitines, diacylglycerol and triglycerides levels.**

*Acylcarnitines:* On the same homogenates prepared to measure citrate synthase activity, part of lysates (20 $\mu$ L) was spotted on Whatman filter membranes (Protein Saver 903 cards). The dried spots were then treated as reported (Chace, Hillman et al. 1997). Briefly, acylcarnitines were derivatized by addition of butanolic HCl, and treated with the reagents of the Neogram MS-AAAC # 8970EY (Perkin-Elmer) kit, which contains the deuterated internal standards. Free carnitine and acylcarnitines were quantified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Data were acquired using a Micromass Quattro Micro API spectrometer equipped with a 2795 HPLC module, and a data system controlled by MassLynx 4.1 operating system (Waters, Millford, MA).

*Lipid profile:* Muscles (5-10 mg) were homogenized in 2ml of methanol/ 5mM EGTA (2:1 v/v) with FAST-PREP (MP Biochemicals). 100  $\mu$ l were evaporated, the dry pellets were dissolved in 0.1 ml of NaOH (0.1M) overnight and proteins were measured with the Bio-Rad assay. Neutral lipids (TG and DAG) corresponding to 0.9 ml of the homogenate were extracted according to Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959) in chloroform/methanol/water (2.5 :2.5 :2.1, v/v/v), in the presence of the internal standards. Chloroform phase was evaporated to dryness. Neutral lipids were separated over SPE column (Macherey Nagel glass Chromabond pure silice, 200mg) : after washing cartridge with 2ml of chloroform, crude was applied on the cartridge in 20 $\mu$ l of chloroform, and neutral lipid were eluted with chloroform:methanol (9:1, v/v ;2ml). The organic phase were evaporated to dryness, and dissolved in 20 $\mu$ l of ethyl acetate. 1 $\mu$ l of the lipid extract was analyzed by gas-liquid

chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using an Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5m X 0,32mm i.d, 0.50 µm film thickness) (Barrans, Collet et al. 1994).

**Western blot analysis.** Muscle samples were lysed (Pecelllys, Ozyme France) and loaded (50 µg protein per lane) on a 4-12% Criterion/XT gel (BioRad) and transferred to nitrocellulose membrane (Schleicher-Schuell). After blocking with 5% non fat milk in Tris-buffered saline with 0.1% tween, membranes were probed in 5% BSA with 1/1000 of mouse anti-OXPPOS (Mitosciences, Euromedex, France). AC III/3000 in 5% milk was used as a secondary antibody and then membranes were stripped and reprobred with β-actin antibody for total proteins. Immunoreactive proteins were detected using the ECL Plus (GE Healthcare, UK) and quantified by Image Quant TL software (GE Healthcare Bio-sciences, Sweden).

**Protein assay.** Concentration of samples was determined using the DC protein assay kit (biorad, France) according to the manufacturer's instructions.

**Real-time PCR.** Total RNAs (1 mg) were isolated from muscle using RNA STAT (AMS Technology, UK). Total RNAs were reverse transcribed using random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, UK). Real time PCR was performed as previously described (Boucher, Masri et al. 2005).

**Glucose uptake.** Muscles were isolated and preincubated for 10 min in Krebs-Henseleit (KH) buffer, pH 7.4, containing bovine serum albumin (2 mg/ml), 2 mM sodium pyruvate and 20

mM Hepes. Muscles were then incubated for 45 min in the absence or the presence of 100 nM insulin as previously reported (4).

**Statistical analysis.** Data are presented as means  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were carried out for different parameters using Prism 5.0 software (GraphPad Software). A two way ANOVA was applied to detect interaction between treatment and time. When appropriate, Student's t test paired or nonpaired was applied. Differences at  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant and was noted \*.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grant from ALFEDIAM/SFD 2009 (Société Francophone du Diabète). We gratefully acknowledge Pr. Birnbaum (HHMI, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) for providing DN-AMPK mice. We would like also to acknowledge for their expertise the Anexplo platform (phenotypage, lipidomique) of the IFR150 institute and the staff of animal facilities; Danielle Prévot for excellent technical assistance; Dr François Crampes and Dr Jean-Sebastien Saulnier-Blache for fruitful discussion and advice.

## References

1. Boucher J, *et al.* (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146(4):1764-1771.
2. Tatemoto K, *et al.* (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2):471-476.
3. Carpené C, *et al.* (2007) Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. (Translated from eng) *J Physiol Biochem* 63(4):359-373 (in eng).
4. Dray C, *et al.* (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. (Translated from eng) *Cell Metab* 8(5):437-445 (in eng).
5. Yue P, *et al.* (2009) Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(1):E59-67.
6. Dray C, *et al.* (2008) Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(6):E1161-1169.
7. Higuchi K, *et al.* (2007) Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148(6):2690-2697.
8. Yue P, *et al.* Apelin Decreases Lipolysis via Gq, Gi, and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology* (in press).
9. Kim JA, Wei Y, Sowers JR (2008) Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 102(4):401-414.
10. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1(6):361-370.
11. Jones TE, Baar K, Ojuka E, Chen M, Holloszy JO (2003) Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(1):E96-101.
12. Koves TR, *et al.* (2008) Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7(1):45-56.
13. Mihalik SJ, *et al.* (2010) Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. *Obesity (Silver Spring)* 18(9):1695-1700.
14. Morino K, Petersen KF, Shulman GI (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2:S9-S15.
15. Turner N, Heilbronn LK (2008) Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab* 19(9):324-330.
16. Frier BC, Williams DB, Wright DC (2009) The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(6):R1761-1768.
17. Muoio DM, Koves TR (2007) Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 32(5):874-883.
18. Koves TR, *et al.* (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem* 280(39):33588-33598.

19. Mootha VK, *et al.* (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34(3):267-273.
20. Patti ME, *et al.* (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(14):8466-8471.
21. Bruce CR, *et al.* (2009) Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58(3):550-558.
22. Perdomo G, *et al.* (2004) Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 279(26):27177-27186.
23. Bezaire V, *et al.* (2005) Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J* 19(8):977-979.
24. Seifert EL, Bezaire V, Estey C, Harper ME (2008) Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J Biol Chem* 283(37):25124-25131.
25. Bruce CR, Kriketos AD, Cooney GJ, Hawley JA (2004) Disassociation of muscle triglyceride content and insulin sensitivity after exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47(1):23-30.
26. Smith AC, Bruce CR, Dyck DJ (2005) AMP kinase activation with AICAR further increases fatty acid oxidation and blunts triacylglycerol hydrolysis in contracting rat soleus muscle. *J Physiol* 565(Pt 2):547-553.
27. Bruce CR, Febbraio MA (2007) It's what you do with the fat that matters! *Nat Med* 13(10):1137-1138 .
28. Benani A, *et al.* (2009) Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. *J Neurosci Methods* 178(2):301-307.
29. Knauf C, *et al.* (2008) Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 149(10):4768-4777.
30. Bezaire V, *et al.* (2006) Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(3):E509-515.
31. Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Naylor EW (1997) Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 43(11):2106-2113.
32. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911-917.
33. Barrans A, *et al.* (1994) Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem* 269(15):11572-11577.

**Legends of figures:**

**Figure 1: Chronic apelin treatment in HFD mice improved insulin sensitivity.** A) Fasted glucose (left) and insulin blood levels (right) in PBS-treated (control) (n=12) and apelin-treated mice (n=12) before and after the treatment. Results are means  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ ; B) GTT before and at the end of the apelin treatment in HFD mice (n=12). Results are means  $\pm$  SEM, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; C) ITT before and at the end of the apelin treatment in HFD mice (n=8). Results are means  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

**Figure 2: Chronic apelin treatment in HFD mice increased lipid oxidation in vivo.** A) RER measurement during 24h in insulin resistant mice chronically treated with PBS (n=13) or apelin (n=12). Results are means  $\pm$  SEM. \*\* $p \leq 0.01$ ; B) RER during the light (left) and dark period (right) in PBS- (n=13) and apelin-treated mice (n=12). Results are means  $\pm$  SEM. \*\* $p \leq 0.01$ ; C) Amount of lipid and glucose oxidized during the light (left) and dark (right) period calculated as mentioned in Materials and Methods in PBS-treated and apelin-treated mice. Results are means  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

**Figure 3: RER in apelin-deficient mice.** A) RER measurement during 24h in apelin  $-/-$  mice (n=13) and the corresponding wild type (WT), (n= 11). Results are means  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ ; B) RER during the light (left) and dark period (right) in WT and apelin  $-/-$  mice. Results are means  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ ; C) Amount of lipid and glucose oxidized during the light (left) and dark (right) period calculated as mentioned in Materials and Methods in WT and apelin  $-/-$  mice. Results are means  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ .

**Figure 4: Effect of chronic apelin treatment on palmitate partitioning in muscle of insulin resistant mice.** A) TG and DAG levels in muscle homogenates of PBS-treated (n=7) and apelin-treated mice (n=8). Results are means  $\pm$  SEM; B) Measure of [ $^{14}$ C]palmitate incorporation into TG in muscle of PBS-treated mice (n=11) and apelin-treated mice (n=12). Results are means  $\pm$  SEM; C) Complete (left) and incomplete FAO (right) measured as described in Materials and Methods. Results are means  $\pm$  SEM of n= 11 PBS-treated mice and n=9 apelin-treated mice. \*\*p $\leq$  0.01.

**Figure 5: Chronic apelin treatment in HFD mice increased mitochondrial oxidative capacities and biogenesis in muscle.** A) State 2 and State 3 respiration were measured on fresh permeabilized fibers prepared from soleus skeletal muscle of PBS-treated (n=7) and apelin-treated mice (n=7) as described in Materials and Methods; B) Representative western blot of the different mitochondrial complexes (left) and quantification (right) in PBS- treated (n=6) and apelin-treated mice (n=7). Results are means  $\pm$  SEM. \*p $\leq$  0.05; C) Gene expression in soleus muscle of PBS-treated (n=5) and apelin-treated mice (n=5). Results are means  $\pm$  SEM. \*p $\leq$  0.05.

**Figure 6: Effect of chronic apelin treatment in muscle of insulin-resistant mice on acylcarnitines levels and insulin-stimulated glucose uptake.** A) Long chain species acylcarnitines levels were measured in chow-fed mice (n=5) and in HFD fed mice treated with apelin (n=8) or PBS (n=7). Results are means  $\pm$  SEM. \*p $\leq$  0.05; B) Insulin-induced glucose uptake in soleus muscle of PBS-treated (n=7) and apelin-treated mice (n=6). Results are means  $\pm$  SEM. \*p $\leq$  0.05; \*\*p $\leq$  0.01.

Table 1 : Body weight, fat mass, plasma parameters and indirect calorimetry measured in chow-fed and HFD fed mice treated or not with apelin .

	Chow fed PBS-treated n=8-10	HFD PBS-treated n = 13	HFD apelin-treated n = 12
<b>Before treatment:</b>			
Fasted plasma insulin (mU/ml)	19.8 ± 3.6	104.3 ± 7.8 \$\$\$	112.6 ± 15.5 \$\$\$
Fasted Glycemia (mmol/l)	8.9 ± 0.4	11.6 ± 0.3 \$\$\$	12.05 ± 0.49 \$\$\$
AUC GTT (mM.min)	70.3 ± 4.1	130.1 ± 7.1 \$\$\$	122.9 ± 6.5 \$\$\$
Body weight after treatment (g)	30.6 ± 0.6	44.1 ± 0.9 \$\$\$	44.8 ± 0.9
Weight gain (g)	- 0.50 ± 0.34	- 0.22 ± 0.32	-0.36 ± 0.35
% fat after treatment	13.65 ± 0.85	35.79 ± 1.30 \$\$\$	34.32 ± 1.36
Whole body fat gain (%)	+ 1.11 ± 0.53	+ 1.42 ± 0.51	- 0.11 ± 0.57 *
Plasma FFA (mM)	ND	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.02
Plasma TG (g/L)	ND	0.87 ± 0.04	0.71 ± 0.04 *
<b>Dark period</b>			
VCO2 (ml/g/h)	26.51 ± 1.76	23.10 ± 0.95 \$	23.68 ± 1.20
VO2 (ml/g/h)	31.35 ± 1.80	31.07 ± 1.15	33.94 ± 1.65
EE (kcal/h)	218.5 ± 12.75	211.72 ± 7.95	224.14 ± 10.27
<b>Light period</b>			
VCO2(ml/g/h)	22.37 ± 1.41	21.05 ± 0.80	22.62 ± 1.18
VO2 (ml/g/h)	28.61 ± 1.54	29.56 ± 1.10	32.60 ± 1.58
EE (kcal/h)	196.8 ± 10.86	199.9 ± 7.5	214.6 ± 10.8

Data are means ± SEM of the indicated number of mice. VO2 and VCO2 values represent the average values recorded during the period.

\$ : comparison between chow fed PBS and HFD PBS, \$ p<0.05, \$\$\$ p< 0.001;

\* : comparison between HFD PBS and HFD APE \*p<0.05;

ND : not determined

Figure 1

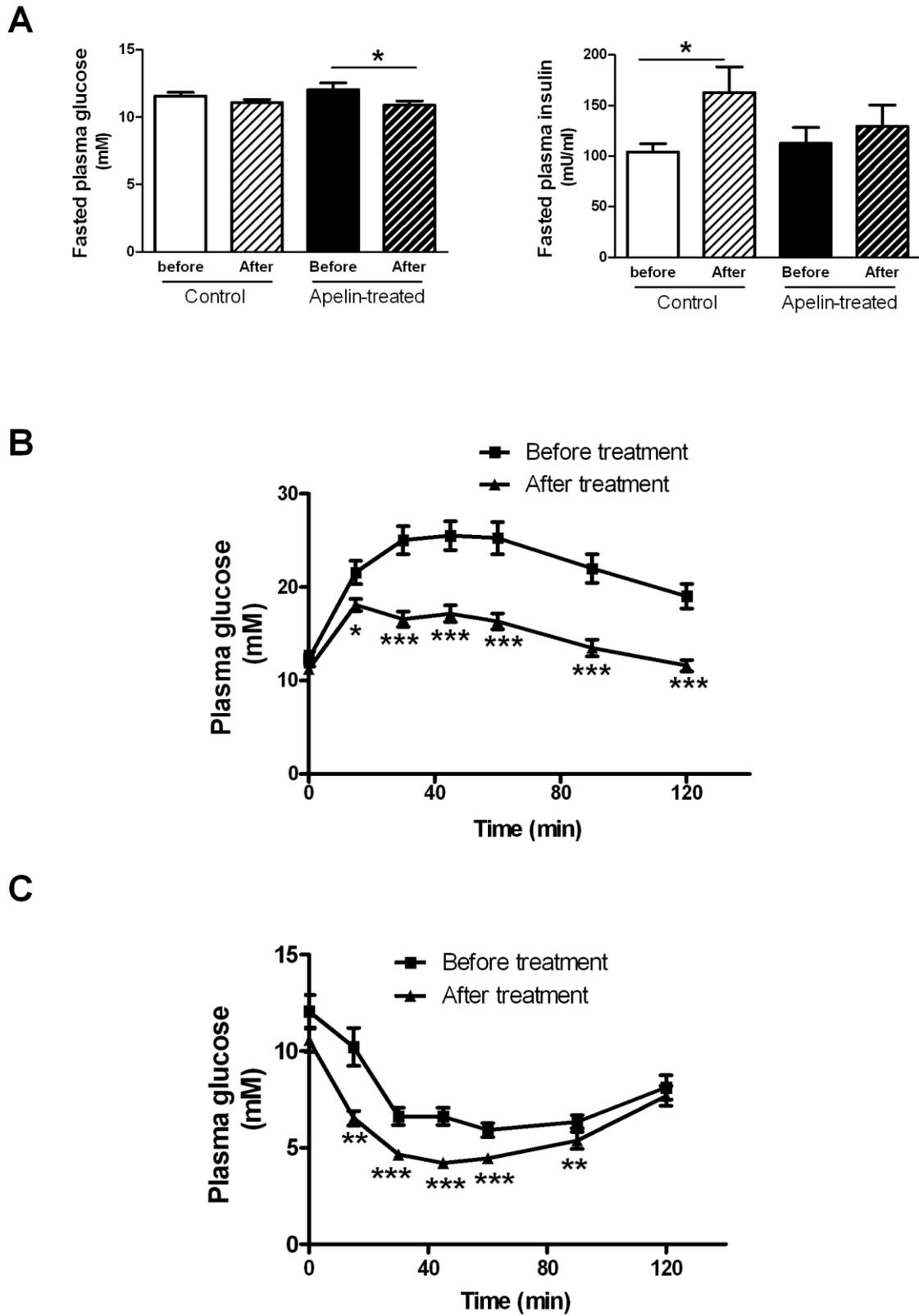


Figure 2

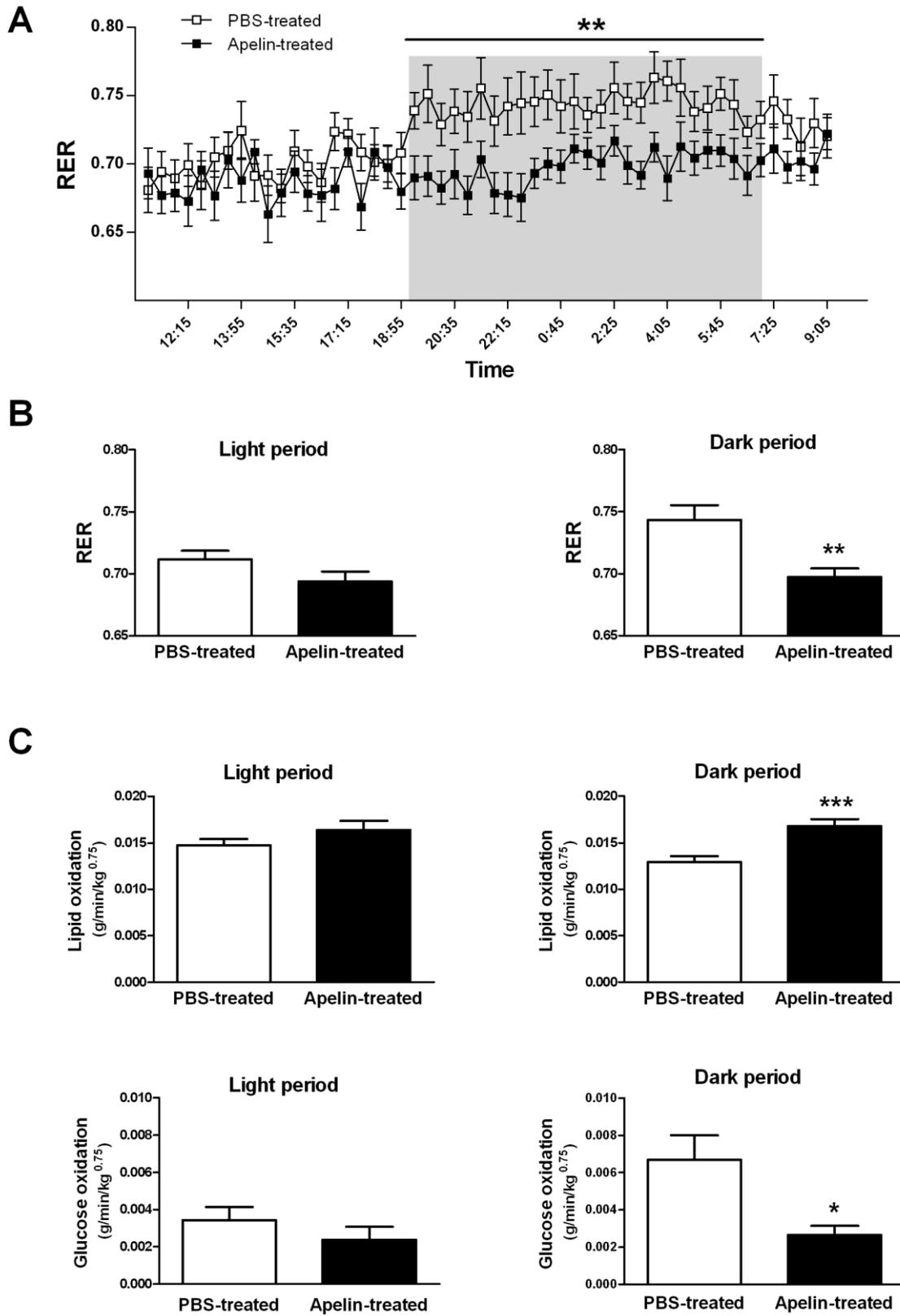


Figure 3

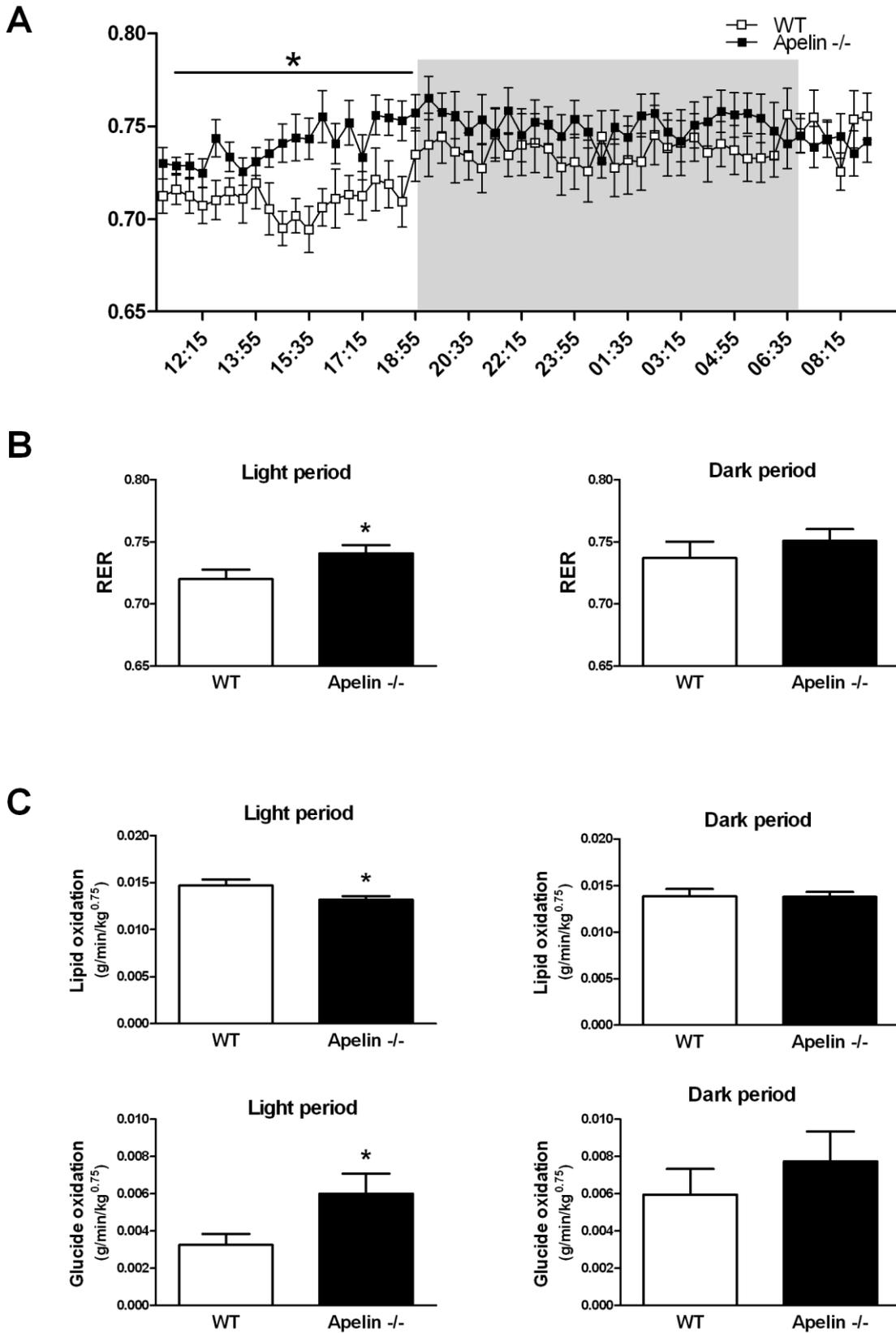


Figure 4

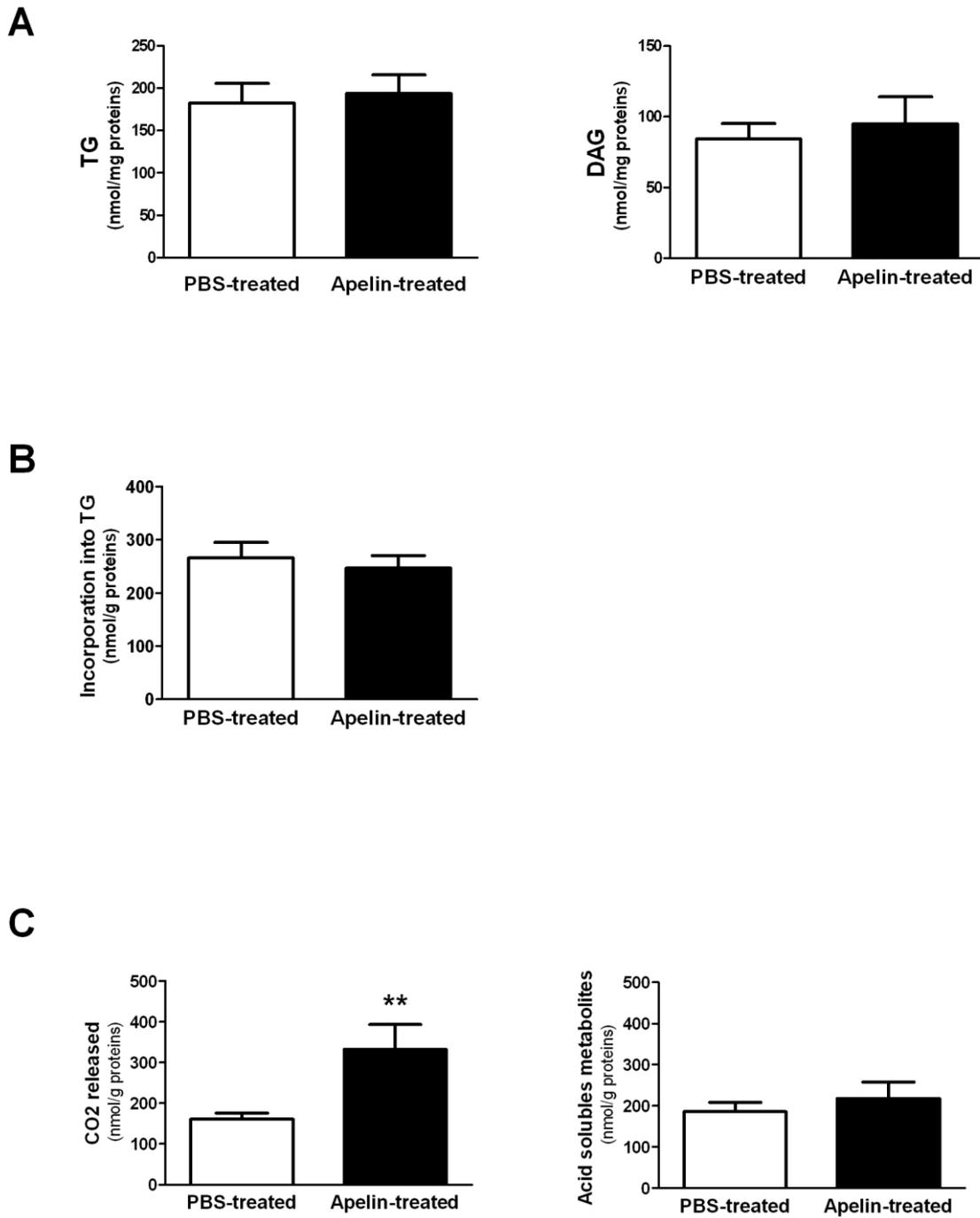


Figure 5

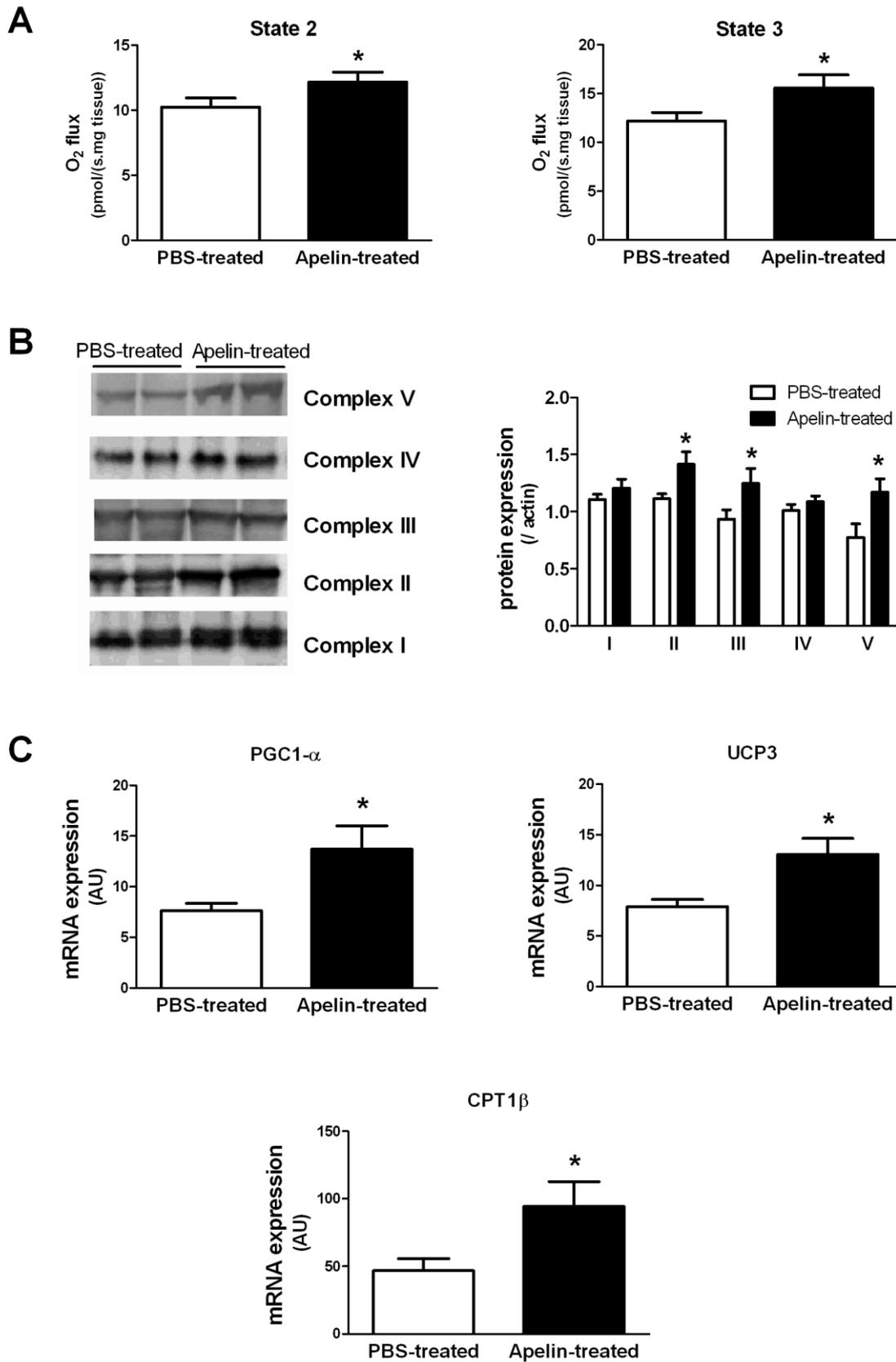
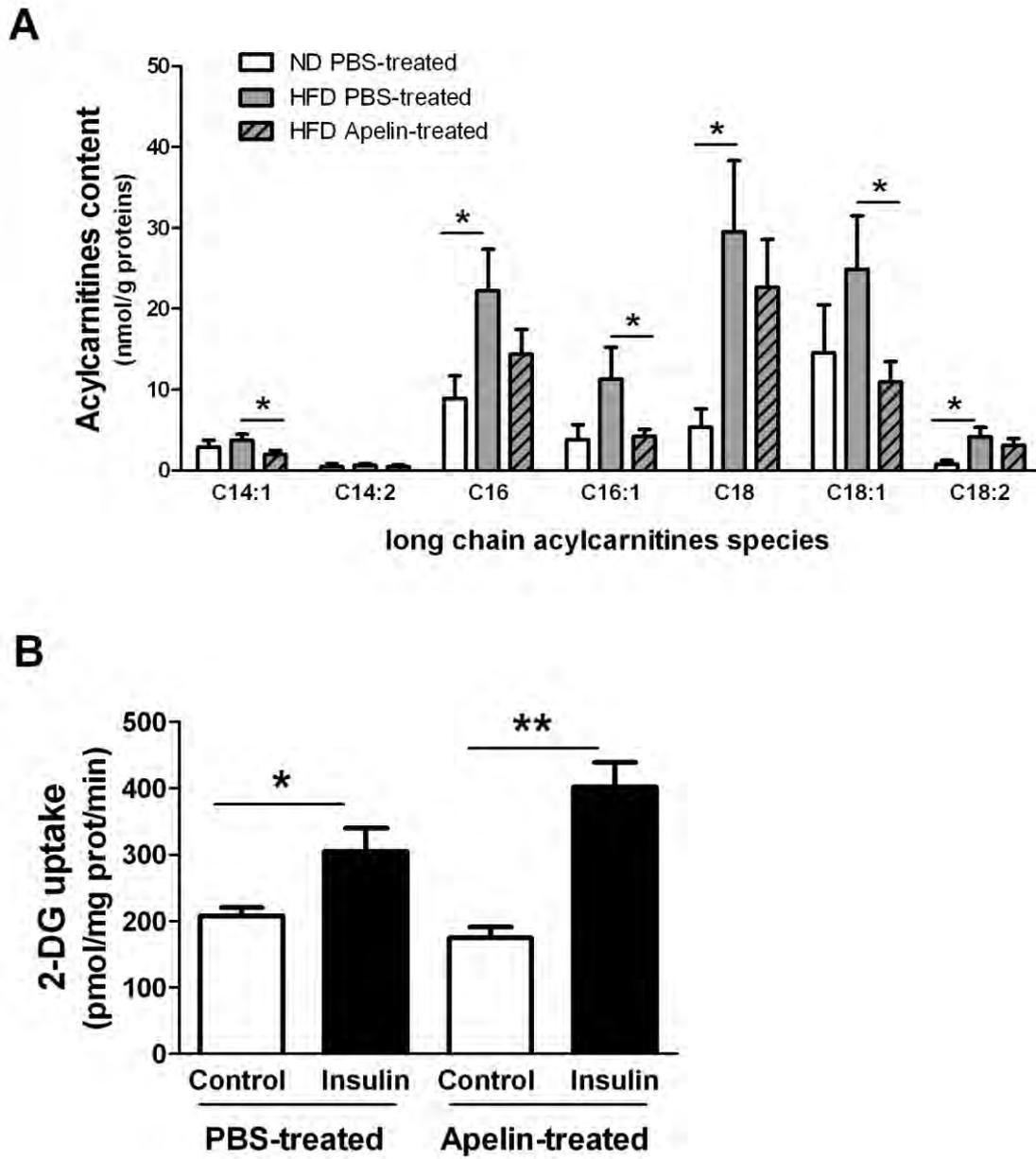


Figure 6



## 2. Infusion chronique d'apeline en ip

A la suite de ces résultats, l'effet d'une infusion chronique d'apeline (1  $\mu\text{mol/kg/jour}$ ) pendant 28 jours a été étudié. Pour cela, une minipompe osmotique Alzet<sup>®</sup> contenant l'apeline est placée dans la cavité intrapéritonéale des souris et permet de délivrer en continu l'apeline (0,11  $\mu\text{l/heure}$ ). Ce type de traitement permet de s'affranchir de l'effet stress d'une injection quotidienne et de maintenir une augmentation constante de l'apelinémie. En effet, chez des souris invalidées pour l'apeline, cette même dose d'infusion d'apeline restaure et maintient des taux plasmatiques physiologiques d'apeline (4,3 ng/ml) (Yue, Jin et al.). De plus, la demi-vie de l'apeline est courte, de l'ordre de 8 minutes (Japp, Cruden et al. 2008) et une infusion prolongée d'apeline permet une activation efficace et continue du récepteur APJ mais pourrait également entraîner une désensibilisation du récepteur.

L'efficacité de ce type de traitement en continu a déjà été prouvée dans l'étude des effets de l'apeline dans la sphère cardiovasculaire (Ashley, Powers et al. 2005) mais aussi par les travaux de Yue et ses collaborateurs où l'apeline administrée en sous cutané pendant 28 jours, améliore la sensibilité à l'insuline de souris *db/db* (Yue, Jin et al.). Afin de compléter les résultats obtenus par Yue, nous avons étudié l'effet d'une infusion d'apeline pendant 28 jours sur le métabolisme énergétique *in vivo* et *ex vivo*, chez des souris rendues obèses et insulino-résistantes par un régime hyperlipidique.

### a) Caractéristiques générales

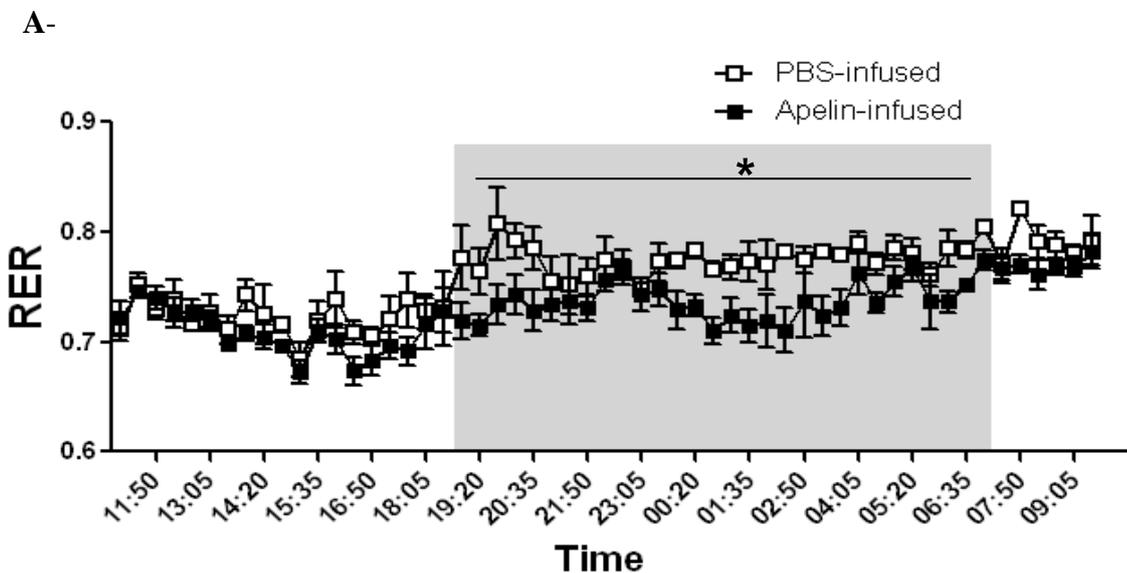
Une diminution de la prise de poids a été observée chez les souris traitées par l'apeline et ceci s'accompagne d'une diminution du poids des tissus adipeux périgonadique et sous-cutané (Tableau 2). De plus, nous avons observé une tendance à la diminution des taux plasmatique d'insuline sans modification de la glycémie. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Yue sur des souris *db/db* traitées de la même manière pendant 14 jours (Yue, Jin et al.) mais aussi avec les effets que nous avons observés lors de l'injection quotidienne d'apeline en ip.

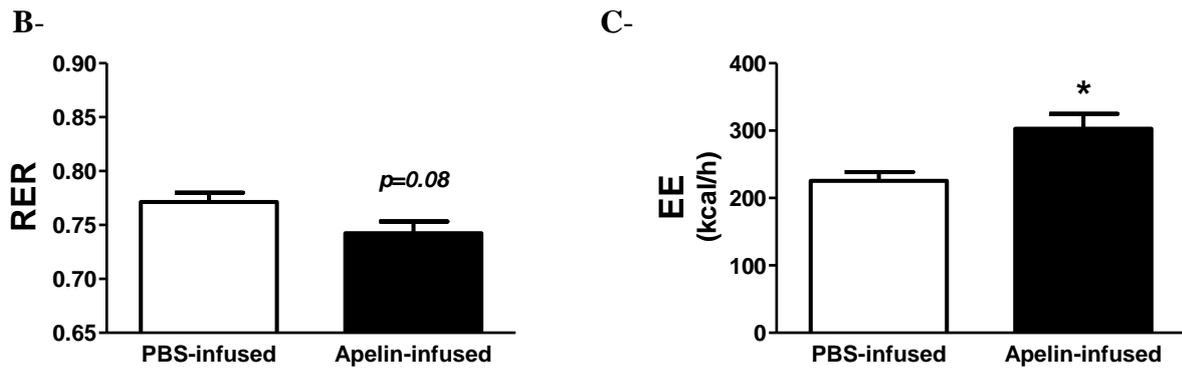
	PBS-infused	Apelin-infused
<b>Body weight gain (g)</b>	4.97 ± 0.47	2.77 ± 0.45 **
<b>Fasted glucose after treatment (mg/dl)</b>	179.4 ± 4.5	162.2 ± 12.2
<b>Fasted insulin after treatment (mU/ml)</b>	112 ± 27	67 ± 14 *
<b>Subcutaneous adipose tissue weight (g)</b>	2.135 ± 0.113	1.677 ± 0.167 *
<b>Perigonadic adipose tissue weight (g)</b>	1.888 ± 0.097	1.593 ± 0.093 *

**Tableau 2 : Effet d'une infusion chronique d'apeline (pompe Alzet) sur la prise de poids, la glycémie et l'insulinémie à jeun et le poids des dépôts adipeux sous-cutanés et périgonadique chez des souris obèses et insulino-résistantes.** Les valeurs représentées sont des moyennes ± esm. n = 4. \* p ≤ 0.05 ; \*\* p ≤ 0.01.

b) Mesure de l'utilisation des substrats in vivo et ex vivo

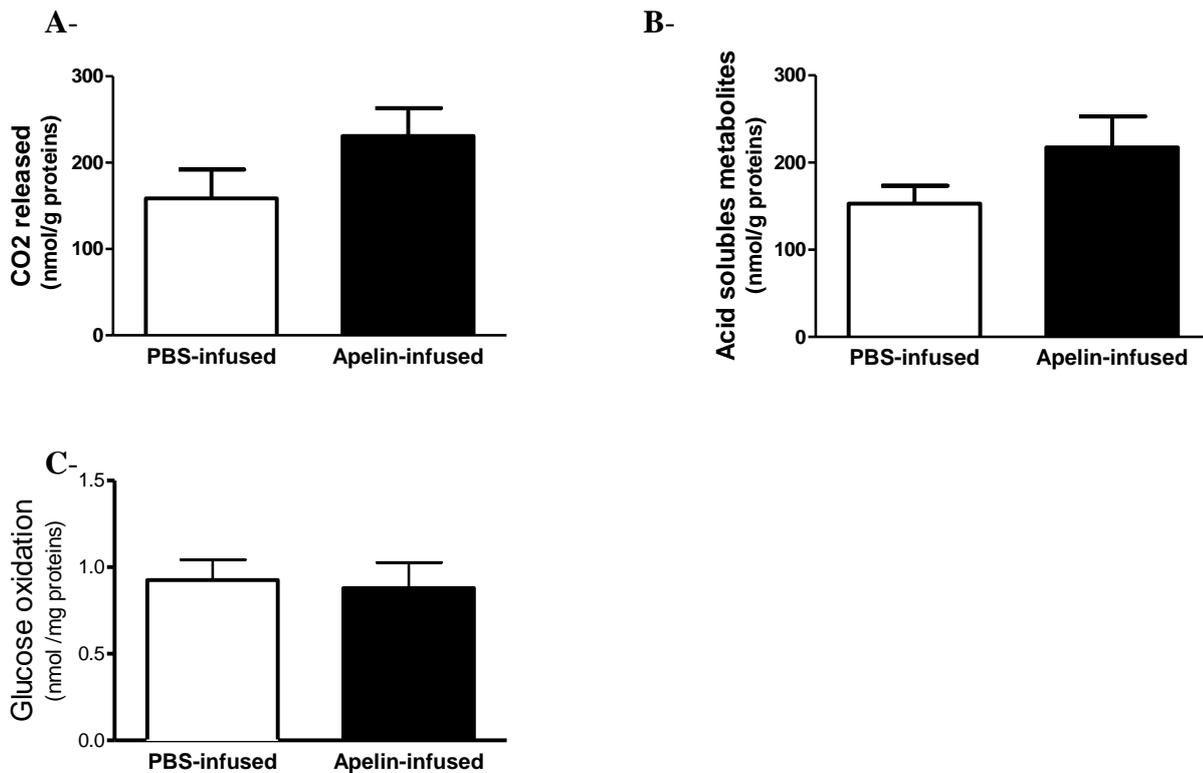
Comme pour les souris traitées quotidiennement à l'apeline, la mesure des échanges gazeux par calorimétrie indirecte a permis d'étudier l'utilisation des substrats *in vivo*. L'administration continue d'apeline entraîne une diminution du quotient respiratoire (QR) et une augmentation de la dépense énergétique pendant la nuit mais n'a pas d'effet pendant la journée (Figure 30).





**Figure 31 : Effet d'une infusion chronique d'apeline sur le quotient respiratoire (RER) pendant 24h (A) et pendant la période de nuit (B) et sur la dépense énergétique (EE) pendant la période de nuit (C) chez des souris obèses et insulino-résistantes. . Les valeurs représentées sont des moyennes  $\pm$  esm. n = 4. \*  $p \leq 0.05$ .**

A la fin du traitement, l'oxydation du palmitate a été mesurée sur le muscle soléaire et l'oxydation du glucose a été effectuée sur le faisceau rouge du muscle gastrocnémien. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'oxydation totale du palmitate ( $298 \pm 55$  versus  $448 \pm 66$  nmol palmitate oxydé/g protéines chez les souris traitées à l'apeline ;  $p \leq 0.05$ ) sans modification de l'oxydation du glucose (figure 31C). Ces résultats reflètent bien la diminution du QR observée *in vivo* et vont dans le même sens que les effets observés lors du traitement quotidien. Cependant, l'augmentation de l'oxydation totale du palmitate est associée à une augmentation non significative de l'oxydation complète (figure 31A) mais aussi de l'oxydation incomplète (figure 31B). Ces résultats restent à confirmer et il sera aussi important de mesurer l'oxydation incomplète plus précisément par la quantification des acylcarnitines comme lors du protocole d'injections quotidiennes.



**Figure 32 : Effet d'une infusion chronique d'apeline sur l'oxydation complète (A) et incomplète (B) du palmitate sur le muscle soléaire et effet sur l'oxydation du glucose sur le faisceau rouge du muscle gastrocnémien (C) chez des souris obèses et insulino-résistantes. Les valeurs représentées sont des moyennes  $\pm$  esm. n = 4.**

### **C. Discussion générale sur les effets obtenus par les 2 types de traitement chronique par l'apeline**

#### ***1. Effets de l'apeline sur l'utilisation des substrats in vivo***

Chez des souris nourries par un régime normal, le QR augmente pendant la période alimentaire, les animaux utilisant le glucose de l'alimentation comme source d'énergie. A l'inverse, le QR diminue pendant la journée (période de jeûne) puisque l'organisme puise dans les réserves lipidiques du tissu adipeux pour fournir des AG aux muscles squelettiques afin de produire l'énergie. Cette capacité de changer de substrat, appelée flexibilité métabolique (Kelley and Mandarino 2000), est diminuée chez des souris en régime hyperlipidique. Ceci peut s'expliquer en partie par l'apport plus important de lipides par l'alimentation, entraînant leur utilisation après le repas.

Nous avons pu montrer qu'un traitement de 28 jours par l'apeline (injection quotidienne ou infusion continue) chez des souris insulino-résistantes entraîne une diminution du quotient respiratoire (QR) pendant la nuit. Ceci démontre une utilisation préférentielle des lipides plutôt que des glucides en tant que substrat énergétique pendant la période alimentaire. En effet, le calcul de la quantité de glucides et de lipides oxydés permis de montrer une augmentation de l'oxydation des AG et une diminution de l'oxydation des glucides pendant cette période.

L'étude des échanges gazeux chez des souris invalidées pour le gène de l'apeline a révélé à l'inverse une augmentation du QR pendant la période de jour. Ceci indique une perte de la capacité de ces souris à utiliser les lipides en période de jeûne. De plus, ces souris présentent une masse adipeuse accrue par rapport à des souris sauvages du même âge. Ainsi, lors de la période de jour (jeûne), les souris invalidées pour l'apeline ne sont pas capables de mobiliser les réserves lipidiques du tissu adipeux blanc pour fournir des AG au muscle pour produire de l'énergie. Il y a donc une diminution de l'oxydation des AG pendant la période de jeûne et une augmentation du stockage de TG dans le tissu adipeux blanc, ceux-ci n'étant pas mobilisés. On parle dans ce cas d'inflexibilité métabolique et ceci est associé à une diminution de la sensibilité à l'insuline chez ces souris.

Par contre, chez les souris insulino-résistantes traitées en chronique à l'apeline, la diminution du QR est associée à une diminution de la masse adipeuse par rapport aux souris contrôles. Ainsi, ces résultats suggèrent que le traitement par l'apeline entraîne une meilleure mobilisation des lipides dans le tissu adipeux et les AG libérés seraient ensuite utilisés au niveau du muscle squelettique. De plus, chez ces animaux, la sensibilité à l'insuline est améliorée et ceci se traduit par une augmentation du transport de glucose stimulé par l'insuline dans le muscle. Il semblerait que ce glucose ne soit pas oxydé, d'après les résultats de QR ; on peut donc penser que ce glucose est stocké sous forme de glycogène et sera important de le confirmer.

Les résultats de calorimétrie indirecte ont également permis de mettre en évidence une augmentation de la dépense énergétique chez les souris traitées en continu avec l'apeline. Cet effet est à associer à une augmentation de l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun ainsi qu'une augmentation de la température rectale chez des souris en régime standard traitées à l'apeline (Higuchi, Masaki et al. 2007). Nous n'avons pas étudié les conséquences du traitement par l'apeline sur le tissu adipeux brun chez des souris insulino-résistantes mais

il serait intéressant de savoir si l'effet observé chez les souris en régime standard persiste chez les souris en régime hyperlipidique. De plus, il semble important de mesurer les effets métaboliques de l'apeline sur ce tissu, c'est-à-dire de mesurer l'oxydation des lipides ainsi que la dissipation d'énergie sous forme de chaleur par UCP1.

## **2. Effet de l'apeline sur la biogenèse mitochondriale**

Nous avons pu mettre en évidence qu'un traitement chronique par l'apeline augmente l'oxydation des acides gras *via* une induction de la biogenèse mitochondriale. En effet, l'apeline augmente l'activité de la citrate synthase (marqueur du contenu en mitochondries) et l'expression de différents complexes de la chaîne respiratoire. Nos résultats corroborent l'augmentation du nombre de mitochondries observé par Frier chez des rats en régime normal traités pendant 14 jours par l'apeline (Frier, Williams et al. 2009).

De plus, nous avons pu montrer que l'apeline augmente l'expression d'UCP3, une protéine souvent associée à la biogenèse mitochondriale dans le muscle (Jones, Baar et al. 2003). Cet effet de l'apeline dans le muscle confirme sur des souris insulino-résistantes ce qu'avait observé Higuchi sur des souris normopondérales. Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'expression en ARNm de PGC1 $\alpha$ , un corégulateur transcriptionnel, activateur de la biogenèse mitochondriale (Lin, Handschin et al. 2005). Il sera tout de même important de confirmer cet effet par l'étude de la protéine, car les taux d'ARNm de PGC1 $\alpha$  ne reflètent pas toujours l'activité de la protéine, PGC1 $\alpha$  étant régulé par des modifications post-traductionnelles, notamment des méthylations (Lin, Handschin et al. 2005; Barres, Osler et al. 2009). Contrairement à nos résultats, Frier et ses collaborateurs n'ont pas observé d'augmentation de l'expression de PGC1 $\alpha$  mais de PGC1 $\beta$  (Frier, Williams et al. 2009), aussi impliqué dans la biogenèse mitochondriale mais activé par des stimuli différents de ceux induisant PGC1 $\alpha$ .

Par ailleurs, l'activation de l'AMPK augmente la biogenèse mitochondriale *via* l'activation de PGC1 $\alpha$  (Jager, Handschin et al. 2007). Or, nous avons montré, chez des souris en régime standard, que l'activation de l'AMPK est nécessaire pour l'augmentation de l'oxydation des AG induite par l'apeline, suggérant que l'activation de la biogenèse mitochondriale serait induite par une activation de l'AMPK. Cependant, chez des rats en régime standard, un traitement chronique par l'apeline n'active pas l'AMPK, cette différence pouvant être due à l'espèce mais aussi au type de muscle utilisé dans cette étude (Frier,

Williams et al. 2009). En effet, Frier et ses collaborateurs ont travaillé sur le triceps brachial, composé majoritairement de fibres glycolytiques alors que dans nos études *ex vivo*, nous avons utilisé le muscle soléaire, composé en majorité de fibres oxydatives (Frier, Williams et al. 2009). Afin de savoir si l'effet de l'apeline sur l'oxydation des AG et la respiration mitochondriale était aussi présent dans des fibres glycolytiques, ces deux voies métaboliques ont été mesurées sur l'EDL (*Extensor Digitorum Longis*) de souris nourries par un régime standard ou hyperlipidique. Nous n'avons pas observé de modification de l'oxydation des AG ni de la respiration mitochondriale (résultats non montrés). Ainsi, ces résultats sont donc en désaccord avec l'augmentation de la biogenèse mitochondriale observée par Frier et ces différences pourraient s'expliquer par le choix de l'espèce ou du muscle étudié.

Ainsi, la biogenèse mitochondriale induite par le traitement par l'apeline mériterait d'être mieux caractérisée par une mesure plus précise du nombre de mitochondries (quantification de l'ADN mitochondrial) mais aussi de leur morphologie visualisée par microscopie électronique. De plus, la voie de signalisation impliquée dans cette augmentation de la biogenèse mitochondriale par l'apeline devra également être étudiée de façon plus approfondie.

### ***3. Effet de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline***

Nous avons mesuré la sensibilité à l'insuline lors de notre protocole d'injection quotidienne d'apeline mais pas lors de l'infusion continue d'apeline ceci ayant été montré par Yue chez des souris *db/db* jeunes. Nos résultats ainsi que les travaux de Yue montrent qu'un traitement chronique de 28 jours par l'apeline améliore la sensibilité à l'insuline chez des souris insulino-résistantes (Yue, Jin et al.). De plus, au niveau du muscle, nous avons pu montrer que le traitement par l'apeline augmente le transport de glucose stimulé par l'insuline, indiquant ainsi que l'apeline restaure la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire. Cependant, l'apeline n'a pas d'effet sur le transport non stimulé contrairement à ce qui avait été observé lors d'un traitement aigu (Dray, Knauf et al. 2008). Ces résultats sont cohérents avec les effets d'un traitement chronique par l'AICAR chez le rat Zucker (Buhl, Jessen et al. 2002). Dans cette étude, malgré une augmentation de l'expression de GLUT4 induite par le traitement par l'AICAR, seul le transport stimulé par l'insuline est augmenté (Buhl, Jessen et al. 2002).

L'effet de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline peut s'expliquer par une augmentation du métabolisme mitochondrial dans le muscle mais aussi, au niveau du tissu adipeux, par une diminution de la masse grasse et une augmentation de la sécrétion d'adipokines.

### **Augmentation du métabolisme mitochondrial**

Un traitement chronique par l'apeline augmente l'oxydation des AG ainsi que les voies métaboliques en aval de celle-ci, sans modifier le stockage des AG en TG ou DG ou la formation de céramides. En effet, l'apeline augmente l'activité du cycle de Krebs (activité citrate synthase) mais aussi la respiration mitochondriale (complexe II et V). L'activité de la citrate synthase utilisée comme marqueur du nombre de mitochondries, est avant tout un indicateur de l'activité du cycle de Krebs, cette enzyme catalysant la première réaction de ce cycle. Les travaux de Muoio ont montré qu'une augmentation de la  $\beta$ -oxydation sans augmentation de l'activité du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire entraîne une surcharge mitochondriale (Koves, Ussher et al. 2008). Ceci se caractérise par une oxydation incomplète des AG conduisant à l'accumulation d'acylcarnitines qui pourraient être impliquées dans l'inhibition de la voie de l'insuline. Dans notre étude, l'apeline augmente l'oxydation complète sans modifier l'oxydation incomplète. Parallèlement à ces mesures, la quantification plus précise des différentes formes d'acylcarnitines a permis de montrer une diminution de certaines espèces monoinsaturées d'acylcarnitines à longue chaîne (C14-1 ; C16-1 et C18-1) chez les souris traitées quotidiennement par l'apeline. Pour le protocole d'infusion chronique d'apeline, l'oxydation incomplète semble augmentée mais il sera nécessaire de quantifier précisément les différentes espèces d'acylcarnitines.

De plus, Muoio et ses collaborateurs expliquent que la coordination des voies métaboliques mitochondriales nécessite d'une part, l'induction de l'expression des gènes de la  $\beta$ -oxydation *via* l'activation de PPAR $\alpha$  et/ou  $\delta$  par les AG et d'autre part, l'augmentation de l'expression des gènes de la biogenèse mitochondriale par PGC1 $\alpha$  (Koves, Li et al. 2005). Dans notre étude, nous avons montré une augmentation de l'expression en ARNm de PGC1 $\alpha$  et de PPAR $\gamma$  sans modification de PPAR $\alpha$ . Ces résultats restent à confirmer en protéines notamment pour PGC1 $\alpha$  dont l'expression en ARNm ne reflète pas toujours l'activité. Ainsi, ces résultats montrent que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline en réponse à l'apeline serait plutôt due à une diminution de certaines acylcarnitines qu'à une modification de l'accumulation de DG et de céramides. Cependant, d'autres investigations sont nécessaires

pour confirmer cette hypothèse puisqu'aucun effet direct des acylcarnitines sur l'inhibition de la voie de l'insuline n'a encore été démontré. En effet, les études relatives aux acylcarnitines montrent que leur taux est corrélé positivement à la résistance à l'insuline chez l'Homme et le rongeur (Adams, Hoppel et al. 2009; Huffman, Shah et al. 2009; Newgard, An et al. 2009).

### **Modification des flux lipidiques**

Nous avons pu montrer qu'un traitement chronique par l'apeline entraîne une diminution de la masse grasse mesurée par EchoMRI (traitement ip quotidien) ou par la pesée des dépôts adipeux (protocole d'infusion chronique). Cet effet pourrait s'expliquer par une lipogénèse diminuée ou une lipolyse accrue. Dans ces deux cas, les AG et les TG seraient augmentés dans le plasma des souris traitées à l'apeline puis utilisés par différents tissus comme les muscles et le tissu adipeux brun.

Pour confirmer cette hypothèse, en collaboration avec l'entreprise Physiogenex, nous avons mesuré les flux d'AG *in vivo* en perfusant pendant 2 heures du palmitate tritié chez des souris traitées pendant 28 jours à l'apeline (injection ip). Différents prélèvements de sang ont été effectués lors de la perfusion afin de mesurer la clairance et le turn-over du palmitate à l'échelle de l'organisme. Nous avons pu observer une diminution non significative de la clairance des AG sans modification du turn-over. Cette mesure étant globale, elle ne nous permet pas de conclure quant à l'utilisation des AG dans les tissus oxydatifs. Pour cela, après l'arrêt de la perfusion de palmitate, différents tissus ont été récupérés afin d'analyser le stockage du palmitate sous forme de TG. Hélas, lors de l'analyse des tissus, des résultats contradictoires et peu clairs ont été obtenus quant au contenu en TG dans les tissus, ce qui ne nous a pas permis de conclure. De plus, cette étude du métabolisme du palmitate tritié *in vivo* nous renseigne seulement sur le palmitate qui est stocké dans les tissus étudiés, mais pas sur la clairance des AG par chaque tissu. Il serait donc intéressant d'utiliser du bromo-palmitate tritié, un analogue du palmitate non métabolisable qui, lorsqu'il est entré dans la cellule, reste sous cette forme et est facilement quantifiable (Oakes and Furler 2002).

Ainsi, il apparaît nécessaire d'effectuer à nouveau des études de flux lipidiques *in vivo* mais, cette fois en perfusant du bromo-palmitate tritié. Ceci nous permettrait alors d'expliquer si la masse grasse est diminuée chez les souris traitées à l'apeline à cause d'une diminution de l'entrée des AG dans le tissu adipeux et/ou d'une augmentation de la libération d'AG. De plus, ces expériences nous permettraient de confirmer notre hypothèse selon laquelle les AG libérés ou non captés par le tissu adipeux (diminution de la masse grasse) sont pris en charge

par les tissus oxydatifs (augmentation de la dépense énergétique). En effet, nos résultats ont mis en évidence une augmentation de l'oxydation des AG dans le muscle soléaire sans modifier leur stockage sous forme de TG (estérification du palmitate et quantification du contenu intramusculaire en TG) chez les souris traitées à l'apeline. Ceci suggère que l'apeline augmente l'entrée des AG dans les cellules musculaires, ce qui pourrait être confirmé par l'étude du flux des AG *in vivo*. De plus, l'étude des flux lipidiques pourrait nous permettre d'étudier l'implication d'autres tissus oxydatifs comme le tissu adipeux brun (ou le cœur) qui pourraient contribuer à l'augmentation de la dépense énergétique observée par Higuchi et dans nos travaux.

### **Modification des sécrétions adipocytaires**

Il est important de souligner que les effets du traitement chronique par l'apeline sur le métabolisme lipidique dans le muscle et sur la sensibilité à l'insuline pourraient être indirects. En effet, dans son étude, Higuchi et ses collaborateurs ont montré une augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine et une diminution de ceux de leptine chez les souris en régime standard traitées par l'apeline (Higuchi, Masaki et al. 2007), mais ces résultats n'ont pas été retrouvés par les travaux de Frier sur le rat (Frier, Williams et al. 2009). Malgré ces résultats opposés, il est nécessaire d'étudier l'impact de la modification des taux circulants d'adiponectine et de leptine dans notre modèle puisque ces deux adipokines agissent sur le métabolisme lipidique musculaire et sur la sensibilité à l'insuline. En effet, une administration chronique d'adiponectine augmente la biogenèse mitochondriale ainsi que la capacité oxydative du muscle *via* l'activation de l'AMPK (Civitarese, Ukropcova et al. 2006). L'adiponectine améliore également la sensibilité à l'insuline (Maeda, Shimomura et al. 2002). Ainsi les effets de l'adiponectine sont semblables à ceux de l'apeline que nous avons observés, ce qui va dans le sens d'une implication de l'adiponectine dans l'effet de l'apeline.

Il sera donc nécessaire de mesurer dans notre modèle de souris obèses et insulino-résistantes la sécrétion d'adipokines telles que l'adiponectine et la leptine mais aussi des cytokines pro-inflammatoires et d'étudier leur impact sur les effets de l'apeline pour savoir si l'apeline agit directement ou non.

***CONCLUSION-  
PERSPECTIVES***



La résistance à l'insuline est une anomalie métabolique majeure conduisant au diabète de type 2 et il y a un intérêt considérable dans la découverte d'agents insulino-sensibilisateurs, et dans le développement de nouvelles stratégies. L'apeline est une nouvelle cible attractive par son rôle sur le métabolisme énergétique récemment mis en évidence. Même si différentes publications ont montré un effet bénéfique de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline dans différents modèles de souris obèses et résistantes à l'insuline avant les travaux de cette thèse, il était important de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu et de savoir si l'apeline pouvait exercer de nouveaux effets métaboliques.

En 2007, les travaux d'Higuchi et de ses collaborateurs ont montré une diminution de l'adiposité et une amélioration du profil lipidique plasmatique chez des souris en régime standard mais aussi en régime hyperlipidique traitées quotidiennement pendant 14 jours par l'apeline (Higuchi, Masaki et al. 2007). Ces effets sont associés à une augmentation de la dépense énergétique et une meilleure utilisation des lipides chez des souris normopondérales. Dans ce sens, une augmentation de la biogenèse mitochondriale a été observée dans un muscle glycolytique de rats en régime standard traités 14 jours par l'apeline (Frier, Williams et al. 2009). En 2008, les travaux de C. Dray dans notre équipe ont montré une augmentation de l'utilisation du glucose dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux chez des souris normopondérales mais aussi chez des souris rendues insulino-résistantes par un régime hyperlipidique (Dray, Knauf et al. 2008). De plus, cette étude a montré pour la première fois une amélioration de la sensibilité à l'insuline après un traitement aigu par l'apeline chez des souris en régime hyperlipidique. Par la suite, cet effet a été confirmé chez des souris *db/db* traitées en chronique et en continu par l'apeline mais aussi par l'étude de souris invalidées pour l'apeline, qui deviennent rapidement insulino-résistantes (Yue, Jin et al.). L'ensemble de ces travaux a donc mis en évidence le rôle de l'apeline dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'utilisation des lipides *in vivo* mais aussi *ex vivo* sur le muscle squelettique chez des souris en régime hyperlipidique traitées 28 jours par l'apeline. Cet effet est associé à une meilleure capacité oxydative du muscle permettant d'empêcher une surcharge mitochondriale pouvant être délétère pour la voie de transduction de l'insuline. Cette augmentation de la biogenèse mitochondriale a été observée dans notre étude dans le muscle soléaire, un muscle oxydatif. Dans un muscle glycolytique, l'EDL, aucune augmentation de la biogenèse mitochondriale

n'a été retrouvée chez des souris insulino-résistantes. Toutefois, il serait intéressant de voir si un traitement par l'apeline permet d'induire un « switch » des fibres glycolytiques vers un phénotype oxydatif, comme ce qui est observé lors de la pratique régulière d'un exercice physique (Turcotte and Fisher 2008). Dans ce sens, l'augmentation de la capacité oxydative musculaire induite par l'apeline pourrait améliorer la performance physique des souris lors d'un exercice physique. En effet, une activation chronique de l'AMPK par l'AICAR pendant 28 jours permet d'améliorer l'endurance chez des souris non entraînées (Narkar, Downes et al. 2008) ceci étant associé à une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme oxydatif. Ainsi, il sera intéressant de regarder si l'apeline, comme l'AICAR, permet de mimer les effets d'un exercice physique régulier (augmentation de la biogenèse mitochondriale et switch des fibres) ce qui permettrait ainsi d'augmenter la capacité physique des animaux traités.

Au niveau du tissu adipeux blanc, nous avons observé une diminution de la masse adipeuse chez des souris insulino-résistantes traitées pendant 28 jours à l'apeline ce qui corrobore les résultats d'Higuchi. Cependant, des études du métabolisme du tissu adipeux *in vivo* sont nécessaires pour comprendre par quel mécanisme l'apeline réduit le stockage de TG dans le tissu adipeux. On peut ainsi envisager que l'apeline diminue le stockage des AG et/ou augmente la mobilisation de TG (lipolyse) mais aussi, qu'elle améliore la capacité du tissu adipeux blanc à utiliser les lipides ( $\beta$ -oxydation). En effet, une activation de l'AMPK *in vivo* chez le rat permet d'augmenter l'oxydation des AG dans tissu adipeux blanc, et ceci est associé à une augmentation de l'expression de PGC1 $\alpha$  ainsi que de PPAR  $\alpha$  et  $\delta$  (Gaidhu, Fediuc et al. 2009). Le tissu adipeux blanc peut ainsi acquérir des caractéristiques phénotypiques et moléculaires du tissu adipeux brun ce qui lui permet ainsi d'oxyder les AG au lieu de les stocker, réduisant ainsi l'adiposité (Cannon and Nedergaard ; Guerra, Koza et al. 1998). De manière intéressante, l'exposition de souris au froid permet d'augmenter PGC1 $\alpha$  dans le tissu adipeux blanc et ceci conduit à une augmentation de l'expression d'apeline (Mazzucotelli, Ribet et al. 2008). De plus, comme nous l'avons déjà évoqué, le tissu adipeux brun pourrait être lui aussi une cible importante de l'apeline. Chez des souris insulino-résistantes, nous avons pu montrer qu'une infusion chronique d'apeline augmente la dépense énergétique ceci pouvant être associé à une augmentation de l'oxydation des lipides dans les muscles oxydatifs mais aussi dans le tissu adipeux brun. Dans ce tissu, l'oxydation des AG est

associée à un découplage de la chaîne respiratoire par UCP1 ce qui conduit à la production de chaleur.

Chez l'homme, la présence de tissu adipeux brun a récemment été révélée (Enerback). Même si pour l'instant il est trop tôt pour savoir les conséquences fonctionnelles liées à la présence de ces adipocytes, il est toujours tentant de spéculer que d'arriver à optimiser leur capacités oxydatives et de surcroît en réponse à l'apeline pourrait avoir des répercussions non négligeables sur la prise de poids et la dépense énergétique.

Jusqu'à présent, le rôle de l'apeline sur le métabolisme énergétique a été étudié au niveau du tissu adipeux blanc et du muscle. Etant donné la très faible expression en ARNm du récepteur APJ dans le foie de souris en régime standard, ce tissu n'a pas été étudié en priorité. Cependant rien n'exclut que le métabolisme hépatique, par des effets indirects, soit aussi modifié en réponse au traitement par l'apeline. En effet, un traitement de 14 jours par l'apeline chez des souris de poids normal modifie la sécrétion d'adipokines puisqu'elle augmente la sécrétion d'adiponectine et diminue celle de leptine, deux adipokines participant à la régulation du métabolisme hépatique. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion d'adiponectine par l'apeline pourrait, *via* l'activation de l'AMPK dans le foie, diminuer la production hépatique de glucose. Un parallèle pourrait alors être fait avec les thiazolidinediones qui, de la même manière, augmentent la sécrétion d'adiponectine qui agit sur le foie en inhibant la néoglucogenèse hépatique (Kubota, Terauchi et al. 2006). Enfin, un effet direct de l'apeline pourrait être envisagé en condition pathologique. En effet, l'expression d'APJ est fortement augmentée au cours de certaines pathologies comme la cirrhose hépatique (Principe, Melgar-Lesmes et al. 2008). APJ pourrait aussi être augmenté au cours du diabète induit par l'obésité qui est associé à une stéatose hépatique pouvant se compliquer en cirrhose hépatique (Postic and Girard 2008). D'ailleurs, des données récentes dans l'équipe montrent que chez des souris *db/db* âgées, il y a une nette augmentation de l'expression d'APJ (ARNm) dans le foie. De plus, il est possible qu'APJ soit présent sur un type cellulaire minoritairement représenté mais qu'il soit fonctionnel et impliqué dans la régulation du métabolisme hépatique.

L'ensemble des effets de l'apeline que nous venons de décrire montrent un rôle bénéfique de l'apeline puisqu'elle améliore la sensibilité à l'insuline et l'adiposité. Dans le

cadre plus général du syndrome métabolique, l'obésité et le diabète sont associés à d'autres pathologies telles que les dyslipidémies (hypertriglycéridémie et diminution du HDL cholestérol plasmatique), l'athérosclérose, et l'hypertension artérielle qui augmentent le risque d'apparition de pathologie cardiaque.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'apeline joue un rôle bénéfique au niveau de la sphère cardiovasculaire, *via* ses effets hypotenseurs et l'amélioration de la contractilité cardiaque lors de l'insuffisance cardiaque. La régulation du métabolisme énergétique cardiaque par certaines adipokines comme la leptine et l'adiponectine joue un rôle important dans la mise en place des pathologies cardiaques (Fang, Palanivel et al. ; Palanivel, Eguchi et al. 2006). Ainsi, l'implication de l'apeline dans le métabolisme énergétique cardiaque est étudiée dans l'équipe dans un modèle d'insuffisance cardiaque dans un contexte d'obésité. En ce qui concerne les dyslipidémies, les taux plasmatiques d'apeline sont diminués chez des patients atteints de dyslipidémie (Tasci, Dogru et al. 2007) alors que la diminution du LDL-cholestérol par des statines est associée à une augmentation des taux plasmatiques d'apeline (Tasci, Erdem et al. 2009). De plus, dans notre étude, un traitement chronique par l'apeline diminue le taux plasmatique de TG mais il serait aussi intéressant de voir si ce traitement augmente le HDL-cholestérol comme cela a été montré chez des rats Zucker traités chroniquement à l'AICAR (Buhl, Jessen et al. 2002). Enfin, deux études ont suggéré l'implication du système apeline/APJ dans l'athérosclérose mais ces travaux présentent des résultats contradictoires et il sera donc important de les éclaircir.

Les études concernant le rôle de l'apeline sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline ont toutes été réalisées au niveau périphérique mais l'implication du SNC doit être envisagée dans ces effets. En effet, d'autres adipokines comme la leptine et l'adiponectine régulent le métabolisme énergétique à la fois par une action périphérique et par des effets centraux. Ainsi, dans l'équipe, les effets de différentes doses d'apeline injectées en intracérébroventriculaire (icv) ont été étudiés sur l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline. L'injection aigue en icv de faibles doses d'apeline chez la souris normale provoque des effets bénéfiques sur l'homéostasie glucidique (diminution de la glycémie, amélioration de la tolérance au glucose) par une voie dépendante du monoxyde d'azote (NO) hypothalamique alors qu'au contraire de fortes doses déclenchent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun mimant ainsi les caractéristiques d'un DT2. De plus, tous les effets

bénéfiques de l'apeline « faible dose » injectée en icv sur la glycémie sont absents dans chez des souris obèses et insulino-résistantes (Duparc et al en révision).

De plus, les effets de signaux périphériques sur le SNC doivent être également envisagés dans l'étude des effets centraux de l'apeline. En effet, Higuchi et ses collaborateurs (2007) ont rapporté qu'un traitement de 14 jours à l'apeline injectée par voie ip entraîne une augmentation des taux d'apeline dans l'hypothalamus, suggérant que ce peptide peut traverser la barrière hémato-encéphalique. De plus, différents signaux hormonaux et nutritionnels agissent au niveau du SNC pour contrôler l'homéostasie énergétique (Schwartz, Woods et al. 2000). Depuis plusieurs années, le glucose ainsi que l'insuline et la leptine sont connus pour « prévenir » l'hypothalamus de l'état nutritionnel de l'organisme lui permettant ainsi d'inhiber la prise alimentaire et la production hépatique de glucose. Plus récemment, l'implication des AG dans ce phénomène a été mise en évidence. En effet, les AG (non liés à l'albumine ou issus de l'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons ou les VLDL) peuvent passer la barrière hémato-encéphalique par diffusion simple et atteignent l'hypothalamus. Comme en périphérie, une fois dans la cellule, les AG sont transformés en acyl-CoA et pourront être oxydés après leur transport dans les mitochondries. De manière intéressante, ce métabolisme lipidique dans l'hypothalamus participe à la régulation de la prise alimentaire. En effet, l'augmentation de l'entrée des AG ou l'inhibition de leur oxydation dans l'hypothalamus entraîne une accumulation d'acyl-CoA et donc une inhibition de la prise alimentaire. Ceci permet d'ailleurs d'expliquer l'inhibition de la prise alimentaire par l'insuline et la leptine. Nous avons vu dans l'introduction que le rôle de l'apeline sur la prise alimentaire est controversé. Il sera donc intéressant d'étudier l'effet de l'apeline non seulement sur la phosphorylation de l'AMPK dans l'hypothalamus mais aussi sur le métabolisme des AG dans cette région cérébrale.

De plus, l'hypothalamus régule le métabolisme hépatique ainsi que la thermogénèse adaptative du tissu adipeux brun, *via* l'activation du système nerveux autonome ce qui mériterait d'être également étudié en réponse à l'apeline.

L'ensemble des effets métaboliques de l'apeline a été étudié soit par un traitement aigu (injection iv d'apeline), soit après un traitement chronique de 14 ou 28 jours par des injections quotidiennes ou une infusion continue d'apeline. Un traitement long terme par l'apeline améliore la sensibilité à l'insuline, cependant le système apeline/APJ exerce de nombreux autres effets notamment dans la sphère cardio-vasculaire, sur l'angiogénèse et l'équilibre

hydrique, la prise alimentaire et les fonctions gastro-intestinales. Il sera notamment important d'étudier les conséquences d'un tel traitement sur la sphère cardio-vasculaire et les phénomènes de prolifération. De plus, d'autres questions relatives au traitement se posent à savoir : quelle est la stratégie thérapeutique optimale : aigu ou chronique, et quelle est la durée des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline ?

En effet, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par l'apeline après une simple injection d'apeline est due à une activation de l'AMPK permettant une augmentation du transport de glucose dans le muscle et le tissu adipeux. Il serait intéressant de voir combien de temps cet effet est maintenu. De plus, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par un traitement chronique est notamment due à une amélioration de la capacité oxydative mitochondriale du muscle mais nous ne savons pas actuellement à quel moment du traitement cet effet se met en place ni combien de temps il perdurerait à la fin du traitement. Ainsi, il sera important de répondre à ces questions pour envisager une stratégie thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2. De plus, le développement de ligands non peptidiques, sélectifs d'APJ et capables de mimer les effets de l'apeline permettra une administration orale. Enfin, l'intérêt par rapport aux autres médicaments anti-diabétiques doit aussi être envisagé.

Ainsi, même si certaines questions restent en suspend, le système apeline/APJ doit être considéré comme une cible d'intérêt dans le traitement du diabète de type 2 et des études chez l'Homme sont maintenant nécessaires pour confirmer ce potentiel thérapeutique.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***



- Abu-Elheiga, L., M. M. Matzuk, et al. (2001). "Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2." *Science* **291**(5513): 2613-6.
- Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, et al. (1993). "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36." *J Biol Chem* **268**(24): 17665-8.
- Abumrad, N. A., J. H. Park, et al. (1984). "Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein." *J Biol Chem* **259**(14): 8945-53.
- Abumrad, N. A., R. C. Perkins, et al. (1981). "Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte." *J Biol Chem* **256**(17): 9183-91.
- Adams, S. H., C. L. Hoppel, et al. (2009). "Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women." *J Nutr* **139**(6): 1073-81.
- Aguer, C., J. Mercier, et al. (2010) "Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients." *Diabetologia* **53**(6): 1151-63.
- Aguirre, V., T. Uchida, et al. (2000). "The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)." *J Biol Chem* **275**(12): 9047-54.
- Aguirre, V., E. D. Werner, et al. (2002). "Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action." *J Biol Chem* **277**(2): 1531-7.
- Ahren, B., S. Mansson, et al. (1997). "Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 2): R113-20.
- An, J., D. M. Muoio, et al. (2004). "Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance." *Nat Med* **10**(3): 268-74.
- Anderson, E. J., M. E. Lustig, et al. (2009). "Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans." *J Clin Invest*.
- Anthonsen, M. W., L. Ronnstrand, et al. (1998). "Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro." *J Biol Chem* **273**(1): 215-21.
- Anthony, N. M., M. P. Gaidhu, et al. (2009). "Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation." *Obesity (Silver Spring)* **17**(7): 1312-7.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83.
- Arner, P. (2005). "Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**(4): 471-82.
- Ashley, E. A., J. Powers, et al. (2005). "The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo." *Cardiovasc Res* **65**(1): 73-82.
- Azizi, M., X. Iturrioz, et al. (2008). "Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli." *J Am Soc Nephrol* **19**(5): 1015-24.
- Bain, J. R., R. D. Stevens, et al. (2009). "Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge." *Diabetes* **58**(11): 2429-43.
- Barnes, G., A. G. Japp, et al. (2010) "Translational promise of the apelin--APJ system." *Heart* **96**(13): 1011-6.
- Barres, R., M. E. Osler, et al. (2009). "Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density." *Cell Metab* **10**(3): 189-98.
- Barthel, A., D. Schmoll, et al. (2002). "Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase." *Endocrinology* **143**(8): 3183-6.
- Baur, J. A., K. J. Pearson, et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* **444**(7117): 337-42.

- Bavenholm, P. N., J. Kuhl, et al. (2003). "Insulin resistance in type 2 diabetes: association with truncal obesity, impaired fitness, and atypical malonyl coenzyme A regulation." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(1): 82-7.
- Ben Sahra, I., K. Laurent, et al. (2008). "The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level." *Oncogene* **27**(25): 3576-86.
- Benton, C. R., G. P. Holloway, et al. (2008). "Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle mitochondria." *J Physiol* **586**(6): 1755-66.
- Berg, A. H., T. P. Combs, et al. (2002). "ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **13**(2): 84-9.
- Bergeron, R., S. F. Previs, et al. (2001). "Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats." *Diabetes* **50**(5): 1076-82.
- Bergeron, R., J. M. Ren, et al. (2001). "Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**(6): E1340-6.
- Bezaire, V., C. R. Bruce, et al. (2006). "Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(3): E509-15.
- Bjorntorp, P. (1995). "Endocrine abnormalities of obesity." *Metabolism* **44**(9 Suppl 3): 21-3.
- Blaak, E. E. (2005). "Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**(3): 391-403.
- Bloch-Damti, A. and N. Bashan (2005). "Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* **7**(11-12): 1553-67.
- Bluher, M., J. W. Bullen, Jr., et al. (2006). "Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(6): 2310-6.
- Bogacka, I., H. Xie, et al. (2005). "Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo." *Diabetes* **54**(5): 1392-9.
- Bonen, A., A. Chabowski, et al. (2007). "Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence." *Physiology (Bethesda)* **22**: 15-29.
- Bonen, A., J. J. Luiken, et al. (2000). "Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase." *J Biol Chem* **275**(19): 14501-8.
- Bonen, A., J. J. Luiken, et al. (1998). "Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles." *Am J Physiol* **275**(3 Pt 1): E471-8.
- Bonen, A., M. L. Parolin, et al. (2004). "Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36." *FASEB J* **18**(10): 1144-6.
- Bonnard, C., A. Durand, et al. (2008). "Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice." *J Clin Invest* **118**(2): 789-800.
- Bonnefond, A., P. Froguel, et al. (2010) "The emerging genetics of type 2 diabetes." *Trends Mol Med* **16**(9): 407-16.
- Boon, H., M. Bosselaar, et al. (2008). "Intravenous AICAR administration reduces hepatic glucose output and inhibits whole body lipolysis in type 2 diabetic patients." *Diabetologia* **51**(10): 1893-900.
- Boss, O., S. Samec, et al. (1997). "Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression." *FEBS Lett* **408**(1): 39-42.
- Boucher, J., B. Masri, et al. (2005). "Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity." *Endocrinology* **146**(4): 1764-71.
- Boudeau, J., J. W. Scott, et al. (2004). "Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex." *J Cell Sci* **117**(Pt 26): 6365-75.
- Bourron, O., M. Daval, et al. (2010) "Biguanides and thiazolidinediones inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes through activation of AMP-activated protein kinase." *Diabetologia* **53**(4): 768-78.

- Boushel, R., E. Gnaiger, et al. (2007). "Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle." *Diabetologia* **50**(4): 790-6.
- Bouzakri, K., R. Austin, et al. (2008). "Malonyl CoenzymeA decarboxylase regulates lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle." *Diabetes* **57**(6): 1508-16.
- Brand, M. D., L. F. Chien, et al. (1994). "Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport." *Biochem J* **297** ( Pt 1): 27-9.
- Brechtel, K., D. B. Dahl, et al. (2001). "Fast elevation of the intramyocellular lipid content in the presence of circulating free fatty acids and hyperinsulinemia: a dynamic 1H-MRS study." *Magn Reson Med* **45**(2): 179-83.
- Bruce, C. R., V. A. Mertz, et al. (2005). "The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects." *Diabetes* **54**(11): 3154-60.
- Buhl, E. S., N. Jessen, et al. (2002). "Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome." *Diabetes* **51**(7): 2199-206.
- Butler, A. E., J. Janson, et al. (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." *Diabetes* **52**(1): 102-10.
- Campbell, I. W. (2004). "Long-term glycaemic control with pioglitazone in patients with type 2 diabetes." *Int J Clin Pract* **58**(2): 192-200.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2010) "Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans)." *Int J Obes (Lond)* **34** Suppl 1: S7-16.
- Canto, C. and J. Auwerx (2009). "PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure." *Curr Opin Lipidol* **20**(2): 98-105.
- Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." *Med Sci (Paris)* **19**(8-9): 834-9.
- Carling, D., V. A. Zammit, et al. (1987). "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis." *FEBS Lett* **223**(2): 217-22.
- Carpene, C., C. Dray, et al. (2007). "Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology." *J Physiol Biochem* **63**(4): 359-73.
- Carr, R. D., C. L. Brand, et al. (2003). "NN414, a SUR1/Kir6.2-selective potassium channel opener, reduces blood glucose and improves glucose tolerance in the VDF Zucker rat." *Diabetes* **52**(10): 2513-8.
- Castan-Laurell, I., M. Vitkova, et al. (2008). "Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ." *Eur J Endocrinol* **158**(6): 905-10.
- Ceddia, R. B., R. Somwar, et al. (2005). "Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells." *Diabetologia* **48**(1): 132-9.
- Chandrasekaran, B., O. Dar, et al. (2008). "The role of apelin in cardiovascular function and heart failure." *Eur J Heart Fail* **10**(8): 725-32.
- Charo, D. N., M. Ho, et al. (2009). "Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(5): H1904-13.
- Chavez, J. A., W. L. Holland, et al. (2005). "Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling." *J Biol Chem* **280**(20): 20148-53.
- Chen, M. M., E. A. Ashley, et al. (2003). "Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction." *Circulation* **108**(12): 1432-9.
- Chibalin, A. V., Y. Leng, et al. (2008). "Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance." *Cell* **132**(3): 375-86.
- Choi, C. S., D. B. Savage, et al. (2007). "Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16480-5.
- Chong, K. S., R. S. Gardner, et al. (2006). "Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure." *Eur J Heart Fail* **8**(4): 355-60.

- Choo, H. J., J. H. Kim, et al. (2006). "Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice." *Diabetologia* **49**(4): 784-91.
- Chun, H. J., Z. A. Ali, et al. (2008). "Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis." *J Clin Invest* **118**(10): 3343-54.
- Civitarese, A. E., S. Carling, et al. (2007). "Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans." *PLoS Med* **4**(3): e76.
- Civitarese, A. E., B. Ukropcova, et al. (2006). "Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics." *Cell Metab* **4**(1): 75-87.
- Clarke, K. J., K. W. Whitaker, et al. (2009). "Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet." *J Neuroendocrinol* **21**(2): 83-9.
- Coburn, C. T., F. F. Knapp, Jr., et al. (2000). "Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice." *J Biol Chem* **275**(42): 32523-9.
- Colombo, C., J. J. Cutson, et al. (2002). "Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipotrophy." *Diabetes* **51**(9): 2727-33.
- Cool, B., B. Zinker, et al. (2006). "Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome." *Cell Metab* **3**(6): 403-16.
- Costford, S. R., E. L. Seifert, et al. (2007). "The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle." *Appl Physiol Nutr Metab* **32**(5): 884-94.
- Cox, C. M., S. L. D'Agostino, et al. (2006). "Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo." *Dev Biol* **296**(1): 177-89.
- Cuthbertson, D. J., J. A. Babraj, et al. (2007). "5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside acutely stimulates skeletal muscle 2-deoxyglucose uptake in healthy men." *Diabetes* **56**(8): 2078-84.
- Dai, T., G. Ramirez-Correa, et al. (2006). "Apelin increases contractility in failing cardiac muscle." *Eur J Pharmacol* **553**(1-3): 222-8.
- Daval, M., F. Diot-Dupuy, et al. (2005). "Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes." *J Biol Chem* **280**(26): 25250-7.
- Daval, M., F. Fougelle, et al. (2006). "Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue." *J Physiol* **574**(Pt 1): 55-62.
- Daviaud, D., J. Boucher, et al. (2006). "TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue." *FASEB J* **20**(9): 1528-30.
- De Feyter, H. M., N. M. van den Broek, et al. (2008). "Early or advanced stage type 2 diabetes is not accompanied by in vivo skeletal muscle mitochondrial dysfunction." *Eur J Endocrinol* **158**(5): 643-53.
- De Mota, N., Z. Lenkei, et al. (2000). "Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor." *Neuroendocrinology* **72**(6): 400-7.
- De Mota, N., A. Reaux-Le Goazigo, et al. (2004). "Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(28): 10464-9.
- de Wilde, J., R. Mohren, et al. (2008). "Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice." *Physiol Genomics* **32**(3): 360-9.
- DeFronzo, R. A. (2004). "Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes." *Int J Clin Pract Suppl*(143): 9-21.
- Despres, J. P., B. Lamarche, et al. (1995). "Exercise and the prevention of dyslipidemia and coronary heart disease." *Int J Obes Relat Metab Disord* **19 Suppl 4**: S45-51.
- Diede, H. E., E. Rodilla-Sala, et al. (1992). "Identification and characterization of a monoclonal antibody to the membrane fatty acid binding protein." *Biochim Biophys Acta* **1125**(1): 13-20.
- Dixon, J. B., P. E. O'Brien, et al. (2008). "Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial." *JAMA* **299**(3): 316-23.

- Djouder, N., R. D. Tuerk, et al. (2010) "PKA phosphorylates and inactivates AMPK $\alpha$  to promote efficient lipolysis." *EMBO J* **29**(2): 469-81.
- Dobbins, R. L., L. S. Szczepaniak, et al. (2003). "Chemical sympathectomy alters regulation of body weight during prolonged ICV leptin infusion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(4): E778-87.
- Dray, C., C. Debard, et al. (2010) "Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(6): E1161-9.
- Dray, C., C. Knauf, et al. (2008). "Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice." *Cell Metab* **8**(5): 437-45.
- Eckel, R. H., K. G. Alberti, et al. "The metabolic syndrome." *Lancet* **375**(9710): 181-3.
- Dube, J. J., F. Amati, et al. (2008). "Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(5): E882-8.
- Edinger, A. L., T. L. Hoffman, et al. (1998). "An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus." *J Virol* **72**(10): 7934-40.
- El-Mir, M. Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." *J Biol Chem* **275**(1): 223-8.
- El Messari, S., X. Iturrioz, et al. (2004). "Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure." *J Neurochem* **90**(6): 1290-301.
- Enerback, S. (2010) "Brown adipose tissue in humans." *Int J Obes (Lond)* **34 Suppl 1**: S43-6.
- Erdem, G., T. Dogru, et al. (2008). "Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **116**(5): 289-92.
- Evans, M. J. and R. C. Scarpulla (1989). "Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences." *J Biol Chem* **264**(24): 14361-8.
- Evans, R. M., G. D. Barish, et al. (2004). "PPARs and the complex journey to obesity." *Nat Med* **10**(4): 355-61.
- Eyries, M., G. Siegfried, et al. (2008). "Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis." *Circ Res* **103**(4): 432-40.
- Fan, X., N. Zhou, et al. (2003). "Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, APJ." *Biochemistry* **42**(34): 10163-8.
- Fang, X., R. Palanivel, et al. (2010) "An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(5): E721-9.
- Farkasfalvi, K., M. A. Stagg, et al. (2007). "Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(4): 889-95.
- Faust, I. M., P. R. Johnson, et al. (1978). "Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity." *Am J Physiol* **235**(3): E279-86.
- Felber, J. P. and A. Golay (2002). "Pathways from obesity to diabetes." *Int J Obes Relat Metab Disord* **26 Suppl 2**: S39-45.
- Fisher, J. S., J. Gao, et al. (2002). "Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(1): E18-23.
- Foldes, G., F. Horkay, et al. (2003). "Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure." *Biochem Biophys Res Commun* **308**(3): 480-5.
- Folmes, C. D. and G. D. Lopaschuk (2007). "Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity." *Cardiovasc Res* **73**(2): 278-87.
- Foretz, M., N. Ancellin, et al. (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**(5): 1331-9.
- Foretz, M., B. Guigas, et al. (2006). "[From cancer to diabetes treatment : the tumor suppressor LKB1 as a new pharmacological target]." *Med Sci (Paris)* **22**(4): 348-50.

- Foretz, M., S. Hebrard, et al. (2010). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state." J Clin Invest **120**(7): 2355-69.
- Francia, P., A. Salvati, et al. (2007). "Cardiac resynchronization therapy increases plasma levels of the endogenous inotrope apelin." Eur J Heart Fail **9**(3): 306-9.
- Frayn, K. N. (2002). "Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux." Diabetologia **45**(9): 1201-10.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature **395**(6704): 763-70.
- Frier, B. C., D. B. Williams, et al. (2009). "The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(6): R1761-8.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, et al. (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**(4): 2005-10.
- Fryer, L. G., F. Fougère, et al. (2002). "Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells." Biochem J **363**(Pt 1): 167-74.
- Fryer, L. G., E. Hajdich, et al. (2000). "Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase." Diabetes **49**(12): 1978-85.
- Fryer, L. G., A. Parbu-Patel, et al. (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." J Biol Chem **277**(28): 25226-32.
- Fujii, N., M. F. Hirshman, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase alpha2 activity is not essential for contraction- and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle." J Biol Chem **280**(47): 39033-41.
- Gaidhu, M. P., S. Fediuc, et al. (2009). "Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL." J Lipid Res **50**(4): 704-15.
- Galgani, J. E., C. Moro, et al. (2008). "Metabolic flexibility and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(5): E1009-17.
- Ganda, O. P. (2000). "Lipoatrophy, lipodystrophy, and insulin resistance." Ann Intern Med **133**(4): 304-6.
- Garcia-Diaz, D., J. Campion, et al. (2007). "Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers." Mol Cell Biochem **305**(1-2): 87-94.
- Garcia-Roves, P., J. M. Huss, et al. (2007). "Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10709-13.
- Gauthier, M. S., H. Miyoshi, et al. (2008). "AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance." J Biol Chem **283**(24): 16514-24.
- Gavrilova, O., B. Marcus-Samuels, et al. (2000). "Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice." J Clin Invest **105**(3): 271-8.
- Gerstein, H. C., S. Yusuf, et al. (2006). "Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial." Lancet **368**(9541): 1096-105.
- Gimeno, R. E., M. Dembski, et al. (1997). "Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis." Diabetes **46**(5): 900-6.
- Gimeno, R. E., A. M. Ortegon, et al. (2003). "Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein." J Biol Chem **278**(18): 16039-44.
- Glassford, A. J., P. Yue, et al. (2007). "HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(6): E1590-6.
- Glatz, J. F., A. Bonen, et al. (2002). "Exercise and insulin increase muscle fatty acid uptake by recruiting putative fatty acid transporters to the sarcolemma." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**(4): 365-70.
- Goodpaster, B. H., J. He, et al. (2001). "Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes." J Clin Endocrinol Metab **86**(12): 5755-61.

- Griffin, M. E., M. J. Marcucci, et al. (1999). "Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade." *Diabetes* **48**(6): 1270-4.
- Guerra, B., T. Fuentes, et al. (2008). "Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity." *PLoS One* **3**(10): e3466.
- Guerra, B., A. Santana, et al. (2007). "Leptin receptors in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* **102**(5): 1786-92.
- Guerra, C., R. A. Koza, et al. (1998). "Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity." *J Clin Invest* **102**(2): 412-20.
- Guo, L., Q. Li, et al. (2009). "Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B." *Endocr Res* **34**(4): 142-54.
- Gurzu, B., B. C. Petrescu, et al. (2006). "Interactions between apelin and angiotensin II on rat portal vein." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **7**(4): 212-6.
- Habata, Y., R. Fujii, et al. (1999). "Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum." *Biochim Biophys Acta* **1452**(1): 25-35.
- Hamilton, J. A., W. Guo, et al. (2002). "Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins?" *Mol Cell Biochem* **239**(1-2): 17-23.
- Hamilton, J. A., R. A. Johnson, et al. (2001). "Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 99-108; discussion 151-7.
- Han, S., G. Wang, et al. (2008). "A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(6): R1832-9.
- Han, S., G. Wang, et al. (2007). "Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD." *Regul Pept* **142**(3): 131-7.
- Han, X. X., A. Chabowski, et al. (2007). "Metabolic challenges reveal impaired fatty acid metabolism and translocation of FAT/CD36 but not FABPpm in obese Zucker rat muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(2): E566-75.
- Hancock, C. R., D. H. Han, et al. (2008). "High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7815-20.
- Hardie, D. G. (2004). "AMP-activated protein kinase: the guardian of cardiac energy status." *J Clin Invest* **114**(4): 465-8.
- Hardie, D. G. and S. A. Hawley (2001). "AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited." *Bioessays* **23**(12): 1112-9.
- Hashimoto, T., M. Kihara, et al. (2007). "Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis." *Am J Pathol* **171**(5): 1705-12.
- Hashimoto, T., M. Kihara, et al. (2006). "Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(6): 1267-72.
- Hawley, J. A. and S. J. Lessard (2008). "Exercise training-induced improvements in insulin action." *Acta Physiol (Oxf)* **192**(1): 127-35.
- Hawley, S. A., J. Boudeau, et al. (2003). "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade." *J Biol* **2**(4): 28.
- Hawley, S. A., D. A. Pan, et al. (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." *Cell Metab* **2**(1): 9-19.
- Hawley, S. A., F. A. Ross, et al. (2010) "Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation." *Cell Metab* **11**(6): 554-65.
- Hayashi, T., M. F. Hirshman, et al. (1998). "Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport." *Diabetes* **47**(8): 1369-73.
- Hayes, C. and A. Kriska (2008). "Role of physical activity in diabetes management and prevention." *J Am Diet Assoc* **108**(4 Suppl 1): S19-23.
- He, J., S. Watkins, et al. (2001). "Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity." *Diabetes* **50**(4): 817-23.
- Hegarty, B. D., G. J. Cooney, et al. (2002). "Increased efficiency of fatty acid uptake contributes to lipid accumulation in skeletal muscle of high fat-fed insulin-resistant rats." *Diabetes* **51**(5): 1477-84.

- Heinonen, M. V., D. E. Laaksonen, et al. (2009). "Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome." Nutr Metab Cardiovasc Dis **19**(9): 626-33.
- Higuchi, K., T. Masaki, et al. (2007). "Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice." Endocrinology **148**(6): 2690-7.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**(6913): 333-6.
- Ho, J. K., R. I. Duclos, Jr., et al. (2002). "Interactions of acyl carnitines with model membranes: a (13)C-NMR study." J Lipid Res **43**(9): 1429-39.
- Hoehn, K. L., A. B. Salmon, et al. (2009). "Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17787-92.
- Hoehn, K. L., N. Turner, et al. (2010) "Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity." Cell Metab **11**(1): 70-6.
- Hoeks, J., J. J. Briede, et al. (2008). "Mitochondrial function, content and ROS production in rat skeletal muscle: effect of high-fat feeding." FEBS Lett **582**(4): 510-6.
- Hoggard, N., J. G. Mercer, et al. (1997). "Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization." Biochem Biophys Res Commun **232**(2): 383-7.
- Holland, W. L., J. T. Brozinick, et al. (2007). "Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance." Cell Metab **5**(3): 167-79.
- Holloszy, J. O. and E. F. Coyle (1984). "Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences." J Appl Physiol **56**(4): 831-8.
- Holloway, G. P., C. R. Benton, et al. (2009). "In obese rat muscle transport of palmitate is increased and is channeled to triacylglycerol storage despite an increase in mitochondrial palmitate oxidation." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E738-47.
- Holloway, G. P., A. B. Thrush, et al. (2007). "Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(6): E1782-9.
- Holmes, B. F., E. J. Kurth-Kraczek, et al. (1999). "Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle." J Appl Physiol **87**(5): 1990-5.
- Holmes, B. F., D. B. Lang, et al. (2004). "AMP kinase is not required for the GLUT4 response to exercise and denervation in skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(4): E739-43.
- Hong, Y. H., U. S. Varanasi, et al. (2003). "AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability." J Biol Chem **278**(30): 27495-501.
- Hosoya, M., Y. Kawamata, et al. (2000). "Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin." J Biol Chem **275**(28): 21061-7.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Hou, X., S. Xu, et al. (2008). "SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **283**(29): 20015-26.
- Houstis, N., E. D. Rosen, et al. (2006). "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance." Nature **440**(7086): 944-8.
- Hue, L. and H. Taegtmeier (2009). "The Randle cycle revisited: a new head for an old hat." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(3): E578-91.
- Huffman, K. M., S. H. Shah, et al. (2009). "Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women." Diabetes Care **32**(9): 1678-83.

- Hus-Citharel, A., N. Bouby, et al. (2008). "Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney." *Kidney Int* **74**(4): 486-94.
- Huss, J. M., R. P. Kopp, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha." *J Biol Chem* **277**(43): 40265-74.
- Huss, J. M., I. P. Torra, et al. (2004). "Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle." *Mol Cell Biol* **24**(20): 9079-91.
- Huypens, P., E. Quartier, et al. (2005). "Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase." *Eur J Pharmacol* **518**(2-3): 90-5.
- Iglesias, M. A., J. M. Ye, et al. (2002). "AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats." *Diabetes* **51**(10): 2886-94.
- Irrcher, I., P. J. Adhihetty, et al. (2003). "Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise." *Sports Med* **33**(11): 783-93.
- Ishida, J., T. Hashimoto, et al. (2004). "Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo." *J Biol Chem* **279**(25): 26274-9.
- Itani, S. I., W. J. Pories, et al. (2001). "Increased protein kinase C theta in skeletal muscle of diabetic patients." *Metabolism* **50**(5): 553-7.
- Itani, S. I., N. B. Ruderman, et al. (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha." *Diabetes* **51**(7): 2005-11.
- Iwanaga, Y., Y. Kihara, et al. (2006). "Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system." *J Mol Cell Cardiol* **41**(5): 798-806.
- Jager, S., C. Handschin, et al. (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29): 12017-22.
- Japp, A. G., N. L. Cruden, et al. (2008). "Vascular effects of apelin in vivo in man." *J Am Coll Cardiol* **52**(11): 908-13.
- Japp, A. G., N. L. Cruden, et al. (2010) "Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure." *Circulation* **121**(16): 1818-27.
- Japp, A. G. and D. E. Newby (2008). "The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential." *Biochem Pharmacol* **75**(10): 1882-92.
- Jia, Y. X., C. S. Pan, et al. (2006). "Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats." *Regul Pept* **133**(1-3): 147-54.
- Jones, T. E., K. Baar, et al. (2003). "Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(1): E96-101.
- Jorgensen, S. B., J. N. Nielsen, et al. (2004). "The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading." *Diabetes* **53**(12): 3074-81.
- Jorgensen, S. B., B. Viollet, et al. (2004). "Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle." *J Biol Chem* **279**(2): 1070-9.
- Jorgensen, S. B., J. F. Wojtaszewski, et al. (2005). "Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle." *FASEB J* **19**(9): 1146-8.
- Kadoglou, N. P., H. Tsanikidis, et al. (2010) "Effects of rosiglitazone and metformin treatment on apelin, visfatin, and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus." *Metabolism* **59**(3): 373-9.
- Kagiyama, S., M. Fukuhara, et al. (2005). "Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats." *Regul Pept* **125**(1-3): 55-9.

- Kahn, B. B., T. Alquier, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metab* **1**(1): 15-25.
- Kalin, R. E., M. P. Kretz, et al. (2007). "Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis." *Dev Biol* **305**(2): 599-614.
- Kanda, H., S. Tateya, et al. (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." *J Clin Invest* **116**(6): 1494-505.
- Kapur, S., S. Bedard, et al. (1997). "Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action." *Diabetes* **46**(11): 1691-700.
- Kasai, A., N. Shintani, et al. (2004). "Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **325**(2): 395-400.
- Katugampola, S. D., J. J. Maguire, et al. (2001). "[<sup>125</sup>I]-Pyr(1)Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man." *Br J Pharmacol* **132**(6): 1255-60.
- Kawaguchi, T., K. Osatomi, et al. (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**(6): 3829-35.
- Kawamata, Y., Y. Habata, et al. (2001). "Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding." *Biochim Biophys Acta* **1538**(2-3): 162-71.
- Kefas, B. A., H. Heimberg, et al. (2003). "AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase." *Diabetologia* **46**(2): 250-4.
- Kelley, D. E., B. Goodpaster, et al. (1999). "Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss." *Am J Physiol* **277**(6 Pt 1): E1130-41.
- Kelley, D. E. and B. H. Goodpaster (2001). "Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance." *Diabetes Care* **24**(5): 933-41.
- Kelley, D. E., J. He, et al. (2002). "Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes." *Diabetes* **51**(10): 2944-50.
- Kelley, D. E. and L. J. Mandarino (2000). "Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination." *Diabetes* **49**(5): 677-83.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2548-56.
- Kiens, B. (2006). "Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance." *Physiol Rev* **86**(1): 205-43.
- Kim, J. K., J. J. Fillmore, et al. (2004). "PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance." *J Clin Invest* **114**(6): 823-7.
- Kim, J. K., O. Gavrilova, et al. (2000). "Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice." *J Biol Chem* **275**(12): 8456-60.
- Kim, J. Y., R. C. Hickner, et al. (2000). "Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**(5): E1039-44.
- Kim, M. S., J. Y. Park, et al. (2004). "Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase." *Nat Med* **10**(7): 727-33.
- Kleinz, M. J. and A. P. Davenport (2004). "Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells." *Regul Pept* **118**(3): 119-25.
- Kleinz, M. J. and A. P. Davenport (2005). "Emerging roles of apelin in biology and medicine." *Pharmacol Ther* **107**(2): 198-211.
- Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, et al. (2002). "Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin." *N Engl J Med* **346**(6): 393-403.
- Koh, H. J., M. F. Hirshman, et al. (2007). "Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes." *Biochem J* **403**(3): 473-81.
- Koistinen, H. A., D. Galuska, et al. (2003). "5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes." *Diabetes* **52**(5): 1066-72.
- Koo, S. H., L. Flechner, et al. (2005). "The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism." *Nature* **437**(7062): 1109-11.

- Korshunov, S. S., V. P. Skulachev, et al. (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." *FEBS Lett* **416**(1): 15-8.
- Koves, T. R., P. Li, et al. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency." *J Biol Chem* **280**(39): 33588-98.
- Koves, T. R., J. R. Ussher, et al. (2008). "Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance." *Cell Metab* **7**(1): 45-56.
- Kralisch, S., U. Lossner, et al. (2007). "Growth hormone induces apelin mRNA expression and secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes." *Regul Pept* **139**(1-3): 84-9.
- Krssak, M., K. Falk Petersen, et al. (1999). "Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study." *Diabetologia* **42**(1): 113-6.
- Kuba, K., L. Zhang, et al. (2007). "Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload." *Circ Res* **101**(4): e32-42.
- Kubota, N., Y. Terauchi, et al. (2006). "Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways." *J Biol Chem* **281**(13): 8748-55.
- Kunduzova, O., N. Alet, et al. (2008). "Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes." *FASEB J* **22**(12): 4146-53.
- Kuoppamaa, H., P. Skrobuk, et al. (2008). "Globular adiponectin stimulates glucose transport in type 2 diabetic muscle." *Diabetes Metab Res Rev* **24**(7): 554-62.
- Kurth-Kraczek, E. J., M. F. Hirshman, et al. (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." *Diabetes* **48**(8): 1667-71.
- Lafontan, M. (2008). "Advances in adipose tissue metabolism." *Int J Obes (Lond)* **32** Suppl 7: S39-51.
- Lafontan, M. and D. Langin (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue." *Prog Lipid Res* **48**(5): 275-97.
- Lafontan, M., C. Moro, et al. (2005). "An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides: the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(10): 2032-42.
- Lagouge, M., C. Argmann, et al. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." *Cell* **127**(6): 1109-22.
- Langin, D. and P. Arner (2006). "Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis." *Trends Endocrinol Metab* **17**(8): 314-20.
- Larson-Meyer, D. E., L. K. Heilbronn, et al. (2006). "Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects." *Diabetes Care* **29**(6): 1337-44.
- Leclerc, I., C. Lenzner, et al. (2001). "Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase." *Diabetes* **50**(7): 1515-21.
- Lee, D. K., R. Cheng, et al. (2000). "Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor." *J Neurochem* **74**(1): 34-41.
- Lee, D. K., V. R. Saldivia, et al. (2005). "Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action." *Endocrinology* **146**(1): 231-6.
- Letexier, D., C. Pinteur, et al. (2003). "Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue." *J Lipid Res* **44**(11): 2127-34.
- Li, F., L. Li, et al. (2008). "Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1." *Front Biosci* **13**: 3786-92.
- Li, L., G. Yang, et al. (2006). "Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **114**(10): 544-8.
- Lihn, A. S., N. Jessen, et al. (2004). "AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **316**(3): 853-8.
- Lin, H. Z., S. Q. Yang, et al. (2000). "Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice." *Nat Med* **6**(9): 998-1003.
- Lin, J., H. Wu, et al. (2002). "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." *Nature* **418**(6899): 797-801.

- Lin, X., M. R. Chavez, et al. (1998). "The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity." *J Nutr* **128**(10): 1606-13.
- Linn, S. C., H. S. Kim, et al. (2001). "Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 6): 831-5.
- Liu, L., X. Shi, et al. (2009). "Paradoxical coupling of triglyceride synthesis and fatty acid oxidation in skeletal muscle overexpressing DGAT1." *Diabetes* **58**(11): 2516-24.
- Lochhead, P. A., I. P. Salt, et al. (2000). "5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase." *Diabetes* **49**(6): 896-903.
- Long, Y. C. and J. R. Zierath (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." *J Clin Invest* **116**(7): 1776-83.
- Lonnqvist, F., P. Arner, et al. (1995). "Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects." *Nat Med* **1**(9): 950-3.
- Lorente-Cebrian, S., M. Bustos, et al. (2010) "Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Nutr Food Res* **54** **Suppl 1**: S104-11.
- Lowell, B. B. and G. I. Shulman (2005). "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes." *Science* **307**(5708): 384-7.
- Luiken, J. J., Y. Arumugam, et al. (2001). "Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats." *J Biol Chem* **276**(44): 40567-73.
- Luiken, J. J., D. J. Dyck, et al. (2002). "Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(2): E491-5.
- Luquet, S., J. Lopez-Soriano, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability." *FASEB J* **17**(15): 2299-301.
- Maeda, N., I. Shimomura, et al. (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." *Nat Med* **8**(7): 731-7.
- Maguire, J. J., M. J. Kleinz, et al. (2009). "[Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease." *Hypertension* **54**(3): 598-604.
- Malyszko, J., J. S. Malyszko, et al. (2008). "Apelin, a novel adipocytokine, in relation to endothelial function and inflammation in kidney allograft recipients." *Transplant Proc* **40**(10): 3466-9.
- Mao, X., C. K. Kikani, et al. (2006). "APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function." *Nat Cell Biol* **8**(5): 516-23.
- Marsin, A. S., L. Bertrand, et al. (2000). "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." *Curr Biol* **10**(20): 1247-55.
- Masri, B., H. Lahlou, et al. (2002). "Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 539-45.
- Masri, B., N. Morin, et al. (2004). "Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells." *FASEB J* **18**(15): 1909-11.
- Matejkova, O., K. J. Mustard, et al. (2004). "Possible involvement of AMP-activated protein kinase in obesity resistance induced by respiratory uncoupling in white fat." *FEBS Lett* **569**(1-3): 245-8.
- Matsumoto, M., K. Hidaka, et al. (1996). "Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven-transmembrane receptor, APJ, in human brain." *Neurosci Lett* **219**(2): 119-22.
- Matsuzawa, Y., T. Funahashi, et al. (2004). "Adiponectin and metabolic syndrome." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(1): 29-33.
- Mazzucotelli, A., C. Ribet, et al. (2008). "The transcriptional co-activator PGC-1alpha up regulates apelin in human and mouse adipocytes." *Regul Pept* **150**(1-3): 33-7.
- McGarry, J. D., G. P. Mannaerts, et al. (1977). "A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis." *J Clin Invest* **60**(1): 265-70.
- Medhurst, A. D., C. A. Jennings, et al. (2003). "Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin." *J Neurochem* **84**(5): 1162-72.

- Merrill, G. F., E. J. Kurth, et al. (1997). "AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 1): E1107-12.
- Mesmin, C., M. Dubois, et al. (2010) "Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma." *Rapid Commun Mass Spectrom* **24**(19): 2875-84.
- Meyer, S. G. and H. de Groot (2003). "Cycloserine and threo-dihydrospingosine inhibit TNF-alpha-induced cytotoxicity: evidence for the importance of de novo ceramide synthesis in TNF-alpha signaling." *Biochim Biophys Acta* **1643**(1-3): 1-4.
- Miettinen, K. H., J. Magga, et al. (2007). "Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy." *Regul Pept* **140**(3): 178-84.
- Milne, J. C., P. D. Lambert, et al. (2007). "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes." *Nature* **450**(7170): 712-6.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, et al. (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* **428**(6982): 569-74.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, et al. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nature* **415**(6869): 339-43.
- Mitra, A., M. J. Katovich, et al. (2006). "Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats." *Physiol Behav* **89**(2): 221-5.
- Miyamoto, L., T. Toyoda, et al. (2007). "Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle." *J Appl Physiol* **102**(3): 1007-13.
- Mogensen, M., K. Sahlin, et al. (2007). "Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **56**(6): 1592-9.
- Mohamed-Ali, V., S. Goodrick, et al. (1997). "Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4196-200.
- Momcilovic, M., S. P. Hong, et al. (2006). "Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro." *J Biol Chem* **281**(35): 25336-43.
- Mootha, V. K., C. M. Lindgren, et al. (2003). "PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes." *Nat Genet* **34**(3): 267-73.
- Morino, K., S. Neschen, et al. (2008). "Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle." *Diabetes* **57**(10): 2644-51.
- Morino, K., K. F. Petersen, et al. (2005). "Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents." *J Clin Invest* **115**(12): 3587-93.
- Morino, K., K. F. Petersen, et al. (2006). "Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction." *Diabetes* **55** Suppl 2: S9-S15.
- Morris, M. J. and H. Chen (2009). "Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth." *Int J Obes (Lond)* **33**(1): 115-22.
- Mortensen, O. H., P. Plomgaard, et al. (2007). "PGC-1beta is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day vs. once daily on expression of the PGC-1 family." *J Appl Physiol* **103**(5): 1536-42.
- Mountjoy, P. D., S. J. Bailey, et al. (2007). "Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity." *Diabetologia* **50**(1): 168-77.
- Mu, J., J. T. Brozinick, Jr., et al. (2001). "A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle." *Mol Cell* **7**(5): 1085-94.
- Mullen, K. L., J. Pritchard, et al. (2009). "Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**(2): R243-51.
- Mullen, K. L., A. C. Smith, et al. (2007). "Globular adiponectin resistance develops independently of impaired insulin-stimulated glucose transport in soleus muscle from high-fat-fed rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(1): E83-90.
- Muoio, D. M., G. L. Dohm, et al. (1997). "Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle." *Diabetes* **46**(8): 1360-3.

- Muoio, D. M. and G. Lynis Dohm (2002). "Peripheral metabolic actions of leptin." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16**(4): 653-66.
- Muoio, D. M. and C. B. Newgard (2008). "Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 193-205.
- Musi, N., N. Fujii, et al. (2001). "AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise." Diabetes **50**(5): 921-7.
- Musi, N., M. F. Hirshman, et al. (2002). "Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes." Diabetes **51**(7): 2074-81.
- Nabben, M., J. Hoeks, et al. (2008). "The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice." FEBS Lett **582**(30): 4147-52.
- Nakano, Y., T. Tobe, et al. (1996). "Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma." J Biochem **120**(4): 803-12.
- Narkar, V. A., M. Downes, et al. (2008). "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics." Cell **134**(3): 405-15.
- Nathan, D. M., J. B. Buse, et al. (2009). "Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetologia **52**(1): 17-30.
- Nawrocki, A. R., M. W. Rajala, et al. (2006). "Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists." J Biol Chem **281**(5): 2654-60.
- Newgard, C. B., J. An, et al. (2009). "A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance." Cell Metab **9**(4): 311-26.
- O'Carroll, A. M., T. L. Selby, et al. (2000). "Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues." Biochim Biophys Acta **1492**(1): 72-80.
- O'Carroll, A. M. and S. J. Lolait (2003). "Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli." J Neuroendocrinol **15**(7): 661-6.
- O'Dowd, B. F., M. Heiber, et al. (1993). "A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11." Gene **136**(1-2): 355-60.
- O'Shea, M., M. J. Hansen, et al. (2003). "Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat." Nutr Neurosci **6**(3): 163-7.
- Oakes, N. D., P. G. Thalen, et al. (2001). "Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability." Diabetes **50**(5): 1158-65.
- Oakes, N. D. and S. M. Furler (2002). "Evaluation of free fatty acid metabolism in vivo." Ann N Y Acad Sci **967**: 158-75.
- Obici, S., Z. Feng, et al. (2003). "Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production." Nat Med **9**(6): 756-61.
- Ong, J. M. and P. A. Kern (1989). "Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue." J Clin Invest **84**(1): 305-11.
- Ostergard, T., J. L. Andersen, et al. (2006). "Impact of exercise training on insulin sensitivity, physical fitness, and muscle oxidative capacity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(5): E998-1005.
- Osuga, J., S. Ishibashi, et al. (2000). "Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 787-92.
- Owen, M. R., E. Doran, et al. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-14.

- Pajvani, U. B., M. Hawkins, et al. (2004). "Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity." *J Biol Chem* **279**(13): 12152-62.
- Palanivel, R., M. Eguchi, et al. (2006). "Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes." *Metabolism* **55**(8): 1067-75.
- Park, H., V. K. Kaushik, et al. (2002). "Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise." *J Biol Chem* **277**(36): 32571-7.
- Park, S. H., S. R. Gammon, et al. (2002). "Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle." *J Appl Physiol* **92**(6): 2475-82.
- Patti, M. E., A. J. Butte, et al. (2003). "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8466-71.
- Perez-Matute, P., N. Perez-Echarri, et al. (2007). "Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha." *Br J Nutr* **97**(2): 389-98.
- Perseghin, G., P. Scifo, et al. (1999). "Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents." *Diabetes* **48**(8): 1600-6.
- Petersen, K. F., D. Befroy, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." *Science* **300**(5622): 1140-2.
- Petersen, K. F., S. Dufour, et al. (2004). "Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes." *N Engl J Med* **350**(7): 664-71.
- Petersen, K. F., E. A. Oral, et al. (2002). "Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy." *J Clin Invest* **109**(10): 1345-50.
- Petersen, K. F. and G. I. Shulman (2006). "New insights into the pathogenesis of insulin resistance in humans using magnetic resonance spectroscopy." *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 1**: 34S-40S.
- Phielix, E., V. B. Schrauwen-Hinderling, et al. (2008). "Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients." *Diabetes* **57**(11): 2943-9.
- Picard, F., M. Kurtev, et al. (2004). "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma." *Nature* **429**(6993): 771-6.
- Pold, R., L. S. Jensen, et al. (2005). "Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats." *Diabetes* **54**(4): 928-34.
- Pospasilik, J. A., C. Knauf, et al. (2007). "Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes." *Cell* **131**(3): 476-91.
- Postic, C. and J. Girard (2008). "The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis." *Diabetes Metab* **34**(6 Pt 2): 643-8.
- Principe, A., P. Melgar-Lesmes, et al. (2008). "The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease." *Hepatology* **48**(4): 1193-201.
- Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator." *Endocr Rev* **24**(1): 78-90.
- Prentki, M. (1996). "New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion." *Eur J Endocrinol* **134**(3): 272-86.
- Randle, P. J. (1998). "Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years." *Diabetes Metab Rev* **14**(4): 263-83.
- Randle, P. J., P. B. Garland, et al. (1963). "The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus." *Lancet* **1**(7285): 785-9.
- Rasmussen, B. B., U. C. Holmback, et al. (2002). "Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle." *J Clin Invest* **110**(11): 1687-93.

- Reaux-Le Goazigo, A., A. Morinville, et al. (2004). "Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons." *Endocrinology* **145**(9): 4392-400.
- Reaux, A., K. Gallatz, et al. (2002). "Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain." *Neuroscience* **113**(3): 653-62.
- Reaux, A., N. De Mota, et al. (2001). "Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain." *J Neurochem* **77**(4): 1085-96.
- Reddy, J. K. and T. Hashimoto (2001). "Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system." *Annu Rev Nutr* **21**: 193-230.
- Reznick, R. M., H. Zong, et al. (2007). "Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis." *Cell Metab* **5**(2): 151-6.
- Riboulet-Chavey, A., F. Diraison, et al. (2008). "Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8+ T-cell-induced cytotoxicity." *Diabetes* **57**(2): 415-23.
- Ricquier, D. and J. C. Kader (1976). "Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study." *Biochem Biophys Res Commun* **73**(3): 577-83.
- Riemens, S. C., W. J. Sluiter, et al. (2000). "Enhanced escape of non-esterified fatty acids from tissue uptake: its role in impaired insulin-induced lowering of total rate of appearance in obesity and Type II diabetes mellitus." *Diabetologia* **43**(4): 416-26.
- Rimbert, V., Y. Boirie, et al. (2004). "Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity." *FASEB J* **18**(6): 737-9.
- Ritov, V. B., E. V. Menshikova, et al. (2005). "Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes." *Diabetes* **54**(1): 8-14.
- Rizza, R. A., L. J. Mandarino, et al. (1982). "Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization." *Diabetes* **31**(8 Pt 1): 663-9.
- Roberts, E. M., M. J. Newson, et al. (2009). "Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice." *J Endocrinol* **202**(3): 453-62.
- Roberts, E. M., G. R. Pope, et al. (2010). "Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice." *J Neuroendocrinol* **22**(4): 301-8.
- Rockl, K. S., M. F. Hirshman, et al. (2007). "Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift." *Diabetes* **56**(8): 2062-9.
- Roden, M., T. B. Price, et al. (1996). "Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans." *J Clin Invest* **97**(12): 2859-65.
- Rodgers, J. T. and P. Puigserver (2007). "Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12861-6.
- Rolfe, D. F., A. J. Hulbert, et al. (1994). "Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat." *Biochim Biophys Acta* **1188**(3): 405-16.
- Rong, J. X., Y. Qiu, et al. (2007). "Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone." *Diabetes* **56**(7): 1751-60.
- Ronkainen, V. P., J. J. Ronkainen, et al. (2007). "Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin." *FASEB J* **21**(8): 1821-30.
- Rossmesl, M., G. Barbatelli, et al. (2002). "Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo." *Eur J Biochem* **269**(1): 19-28.
- Rubino, F., P. R. Schauer, et al. (2010). "Metabolic surgery to treat type 2 diabetes: clinical outcomes and mechanisms of action." *Annu Rev Med* **61**: 393-411.
- Ruderman, N. B., J. M. Cacicedo, et al. (2003). "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 1): 202-6.
- Ruderman, N. B., H. Park, et al. (2003). "AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise." *Acta Physiol Scand* **178**(4): 435-42.

- Ruderman, N. B., A. K. Saha, et al. (2003). "Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity." *Endocrinology* **144**(12): 5166-71.
- Russell, A. P., G. Gastaldi, et al. (2003). "Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids?" *FEBS Lett* **551**(1-3): 104-6.
- Saha, A. K. and N. B. Ruderman (2003). "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership." *Mol Cell Biochem* **253**(1-2): 65-70.
- Saha, A. K., A. J. Schwarsin, et al. (2000). "Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside." *J Biol Chem* **275**(32): 24279-83.
- Sakamoto, K. and G. D. Holman (2008). "Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(1): E29-37.
- Sakamoto, K., A. McCarthy, et al. (2005). "Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction." *EMBO J* **24**(10): 1810-20.
- Saladin, R., P. De Vos, et al. (1995). "Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration." *Nature* **377**(6549): 527-9.
- Salt, I. P., G. Johnson, et al. (1998). "AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release." *Biochem J* **335** (Pt 3): 533-9.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Sartipy, P. and D. J. Loskutoff (2003). "Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7265-70.
- Schaffer, J. E. and H. F. Lodish (1994). "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein." *Cell* **79**(3): 427-36.
- Schenk, S. and J. F. Horowitz (2007). "Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance." *J Clin Invest* **117**(6): 1690-8.
- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *J Biol Chem* **270**(45): 26746-9.
- Schmitz-Peiffer, C., C. L. Browne, et al. (1997). "Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat." *Diabetes* **46**(2): 169-78.
- Schoonjans, K., B. Staels, et al. (1996). "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation." *Biochim Biophys Acta* **1302**(2): 93-109.
- Schrauwen-Hinderling, V. B., M. E. Kooi, et al. (2007). "Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects." *Diabetologia* **50**(1): 113-20.
- Schrauwen-Hinderling, V. B., M. Mensink, et al. (2008). "The insulin-sensitizing effect of rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus patients does not require improved in vivo muscle mitochondrial function." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(7): 2917-21.
- Schrauwen, P. and M. K. Hesselink (2004). "Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes." *Diabetes* **53**(6): 1412-7.
- Schrauwen, P., V. Schrauwen-Hinderling, et al. (2010) "Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity." *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 266-71.
- Schuler, M., F. Ali, et al. (2006). "PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes." *Cell Metab* **4**(5): 407-14.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* **404**(6778): 661-71.
- Scott, J. W., S. A. Hawley, et al. (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." *J Clin Invest* **113**(2): 274-84.
- Segal, K. R., A. Edano, et al. (1991). "Effect of exercise training on insulin sensitivity and glucose metabolism in lean, obese, and diabetic men." *J Appl Physiol* **71**(6): 2402-11.

- Sell, H., D. Dietze-Schroeder, et al. (2006). "Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone." *Biochem Biophys Res Commun* **343**(3): 700-6.
- Sengenès, C., M. Berlan, et al. (2000). "Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes." *FASEB J* **14**(10): 1345-51.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, et al. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." *Science* **310**(5754): 1642-6.
- Shimabukuro, M., K. Koyama, et al. (1997). "Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4637-41.
- Shimomura, I., R. E. Hammer, et al. (1998). "Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy." *Genes Dev* **12**(20): 3182-94.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2003). "Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance." *Int J Obes Relat Metab Disord* **27** Suppl 3: S49-52.
- Shu, Y., S. A. Sheardown, et al. (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." *J Clin Invest* **117**(5): 1422-31.
- Sigal, R. J., G. P. Kenny, et al. (2004). "Physical activity/exercise and type 2 diabetes." *Diabetes Care* **27**(10): 2518-39.
- Simoneau, J. A., J. H. Veerkamp, et al. (1999). "Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss." *FASEB J* **13**(14): 2051-60.
- Simpkin, J. C., D. M. Yellon, et al. (2007). "Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury." *Basic Res Cardiol* **102**(6): 518-28.
- Sims, E. A., E. Danforth, Jr., et al. (1973). "Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man." *Recent Prog Horm Res* **29**: 457-96.
- Song, X. M., M. Fiedler, et al. (2002). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice." *Diabetologia* **45**(1): 56-65.
- Sorhede Winzell, M., C. Magnusson, et al. (2005). "The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice." *Regul Pept* **131**(1-3): 12-7.
- Soriguer, F., L. Garrido-Sanchez, et al. (2009). "Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus." *Obes Surg* **19**(11): 1574-80.
- Sorli, S. C., S. Le Gonidec, et al. (2007). "Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis." *Oncogene* **26**(55): 7692-9.
- Spalding, K. L., E. Arner, et al. (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature* **453**(7196): 783-7.
- Sparks, L. M., H. Xie, et al. (2005). "A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle." *Diabetes* **54**(7): 1926-33.
- Spitsberg, V. L., E. Matitashvili, et al. (1995). "Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland." *Eur J Biochem* **230**(3): 872-8.
- Stein, S. C., A. Woods, et al. (2000). "The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation." *Biochem J* **345** Pt 3: 437-43.
- Steinberg, G. R., A. Bonen, et al. (2002). "Fatty acid oxidation and triacylglycerol hydrolysis are enhanced after chronic leptin treatment in rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(3): E593-600.
- Steinberg, G. R. and D. J. Dyck (2000). "Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**(6): E1374-82.
- Steinberg, G. R., D. J. Dyck, et al. (2002). "Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle." *J Biol Chem* **277**(11): 8854-60.
- Steinberg, G. R., A. J. McAinch, et al. (2006). "The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(9): 3592-7.

- Steinberg, G. R., M. L. Parolin, et al. (2002). "Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(1): E187-92.
- Steinberg, G. R., J. W. Rush, et al. (2003). "AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(3): E648-54.
- Steinberg, G. R., A. C. Smith, et al. (2004). "AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(9): 4575-80.
- Steinberg, G. R., A. C. Smith, et al. (2004). "Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(1): E57-63.
- Stremmel, W., G. Strohmeyer, et al. (1985). "Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(1): 4-8.
- Sullivan, J. E., K. J. Brocklehurst, et al. (1994). "Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase." *FEBS Lett* **353**(1): 33-6.
- Summers, S. A. and D. H. Nelson (2005). "A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome." *Diabetes* **54**(3): 591-602.
- Sun, C., F. Zhang, et al. (2007). "SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B." *Cell Metab* **6**(4): 307-19.
- Sunter, D., A. K. Hewson, et al. (2003). "Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat." *Neurosci Lett* **353**(1): 1-4.
- Suter, M., U. Riek, et al. (2006). "Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* **281**(43): 32207-16.
- Suwa, M., T. Egashira, et al. (2006). "Metformin increases the PGC-1alpha protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo." *J Appl Physiol* **101**(6): 1685-92.
- Suwa, M., H. Nakano, et al. (2003). "Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles." *J Appl Physiol* **95**(3): 960-8.
- Sweeney, G. (2002). "Leptin signalling." *Cell Signal* **14**(8): 655-63.
- Swierczynski, J., E. Goyke, et al. (2000). "Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue." *Metabolism* **49**(5): 594-9.
- Szokodi, I., P. Tavi, et al. (2002). "Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility." *Circ Res* **91**(5): 434-40.
- Taheri, S., K. Murphy, et al. (2002). "The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **291**(5): 1208-12.
- Tanaka, T., J. Yamamoto, et al. (2003). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15924-9.
- Tanner, C. J., H. A. Barakat, et al. (2002). "Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(6): E1191-6.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, et al. (2004). "The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis." *IUBMB Life* **56**(7): 379-85.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* **83**(7): 1263-71.
- Tasci, I., T. Dogru, et al. (2007). "Plasma apelin is lower in patients with elevated LDL-cholesterol." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **115**(7): 428-32.
- Tasci, I., G. Erdem, et al. (2009). "LDL-cholesterol lowering increases plasma apelin in isolated hypercholesterolemia." *Atherosclerosis* **204**(1): 222-8.
- Tatemoto, K., M. Hosoya, et al. (1998). "Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(2): 471-6.
- Tatemoto, K., K. Takayama, et al. (2001). "The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism." *Regul Pept* **99**(2-3): 87-92.

- Tiraby, C., G. Tavernier, et al. (2003). "Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes." *J Biol Chem* **278**(35): 33370-6.
- Toledo, F. G., E. V. Menshikova, et al. (2007). "Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes." *Diabetes* **56**(8): 2142-7.
- Tomas, E., T. S. Tsao, et al. (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**(25): 16309-13.
- Treebak, J. T., S. Glund, et al. (2006). "AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits." *Diabetes* **55**(7): 2051-8.
- Turcotte, L. P. and J. S. Fisher (2008). "Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise." *Phys Ther* **88**(11): 1279-96.
- Turner, N., C. R. Bruce, et al. (2007). "Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents." *Diabetes* **56**(8): 2085-92.
- Turner, N., J. Y. Li, et al. (2008). "Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action." *Diabetes* **57**(5): 1414-8.
- Ussher, J. R., T. R. Koves, et al. (2010) "Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption." *Diabetes* **59**(10): 2453-64.
- Valle, A., N. Hoggard, et al. (2008). "Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice." *J Neuroendocrinol* **20**(1): 79-84.
- Van Coillie, E., P. Proost, et al. (1998). "Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV." *Biochemistry* **37**(36): 12672-80.
- Van Heek, M., D. S. Compton, et al. (1997). "Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin." *J Clin Invest* **99**(3): 385-90.
- Vega, R. B., J. M. Huss, et al. (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1868-76.
- Velasco, G., M. J. Geelen, et al. (1997). "Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism." *Arch Biochem Biophys* **337**(2): 169-75.
- Vickers, C., P. Hales, et al. (2002). "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase." *J Biol Chem* **277**(17): 14838-43.
- Villena, J. A., M. C. Carmona, et al. (2002). "Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors." *Cell Mol Life Sci* **59**(11): 1934-44.
- Viollet, B., F. Andreelli, et al. (2003). "The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity." *J Clin Invest* **111**(1): 91-8.
- Wang, G., Y. Anini, et al. (2004). "Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion." *Endocrinology* **145**(3): 1342-8.
- Wang, J., S. Obici, et al. (2001). "Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance." *Diabetes* **50**(12): 2786-91.
- Watt, M. J., A. G. Holmes, et al. (2006). "Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(3): E500-8.
- Wei, L., X. Hou, et al. (2005). "Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes." *Regul Pept* **132**(1-3): 27-32.
- Weisberg, S. P., D. Hunter, et al. (2006). "CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding." *J Clin Invest* **116**(1): 115-24.

- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-808.
- Weiss, E. P., S. B. Racette, et al. (2006). "Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* **84**(5): 1033-42.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2003). "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1785-8.
- Weyer, C., T. Funahashi, et al. (2001). "Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(5): 1930-5.
- Wild, S., G. Roglic, et al. (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." *Diabetes Care* **27**(5): 1047-53.
- Wilson-Fritch, L., S. Nicoloso, et al. (2004). "Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone." *J Clin Invest* **114**(9): 1281-9.
- Winder, W. W., B. F. Holmes, et al. (2000). "Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle." *J Appl Physiol* **88**(6): 2219-26.
- Woods, A., K. Dickerson, et al. (2005). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab* **2**(1): 21-33.
- Woods, A., S. R. Johnstone, et al. (2003). "LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade." *Curr Biol* **13**(22): 2004-8.
- Wredenberg, A., C. Freyer, et al. (2006). "Respiratory chain dysfunction in skeletal muscle does not cause insulin resistance." *Biochem Biophys Res Commun* **350**(1): 202-7.
- Wu, Z., P. Puigserver, et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." *Cell* **98**(1): 115-24.
- Xie, M., D. Zhang, et al. (2006). "A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17378-83.
- Xue, B. and B. B. Kahn (2006). "AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues." *J Physiol* **574**(Pt 1): 73-83.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nat Med* **8**(11): 1288-95.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity." *Nat Med* **7**(8): 941-6.
- Yaspelkis, B. B., 3rd, M. K. Singh, et al. (2004). "Chronic leptin treatment enhances insulin-stimulated glucose disposal in skeletal muscle of high-fat fed rodents." *Life Sci* **74**(14): 1801-16.
- Ye, J. M., N. Dzamko, et al. (2006). "Rosiglitazone treatment enhances acute AMP-activated protein kinase-mediated muscle and adipose tissue glucose uptake in high-fat-fed rats." *Diabetes* **55**(10): 2797-804.
- Yin, J., Z. Gao, et al. (2008). "Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(1): E148-56.
- Yin, M. J., Y. Yamamoto, et al. (1998). "The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta." *Nature* **396**(6706): 77-80.
- Yin, W., J. Mu, et al. (2003). "Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **278**(44): 43074-80.
- Yoon, M. J., G. Y. Lee, et al. (2006). "Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha." *Diabetes* **55**(9): 2562-70.
- Yu, C., Y. Chen, et al. (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* **277**(52): 50230-6.
- Yue, P., H. Jin, et al. (2010). "Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(1): E59-67.

- Yudkin, J. S., C. D. Stehouwer, et al. (1999). "C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(4): 972-8.
- Zakikhani, M., R. Dowling, et al. (2006). "Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells." *Cancer Res* **66**(21): 10269-73.
- Zammit, V. A. (1999). "The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function." *Biochem J* **343 Pt 3**: 505-15.
- Zang, M., S. Xu, et al. (2006). "Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice." *Diabetes* **55**(8): 2180-91.
- Zeng, X. J., L. K. Zhang, et al. (2009). "Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat." *Peptides* **30**(6): 1144-52.
- Zhang, J., C. X. Ren, et al. (2006). "Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats." *Life Sci* **79**(12): 1153-9.
- Zhang, R., C. Hu, et al. (2009). "Association of apelin genetic variants with type 2 diabetes and related clinical features in Chinese Hans." *Chin Med J (Engl)* **122**(11): 1273-6.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-32.
- Zhang, Y., C. Shen, et al. (2009). "Low plasma apelin in newly diagnosed type 2 diabetes in Chinese people." *Diabetes Care* **32**(12): e150.
- Zhong, J. C., Y. Huang, et al. (2007). "The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice." *Regul Pept* **144**(1-3): 109-14.
- Zhong, J. C., X. Y. Yu, et al. (2007). "Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice." *Cardiovasc Res* **74**(3): 388-95.
- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* **108**(8): 1167-74.
- Zhou, Y. T., M. Shimabukuro, et al. (1997). "Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6386-90.
- Zick, Y. (2004). "Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 812-6.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, et al. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." *Science* **306**(5700): 1383-6.
- Zong, H., J. M. Ren, et al. (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15983-7.

**Auteur** : Camille Attané

**Titre** : Apeline et métabolisme énergétique : implication dans la résistance à l'insuline.

**Directrice de thèse** : Isabelle Castan-Laurell

**Lieu et date de soutenance** : Toulouse le 17 décembre 2010.

---

**Résumé** : L'apeline est le ligand endogène du récepteur membranaire couplé aux protéines G appelé APJ. Plusieurs isoformes de ce peptide existent comme l'apeline-36 et l'apeline-13. L'apeline et APJ sont exprimés dans le système nerveux central, en particulier dans l'hypothalamus et dans de nombreux tissus périphériques (cœur, poumons, cellules endothéliales, muscle squelettique...). L'apeline est impliquée dans la régulation de la prise hydrique par ses effets diurétiques, des fonctions cardiovasculaires, de la prise alimentaire, de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse. L'apeline a été décrite par notre groupe comme pouvant être produite et sécrétée par les adipocytes chez la souris et chez l'Homme. Avec l'obésité et les pathologies associées comme le diabète de type 2, les concentrations plasmatiques d'apeline sont augmentées. Le lien entre l'apeline et les troubles métaboliques est un nouveau domaine d'investigation. Des données récentes du laboratoire et par d'autres équipes ont mis en évidence un rôle important de l'apeline sur le métabolisme glucidique. Les travaux réalisés au cours de la thèse ont eu pour objectif d'étudier les effets de l'apeline sur le métabolisme lipidique et, dans un premier temps, les effets sur le tissu adipeux.

Nous avons pu montrer que sur du tissu adipeux humain, l'apeline stimule l'AMPK, une enzyme importante dans la régulation du métabolisme énergétique. De plus, l'apeline stimule le transport de glucose par une voie dépendante de l'AMPK mais n'a pas d'effet sur la lipolyse.

Dans un deuxième temps, l'effet d'un traitement chronique à l'apeline a été étudié sur le métabolisme lipidique du muscle squelettique chez des souris obèses et résistantes à l'insuline. Nous avons pu montrer une augmentation de l'utilisation des lipides *in vivo* et *ex vivo* sur le muscle soléaire de souris traitées à l'apeline. Cet effet est associé à une augmentation de la biogenèse mitochondriale permettant une meilleure capacité oxydative du muscle squelettique et à une diminution de la formation d'acylcarnitines. Enfin, le traitement chronique à l'apeline améliore globalement la sensibilité à l'insuline mais aussi au niveau musculaire, en augmentant le transport de glucose stimulé par l'insuline.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis d'identifier de nouveaux effets métaboliques pour l'apeline, ceux-ci pouvant participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'apeline et son récepteur APJ constituent ainsi une cible pharmacologique d'avenir dans le traitement du diabète de type 2.

---

**Intitulé et adresse du laboratoire** : INSERM U858 - Equipe 3 : Sécrétions adipocytaires, obésité et pathologies associées.

CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, Bâtiment L4 - BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4.