

Université de Montréal

**Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à  
l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le  
chromosome-20**

par

**Céline Bourdon**

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en science (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

Août 2006

©Céline Bourdon, 2006





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à  
l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le  
chromosome-20**

présenté par:

**Céline Bourdon**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Suhayla Mukaddam-Daher, Ph.D :	président rapporteur
Zdenka Pausova, MD :	directeur de recherche
Daniel Gaudet :	membre du jury

Mémoire déposé: août 2006

## SOMMAIRE

L'obésité est une cause principale d'hypertension et l'accumulation de masse adipeuse y serait directement impliquée. Nos études préalables suggèrent qu'un/des gènes, trouvé(s) dans la région homologue du chromosome -6 humain et -20 du rat, joue(nt) un rôle dans la pathogénèse de l'obésité associée à l'hypertension. Cette étude continue la quête du/des gène(s) responsable(s).

Des rats spontanément hypertendus (SHR) et leur souche congénique (SHR.1N), contenant la région chromosomique homologue RNO20 transférée des rats Brown Norway (BN), sont soumis à 12 semaines de diète normale ou élevée en gras (HFD). Durant cette intervention, la pression sanguine est mesurée par télémétrie et, au sacrifice, le sérum et des tissus sont recueillis.

La diète HFD induit une plus grande augmentation du poids corporel, de la masse adipeuse, de la taille adipocytaire, du taux de leptine sérique et de la pression sanguine chez les SHR.1N que chez les SHR. La taille adipocytaire corrèle avec le taux de leptine. Le profil d'expression génique dans le tissu adipeux (Affymetrix, 15,923 gènes et ESTs) révèle des changements coordonnés de plusieurs groupes géniques qui incitent une accumulation lipidique plus grande chez les SHR.1N que les SHR. Les processus physiologiques impliqués sont la lipogénèse, le remodelage de l'actine-cytosquelettique et la dissipation d'acides gras. Les gènes TNF- $\alpha$  et PPAR- $\delta$  localisés dans la région RNO20 régulent ces processus, ce qui suggère leur implication.

D'après nos résultats, le segment RNO20 régule l'augmentation induite par la diète de l'adiposité et la pression sanguine par son impact sur l'accumulation lipidique intracellulaire et la taille adipocytaire.

**Mots-clefs :** obésité; hypertension; adiposité; tissu adipeux; taille adipocytaire, leptine, profil d'expression génique; désordres métaboliques; diète élevée en gras; interaction gène-environnement.

## ABSTRACT

Obesity is a leading cause of hypertension. Body-fat accumulation has been implicated in this relationship. Our previous studies suggest that a gene(s) within the homologous region of human chromosome 6 and rat chromosome 20 (RNO20) play(s) a role in the pathogenesis of obesity-related hypertension. Here, we continued searching for the gene in the rat model.

Adult spontaneously hypertensive rats (SHR) and its congenic strain (SHR.1N), with a segment of RNO20 transferred from the Brown Norway rat and containing the homologous region, were subjected to a 12-week high-fat (HFD) or normal diet. During that period, blood pressure was measured with telemetry. At the end, selected tissues and sera were collected for further analyses.

In response to HFD, body weight, fat-pad weight, serum leptin, and blood pressure increased more in SHR.1N than in SHR. Adipocyte size also increased more in SHR.1N than in SHR. Close correlation between adipocyte size and serum leptin was observed. Micro array gene-expression profiling in adipose tissue (Affymetrix, 15,923 genes and ESTs) revealed a highly co-ordinated pattern, favouring mostly to a greater accumulation of intracellular fat in SHR.1N than in SHR. The physiological processes involved were lipogenesis, actin-cytoskeleton remodelling and fat burning. Analyses of the TNF- $\alpha$  and PPAR- $\delta$  genes, located within the RNO20 region and known to regulate these processes, provided some support for their combined effect.

Our results suggest that the RNO20 segment regulates diet-induced increases in adiposity and blood pressure and that this effect may be mediated by its impact on intracellular lipid accumulation and adipocyte size.

**Key words :** obesity; hypertension; adiposity; adipose tissue; gene expression profiling; metabolic disorders; high fat diet; gene-environment interaction.

# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xxi

## INTRODUCTION 1

## CHAPITRE 1 : OBÉSITÉ 2

1.1 Définition de l'obésité.....	2
1.1.1 Mesure de l'adiposité.....	3
1.1.1.1 Indice de masse corporelle.....	3
1.1.1.2 Tour de taille.....	3
1.2 Gènes inadaptés à l'environnement moderne .....	4
1.2.1 Systèmes régulant l'alimentation.....	4
1.2.1.1 Stimulus relié à la dépense énergétique de l'organisme. 4	
1.2.1.2 Stimulus de thermogenèse.....	4
1.2.1.3 Stimulus hormonal.....	4
1.2.1.4 Stimulus environnemental.....	4
1.3 Obésité, interaction gène-environnement.....	5
1.4 Conséquences associées à l'obésité.....	6
1.4.1 Syndrome métabolique.....	7
1.4.1.1 Résistance à l'insuline et/ou hyper insulinémie.....	8

1.4.1.2 Dyslipidémie .....	9
1.4.1.2.1 Physiologie des triglycérides.....	9
1.4.1.2.2 Rôle des triglycérides dans la pathophysiologie de l'obésité associée au syndrome métabolique.....	10
1.4.1.2.3 Physiologie des HDL .....	11
1.4.1.2.4 Rôle des HDL dans la pathophysiologie de l'obésité associée au syndrome métabolique....	11
1.4.1.4 Hypertension artérielle .....	11
1.4.1.2 États proinflammatoire et prothrombotique.....	11
<b><u>CHAPITRE 2 : HYPERTENSION ASSOCIÉE À L'OBÉSITÉ</u></b>	<b>13</b>
2.1 Relation épidémiologique entre l'hypertension et l'obésité.....	14
2.2 Pathogénèse de l'hypertension associée à l'obésité.....	14
2.2.1 Activation du système nerveux sympathique.....	15
2.2.1.1 Hyper leptinémie.....	16
2.2.1.2 Hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline (effet indirect – par activation du SNS).....	16
2.2.2 Hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline (effet direct).....	17
2.2.3 Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	17
2.2.3.1 Système rénine-angiotensine-aldostérone local du tissu adipeux.....	18
2.2.4 Stress oxydatif, facteurs d'inflammation et de coagulation.....	18
2.2.5 Dysfonction du tissu adipeux.....	19
2.2.5.1 Tissu adipeux comme organe endocrinien.....	20

2.2.5.2 Taille des adipocytes reliée à la dysfonction du tissu adipeux.....	21
2.2.5.2.1 Production dérégulée de molécules bio actives..	21
2.2.5.2.2 Infiltration de macrophages.....	22
2.2.5.2.3 Capacité insuffisante à accommoder les graisses	23
2.2.5.3 Mécanismes par lesquels la taille augmentée des adipocytes induit les cascades menant à l'hypertension associée à l'obésité.....	24
2.2.5.3.1 Altérations de la signalisation entre la matrice extra- et intra- cellulaire.....	24
2.2.5.3.2 Redistribution du cholestérol.....	25
2.2.5.3.3 Augmentation du flux des acides gras libres.....	25
2.2.5.4 Dysfonction encourageant l'augmentation de taille des adipocytes .....	25
2.2.5.4.1 Défaut de différenciation.....	26
2.2.5.4.2 Capacité réduite d'oxyder les lipides.....	27
2.3 Conséquences délétères sur organes cibles .....	28
2.3.1 Cardiopathies.....	28
2.3.1.1 Dysfonction diastolique.....	28
2.3.1.2 Dysfonction systolique.....	28
2.3.2 Perturbations rénales.....	29

**CHAPITRE 3 : RÔLE DU LOCUS GÉNIQUE DE TNF- $\alpha$  DANS L'HYPERTENSION ASSOCIÉE À L'OBÉSITÉ INDUITE PAR LA DIÈTE** 30

3.1 Recherche des composantes génétiques déterminant l'hypertension associée à l'obésité: Études effectuées chez l'humain et les animaux.....	30
3.1.1 Étude de gène candidat, récepteur $\beta$ 3-adrénergique.....	31
3.1.2 Étude de gène candidat, sous-unité $\beta$ 3 de la protéine G.....	31
3.1.3 Étude de gène candidat, TNF- $\alpha$ .....	31
3.2 Notre étude préalable effectuée chez l'humain: Rôle du locus génique de TNF- $\alpha$ dans l'hypertension associée à l'obésité.....	32
3.3 Notre étude préalable effectuée chez le rat: Rôle du locus génique de TNF- $\alpha$ du rat dans l'hypertension associée à l'obésité induite par la diète .....	33
3.3.1 Souches.....	33
3.3.2 Segment différentiel du chromosome 20.....	33
3.3.3 Résultats de l'étude.....	34
3.3.4 Gènes candidats : TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	35
3.3.4.1 TNF- $\alpha$ et son implication dans l'hypertension associée à l'obésité.....	35
3.3.4.2 PPAR- $\delta$ et son implication possible dans l'hypertension associée à l'obésité.....	36

**BUT DE L'ÉTUDE** 38

**CHAPITRE 4 : But de l'étude** 38

<b>ARTICLE</b>	<b>39</b>
<b>CHAPITRE 5 : Article</b>	<b>40</b>
5.1 Sommaire [ <i>Abstract</i> ]	41
5.2 Introduction [ <i>Introduction</i> ]	42
5.3 Matériel et Méthodes [ <i>Materials and Methods</i> ]	44
5.3.1 Animaux [ <i>Animals</i> ]	44
5.3.2 Protocole expérimental [ <i>Experimental protocol</i> ]	44
5.3.3 Analyse de la morphologie du tissu adipeux [ <i>Adipose-tissue morphology analyses</i> ]	44
5.3.4 Analyse de l'expression génique dans le tissu adipeux [ <i>Gene-expression analyses in adipose tissue</i> ]	45
5.3.5 Analyse de l'expression protéique [ <i>Protein-expression analyses</i> ]	45
5.3.6 Analyse statistique [ <i>Statistical analyses</i> ]	46
5.4 Résultats [ <i>Results</i> ]	46
5.4.1 Adiposité, taille adipocytaire, leptine circulant et pression sanguine [ <i>Adiposity, adipocyte size, circulating leptin and blood pressure</i> ]	46
5.4.2 Profil d'expression génique du tissu adipeux [ <i>Adipose tissue gene-expression profiling</i> ]	48
5.4.2.1 Gènes régulés à la baisse par la diète HFD dans les deux souches [ <i>The group of genes downregulated by HFD in both strains</i> ]	49
5.4.2.2 Gènes régulés à la hausse par la diète HFD dans les deux souches [ <i>The genes significantly upregulated by HFD in both SHR and SHR.1N</i> ]	50
5.4.2.3 Gène montrant une régulation induite par la diète HFD opposée entre les souches [ <i>The genes with strain-opposite HFD-induced changes</i> ]	51
5.3 Discussion [ <i>Discussion</i> ]	57

5.4 Remerciements [ <i>Acknowledgments</i> ].....	61
<b>SUPPLÉMENT: MATÉRIEL ET MÉTHODE / RÉSULTATS</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE 6 : Supplément : Matériel et méthode/ Résultats</b>	<b>62</b>
6.1 Matériel et Méthode.....	62
6.1.1 Séquençage des gènes candidats: TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	62
6.1.1.1 TNF- $\alpha$ .....	62
6.1.1.2 PPAR- $\delta$ .....	62
6.1.2 Analyse d'expression génique/protéique.....	63
6.1.2.1 Expression génique de TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ par transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérase en temps réel .....	63
6.1.2.2 Expression protéique de TNF- $\alpha$ .....	63
6.1.2.3 Expression protéique de PPAR- $\delta$ .....	63
6.2 Résultats.....	64
6.2.1 Séquençage des gènes candidats: TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	64
6.2.1.1 TNF- $\alpha$ .....	64
6.2.1.2 PPAR- $\delta$ .....	64
6.2.2 Analyse de l'expression génique/protéique de TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ ..	66
6.2.2.1 Expression génique TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	66
6.2.2.2 Expression protéique de TNF- $\alpha$ .....	66
6.2.2.2 Expression protéique de PPAR- $\delta$ .....	67

<b>DISCUSSION</b>	<b>68</b>
<b>CHAPITRE 7 : DISCUSSION</b>	<b>70</b>
7.1 Progression dynamique de l'adipogenèse différentielle entre les souches...	70
7.2 « Dysfonction » différentielle du tissu adipeux causée par une hypertrophie adipocytaire différentielle entre les souches.....	71
7.2.1 Changements métaboliques des adipocytes.....	72
7.2.2 Production accrue de molécules bio actives.....	72
7.2.2.1 Production accrue de molécules bio actives induite par l'augmentation de la taille adipocytaire, proposition mécaniste.....	72
7.2.2.2 Leptine.....	73
7.2.3 Remodelage du cytosquelette.....	73
7.3 Liens proposés entre les protéines structurales et les phénotypes différentiels entre les souches.....	74
7.3.1 Changements de l'expression des molécules structurales attribués à la fraction non-adipocytaire du tissu adipeux.....	74
7.3.1.1 Expression de molécules structurales myoïdes reflétant le bassin de cellules pluripotentes mésenchymales.....	74
7.3.2 Changements de l'expression des molécules structurales attribués à la fraction adipocytaire du tissu adipeux.....	76
7.3.2.1 Dépolymérisation de protéines structurales facilitant l'augmentation volumique des adipocytes.....	76

7.3.2.2 Dépolymérisation de protéines structurales causant des perturbations dans le métabolisme des adipocytes.....	77
7.4 Segment différentiel.....	77
7.5 Indices théoriques de l'implication des gènes candidats : TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	78
7.5.1 Indices théoriques de l'implication du TNF- $\alpha$ .....	78
7.5.1.1 Indices théoriques de l'implication du TNF- $\alpha$ circulant.....	78
7.5.1.1.1 Effet continu et/ou tardif; effet lipostatique généralisé.....	78
7.5.1.2 Indices théoriques de l'implication du TNF- $\alpha$ tissulaire... ..	79
7.5.1.2.1 Effet précoce; inhibition de l'adipogenèse.....	79
7.5.1.2.2 Effet continu et/ou tardif; régulation à la baisse des gènes structuraux.....	79
7.5.2 Indices théoriques de l'implication du PPAR- $\delta$ .....	80
7.5.2.1 Indices théoriques de l'implication du PPAR- $\delta$ dans le tissu adipeux.....	80
7.5.2.1.1 Effet précoce; induction de l'adipogenèse.....	80
7.5.2.1.2 Effet continu et/ou tardif; régulation à la baisse des gènes structuraux.....	80
7.5.2.1.3 Effet continu et/ou tardif; induction des voies de dissipation des graisses.....	81
7.5.2.2 Indices théoriques de l'implication du PPAR- $\delta$ dans le tissu musculaire.....	81
7.5.2.2.1 Effet continu et/ou tardif; induction des voies de dissipation des graisses.....	81

7.5.2.3 Indices théoriques de l'implication du PPAR- $\delta$ dans d'autres tissus.....	83
7.5.2.3.1 Effet continu et/ou tardif; effet de transdifférentiation de cellules non-adipocytaires.....	83
7.6 Séquençage et analyse d'expression génique/protéique : Preuves de l'implication du TNF- $\alpha$ et du PPAR- $\delta$ limitées à ce stade.....	84
7.6.1 Séquençage de TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	84
7.6.2 Expression génique de TNF- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ .....	84
7.6.3 Expression protéique de TNF- $\alpha$ .....	85
7.6.3.1 Expression protéique de TNF- $\alpha$ sérique.....	85
7.6.3.2 Expression protéique de TNF- $\alpha$ tissulaire.....	85
7.6.3.2.1 Hypothèse liée à l'infiltration de macrophages expliquant l'absence de hausse d'expression de TNF- $\alpha$ tissulaire.....	86
7.6.4 Expression protéique de PPAR- $\delta$ .....	86
7.6.5 Limites de l'analyse de l'expression génique/protéique pour les gènes de TNF- $\alpha$ et PPAR $\delta$ .....	87
7.7 Ouverture.....	88
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>89</b>
<b>CHAPITRE 8 : CONCLUSION</b> .....	<b>89</b>
BIBLIOGRAPHIE.....	90

ANNEXE I : Tableaux supplémentaires.....	112
A.1 Tableau supplémentaire 1 [ <i>Supplemental table 1</i> ].....	113
A.2 Tableau supplémentaire 2 [ <i>Supplemental table 2</i> ].....	118
ANNEXE II: Déclaration des coauteurs.....	129
ANNEXE III: Demande d'autorisation de rédiger par articles.....	135
ANNEXE IV: État de l'apport original de l'étudiant.....	136

## LISTE DES TABLEAUX

1.1	Classification des types d'interactions « gène-environnement » .....	6
A.1	Tableau supplémentaire 1 - Catégorisation des gènes montrant une régulation d'expression génique induite par la diète [ <i>Supplementale table 1 – Categorized genes showing diet-induced changes in gene expression</i> ].....	113
A.2	Tableau supplémentaire 2 – Liste des gènes présents dans le segment différentiel [ <i>Supplementale table 2- List of genes present in the differential segment</i> ].....	118

## LISTE DES FIGURES

1.1 Composantes du syndrome métabolique.....	7
2.1 Mécanismes pathophysiologiques enclenchés par la dérégulation des molécules bio actives dans le tissu adipeux en expansion pouvant induire l'hypertension associée à l'obésité.....	15
2.2 Morphologie des adipocytes.....	20
3.1 Segment chromosomique différentiel entre les souches congéniques SHR et SHR.1N.....	34
5.1 Souches congéniques SHR.1N, ou simplement 1N, et les souches parentaux soit les rats spontanément hypertendus (SHR) et la souche de rats normo-tensifs Brown Norway (BN.Lx) [ <i>Congenic strains SHR.1N, also named 1N, and its parental strains, spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Brown Norway (BN.Lx) rats</i> ].....	43
5.2 (A) Gain de poids corporel cumulatif pendant 12 semaines d'intervention diététique [ <i>Cumulative body-weight increments during a 12-week dietary intervention</i> ]. (B) Moyennes de 12 heures de la pression artérielle systolique pendant le jour [D] et la nuit [N] mesurées par radio-téléométrie pour au moins 3 jours consécutifs avant, pendant et après l'intervention [ <i>12-hour averages of day [D] and night [N] systolic blood pressure measured by radio-telemetry for at least three consecutive days prior to, in middle and at the end of the intervention</i> ].....	47

5.3 (A) Poids du tissu adipeux de l'épididyme [ <i>Weight of epididymal fat pads</i> ]. (B) Taille adipocytaire [ <i>Adipocyte size</i> ]. (C) Nombre de cellules adipeuses [ <i>Adipose-tissue cell number</i> ]. (D et E) Corrélation entre la leptine circulante et la taille adipocytaire dans les SHR et les SHR.1N gardés soit sur la diète élevée en gras (HFD) ou sur la diète normale [ <i>Correlation between circulating leptin and adipocyte size in SHR and SHR.1N fed either a high-fat diet (HFD) or normal diet (ND)</i> ]. . . .	48
5.4 Analyse des profils d'expression génique: (A) Gènes régulés à la baisse par la diète élevée en gras (HFD) dans les deux souches [ <i>Genes downregulated by a high-fat diet (HFD) in both strains</i> ]. (B) Gènes régulés à la hausse par la diète HFD dans les deux souches [ <i>Genes upregulated by HFD in both strains</i> ]. (C) Gènes montrant une régulation opposée entre les souches [ <i>Genes strain-differential HFD-regulation</i> ]. . . . .	53
5.5 (A) Immunohistochimie (magnification de 10X) [ <i>Immunohistochemistry (10x magnification)</i> ]. (B) Analyse de l' $\alpha$ -actine sarcomérique dans le tissu adipeux par la technique « Western » [ <i>Western blot analysis of sarcomeric <math>\alpha</math>-actin in adipose tissue</i> ]. . . . .	56
6.1 Structure schématique de PPAR- $\delta$ (GeneID :25682) dans le RNO20 (NW_047597). . . . .	65
6.2 Résultats de séquençage du PPAR- $\delta$ . . . . .	65
6.3 Analyse de l'expression protéique de TNF- $\alpha$ par ELISA dans le sérum et le tissu adipeux. . . . .	66
6.4 (A) Analyse d'expression génique et (B) protéique de PPAR- $\delta$ dans le tissu adipeux. . . . .	67

## LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

<b>ACV :</b>	<u>Accidents cérébraux vasculaires</u>
<b>ADN /DNA :</b>	<u>Acides désoxyribonucléiques</u>
<b>ADNc / cDNA:</b>	<u>Acides désoxyribonucléiques complémentaires</u>
<b>Adrp :</b>	<u>Protéine reliée à la différenciation des adipocytes</u>
<b>AGT II :</b>	<u>Angiotensine-II</u>
<b>A.M. :</b>	<u>Avant-midi</u>
<b>aP :</b>	<u>Protéine adipocytaire liant les acides gras</u>
<b>Aqp :</b>	<u>Aquaporine</u>
<b>ARN /RNA :</b>	<u>Acides ribonucléiques</u>
<b>ARNm / mRNA :</b>	<u>Acides ribonucléiques messenger</u>
<b>ANOVA :</b>	<u>Analyse de variance</u>
<b>Apo :</b>	<u>Apoprotéine</u>
<b>BN :</b>	<u>Brown Norway</u>
<b>BN.Lx:</b>	<u>Souche de rats normo tendus Brown Norway</u>
<b>°C :</b>	<u>Degré Celsius</u>
<b>cAMP :</b>	<u>Adénosine mono phosphate cyclique</u>
<b>C/EBP :</b>	<u>Protéine favorisant la liaison du CAAT</u>
<b>cm :</b>	<u>centimètre</u>
<b>D :</b>	<u>Jour</u>
<b>DC :</b>	<u>Débit cardiaque</u>
<b>ECA :</b>	<u>Enzyme de conversion de l'angiotensinogène</u>
<b>ELISA :</b>	<u>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</u>
<b>ERK :</b>	<u>Kinase tyrosine reliée à Elk</u>
<b>ESTs :</b>	<u>Expressed Sequence Tags</u>
<b>AG :</b>	<u>Acides gras</u>
<b>Fabp :</b>	<u>Protéine liant les acides gras</u>
<b>FZD :</b>	<u>Protéine frizzled</u>
<b>g:</b>	<u>Gramme</u>

<b>Glut :</b>	<u>Transporteur de glucose</u>
<b>GNB3 :</b>	<u>Sous unité <math>\beta</math>3 de la protéine G</u>
<b>GTPase :</b>	<u>Hydrolase de la guanosine triphosphate</u>
<b>GSK :</b>	<u>Kinase de synthèse du glycogène</u>
<b>h :</b>	<u>Heure</u>
<b>HDL :</b>	<u>Lipoprotéine de haute densité</u>
<b>HFD:</b>	<u>Diète élevée en gras</u>
<b>HSL:</b>	<u>Lipase sensible aux hormones</u>
<b>HTA:</b>	<u>Hypertension artérielle</u>
<b>IL :</b>	<u>Interleukine</u>
<b>IMC :</b>	<u>Indice de masse corporelle</u>
<b>Kcal :</b>	<u>Kilocalorie</u>
<b>Kg :</b>	<u>Kilogramme</u>
<b>LDL :</b>	<u>Lipoprotéine de basse densité</u>
<b>LEF :</b>	<u>Facteur lymphoïde accroissant la liaison</u>
<b>m<sup>2</sup> :</b>	<u>Mètre élevé au carré</u>
<b>MAPK :</b>	<u>Protéine activée par la mitose</u>
<b>Mb :</b>	<u>Méga paires de bases</u>
<b>MCP :</b>	<u>Protéine de chémoattraction des monocytes</u>
<b>MIAME :</b>	<u><i>Minimum Information About a Micro Array Experiment</i></u>
<b>mg :</b>	<u>Milligramme</u>
<b>mm :</b>	<u>Millimètre</u>
<b>mm Hg :</b>	<u>Millimètre de pression de mercure</u>
<b>MyoD :</b>	<u>Facteur de détermination myogénique</u>
<b>N :</b>	<u>Nuit</u>
<b>ND :</b>	<u>Diète normale</u>
<b>ng :</b>	<u>Nanogramme</u>
<b>p :</b>	<u>Probabilité</u>
<b>PA:</b>	<u>Pression artérielle</u>
<b>PAI :</b>	<u>Inhibiteur de l'activateur du plasminogène</u>
<b>pb:</b>	<u>Paires de bases</u>

<b>PCR :</b>	<u>Réaction de la polymérase en chaîne</u>
<b>PPAR :</b>	<u>Récepteur activé de la prolifération des peroxisomes</u>
<b>PPRE :</b>	<u>Élément de réponse spécifique au PPAR</u>
<b>pH :</b>	<u>Potentiel hydrogène</u>
<b>RAAS :</b>	<u>Système rénine-angiotensine-aldostérone</u>
<b>RNO20 :</b>	<u>Chromosome 20 du rat</u>
<b>ROS :</b>	<u>Radicaux libres</u>
<b>RT-PCR :</b>	<u>Transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel</u>
<b>RXR :</b>	<u>Récepteur 9-cis rétinolique</u>
<b>SEM :</b>	<u>Erreur standard à partir de la moyenne</u>
<b>SHR :</b>	<u>Souche de rats spontanément hypertendus</u>
<b>SNC :</b>	<u>Système nerveux central</u>
<b>SNS :</b>	<u>Système nerveux sympathique</u>
<b>SREBP :</b>	<u>Élément régulateur du stérol liant la protéine</u>
<b>TG:</b>	<u>Triglycérides</u>
<b>Tnf:</b>	<u>Facteur de nécrose tumorale</u>
<b>TZD:</b>	<u>Thiazolidinédiones</u>
<b>µg :</b>	<u>Microgramme</u>
<b>µm :</b>	<u>Micromètre</u>
<b>UTR :</b>	<u>Région non-traduite</u>
<b>V :</b>	<u>Volt</u>
<b>VEGF :</b>	<u>Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire</u>
<b>VLDL :</b>	<u>Lipoprotéine de très basse densité</u>
<b>VP16 :</b>	<u>Protéine virale-16 de l'herpès simplex</u>
<b>Wnt :</b>	<u>Protéine "<i>wingless-type MMTV integration site family</i>"</u>
<b>° :</b>	<u>Degré</u>
<b>% :</b>	<u>Pourcentage</u>

## REMERCIEMENTS

Remerciements (Suis-je vraiment rendue là?!). Je décrirais l'aventure de ma Maîtrise comme longue et ardue, parsemée de moments brillants. Je n'y serais jamais arrivée sans l'aide de plusieurs et plusieurs personnes.

Je voudrais commencer par remercier ma directrice de mémoire Zdenka Pausova qui est maintenant chercheure titulaire au « Brain & Body Centre » à l'Université de Nottingham en Angleterre. Cette femme dévouée m'a donné un encadrement et un support remarquable surtout considérant toutes les péripéties liées au déménagement du laboratoire en Angleterre. Avec sa patience et sa compréhension humaine, elle m'a beaucoup encouragée et poussée vers des avenues nouvelles. Merci infiniment.

Sans Julie Bérubé, assistante de recherche à l'Hôtel-Dieu de Montréal, mon projet n'aurait pas avancé avec le même train-train. Elle a été pour moi un guide mais surtout une amie qui m'a tant appris sur les sciences de la vie. Avec tous les hauts et les bas, elle ne m'a surtout pas lâchée et cela malgré mon parcours tortueux. Julie, merci, merci, merci, mille-merci. Mus Musculus!!!

J'exprime aussi ma gratitude envers mes autres collègues qui ont travaillé à mes côtés, notamment Lucie Sedova, Gilles Corbeille, Monique Poirier, Carole Long, Isabelle Chenier et Suzanne LaPhénomène. Ils ont été là pour mes urgences techniques, pour faire l'analyse des bandes bizarres sur mes gels et rire de mes « aventures » laboratoires (explosion de tubes, voltage craqué, gels à l'envers, etc.). Merci à Sébastien Taurin pour avoir sauvé mes yeux d'une attaque d'isopropanol. Merci à Olga Akimova, Stéphane Thifault et Carlos Hader pour le support moral incroyable.

J'aimerais aussi témoigner ma reconnaissance aux personnes du « Brain & Body Centre » de l'Université de Nottingham en Angleterre (qui m'ont gardé saine d'esprit avec leur vitalité). Thank you guys! Marije, Jon, Petr, Katja, Catriona, Luke, Naomi, Vasiliki, Donna, Dale, Stéphanie, Jen, John Totman, Tomas and Martin. Chaque jour, ils me demandaient : Quand est-ce que tu vas finir? Et chaque jour, pendant 1 mois, je leur répondais : Demain, je finis demain. Merci à Eileen pour

avoir à peine remarqué le tapis d'articles éparpillés sur le plancher de notre bureau (pendant ma période « Bibliographie »). Et un merci spéciale à Manon, Dany et Yohan pour leur support et encouragement (et des bons soupers). Et un dernier merci à Pierre-Yves Hervé!!!!!!!!!!!!

Merci, à mes amis à Montréal : Nancy Larochelle, Anna Kawinska, Yee, Julie Bouvrette (MERCİ JULIE!!), Marc-André Larochelle et toutes les autres personnes éparpillées qui m'ont aidé probablement sans vraiment le savoir comme la femme de ménage au centre de recherche qui, très tôt le matin, essayait de passer la balayeuse sans trop me déranger.

Finalement, merci à ma famille qui de loin ou de proche a contribué à mon progrès : ma Grand-mère, Lise, François (qui me traduisait des mots), Sylvie, Jean et sa famille, Laurent et Marjo et leurs tout petits. Je voudrais aussi lancer un merci spécial à Mr. Laurence O'Dwyer (a.k.a. Mr. Bougaloo) qui m'a continuellement et quotidiennement encouragée ou distraite avec ses niaiseries infinies. « Hammer away, Chicken! »; trois mots qui traînaient toujours dans ma tête alors que mes doigts martyrisaient le clavier. Well done everyone ☺ Merci, Mr. BougalooOOOoo.....ta ChickEn ZeebrA.

Finalement, finalement.....MES PARENTS. Merci. Que puis-je dire d'autres? Merci, parce que vous êtes toujours là; pour tout. Parce que je sais que vous m'aimez et que vous vous foutez éperdument de ce mémoire. La seule chose que vous voulez vraiment c'est que vos enfants soient heureux. Et dans ce monde, c'est tout ce que nous pouvons demander à nos parents. Nous avons grandi avec des histoires de pirates et d'îles aux Trésors; la Famille Bourdon encore soudainement échouée sur une mystérieuse île avec une carte codée. Je suis définitivement prête pour ma prochaine aventure. Merci à vous deux, un amour infinie.

Sincèrement, merci à tous (surtout à mes parents)

Finding answers!!!!

# INTRODUCTION

Le nouvel environnement créé par l'avènement de la société industrialisée est une cause importante et inattendue de l'augmentation de la prévalence de l'obésité<sup>1</sup>. En plus de tendre vers un style de vie sédentaire, les individus sont bombardés de produits et publicités spécifiquement créés dans le but d'augmenter la consommation. La commercialisation et la disponibilité des aliments sont une puissante force environnementale qui favorise la surconsommation alimentaire; les producteurs ont de grandes motivations à augmenter leurs ventes en grossissant la demande<sup>2</sup>. La population contemporaine, sédentaire et stressée, évolue dans un environnement calorique engorgé de média « appétitive » créant une dynamique qui pousse les individus susceptibles vers l'obésité.

L'obésité est une surcharge graisseuse corporelle causée par un surplus énergétique chronique. C'est une condition complexe déterminée par l'interaction entre plusieurs facteurs génétiques et environnementaux régissant l'équilibre énergétique<sup>1</sup>. En fait, l'obésité est le principal facteur de risque impliqué dans le développement de divers états de santé adverses, tels que des désordres métaboliques et cardio-vasculaires incluant l'hypertension artérielle (HTA)<sup>1, 3</sup>.

Le tissu adipeux est maintenant considéré comme un véritable organe endocrinien; il produit toute une gamme de peptides biologiquement actifs telle que la leptine<sup>4</sup>. L'expansion de la masse adipeuse et l'augmentation de la taille cellulaire changent le taux d'expression et/ou de sécrétion de plusieurs de ces molécules, créant ainsi des changements endocriniens qui déclenchent des cascades physiologiques néfastes liées à l'HTA associée à l'obésité<sup>5</sup>.

Plusieurs études effectuées chez des animaux et des humains, impliquent la région chromosomale contenant le gène du facteur de nécrose tumorale (Tnf)- $\alpha$  dans le développement de l'HTA associée à l'obésité<sup>3, 6</sup>. L'objectif de mon mémoire est d'investiguer plus profondément le rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$  du rat dans cette pathogenèse.

# CHAPITRE 1

## 1. Obésité

### 1.1 Définition de l'obésité

#### 1.1.1 Mesure de l'adiposité

##### 1.1.1.1 Indice de masse corporelle

##### 1.1.1.2 Tour de taille

### 1.2 Gènes inadaptés à l'environnement moderne

#### 1.2.1 Systèmes régulant l'alimentation

##### 1.2.1.1 Stimulus relié à la dépense énergétique de l'organisme

##### 1.2.1.2 Stimulus de thermogenèse

##### 1.2.1.3 Stimulus hormonal

##### 1.2.1.4 Stimulus environnemental

### 1.3 Obésité, interaction « gène-environnement »

### 1.4 Conséquences associées à l'obésité

#### 1.4.1 Syndrome métabolique

##### 1.4.1.1 Résistance à l'insuline et/ou hyper insulinémie

##### 1.4.1.2 Dyslipidémie

###### 1.4.1.2.1 Physiologie des triglycérides

###### 1.4.1.2.2 Rôle des triglycérides dans la pathophysiologie de l'obésité associée au syndrome métabolique

###### 1.4.1.2.3 Physiologie des HDL

###### 1.4.1.2.4 Rôle des HDL dans la pathophysiologie de l'obésité associée au syndrome métabolique

##### 1.4.1.3 Hypertension artérielle

##### 1.4.1.4 État proinflammatoire et prothrombotique

## 1.1 Définition de l'obésité

Pour survivre, les humains doivent trouver dans leur environnement une source constante d'énergie afin de répondre à leurs besoins métaboliques de base : la croissance, le mouvement, la réparation tissulaire et la reproduction<sup>7</sup>. Cette énergie est obtenue par la dégradation de molécules nutritionnelles telles que les sucres, les protéines et les lipides. Ces molécules sont une source compacte d'énergie relâchée par divers processus cataboliques et utilisée pour maintenir les maintes fonctions du corps humain<sup>7</sup>.

D'un point de vue médical, l'obésité est une condition métabolique où un excès de masse grasseuse entraîne des effets néfastes à l'organisme. Un surplus alimentaire chronique provoque une accumulation graduelle de graisse corporelle.

### **1.1.1 Mesure de l'adiposité**

Le degré d'adiposité se mesure avec l'indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, le ratio taille-hanche ou bien avec des techniques plus avancées comme la résonance magnétique. Avec cette technique, le rapport précis entre la graisse corporelle et la masse « non-grasseuse » peut être déterminé. Toutefois, l'IMC et le tour de taille restent les outils les plus pratiques, rentables et largement utilisés pour évaluer les risques qu'encourt une personne de souffrir de problèmes associés à l'obésité (<http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/bmi/index.htm>).

**1.1.1.1 Indice de masse corporelle :** L'IMC est obtenu en divisant la masse d'un individu (en kilogrammes) par sa grandeur (en mètres) élevée au carré ( $IMC = Kg/m^2$ ). Par exemple, on considère qu'une personne a un surplus de poids modéré lorsque son IMC est plus grand que  $25 Kg/m^2$ . Elle est dite obèse lorsque son IMC devient supérieur à  $30 Kg/m^2$  (<http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/obesity/defining.htm>).

**1.1.1.2 Tour de taille :** Plusieurs études indiquent qu'une distribution adipeuse dite centrale, viscérale, androïde ou abdominale entraîne des conséquences pathophysiologiques métaboliques et cardiovasculaires plus importantes qu'une distribution adipeuse dite périphérique, gynoïde ou sous-cutanée<sup>8-13</sup>. Ainsi, il convient d'évaluer non seulement le niveau d'adiposité mais aussi sa distribution par le biais du tour de taille. Cette mesure devient importante et largement utilisée en clinique. Par exemple, le guide thérapeutique NCEP-ATPIII suggère qu'un tour de taille de plus de 102 cm pour les hommes ou de plus de 88 cm pour les femmes constitue un facteur de risque pour le syndrome métabolique<sup>13</sup>.

## 1.2 Gènes inadaptés à l'environnement moderne

Au début de l'humanité, l'acquisition de nourriture demandait une grande dépense énergétique et les sources d'approvisionnement étaient irrégulièrement disponibles<sup>7</sup>. Dans ce contexte évolutif, les mécanismes physiologiques régulant les comportements humains de recherche alimentaire, d'alimentation et de dépense énergétique sont mis en place<sup>7</sup>. Depuis l'apparition de l'Homo sapiens voilà environ 35 000 années, le génome humain est affecté par très peu de changements<sup>14</sup>. Les humains vivant à « l'ère moderne » restent génétiquement programmés pour un style de vie pré-agricole de type chasseur-cueilleur<sup>14</sup>.

### 1.2.1 Systèmes régulant l'alimentation

Le système nerveux central (SNC) contrôle l'apport nutritionnel en intégrant divers signaux provenant de 4 stimuli de base soit: 1- le *stimulus relié à la dépense énergétique de l'organisme*, 2- le *stimulus de thermogenèse*, 3- le *stimulus hormonal* et 4- le *stimulus environnemental*<sup>7</sup>.

**1.2.1.1 Stimulus relié à la dépense énergétique de l'organisme :** Le cerveau contient des récepteurs chimiques qui détectent le niveau plasmatique d'éléments nutritionnels tels que le sucre, les acides aminés, les acides gras (AG) et le glycérol. Leurs niveaux sont proportionnels aux réserves énergétiques de l'organisme<sup>7</sup>.

**1.2.1.2 Stimulus de thermogenèse :** Des thermorécepteurs centraux influencent la dépense et l'apport énergétique. Un signal thermique élevé (ex. climat, fièvre) inhibe la prise alimentaire alors qu'un signal bas l'augmente<sup>7</sup>.

**1.2.1.3 Stimulus hormonal :** Le SNC détecte des hormones en circulation comme l'insuline, le glucagon, l'adrénaline, le cortisol et la leptine. L'intégration de changements hormonaux permet au SNC de déterminer l'état nutritionnel de l'organisme et de réguler la dépense énergétique<sup>7</sup>.

**1.2.1.4 Stimulus environnemental:** La vue, l'odorat, le goût et les pensées alimentaires créent des changements physiologiques capables de modifier le réflexe alimentaire. Par exemple, le stress produit de l'adrénaline qui augmente l'appétit; le manque de sommeil diminue la leptine et augmente la

sécrétion d'hormones de stress, deux signaux qui augmentent l'apport calorifique<sup>7</sup>. Les facteurs psychiques et environnementaux altèrent l'efficacité de l'organisme à maintenir l'équilibre énergétique.

Beaucoup de ces mécanismes, autrefois profitables, sont maintenant inadaptés à la réalité industrielle moderne<sup>14</sup>.

### **1.3 Obésité, interaction « gène-environnement »**

Les pressions environnementales affectent différemment les individus car la génétique régissant les systèmes physiologiques de chacun est variable. Une étude démontre que des paires de jumeaux identiques consommant 1000 Kcal supplémentaires par jour pendant trois mois subissent un gain de poids significativement plus similaire entre les jumeaux (d'une même paire) qu'entre les paires de jumeaux différentes<sup>15</sup>. L'obésité est déterminée par une importante composante génétique puisqu'elle se transmet de génération en génération. Toutefois, sa pathogenèse reste complexe puisque le phénotype final résulte d'interactions entre plusieurs facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux qui sont dynamiques et changeants selon l'âge et l'état physiologique (ex. ménopause).

L'obésité est une inadaptation de l'évolution du style de vie sur le génome, soit un cas classique d'interaction « gène-environnement »<sup>16</sup>. Les interactions peuvent agir de façon plutôt potentialisante qu'additive ou parallèle. La littérature décrit plusieurs exemples d'interactions « gène-environnement ». L'équipe de Khoury et al. les ont classifiés en 4 groupes; soit type-I, -II, -III, et -IV (Tableau 1.1)<sup>17</sup>.

L'obésité est généralement classifiée comme une interaction « gène-environnement » de type-IV puisqu'un défaut génétique et un apport calorifique élevé conduisent tous les deux de façon indépendante à un certain degré d'obésité. Par contre, la présence combinée des deux éléments crée une synergie qui provoque une accumulation de graisse liée à des conditions métaboliques nocives<sup>1</sup>.

Évidemment, l'équation déterminant la résultante physiologique se complexifie si les facteurs de protection issus de la génétique et/ou de l'environnement sont tenus en compte<sup>1</sup>. De plus, l'exposition environnementale est souvent temporelle. Ainsi, la résultante phénotypique de chacun est déterminée par sa combinaison génétique et environnementale unique. Il reste qu'un trop grand apport alimentaire conduit à un gain corporel qui progresse vers l'obésité (surtout chez les individus génétiquement susceptibles).

#### Classification des types d'interactions « gène-environnement »

Interaction	Description
<b>Type I</b>	Ni la génétique, ni l'environnement n'ont d'effet en eux-mêmes. Seul la présence des deux éléments conduit à la maladie <sup>17</sup> . Ex : Sensibilité génétique au sel menant au développement de l'HTA <sup>1</sup> .
<b>Type II</b>	La génétique seule n'a pas d'effet. L'exposition à un environnement donné conduit à la maladie. L'effet néfaste de la génétique ressort seulement en présence d'un environnement propice <sup>17</sup> . Ex : Diabète chez les indiens « Pima » exposés à un environnement hyper calorique <sup>1</sup> .
<b>Type III</b>	Avoir la génétique peut conduire à la maladie. L'exposition à l'environnement seulement ne conduit pas à la maladie. Par contre, le résultat se potentialise en la présence des deux éléments <sup>17</sup> . Ex : Syndrome de Liddle (forme mono génique d'HTA empirée par le sel) <sup>1</sup> .
<b>Type IV</b>	La génétique et l'environnement peuvent tous les deux, de façon indépendante, conduire à la maladie. La présence des deux éléments donne un résultat synergique <sup>17</sup> . Ex : Obésité <sup>1</sup>

**Tableau 1.1 : Classification des types d'interactions « gène-environnement »** selon le groupe de Khoury et al.<sup>1, 17</sup>.

### 1.4 Conséquences associées à l'obésité

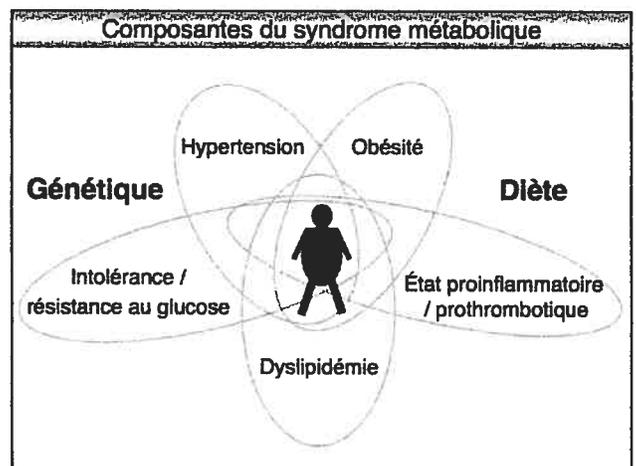
Les personnes obèses souffrent de divers problèmes de santé découlant de leur poids excédentaire. Les problèmes orthopédiques et arthritiques, les troubles du sommeil, les difficultés respiratoires à l'effort et la sudation excessive sont des problèmes de santé directement reliés à l'excès de masse d'un corps obèse. Ces troubles de santé sont une source de stigmatisation et de discrimination sociale. Ces malaises diminuent la qualité de vie des personnes obèses et celles-ci deviennent susceptible de développer des troubles psychologiques, tels que la dépression<sup>18</sup>.

Les conséquences plus sévères liées à l'obésité émergent d'interactions synergiques « gène-environnement ». Chez certains, même un faible excès de poids peut induire des changements endocriniens et métaboliques associés à un risque de morbidité plus élevé.

### 1.4.1 Syndrome métabolique

À la fin des années 80, Reaven et ses collègues proposèrent une première définition du syndrome métabolique<sup>19</sup>. Depuis, un consensus clair n'est toujours pas encore établi. Les différents organismes et guides thérapeutiques (WHO, NCEP/ATP III) utilisent différents critères diagnostiques<sup>13</sup>. Toutefois, les définitions tendent vers une standardisation. Le syndrome métabolique est souvent décrit comme un ensemble de perturbations métaboliques et cardiovasculaires se manifestant chez

un même individu à une fréquence plus élevée que celle du hasard<sup>20</sup>. La gamme de perturbations englobe: 1- *l'obésité (centrale)*, 2- *la résistance à l'insuline et/ou hyper insulinémie*, 3- *la dyslipidémie*, 4- *l'HTA* et 5- *l'état proinflammatoire et prothrombotique*<sup>20</sup> (Figure 1.1). L'obésité serait le principal facteur de risque pour le développement du syndrome métabolique<sup>20</sup>. Cependant, l'obésité dite centrale y est plus fortement associée<sup>8-12</sup>.



**Figure 1.1 Composantes du syndrome métabolique.** Une personne atteinte montre une combinaison de ces dérégulations métaboliques.

**1.4.1.1 Résistance à l'insuline et/ou hyper insulinémie :** L'obésité est un des principaux facteurs de risque pour le développement du diabète de type-II. Des deux millions et plus de canadiens diabétiques, 90% sont aussi obèses ([http://www.diabetes.ca/section\\_main/welcome.asp](http://www.diabetes.ca/section_main/welcome.asp)). Les mécanismes pathogéniques du diabète de type-II ne sont pas tout à fait éclairés<sup>21</sup>.

L'insuline est une hormone circulante sécrétée par les îlots de cellules- $\beta$  du pancréas. Cette hormone agit sur les cellules sensibles à l'insuline (ex. myocytes, adipocytes) en facilitant l'entrée et le métabolisme du glucose. L'insuline inhibe aussi la gluconéogénèse dans les cellules rénales et hépatiques<sup>20</sup>. Lorsque la sensibilité à l'insuline diminue (résistance à l'insuline), sa sécrétion et/ou clairance change pour compenser son défaut d'action; l'hyper insulinémie devient nécessaire pour garder une euglycémie stable<sup>20</sup>. Lorsque ce mécanisme compensatoire fait à son tour défaut (ex. épuisement des cellules- $\beta$  pancréatiques), des dérégulations de sécrétion de l'insuline et de l'hyperglycémie émergent<sup>20</sup>. L'hyperglycémie chronique progresse vers les diabètes de type-II chez les individus génétiquement susceptibles<sup>18</sup>, ce qui mène à diverses complications micro- et macro- vasculaires telles que la rétinopathie, la neuropathie, la néphropathie, l'ischémie cardiaque et autres dérégulations.

La résistance à l'insuline est depuis longtemps vue de façon « glucocentrique » mais aujourd'hui le rôle de la circulation surabondante d'AG est reconnu<sup>20</sup>. Les anomalies d'emmagasinage, de dégradation et de libération des triglycérides (TG) par les tissus devient la mesure primaire diagnostique de la résistance à l'insuline puisqu'elles apparaissent avant l'hyperglycémie<sup>21</sup>. Les irrégularités dans le métabolisme graisseux augmentent le flux d'AG libres aux tissus non-adipeux tels que les muscles et le foie<sup>21</sup>. Les perturbations progressent vers la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie et elles aboutissent au diabète de type-II. L'action de l'insuline la plus sensible est l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux<sup>22</sup>, donc une résistance à l'insuline augmente la lipolyse dans le tissu adipeux<sup>20</sup>. Plusieurs conséquences néfastes découlent de l'augmentation du flux d'AG telles que: 1- la dyslipidémie, 2- une stéatose hépatique, 3- une intolérance au glucose par la baisse de la sensibilité à l'insuline des muscles et du foie, 4-

une clairance de l'insuline diminuée qui est aggravée par une hyper insulinémie périphérique et 5- une dysfonction des cellules- $\beta$  pancréatiques<sup>21</sup>.

Les mécanismes biochimiques par lesquels les AG et les TG cytosoliques exercent leurs effets restent encore mal compris mais la notion de lipocytotoxicité a été avancée<sup>21, 23-25</sup>. Lorsque la balance énergétique est positive, les adipocytes emmagasinent les TG jusqu'à ce que le processus soit limité par une inefficacité d'emmagasinage et/ou d'expansion du tissu adipeux<sup>21</sup>. C'est alors que les substrats énergétiques encombrant les tissus non-adipeux menant aux anomalies métaboliques qui caractérisent l'intolérance au glucose. Plusieurs obèses, en particulier ceux ayant une obésité viscérale, développent une stéatose hépatique (infiltration adipeuse au foie)<sup>21</sup>. L'infiltration graisseuse des tissus non-adipeux peut être lipotoxique soit directement ou indirectement (par l'entre mise de l'augmentation du stress oxydatif)<sup>21</sup>.

Dans l'obésité centrale, les produits de lipolyse sont plutôt libérés dans la circulation splanchnique que la systémique. L'abondance des AG conduits directement au foie influence le métabolisme hépatique<sup>21</sup>. La glycogénèse, la lipogénèse, la sécrétion de protéines prothrombotiques (inhibiteur de l'activateur du plasminogène [PAI]-1, fibrinogène), la sensibilité et la clairance de l'insuline sont tous altérées par un taux élevé de AG<sup>21, 26</sup>.

Finalement, des études récentes impliquent de façon parallèle le glucose et les graisses dans le développement de l'intolérance au glucose; leurs rôles sont partagés. C'est donc l'excès énergétique global qui est diabétogénique<sup>21</sup>.

**1.4.1.2 Dyslipidémie:** L'obésité élève la concentration plasmatique des TG et diminue le cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL), deux caractéristiques qui sont des éléments diagnostiques du syndrome métabolique<sup>13</sup>.

**1.4.1.2.1 Physiologie des triglycérides :** Les TG diététiques subissent une lipolyse lorsqu'ils traversent la barrière intestinale<sup>27</sup>. Une fois entrés, les AG libres sont ré-estérifiés en TG et incorporés dans des chylomicrons qui sont libérés dans la circulation<sup>27</sup>. Les TG circulants sont

aussi transportés par les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), produites par le foie. La lipoprotéine lipase intravasculaire lyse les TG des chylomicrons et des VLDL<sup>27</sup> libérant les AG et le glycérol. Ceux-ci peuvent entrer dans les cellules où ils sont soit : 1-oxydés pour produire de l'énergie ou 2- ré-estérifiés pour les emmagasiner<sup>27</sup>. Une fois dans la cellule, c'est la lipase sensible aux hormones (HSL) qui régule la lyse des TG et qui contrôle la libération des AG du tissu<sup>21</sup>. L'action de l'HSL est grandement réprimée par l'insuline.

**1.4.1.2.2 Rôle des triglycérides dans la pathophysiologie de l'obésité associée au syndrome métabolique:** L'obésité est associée à un déséquilibre entre la lyse des TG et leur synthèse par estérification<sup>21</sup>; ce déséquilibre favorise l'augmentation des AG<sup>21</sup>. Certains suggèrent que la résistance insulinaire affectant les personnes obèses inhibe l'action de l'HSL<sup>21</sup>. Lorsque l'équilibre entre la capture et la relâche d'AG est perturbé dans le tissu adipeux, les AG libres altèrent le métabolisme des tissus non-adipeux tels que le foie, les muscles et éventuellement le pancréas<sup>21</sup>.

Dès le départ, le foie essaie de rétablir un équilibre par des mécanismes compensatoires tels que : 1-l'emmagasinement ectopiquement les TG (stéatose du foie), 2- l'augmentation de l'oxydation des AG, 3- l'augmentation de la synthèse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL)<sup>21</sup>. Ainsi, l'augmentation de la synthèse de TG altère la composition des lipoprotéines en augmentant la relâche de VLDL en circulation, en réduisant la production de lipoprotéines de haute densité (HDL) et en changeant la composition des lipoprotéines de basse densité (LDL) qui deviennent plus petites, denses et athérogéniques<sup>28-30</sup>. En fait, l'hypertriglycéridémie reflète bien la condition de résistance à l'insuline et devient un important critère diagnostique pour le syndrome métabolique<sup>20</sup>.

Des études effectuées chez l'humain montrent que l'accumulation intramyocellulaire de TG est associée à : 1- une résistance à l'insuline des cellules musculaires<sup>31-33</sup>, 2- une réduction de leur capacité oxydative<sup>21</sup> et 3-

l'inhibition du métabolisme du glucose dans le muscle<sup>34</sup>. Par contre, il n'est pas encore certain que la présence intramyocytaire de TG joue un rôle causal dans le développement de la résistance à l'insuline<sup>21</sup>.

**1.4.1.2.3 Physiologie des HDL :** Le foie synthétise aussi les HDL qui transfèrent aux chylomicrons et aux VLDL de: 1- l'apoprotéine (Apo)-C<sub>II</sub>, un activateur de la lipoprotéine lipase, et 2-l'Apo E, un facteur de reconnaissance par les cellules<sup>27</sup>. De plus, les HDL transportent le cholestérol des tissus périphériques au foie où ils peuvent être recyclés<sup>27</sup>.

**1.4.1.2.4 Rôle des HDL dans la pathophysiologie de l'obésité associée au syndrome métabolique :** *In vitro*, l'HDL promue la libération de cholestérol de cellules spumeuses logées dans les lésions athérosclérotiques (transport inverse du cholestérol)<sup>35</sup>. D'autres études attribuent aux HDL des propriétés anti-oxydatives et anti-inflammatoires, qui inhibent l'athérogenèse<sup>36, 37</sup>. Le taux d'HDL est réduit dans l'obésité<sup>38</sup> et la perte de ses effets protecteurs rend le système cardio-vasculaire plus susceptible de développer des pathologies telles que des plaques athérosclérotiques.

**1.4.1.3 Hypertension artérielle :** L'HTA associée à l'obésité fait aussi partie du syndrome métabolique. C'est un bon exemple de conditions pathologiques créées par des interactions « gène-environnement ». Toutefois, l'obésité reste le principal facteur de risque pour le développement de l'HTA (voir chapitre 2). Le sujet principal de ce mémoire est l'identification de facteurs géniques induisant l'HTA associée à l'obésité dans un modèle animal susceptible au développement du syndrome métabolique.

**1.4.1.4 État proinflammatoire et prothrombotique :** Les indices d'inflammation sont augmentés chez les sujets obèses et cette association est bien documentée<sup>20, 39</sup>. En fait, plusieurs cytokines proinflammatoires sont

augmentées telles que : l'interleukine (IL)-6, la résistine, le Tnf- $\alpha$  et la protéine réactive-C<sup>40</sup>. La surproduction de cytokines reflète l'expansion de la masse adipeuse<sup>41</sup>. Des macrophages dérivés de monocytes infiltrent le tissu adipeux et diffusent des cytokines proinflammatoires d'action locale et/ou systémique<sup>42, 43</sup>. En fait, la résistance à l'insuline des tissus hépatiques, musculaires et adipeux est non seulement associée à cette abondance de cytokines mais elle est aussi un résultat direct de cette surcharge inflammatoire<sup>44</sup>.

Principalement produite par les adipocytes, l'adiponectine est une cytokine anti-inflammatoire qui peut : 1- accroître la sensibilité à l'insuline, 2- inhiber l'expression d'enzymes gluconéogéniques, 3- inhiber le taux de production endogène de glucose, 4- accroître le transport du glucose et 5- augmenter l'oxydation des AG<sup>43, 45</sup>. Cependant, il a été démontré que la production d'adiponectine est réduite par l'obésité<sup>46</sup>.

## CHAPITRE 2

### 2. Hypertension associée à l'obésité

#### 2.1 Relation épidémiologique entre l'hypertension et l'obésité

#### 2.2 Pathogenèse de l'hypertension associée à l'obésité

##### 2.2.1 Activation du système nerveux sympathique

###### 2.2.1.1 Hyper leptinémie

###### 2.2.1.2 Hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline (Effet indirect – par activation du SNS)

##### 2.2.2 Hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline (effet direct)

##### 2.2.3 Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone

###### 2.2.3.1 Système rénine-angiotensine-aldostérone local du tissu adipeux

##### 2.2.4 Stress oxydatif, facteurs d'inflammation et de coagulation

##### 2.2.5 Dysfonction du tissu adipeux

###### 2.2.5.1 Tissu adipeux comme organe endocrinien

###### 2.2.5.2 Taille des adipocytes reliée à la dysfonction du tissu adipeux

###### 2.2.5.2.1 Production dérégulée de molécules bio actives

###### 2.2.5.2.2 Infiltration de macrophages

###### 2.2.5.2.3 Capacité insuffisante d'accommoder les graisses

###### 2.2.5.3 Mécanismes par lesquels la taille augmentée des adipocytes induit des cascades menant à l'hypertension associée à l'obésité.

###### 2.2.5.3.1 Altérations de la signalisation entre la matrice extra- et intra- cellulaire

###### 2.2.5.3.2 Redistribution du cholestérol

###### 2.2.5.3.3 Augmentation du flux des acides gras libres

###### 2.2.5.4 Dysfonctions encourageant l'augmentation de la taille des adipocytes

###### 2.2.5.4.1 Défaut de différenciation

###### 2.2.5.4.2 Capacité réduite d'oxyder les lipides

#### 2.3 Conséquences délétères de l'hypertension associée à l'obésité sur organes cibles

##### 2.3.1 Cardiopathies

###### 2.3.1.1 Dysfonction diastolique

###### 2.3.1.2 Dysfonction systolique

##### 2.3.2 Perturbations rénales

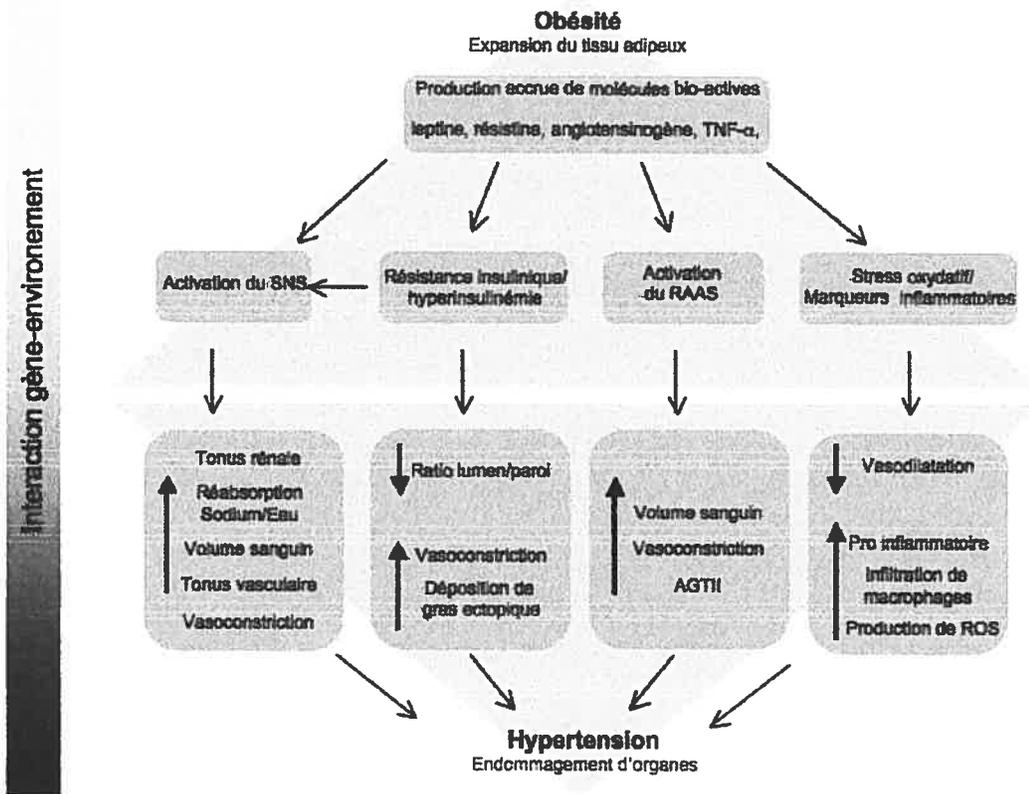
## 2.1 Relation épidémiologique entre l'hypertension et l'obésité

Cliniquement, une personne est considérée hypertendue lorsque sa pression artérielle (PA) dépasse 140/90 mm Hg ou qu'elle utilise des médicaments anti-hypertenseurs<sup>47</sup>. Une HTA persistante est un facteur de risque important pour les accidents cérébraux vasculaires (ACV), les crises cardiaques, l'insuffisance cardiaque et l'insuffisance rénale.

L'augmentation de PA corrèle à la prise de poids; elle est même fortement reliée à l'amplitude du gain de poids<sup>48</sup>. L'étude *Framingham Heart* estime que 65-78% de cas d'HTA sont attribuables à l'obésité<sup>49</sup> et que même une prise de poids modérée est associée à un risque plus élevé<sup>50-52</sup>. La perte de poids est associée à une réduction de la PA même chez les obèses normaux-tendus<sup>53, 54</sup>, ce qui suggère que la PA de ces individus est plus élevée qu'elle le serait avec une adiposité plus basse. L'association entre la PA et le niveau d'adiposité se voit même à travers la gamme des non-obèses<sup>55</sup>. Toutefois, cette relation montre des variations interindividuelles considérables. La résultante phénotypique dépend de la combinaison génétique et environnementale de chacun : tous les obèses ne sont pas hypertendus et tous les hypertendus ne sont pas obèses<sup>11</sup>.

## 2.2 Pathogenèse de l'hypertension associée à l'obésité

L'étiologie de l'association entre l'HTA et l'obésité n'est pas encore tout à fait éclaircie<sup>5, 18</sup>. Quatre grands mécanismes semblent se développer en parallèle et se potentialiser entre eux soit ; 1- l'activation du système nerveux sympathique (SNS), 2- l'hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline, 3- l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) et 4- la production accrue de stress oxydatif<sup>5, 56</sup>. L'expansion du tissu adipeux est reliée à une dysfonction caractérisée par la production dérégulée de molécules bio actives, ce qui enclenche les quatre grands mécanismes pathogéniques induisant l'HTA associée à l'obésité (Figure 2.1). Ainsi, la dysfonction du tissu adipeux devient centrale à l'induction pathophysiologique de l'HTA associée à l'obésité.



**Figure 2.1 :** Mécanismes pathophysiologiques enclenchés par la dérégulation des molécules bio actives dans le tissu adipeux en expansion pouvant induire l'HTA associée à l'obésité : 1- l'activation du système nerveux sympathique (SNS), 2- l'hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline, 3- l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) et 4- la production accrue de stress oxydatif<sup>5</sup>. Note : AGTII; angiotensine II, ROS; radicaux libres, Tnf- $\alpha$ ; facteur de nécrose tumoral.

### 2.2.1 Activation du système nerveux sympathique

Une activation chronique du SNS serait un mécanisme clé dans la pathogenèse de l'HTA associée à l'obésité<sup>5</sup>. Étant un pion clé dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire, plusieurs études lient l'activité du SNS avec l'adiposité et sa distribution<sup>11, 57, 58</sup>. L'obésité induit l'activation sympathique augmentant la PA par : 1- la vasoconstriction périphérique et 2- une hausse de la rétention sodique et liquide<sup>5</sup>. Plusieurs études décrivent une activité accrue des nerfs sympathiques dans l'obésité associée à l'HTA<sup>59-61</sup>. Le SNS peut être activé par 1- l'hyper leptinémie induite par l'obésité et 2- l'hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline.

**2.2.1.1 Hyper leptinémie :** Selon des nouvelles études, la leptine est une molécule clé dans l'activation sympathique associée à l'obésité<sup>62, 63</sup>. La leptine est produite et sécrétée par les adipocytes en proportion avec la masse adipeuse par conséquent, l'obésité est associée à un taux élevé de leptine circulant<sup>64</sup>. Cette molécule agit sur des cibles neuronales de l'hypothalamus pour : 1- réduire l'appétit, 2- accroître la dépense énergétique par la hausse du signal sympathique aux tissus actifs métaboliquement et 3- augmenter l'activité sympathique aux reins et à la vasculature périphérique<sup>5, 65, 66</sup>. La leptine active le SNS par deux systèmes de neurotransmetteurs distincts dans l'hypothalamus : la composante « pressive » provient du système de la mélanocortine<sup>67, 68</sup> alors que la composante métabolique vient du système corticotrophique<sup>69</sup>. Suite à l'hyper leptinémie chronique de l'obésité, les voies moléculaires développent une résistance sélective à la leptine<sup>70</sup>. L'effet sur l'appétit et la dépense énergétique se perd alors que l'effet sur la vasculature et les reins se maintient dans l'obésité associée à l'HTA<sup>5</sup>. De plus, la déficience et la résistance à la leptine sont associées à l'accumulation de TG dans les organes non-adipeux tels que le foie, les muscles et les îlots<sup>70</sup>. La leptine diminue la sécrétion d'insuline<sup>71</sup> et donc la résistance peut introduire une hyper insulinémie avant l'avènement d'une sécrétion d'insuline défectueuse<sup>72</sup>.

**2.2.1.2 Hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline (effet indirect - par activation du SNS) :** Comme décrit ci-dessous, l'hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline peut avoir un effet direct sur l'HTA associée à l'obésité<sup>5, 73-75</sup>. Par contre, il a été proposé que l'hyper insulinémie puisse aussi avoir un effet indirect sur l'HTA associée à l'obésité en activant le SNS qui agit sur la vasculature des reins. Par exemple, l'injection intracérébrale d'insuline chez le rat augmente l'activité nerveuse sympathique à divers organes à travers son action hypothalamique<sup>76, 77</sup>.

Cependant, malgré les maintes études trouvant que l'hyper insulinémie accroît l'activité du SNS<sup>78, 76, 77</sup> de façon à indirectement élever la PA, certaines observations expérimentales remettent cette hypothèse en question<sup>66, 78</sup>. Les

études épidémiologiques montrent des associations mitigées et inconstantes<sup>11, 20</sup>. Les patients atteints d'insulinoma ne montrent pas d'augmentation d'activité du SNS et/ou de la PA; cela malgré des taux plasmatiques d'insuline faramineux<sup>79, 80</sup>. Ainsi, le rôle de l'hyper insulinémie dans l'activation du SNS provoquant de l'HTA est controversé<sup>11</sup>.

### **2.2.2 Hyper insulinémie induite par la résistance à l'insuline (effet direct)**

La résistance à l'insuline et l'hyper insulinémie ont été impliquées plus directement dans la pathophysiologie de l'HTA associée à l'obésité<sup>5, 73-75</sup>. Les obèses montrent un niveau d'insuline circulant augmenté afin de compenser la résistance à l'insuline induite par l'obésité<sup>5</sup>. L'injection systémique d'insuline altère la vasodilatation<sup>81</sup> et la réabsorption de sodium dans le rein<sup>82</sup>. Les divers effets centraux de l'insuline passent via des mécanismes moléculaires distincts<sup>83</sup> d'où émergent des résistances sélectives. L'effet vasodilatateur de l'insuline peut faiblir<sup>84</sup> alors que son effet sur la réabsorption sodique rénale persiste<sup>85</sup>, favorisant l'HTA. La résistance à l'insuline et l'hyper insulinémie peuvent aussi contribuer à l'HTA associée à l'obésité par d'autres mécanismes (ex. Induction de dommages hypertrophiques vasculaires produits par des anomalies chroniques du métabolisme des lipides et du glucose<sup>11</sup>).

### **2.2.3 Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone**

Les résultats d'études effectuées chez les animaux<sup>86, 87</sup> et les humains<sup>88</sup> indiquent que l'activation du RAAS joue un rôle important dans l'étiologie de l'HTA associée à l'obésité en contribuant à l'augmentation de la PA par la vasoconstriction périphérique et la réabsorption rénale accrue de sodium. Plusieurs composantes du RAAS telles que l'angiotensinogène, la rénine, l'aldostérone et l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène (ECA) sont à la hausse chez les humains obèses<sup>88-90</sup>. La perte de poids cause une diminution la rénine plasmatique suit d'une baisse de PA<sup>91-93</sup>. L'inhibition de ECA est un moyen pharmacologique efficace pour abaisser la PA des hypertendus obèses<sup>94</sup>.

Certains pensent que l'angiotensine-II soit capable d'augmenter l'activité du SNS par une action centrale<sup>95-98</sup>.

**2.2.3.1 Système rénine-angiotensine-aldostérone local du tissu adipeux :** Le tissu adipeux exprime plusieurs composantes du RAAS et ce système local a été impliqué dans l'HTA associée à l'obésité<sup>5, 99</sup>. L'angiotensinogène est plutôt exprimée et sécrétée par les adipocytes viscéraux que les sous-cutanés<sup>100</sup>. Chez la souris, la surexpression spécifique d'angiotensinogène dans le tissu adipeux augmente significativement : 1- le taux circulant d'angiotensine et 2- la PA<sup>101</sup>. L'effet sur la PA est aboli par l'administration d'antagonistes sélectifs au récepteur de l'angiotensine-II de type-1<sup>102</sup>, indiquant un rôle fonctionnel de l'activation du RAAS local dans les mécanismes pathologiques de ce modèle d'HTA associée à l'obésité. L'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase-1 régénère le cortisol actif à partir des formes 11-kéto inactives et stimule la lipogénèse<sup>5</sup>. La surexpression de cette enzyme dans le tissu adipeux augmente : 1- l'adiposité viscérale et 2- l'angiotensine circulante et exprimée par le tissu adipeux<sup>102</sup>.

#### **2.2.4 Stress oxydatif, facteurs d'inflammation et de coagulation**

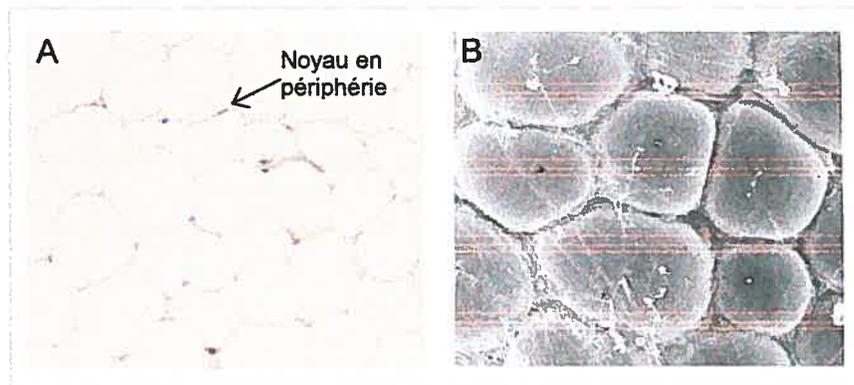
Le stress oxydatif est aussi impliqué dans le développement de l'HTA<sup>103</sup>. Des études récentes suggèrent que l'obésité induit un stress oxydatif systémique<sup>104</sup>. Chez les humains et les modèles expérimentaux, le degré d'adiposité corrèle avec les marqueurs de stress oxydatif systémique<sup>105-107</sup>. Par exemple, un modèle animal montre que l'obésité augmente le taux de production de radicaux libres dans le tissu adipeux mais pas dans le foie, les muscles ou l'aorte<sup>107</sup>. *In vitro*, l'accumulation de graisse par les adipocytes 3T3-L1 augmente en parallèle la production de radicaux libres<sup>107</sup>. La production locale de radicaux libres provient des adipocytes mais aussi des macrophages infiltrant le tissu adipeux<sup>108</sup>. Des études récentes montrent que le degré d'infiltration de macrophages du tissu adipeux corrèle positivement avec l'adiposité corporelle<sup>42</sup>

et que ces macrophages sont en état classique d'activation (produisant un taux élevé de radicaux libres et de cytokines proinflammatoires)<sup>108</sup>.

De plus, le stress oxydatif contribue à la dysfonction endothéliale reliée à l'obésité<sup>109</sup> puisque l'infusion d'antioxydants crée une vasodilatation modulée par l'endothélium seulement chez les obèses. Jouant un rôle central dans l'homéostasie cardiovasculaire, l'endothélium régule le tonus vasculaire et la balance fibrinolytique (adhésion monocytes/plaquettes)<sup>110, 111</sup>. Les forces mécaniques causées par l'obésité altèrent la fonction vasculaire et la structure de l'endothélium<sup>112</sup>. La sévérité de la dysfonction endothéliale est reliée à l'adiposité viscérale plutôt qu'à l'adiposité générale<sup>109, 113</sup>.

### **2.2.5 Dysfonction du tissu adipeux**

L'adipocyte est l'unité cellulaire principale du tissu adipeux qui se spécialise dans l'emmagasiner d'énergie sous forme de TG lorsque l'apport énergétique surpasse la dépense. Le cytoplasme des adipocytes est envahi par une énorme inclusion lipidique centrale qui aplatit le noyau cellulaire en périphérie; seulement une mince couche cytoplasmique est laissée au pourtour de la cellule (Figure 2.2). Des études récentes suggèrent que l'HTA associée à l'obésité est reliée de façon causale à l'accumulation de tissus adipeux dysfonctionnels caractérisés par la présence d'adipocytes morphologiquement plus volumineux et engorgés de lipides<sup>5</sup>.



**Figure 2.2 Morphologie des adipocytes.** A) par microscopie optique. B) par microscopie électronique ([www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/eat/eat.htm](http://www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/eat/eat.htm))

**2.2.5.1 Tissu adipeux comme organe endocrinien :** Traditionnellement, le tissu adipeux avait un rôle passif de « réservoir énergétique ». Maintenant, il est perçu comme un réel organe endocrinien : complexe, essentiel et métaboliquement actif. Le tissu adipeux envoie plusieurs signaux efférents par l'expression et la sécrétion d'une variété d'adipokines, soit des peptides bioactifs d'action locale (autocrine/paracrine) et/ou systémique (endocrine). De plus, les adipocytes expriment des récepteurs qui intègrent des signaux afférents provenant de systèmes hormonaux classiques et du SNC. Le tissu adipeux participe activement dans le réseautage interactif entre les organes qui est nécessaire à la coordination de diverses fonctions métaboliques, neuroendocrines et immunitaires<sup>114</sup>.

Le tissu adipeux contient plusieurs types cellulaires autres que les adipocytes : nerveuses, stromovasculaires, immunes et conjonctives<sup>115</sup>. Plusieurs des molécules sécrétées par le tissu adipeux dérivent de la fraction non-adipocytaire<sup>116</sup>. En fait, les différentes composantes cellulaires agissent comme une unité intégrée permettant au tissu adipeux de fonctionner comme un véritable organe endocrinien<sup>115</sup>.

### 2.2.5.2 Taille des adipocytes reliée à la dysfonction du tissu adipeux :

L'expansion du tissu adipeux se fait par l'augmentation du nombre et de la taille des adipocytes<sup>117</sup>. La phase précoce de l'obésité est dominée par l'hypertrophie progressive des adipocytes déjà présents dans le tissu; la taille des adipocytes augmente jusqu'à ce qu'elle atteigne un plateau<sup>118</sup>. C'est alors que l'hyperplasie se manifeste afin d'accommoder une surcharge graisseuse additionnelle. Cette phase d'adipogenèse requiert : 1- le recrutement de précurseurs d'adipocytes, 2- l'initiation du programme de différenciation et 3- la mise en place d'infrastructures de support<sup>118</sup>. Le programme de différenciation adipocytaire se divise en trois grandes phases : 1- Prolifération-différenciation : les précurseurs cellulaires entreprennent la voie de différenciation spécifique à la lignée adipocytaire via le système signal WNT, 2- Transition ; l'étape transitionnelle entre la prolifération-différenciation et la différenciation terminale est contrôlée par divers facteurs de transcription tels que le récepteur activé de la prolifération des peroxyosomes (Ppar)- $\gamma$ , la protéine favorisant la liaison du CCAAT (C/ebp)- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  et l'élément régulateur du stérol liant la protéine (SREBP)-1, et 3- Différenciation terminale : l'étape finale est marquée par l'expression de facteurs adipocytaires tels que la leptine, l'adiponectine et la protéine adipocytaire liant les AG (aP)-2<sup>119</sup>.

La morphologie du tissu adipeux en expansion diffère entre les individus. Certains montrent des cellules plus grosses et empaquetées d'autres des plus petites, mais nombreuses. La présence d'adipocytes volumineux (plutôt que petits) est associée à des anomalies fonctionnelles et structurelles du tissu adipeux telles que : 1- une *production dérégulée de molécules bio actives*, 2- une *infiltration de macrophages* augmentée et 3- une *capacité insuffisante à accommoder les graisses*<sup>5</sup>.

**2.2.5.2.1 Production dérégulée de molécules bio actives:** Le tissu adipeux dysfonctionnel est source d'une production accrue de molécules bio actives et de radicaux libres. Plusieurs études montrent que l'hypertrophie et l'hyperplasie des adipocytes altèrent la production des molécules signaux endocrines et paracrine/autocrines produites par le

tissu adipeux (ex. Tnf- $\alpha$ , leptine, adiponectine, résistine, angiotensinogène, PAI-1)<sup>114</sup>. Par exemple, le volume adipocytaire corrèle positivement avec la sécrétion de leptine<sup>120, 121</sup> et la perte de poids est associée à: 1- une réduction de la taille adipocytaire et 2- une réduction de la sécrétion de leptine<sup>122</sup>. En relation avec l'activation de RAAS, il est démontré que la surexpression d'angiotensinogène dans le tissu adipeux est reliée à une taille adipocytaire augmentée<sup>101</sup> et que l'abrogation de RAAS mène à une diminution de la taille adipocytaire<sup>123, 124</sup>.

Ces molécules bio actives sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus physiologiques tels que l'activation du SNS, la résistance à l'insuline/hyper insulinémie, l'activation du RAAS, le stress oxydatif, les marqueurs inflammatoires, l'adipolyse, la réabsorption du sodium; bref l'homéostasie générale<sup>5, 86, 125, 126</sup>. Plusieurs de ces processus physiologiques sont ultimement impliqués dans la régulation de la PA et donc dans la pathogenèse de l'HTA associée à l'obésité<sup>5</sup>.

L'expansion du tissu adipeux et l'augmentation de la taille adipocytaire altèrent la production de ces signaux menant à plusieurs dérégulations qui favorisent le développement de l'HTA associée à l'obésité.

**2.2.5.2.2 Infiltration de macrophages :** Dans l'obésité humaine, la fraction stromovasculaire du tissu adipeux est enrichie de macrophages<sup>127</sup>. Ces macrophages infiltrants amplifient la production de radicaux libres ce qui contribue à l'établissement d'un état proinflammatoire aggravé chez les obèses<sup>127</sup>. L'IMC et la taille des adipocytes corrèlent positivement avec le degré d'infiltration de macrophages du tissu adipeux<sup>42</sup>. Lors de la différenciation adipocytaire, la production de radicaux libres s'intensifie au fur et à mesure que les adipocytes accumulent les graisses et augmentent de taille<sup>107</sup>. La morphologie histologique du tissu adipeux de sujets obèses révèle la présence de couronnes de macrophages entourant complètement des adipocytes. Les macrophages « en couronne » emmagasinent des TG

dans leurs cytoplasmes et ressemblent à des cellules spumeuses<sup>42</sup>; ceci peut être une forme de déposition ectopique de lipides. Ainsi, l'infiltration de macrophages peut contribuer à l'induction d'états proinflammatoires, de stress oxydatif, de résistance à l'insuline/hyperinsulinémie<sup>5</sup> et peut donc venir à élever la PA chez les obèses<sup>108</sup>.

#### **2.2.5.2.3 Capacité insuffisante à accommoder les graisses :**

Lorsqu'un excès calorique supplémentaire ne peut plus être accommodé par un tissu adipeux trop engorgé, la graisse se dépose ectopiquement dans des tissus non-adipeux comme les muscles et le foie. La taille adipocytaire corrèle positivement avec le degré d'accumulation lipidique ectopique<sup>128</sup>. Puis, la déposition ectopique contribue au développement de résistance à l'insuline et à l'hyperinsulinémie<sup>128, 129</sup> (deux facteurs impliqués dans l'augmentation de la PA chez les personnes obèses<sup>83</sup>). Plusieurs chercheurs parlent de lipotoxicité où la déposition ectopique de lipides affecte négativement le fonctionnement des cellules non-spécialisées dans l'emmagasinage des graisses; celles-ci peuvent devenir vulnérables à l'apoptose. Avec le temps, les organes en souffrent et ils s'endommagent<sup>21</sup>.

Les trois caractéristiques du tissu adipeux dysfonctionnel (production dérégulée de molécules bio actives, infiltration de macrophages, capacité insuffisante à accommoder les graisses) sont tous associées à la présence d'adipocytes de grande taille. Ainsi, cette morphologie du tissu adipeux (adipocytes volumineux et engorgés de lipides) est associée à une gamme d'anomalies pouvant induire le développement d'HTA associée à l'obésité via : la stimulation de l'activité du SNS, la stimulation de l'activité du RAAS, la résistance à l'insuline et hyper insulinémie, la lipotoxicité ainsi que par la production accrue de stress oxydatif et de marqueurs d'inflammation<sup>5</sup>.

**2.2.5.3 Mécanismes par lesquels la taille augmentée des adipocytes induit les cascades menant à l'hypertension associée à l'obésité :** Comme discuté, plusieurs études trouvent que la taille adipocytaire est reliée aux changements pathologiques induisant le développement de l'HTA associée à l'obésité<sup>5</sup>. Cependant, peu d'études tentent d'identifier les mécanismes par lesquels l'augmentation de la taille adipocytaire vient à induire 1- l'activation du SNS (par l'hyperleptinémie et/ou hyper insulinémie), 2-l'activation de RAAS, 3- la résistance à l'insuline/hyper insulinémie et 4- la production de radicaux libres et de stress oxydatif. Malgré tout, quelques propositions sont avancées. L'augmentation de la taille adipocytaire peut causer: 1- une *altération de la signalisation entre la matrice extra- et intra- cellulaire*, 2- une *redistribution du cholestérol* de la membrane plasmique aux inclusions lipidiques intracellulaires ou 3- une *augmentation du flux des AG libres* dans les adipocytes<sup>5</sup>.

**2.2.5.3.1 Altérations de la signalisation entre la matrice extra- et intra- cellulaire :** Les molécules impliquées dans les interactions « cellule-cellule » ou « cellule-matrice » sont des pivots importants dans la régulation du processus de différenciation<sup>117</sup>. Par exemple, les  $\beta$ 1-intégrines sont des récepteurs de la matrice extracellulaire qui intègrent les indices d'adhésion extracellulaire et les traduisent pour transmettre une réponse intracellulaire fonctionnelle, les  $\beta$ 1-intégrines stimulées activent les voies moléculaires de MAPKs, ERK1 et ERK2. Des études récentes suggèrent qu'une augmentation de la taille des adipocytes induit des changements dans la signalisation entre la matrice extra- et intra- cellulaire via les  $\beta$ 1-intégrines<sup>121</sup>. Les adipocytes volumineux montrent une concentration élevée de  $\beta$ 1-intégrines accompagnée d'une concentration et activité cytoplasmique accrues de ERK1 et ERK2 (comparativement aux cellules de taille plus petite)<sup>121</sup>. Ceci dit, notons que ERK1 et ERK2 ont été récemment impliqués dans la stimulation de la production de leptine par les adipocytes<sup>130</sup>.

**2.2.5.3.2 Redistribution du cholestérol :** La taille adipocytaire peut possiblement influencer l'expression génique via un mécanisme de redistribution cellulaire du cholestérol<sup>5</sup>. L'hypertrophie change la distribution cellulaire du cholestérol; celui-ci se retire de la membrane plasmique et s'implante plutôt dans les inclusions lipidiques intracellulaires. La déplétion du cholestérol plasmique induite de façon expérimentale est associée à des altérations d'expression génique telles que l'induction des gènes de l'angiotensinogène et de cytokines proinflammatoires incluant le Tnf- $\alpha$ <sup>131</sup>.

**2.2.5.3.3 Augmentation du flux des acides gras libres :** Finalement, il a été démontré que la taille des adipocytes corrèle positivement avec le flux des AG libres dans les adipocytes et qu'un taux de relâche des AG augmenté induit de l'inflammation de manière paracrine<sup>132</sup>. Dans un système de co-culture (adipocytes et macrophages), les AG relâchés par les adipocytes accroissent la production de Tnf- $\alpha$  par les macrophages avoisinants, ce qui stimule les marqueurs inflammatoires tels que la protéine de chémoattraction des monocytes (MCP)-1 et l'IL-6 dans les adipocytes<sup>132</sup>. Cette relation « macrophage-adipocyte » crée un cercle vicieux proinflammatoire<sup>132</sup> amplifiant l'hyperleptinémie<sup>133, 134</sup>, la production de radicaux libres<sup>108</sup> et la résistance à l'insuline/hyperinsulinémie<sup>135</sup>. De plus, les changements proinflammatoires provoquent la conversion des pré-adipocytes en macrophages et accroissent l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages<sup>135</sup>.

**2.2.5.4 Dysfonction encourageant l'augmentation de la taille des adipocytes :** Le tissu adipeux composé d'adipocytes plus volumineux et engorgés peut être le résultat d'un *défaut de différenciation* (capacité inadéquate de former des nouveaux adipocytes) ou d'une *capacité réduite d'oxyder les graisses*<sup>128</sup>.

**2.2.5.4.1 Défaut de différenciation :** Des cascades complexes d'événements transcriptionnelles et/ou non-transcriptionnelles régulent la prolifération et la différenciation<sup>5</sup>. Les adipocytes dérivent des cellules pluripotentes mésenchymales qui prolifèrent et se différencient en pré-adipocytes morphologiquement indifférenciés des fibroblastes. Les préadipocytes migrent au site de l'adipogenèse où leur différenciation se poursuit pour devenir des adipocytes matures<sup>5</sup>. Les cellules grossissent et s'arrondissent au fur et à mesure que leur cytoplasme s'entasse d'inclusions lipidiques qui se fusionnent pour ne former qu'une inclusion centrale massive<sup>5</sup>. Les signaux moléculaires dirigeant les cellules souches mésenchymales à entreprendre la voie de différenciation adipocytaire (et non pas ceux des autres lignées : myocytaire, ostéocytaire ou chondrocytaire) restent pour la plupart inconnus.

Des études suggèrent que la modulation du système signal Rho joue un rôle clé dans ce processus<sup>5</sup>. Rho, une petite GTPase, régule les voies de signalisation impliquées dans l'organisation du cytosquelette. L'activation *in vitro* de la kinase-Rho par Rho inhibe l'adipogenèse mais induit la myogenèse; l'activation de la kinase est même requise pour la myogénèse<sup>136</sup>. Les processus de prolifération et de différenciation des préadipocytes en adipocytes matures impliquent une période mitotique d'expansion clonale, suivie d'un arrêt de croissance.

L'expansion mitotique clonale peut être nécessaire au déroulement de l'ADN, ce qui permet aux facteurs de transcription d'avoir accès aux éléments de réponses géniques contrôlant la différenciation<sup>5</sup>. Les intégrines et les gènes adipocytaires « précoces » (C/ebp- $\beta$  et  $-\delta$ ) régulent les activités transcriptionnelles du Ppar- $\gamma$  et du C/ebp- $\alpha$  qui sont les gènes maîtres de la différenciation adipocytaire ainsi que la lipogenèse<sup>137</sup>. Des déficiences dans ces cascades géniques entravent la formation de nouveaux adipocytes même en présence d'un excès énergétique persistant. Ainsi, les adipocytes déjà en place accumulent massivement les lipides et s'engorgent provoquant : 1- les dérégulations des molécules bio

actives, 2- l'infiltration de macrophages<sup>5</sup>. Si l'hypertrophie des adipocytes préexistants s'avère insuffisante, l'accumulation ectopique de lipides s'ensuit. Les muscles et le foie sont les premiers tissus à entamer la tâche adipocytaire<sup>5</sup>. Collectivement, ces phénomènes mènent aux conséquences cliniques adverses discutées plus haut.

**2.2.5.4.2 Capacité réduite d'oxyder les lipides :** L'augmentation de la taille des adipocytes peut aussi être le résultat d'une capacité réduite d'oxyder les lipides<sup>5</sup>. Il est démontré que l'inhibition de l'oxydation des graisses chez les rongeurs accroît le contenu lipidique intracellulaire<sup>138</sup>. Chez les humains, une capacité basse d'oxyder les lipides est associée à l'obésité<sup>139</sup>; c'est même un indicateur prédictif du gain corporel<sup>140</sup>.

Les mitochondries sont responsables de l'oxydation des AG. De ce fait, il est montré que l'exposition à une diète élevée en gras (HFD) provoque de la biogenèse mitochondriale dans le tissu adipeux blanc de rongeurs qui permet la dissipation d'énergie excessive sous forme de chaleur, une propriété normalement attribuée au tissu adipeux brun<sup>141</sup>. Plusieurs voies métaboliques sont impliquées dans ce processus de transdifférentiation. Chez les souris transgéniques, la surexpression de Ppar- $\delta$ , un facteur de transcription nucléaire activé par les AG, induit les gènes impliqués dans l'oxydation et la dissipation énergétique<sup>142</sup>. Ces souris sont protégées de l'obésité induite par la diète et de l'accumulation lipidique ectopique. De plus, la taille de leurs adipocytes est significativement moins grande que celle des souris contrôles puisque leur niveau de catabolisme lipidique est augmenté<sup>142</sup>. Des études montrent que l'activation pharmacologique des voies cAMP et de Ppar- $\gamma$  stimule la biogenèse mitochondriale et l'oxydation des AG dans les adipocytes humains<sup>143</sup>.

Ainsi, une source croissante de données suggèrent qu'une morphologie spécifique du tissu adipeux (adipocytes volumineux et engorgés de lipides) est centrale dans le développement de désordres

métaboliques et cardiovasculaires associés à l'obésité comme l'HTA<sup>5</sup>. Le discernement des voies moléculaires qui conduisent les adipocytes vers cette morphologie peut aider au développement de stratégies préventives et/ou de traitements correctifs de la morbidité et de la mortalité reliées à l'obésité.

## **2.3 Conséquences délétères de l'hypertension associée à l'obésité sur des organes cibles**

Plusieurs organes sont endommagés par les dynamiques physiologiques enclenchées par l'HTA associée à l'obésité. Les dommages encourus par les divers organes amplifient et favorisent le développement d'HTA. Les personnes affectées montrent, entre autres, des cardiopathies, une rigidité artérielle et des perturbations rénales chroniques.

### **2.3.2 Cardiopathies**

L'obésité est associée à des altérations hémodynamiques<sup>11, 144, 145</sup>. Le débit cardiaque (DC) et le flow sanguin aux organes sont augmentés<sup>11, 66, 146</sup>.

**2.3.1.1 Dysfonction diastolique :** La pression élevée de remplissage cardiaque ainsi que l'expansion du volume sanguin augmentent la rigidité ventriculaire; ils sont des stimuli importants de remodelage ventriculaire<sup>147</sup>. Tôt dans la progression de l'obésité, une dysfonction diastolique altère la dynamique de remplissage et de relaxation ventriculaire<sup>147</sup>.

**2.3.1.2 Dysfonction systolique :** La dimension et la fonction du ventricule gauche sont possiblement directement affectées par une obésité prolongée<sup>145, 148</sup>. Initialement la dilatation du ventricule crée un avantage mécanique (aidant à maintenir le volume de contraction et le DC)<sup>56</sup>. Par contre, éventuellement, le changement de volume de la cavité ventriculaire cause : 1- des stress mécaniques à la paroi musculaire du cœur, 2- une augmentation de la demande

d'oxygénation (risque d'ischémie cardiaque) et 3- une réduction de la performance ventriculaire<sup>56</sup>. La dysfonction systolique s'installe graduellement.

Mise ensemble, la dysfonction diastolique et systolique mènent à une hypertrophie excentrique et concentrique qui réduisent la taille de la cavité ventriculaire et la compliance du ventricule<sup>18</sup>. En fait, l'hypertrophie ventriculaire est augmentée de façon synergique par l'HTA et l'obésité ce qui mène à un risque élevé d'insuffisance cardiaque<sup>149</sup>. De plus, l'obésité augmente le dépôt intramyocellulaire de triglycérides<sup>150, 151</sup> provoquant un grand taux d'apoptose médié par les céramides et/ou les radicaux libres<sup>152</sup>. Les myocytes endommagés et apoptotiques du cœur sont graduellement remplacés par le dépôt de tissus fibreux moins élastiques et moins adaptés à la fonction cardiaque<sup>153</sup>.

Ainsi, par tous ces mécanismes, l'obésité est associée à une dysfonction cardiaque et une hypertrophie ventriculaire menant à de l'ischémie cardiaque et/ou une insuffisance cardiaque chronique.

### **2.3.2 Perturbations rénales**

L'obésité et l'HTA favorisent des altérations hémodynamiques dans le rein qui perturbent son fonctionnement. La hausse de réabsorption sodique associée à l'obésité mène à l'expansion du volume extracellulaire ce qui peut mener à l'hyper perfusion et/ou l'hyper filtration rénale<sup>154</sup>. En fait, des études de micro-punctures trouvent de l'hypertension glomérulaire et de l'hyper filtration dans des modèles animaux affectés d'endommagements rénaux associés à l'obésité<sup>154</sup>. Il est pensé que ce profil hémodynamique rénal (hyper filtration et hypertension glomérulaire) soit un facteur pathogénique qui rend le rein susceptible à la perte progressive de fonction<sup>154</sup>. L'endommagement des capillaires glomérulaires associé à l'albuminurie<sup>155</sup> mène à une détérioration de la structure rénale (développement de glomérulosclérose rénale<sup>154</sup>) et potentiellement à une insuffisance rénale chronique<sup>87</sup>.

## CHAPITRE 3

### 3. Rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$ dans l'hypertension associée à l'obésité induite par la diète

#### 3.1 Recherche des composantes génétiques déterminant l'hypertension associée à l'obésité: Études effectuées chez les humains et les animaux

##### 3.1.1 Étude de gène candidat, récepteur $\beta$ 3-adrénergique

##### 3.1.2 Étude de gène candidat, sous-unité $\beta$ 3 de la protéine G

##### 3.1.3 Étude de gène candidat, Tnf- $\alpha$

#### 3.2 Notre étude préalable effectuée chez l'humain : Rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$ dans l'hypertension associée à l'obésité

#### 3.3 Notre étude préalable effectuée chez les animaux : Rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$ du rat dans l'hypertension associée à l'obésité induite par la diète

##### 3.3.1 Souches

##### 3.3.2 Segment différentiel du chromosome 20

##### 3.3.3 Résultats de l'étude

#### 3.3.4 Gènes candidats : Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

##### 3.3.4.1 Tnf- $\alpha$ et son implication dans l'hypertension associée à l'obésité

##### 3.3.4.2 Ppar- $\delta$ et son implication possible dans l'hypertension associée à l'obésité

### **3.1 Recherche des composantes génétiques déterminant l'hypertension associée à l'obésité: Études effectuées chez les humains et les animaux**

L'obésité et l'HTA se co-transmettent dans certaines familles, signifiant que leur transmission est au moins en partie génétique. Le syndrome métabolique a une composante génique importante qui détermine le risque morbide de chacun<sup>3</sup>. Évidemment, des gènes pléiotropiques peuvent être la source des phénotypes conglomérés d'adiposité, de tolérance au glucose, de métabolisme lipidique et de PA. Par contre, les cascades géniques responsables de la collection de

dérégulations peuvent aussi être induites par plusieurs gènes physiquement rapprochés et donc transmis en bloc de génération en génération<sup>3</sup>.

Plusieurs études tentent d'identifier les gènes impliqués dans l'obésité associée à l'HTA. Les analyses génétiques suggèrent que des gènes déterminant l'obésité peuvent contribuer au développement de l'HTA associée à l'obésité<sup>156, 157</sup>. Plusieurs gènes candidats ont été étudiés à cette fin; par exemple, le récepteur  $\beta$ 3-adrénergique, la sous-unité  $\beta$ 3 de la protéine G (GNB3) et le *Tnf- $\alpha$* .

**3.1.1 Études de gène candidat, récepteur  $\beta$ 3-adrénergique:** Ce récepteur régule la lipolyse et la thermogénèse stimulées par les catécholamines<sup>158</sup>. Une activité réduite du récepteur induit le développement de l'obésité viscérale fortement associée aux désordres métaboliques et cardiovasculaires<sup>159</sup>. Une étude finlandaise montre qu'une mutation du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique (Trp64Arg) est reliée à l'obésité abdominale, à la résistance à l'insuline, au développement précoce du diabète de type II et à une pression diastolique élevée<sup>160</sup>.

**3.1.2 Études de gène candidat, sous-unité  $\beta$ 3 de la protéine G (GNB3):** Ce gène est aussi associé à l'obésité et l'HTA. Identifié dans des sujets hypertendus, le changement nucléotidique (C825T)<sup>161-164</sup> peut 1- accroître l'activité du canal échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> et 2- augmenter les cascades de signalisation de la protéine G<sup>161</sup>, soit deux phénomènes impliqués dans l'HTA et l'adipogénèse respectivement<sup>165</sup>. De plus, l'allèle 825T est associée à l'obésité chez les sujets hypertendus; cette association est plus forte que celle reliée à l'HTA seulement<sup>166</sup>. Ainsi, le gène GNB3 peut être impliqué dans la pathogénèse de l'HTA associée à l'obésité.

**3.1.3 Études de gène candidat, *Tnf- $\alpha$* :** En plus de son rôle dans la réponse immunitaire et la répression tumorale, le gène de *Tnf- $\alpha$* , une cytokine proinflammatoire, est impliqué dans le développement et l'expression phénotypique de l'obésité et de l'HTA.

Le Tnf- $\alpha$ , un facteur adipostatique, est induit par l'obésité croissante afin d'en limiter la progression<sup>167</sup>. Cette hypothèse découle des maintes études qui montrent que le Tnf- $\alpha$ : 1- augmente avec l'obésité<sup>168, 169</sup> et 2- exerce des effets anti-adipogéniques<sup>170-173</sup> potentiellement induits par l'induction de la résistance à l'insuline (chez les humains et les animaux)<sup>169, 174-176</sup>. En effet, des études de liaisons et d'associations dénotent que le locus génique du Tnf- $\alpha$  est impliqué dans la pathogenèse de l'obésité et/ou la résistance à l'insuline dans diverses populations ethniques<sup>177, 178</sup>. Le gène Tnf- $\alpha$  est aussi impliqué dans le développement de l'HTA<sup>125, 179-184</sup>. Par exemple, des études montrent que le Tnf- $\alpha$  stimule la production d'endothéline<sup>185, 186</sup> et d'angiotensinogène<sup>179, 187</sup>.

Ainsi, plusieurs études lient la région génique de Tnf- $\alpha$  avec : 1- l'obésité, 2- l'HTA associée à l'obésité et 3- la résistance à l'insuline associée à l'obésité<sup>177, 178, 188, 189</sup>. Une méta-analyse récente montre qu'une variation génique, G-308A, du Tnf- $\alpha$  est associée à une augmentation de l'adiposité, de la PA et de la résistance à l'insuline suggérant encore une fois que le Tnf- $\alpha$  est relié au syndrome métabolique<sup>190</sup>.

Par contre, ces associations semblent exister plutôt chez les individus obèses ou montrant un surplus de poids modéré<sup>177, 188, 189</sup>. Ainsi, nous lançons l'hypothèse que la région génique du Tnf- $\alpha$  détermine l'adiposité, la sensibilité à l'insuline et la PA particulièrement dans un environnement d'excès de graisse corporelle.

### **3.2 Notre étude préalable effectuée chez l'humain : Rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$ dans l'hypertension associée à l'obésité**

Par des études de liaisons et d'associations, nous montrons aussi que le locus génique du Tnf- $\alpha$ , situé sur le chromosome 6 humain, impacte significativement l'obésité et l'HTA associée à l'obésité<sup>189</sup>. En fait, l'étude de liaison (analyse de pairs) sur des familles canadiennes de descendance française montre un effet significatif du locus génique sur 3 mesures globales et 7 mesures régionales d'adiposité. De plus, les tests de risques relatifs des haplotypes

révèlent une association significative entre le locus génique du Tnf- $\alpha$  et l'obésité, puis l'HTA associée à l'obésité<sup>189</sup>.

### **3.3 Notre étude préalable effectuée chez les animaux : Rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$ du rat dans l'hypertension associée à l'obésité induite par la diète**

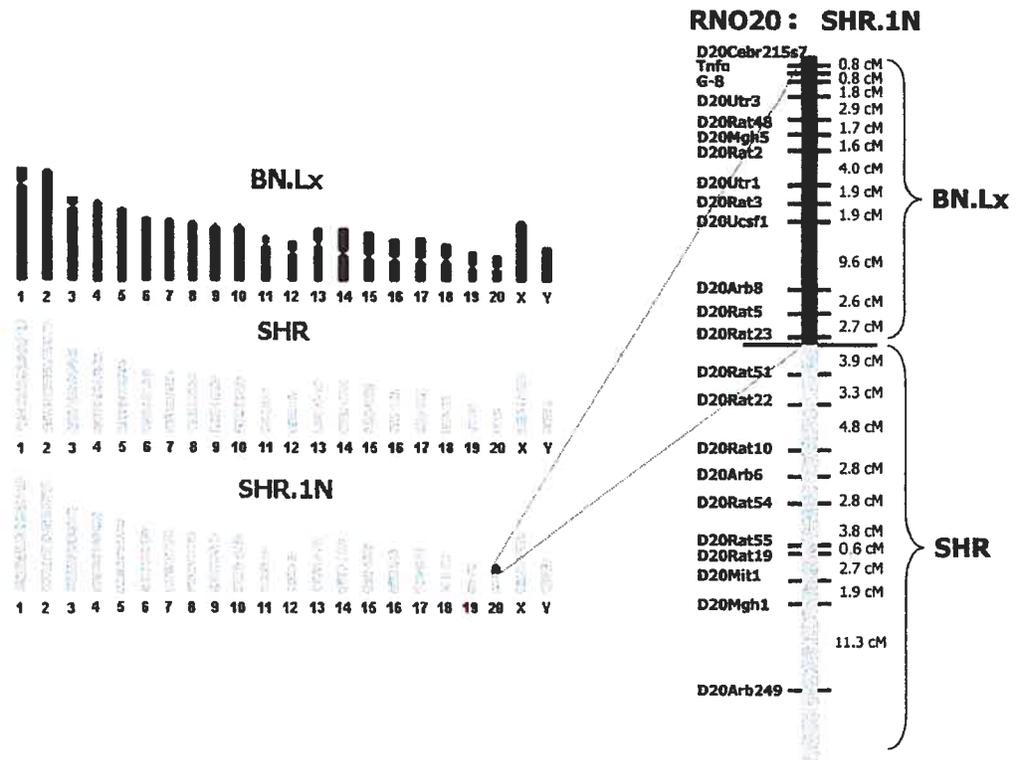
Afin de poursuivre l'enquête sur cette interaction « gène-environnement », nous nous sommes retournés vers un modèle animal pour étudier la région du chromosome 20 du rat (RNO20) contenant le locus génique du Tnf- $\alpha$ , homologue au locus humain de Tnf- $\alpha$ . Les résultats démontrent que ce segment génique détermine chez le rat l'augmentation de l'adiposité, de l'intolérance au glucose et la PA en réponse à 12 semaines de diète HFD<sup>3</sup>.

#### **3.3.1 Souches**

Un segment du chromosome 20 du rat (RNO20) provenant de la souche normotendue Brown Norway (BN.Lx<sup>191</sup>), a été transféré sur le fond génétique de la souche de rat spontanément hypertendu (SHR), créant alors la souche congénique SHR.1N<sup>3</sup>. Les SHR.1N diffèrent génétiquement des SHR que par le segment différentiel du chromosome 20 (RNO20) originaire des rats BN (Figure 1.2).

#### **3.3.2 Segment différentiel du chromosome 20**

Le chromosome 20 du rat (RNO20) est au total 55 Mb en longueur et contient en tout 827 gènes ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/ratsearch.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/ratsearch.html)). Le segment différentiel couvre approximativement 21 Mb télomérique du chromosome et contient un total de 536 gènes. Plusieurs de ces gènes sont localisés dans le complexe RT1 c.-à-d. le complexe majeur d'histocompatibilité du rat. Seulement 9 Mb du segment s'avèrent homologues à la région génique humaine du Tnf- $\alpha$  impliquée dans le développement des désordres associés à l'obésité. Cet intervalle plus restreint contient environ 430 gènes dont le complexe RT1 (Annexe: tableau supplémentaire 2).



**Figure 3.1 Segment chromosomique différentiel entre les souches congéniques SHR et SHR.1N** – Le transfert d'un segment du chromosome 20 (RNO20) de la souche de rats normotendus Brown Norway (BN.Lx<sup>191</sup>) sur le fond génétique des SHR crée les SHR.1N, une souche congénique. Le segment différentiel contenant la région génique du Tnf- $\alpha$  est la seule variante génique entre les souches. La longueur du RNO20 est de 55 Mb. Le segment différentiel fait 21 Mb et contient environ 536 gènes ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/ratsearch.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/ratsearch.html)).

### 3.3.3 Résultats de l'étude

Maintenues sur une diète normale, les deux souches montrent les mêmes profils phénotypiques soit : une prise de poids, une tolérance au glucose et une PA similaires<sup>3</sup>. Par contre, leurs profils phénotypiques divergent suite à l'exposition à la diète HFD. La souche SHR.1N montre une plus grande augmentation de poids corporel, d'intolérance au glucose et de PA que la souche SHR<sup>3</sup>. Ainsi, le segment transféré (contenant la région du gène Tnf- $\alpha$  du rat)

détermine aussi l'impact de la diète HFD sur le degré d'adiposité, la tolérance au glucose et la PA<sup>3</sup>.

Puisque les différences phénotypiques observées dans ce modèle sont induites seulement suite à la diète HFD et que l'excès de graisse corporelle a été maintes fois associé à la pathogenèse de l'HTA et du syndrome métabolique, nous posons l'hypothèse que les dérégulations causées par l'expansion de la masse adipeuse est la source des cascades pathophysiologiques.

De plus, puisque la seule différence entre les souches est le segment chromosomique différentiel, le segment devient l'origine génique des dérégulations. Ainsi, un ou des gènes contenu(s) dans le segment différentiel est (sont) responsable(s) de l'enclenchement des mécanismes pathologiques. Quelques gènes peuvent être considérés comme candidats mais deux d'entre eux semblent plus plausibles soit: le Tnf- $\alpha$  et le Ppar- $\delta$ . La localisation des 2 gènes candidats principaux est très rapprochée sur le chromosome; séparée par seulement 2,8 Mb.

### **3.3.4 Gène candidats : Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$**

**3.3.4.1 Tnf- $\alpha$  et son implication dans l'hypertension associée à l'obésité :** Le Tnf- $\alpha$  est une protéine transmembranaire qui s'active suite à sa relâche par clivage enzymatique. Une fois relâché, il agit sur les récepteurs Tnf de type-I ou -II exprimés par les adipocytes sous forme transmembranaire ou soluble<sup>114</sup>. Dans le tissu adipeux, le Tnf- $\alpha$  est exprimé par les cellules adipeuses et stromovasculaires<sup>116</sup>. Son expression est plus élevée dans le tissu adipeux sous-cutané que viscéral<sup>116</sup>.

Comme discuté dans la section 3.1.3, plusieurs études montrent que le Tnf- $\alpha$  est impliqué dans la pathogenèse de l'obésité et la résistance à l'insuline ainsi que dans celle de l'obésité et l'HTA associée à l'obésité<sup>114, 168, 177, 178, 189, 192, 193</sup>. L'expression tissulaire de Tnf- $\alpha$  augmente avec l'obésité; en fait, elle corrèle positivement avec l'adiposité et la résistance insulinaire<sup>40, 168, 192, 193</sup>. Malgré une concentration circulante basse (comparativement à la concentration locale tissulaire), les taux plasmatiques de Tnf- $\alpha$  semblent aussi corrélés positivement

avec l'obésité et la résistance insulinaire<sup>40</sup>. L'exposition chronique au Tnf- $\alpha$  induit une résistance à l'insuline *in vitro* et *in vivo*<sup>192</sup>.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les effets métaboliques du Tnf- $\alpha$ . Dans le tissu adipeux, il agit en : 1- inhibant les gènes impliqués dans la capture et l'emmagasinage des AG et du glucose, 2- réprimant les gènes de facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse et la lipogenèse et 3- changeant l'expression de plusieurs facteurs sécrétés par les adipocytes tels que la leptine, l'adiponectine et l'IL-6<sup>114, 168, 174, 175, 192-197</sup>. Dans le foie, le Tnf- $\alpha$  agit: 1- en réprimant l'expression de gènes impliqués dans la capture et le métabolisme du glucose, 2- en réprimant des gènes impliqués dans l'oxydation des AG, 3- en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse *de novo* du cholestérol et des AG<sup>114, 197</sup>. Aussi, le Tnf- $\alpha$  interfère directement et indirectement avec les cascades de signalisation de l'insuline<sup>192, 193</sup>.

Par contre, il reste à déterminer si les effets multiples du Tnf- $\alpha$  sur les divers processus métaboliques sont dus à une contribution endocrine directe ou bien à une contribution autocrine/paracrine indirecte telle que la régulation du métabolisme des AG et des autres hormones dérivées du tissu adipeux<sup>114</sup>.

**3.3.4.2 Ppar- $\delta$  et son implication possible dans l'hypertension associée à l'obésité :** Le facteur de transcription nucléaire Ppar- $\delta$  est exprimé de façon ubiquitaire<sup>198, 199</sup>, mais son expression est plus élevée dans les tissus qui métabolisent activement les lipides (tissu adipeux, petit intestin, cœur, muscle)<sup>200</sup>. Le Ppar- $\delta$  est un de 3 isoformes ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) de récepteurs Ppar<sup>199, 201</sup>; il est activé par les AG libres de longue chaîne et les prostacyclines<sup>201</sup>. Il doit s'hétérodimériser avec le récepteur 9-cis rétinolique (RXR)- $\beta$  pour lier les éléments de réponses spécifiques au Ppar (PPRE) trouvés dans les promoteurs de gènes impliqués dans la capture, le métabolisme et la dépense des lipides<sup>199, 201</sup>. Le Ppar- $\delta$  joue un rôle central dans le catabolisme des AG dans plusieurs tissus (cœur, muscle, tissu adipeux)<sup>201</sup> par la régulation d'un large spectre de gènes impliqués dans le transport des AG, la  $\beta$ -oxydation et la respiration

mitochondriale<sup>202</sup>. Il contrôle la prolifération des pré adipocytes et les étapes précoces de l'adipogenèse par l'induction du Ppar- $\gamma$ <sup>201</sup>.

Récemment, des chercheurs ont complété une analyse génomique identifiant les gènes qui possèdent des PPREs. Les PPREs sont présents dans plusieurs systèmes géniques, soit dans les gènes contrôlant le métabolisme des AG, la  $\beta$ -oxydation, le développement musculaire, la différenciation cellulaire, les protéines signaux du système WNT ainsi que ceux du système Frizzled et dans d'autres<sup>203</sup>.

Les Wnts sont des protéines sécrétées (paracrine et autocrine) qui régulent entre autres le déclenchement de l'adipogenèse<sup>204</sup>. L'activation de Wnt maintient les préadipocytes dans un état indifférencié par l'inhibition des facteurs de transcription C/ebp- $\alpha$  et Ppar- $\gamma$ <sup>204</sup>. *In vitro*, l'interruption du système Wnt cause la transdifférenciation des myoblastes en adipocytes<sup>204</sup>. Le système signal Wnt agit à travers d'autres systèmes signaux tels que Frizzled et/ou Rho qui ont aussi été impliqués dans le remodelage cytosquelettique et, comme mentionné ci-haut, dans la régulation du point tournant entre l'adipogenèse et la myogenèse<sup>136</sup>.

Le groupe de Wang et al. a décrit un modèle de souris transgénique qui surexprime une protéine de fusion VP16-Ppar- $\delta$  (forme de Ppar- $\delta$  activé constitutionnellement; activation indépendante au ligand) spécifiquement dans le tissu adipeux<sup>142</sup>. L'expression de cette protéine induit les gènes impliqués dans le catabolisme des AG et du découplage énergétique dans les adipocytes, ce qui baisse le niveau d'adiposité de ces animaux et leur confère une résistance à l'obésité induite par la diète<sup>142</sup>.

## CHAPITRE 4

### 4. But de l'étude

La littérature suggère 1- que le tissu adipeux fonctionne plutôt comme un organe endocrinien, 2- que l'expansion de la masse adipeuse et l'augmentation de la taille cellulaire changent le taux d'expression et/ou de sécrétion de plusieurs molécules bioactives, et 3- que ces changements créent des perturbations endocriniennes qui peuvent potentiellement déclencher des cascades pathophysiologiques menant au développement de l'HTA associée à l'obésité<sup>5</sup>. De plus, plusieurs études, effectuées chez les animaux et les humains, impliquent la région chromosomale contenant le gène  $Tnf-\alpha$  dans le développement de l'HTA associée à l'obésité<sup>3, 6</sup>.

De cette collection d'informations, nous pensons que les souches congéniques à l'étude développent une réponse différentielle à la diète HFD à travers l'enclenchement de cascades géniques différentes originant de leurs tissus adipeux. Cette étude vise donc à identifier les mécanismes géniques mis en branle à la phase tardive du développement de l'obésité. Nous cherchons aussi à identifier la/ou les variante(s) génique(s) contenue(s) dans le segment différentiel qui vient (nent) à déclencher les cascades pathophysiologiques. Pour ce faire, nous analysons, avec la technologie de biopuces, les profils d'expression génique du tissu adipeux rétro péritonéal des deux souches de rats après 12 semaines de traitement diététique.

# ARTICLE

## CHAPITRE 5

5.1 Sommaire [*Abstract*]

5.2 Introduction [*Introduction*]

5.3 Matériel et Méthodes [*Materials and Methods*]

5.3.1 Animaux [*Animals*]

5.3.2 Protocole expérimental [*Experimental protocol*]

5.3.3 Analyse de la morphologie du tissu adipeux [*Adipose-tissue morphology analyses*]

5.3.4 Analyse de l'expression génique dans le tissu adipeux [*Gene-expression analyses in adipose tissue*]

5.3.5 Analyse de l'expression protéique [*Protein-expression analyses*]

5.3.6 Analyse statistique [*Statistical analyses*]

5.4 Résultats [*Results*]

5.4.1 Adiposité, taille adipocytaire, leptine circulant et PA [*Adiposity, adipocyte size, circulating leptin and blood pressure*]

5.4.2 Profil d'expression génique du tissu adipeux [*Adipose tissue gene-expression profiling*]

5.4.2.1 Gènes régulés à la baisse par la diète HFD dans les deux souches [*The group of genes downregulated by HFD in both strains*]

5.4.2.2 Gènes régulés à la hausse par la diète HFD dans les deux souches [*The genes significantly upregulated by HFD in both SHR and SHR.1N*]

5.4.2.3 Gènes montrant une régulation induite par la diète HFD opposée entre les souches [*The genes with strain-opposite HFD-induced changes*]

5.3 Discussion [*Discussion*]

5.4 Remerciements [*Acknowledgments*]

**Genetic locus on rat chromosome 20  
and molecular pathways mediating diet-induced increases  
in adipocyte size and blood pressure**

Céline Bourdon<sup>1,2</sup>, Julie Bérubé<sup>2</sup>, Vladimír Křen<sup>3</sup>, Michal Pravenec<sup>4</sup>, Peter Liu<sup>5</sup>,  
Sara Arab<sup>5</sup>, Zdenka Pausová<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Brain & Body Centre, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom

<sup>2</sup>Centre de recherche de l'Université de Montréal, Montréal, Canada;

<sup>3</sup>Charles University, Prague, Czech Republic,

<sup>4</sup>Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic;

<sup>5</sup>Toronto General Hospital, Toronto, Canada

**\* To whom correspondence should be addressed at:**

Brain & Body Centre  
University of Nottingham  
University Park  
Nottingham  
NG7 2RD  
United Kingdom  
Tel.: (0)115 846-8070  
Fax: (0)115 846-8074  
E-mail: [REDACTED]

## 5.1 ABSTRACT

Obesity is a leading cause of hypertension. Molecular signals released by adipose tissue, such as leptin, have been implicated in this relationship. Our previous studies suggest that a gene(s) within the homologous region of human chromosome 6 and rat chromosome 20 (RNO20) play(s) a role in the pathogenesis of obesity and obesity-related hypertension. Here, we continued searching for the gene in the rat model.

Adult spontaneously hypertensive rats (SHR) and its congenic strain (SHR.1N), with a segment of RNO20 transferred from the Brown Norway rat and containing the homologous region, were subjected to a 12-week high-fat (HFD) or normal diet. During that period, blood pressure was measured with telemetry. At the end, selected tissues and sera were collected for further analyses.

In response to HFD, body weight, fat-pad weight, serum leptin, and blood pressure increased more in SHR.1N than in SHR. This was also the case for adipocyte size. Close correlation between adipocyte size and serum leptin was observed. Micro array profiling carried out in adipose tissue (Affymetrix, 15,923 genes and ESTs) revealed a highly co-ordinated pattern of gene expression, involving molecular pathways of lipogenesis, actin-cytoskeleton remodelling and fat burning and favouring greater accumulation of intracellular fat in SHR.1N than in SHR.

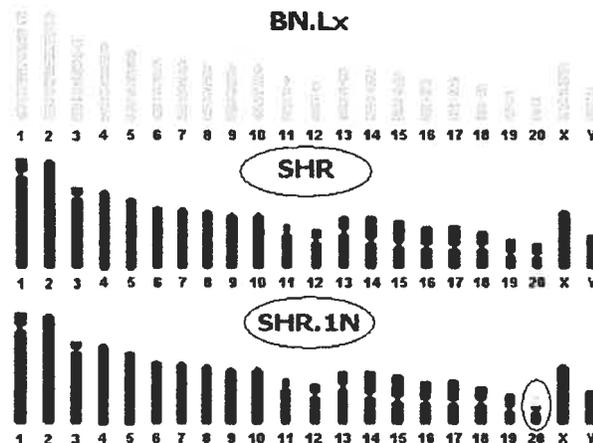
Our results suggest that a gene(s) within the RNO20 segment regulates diet-induced increases in adiposity and blood pressure and that this effect may be mediated by its impact on molecular processes leading to increases in intracellular lipid accumulation and adipocyte size.

## 5.2 INTRODUCTION

The environment created by modern industrialised societies, characterised by increased energy intake and decreased physical activity, has caused an unprecedented rise in the prevalence of obesity and obesity-related disorders, including hypertension<sup>49</sup>. The specific pathogenetic mechanisms linking obesity to hypertension are not very well understood; recent research suggests that most of these mechanisms are related to the accumulation of “dysfunctional” fat characterised by the presence of “large” lipid-laden adipocytes. This is because “large” rather than “small” adipocytes produce endocrine, paracrine, and autocrine signals that can induce augmented activity of the sympathetic nervous and renin-angiotensin-aldosterone systems, insulin resistance, and oxidative stress<sup>5</sup>. These changes, in turn, are thought to play a role in blood pressure augmentation in individuals with obesity.

In response to energy surplus, adipose tissue accumulates fat by increasing both the number and size of adipocytes; these processes involve complex cascades of transcriptional and non-transcriptional events that begin in the prenatal period and continue throughout life. Adipocytes originate from mesenchymal stem cells, which proliferate and differentiate into preadipocytes (cells macroscopically indistinguishable from fibroblasts) that, in turn, proliferate and differentiate into mature adipocytes. During the latter step, the cells become larger and rounder as their actin-cytoskeleton network diminishes (up to 90% decrease upon differentiation in 3T3-L1 adipocytes<sup>205</sup>), and their cytoplasm fills with multiple lipid droplets that, ultimately, fuse into a single large one. Alongside this morphological change, the cells alter the production of various molecular signals that, as described above, may increase blood pressure in susceptible individuals<sup>5</sup>. For example, adipocytes produce leptin in proportion to their size<sup>120, 121</sup> that, when released into the circulation, acts in the central nervous system where it stimulates sympathetic outflow to the kidneys and peripheral vasculature<sup>206, 207</sup>. These effects, in turn, are thought to contribute to blood pressure elevation in overweight and obese individuals.

Family-based studies have demonstrated that obesity co-segregates with hypertension in families, supporting the view that the link between obesity and hypertension is, at least in part, genetically determined<sup>3, 6, 189</sup>. We have shown previously with both linkage and association analyses that the human tumor necrosis factor- $\alpha$  (Tnf- $\alpha$ ) gene (or a gene in its close proximity) on chromosome 6 is an important determinant of obesity and obesity-associated hypertension<sup>189</sup>. The Tnf- $\alpha$  gene was chosen as a candidate gene of obesity-associated hypertension, as this cytokine is involved in the regulation of adipocyte differentiation, lipogenesis and insulin resistance<sup>168, 174, 176, 195, 196, 208</sup>. Subsequently to the human study, we have demonstrated that a homologous region in the rat, a region of chromosome 20 (RNO20) containing the Tnf- $\alpha$  gene (Figure 5.1), determines increases in adiposity, circulating leptin levels and blood pressure in response to a chronic high-fat diet (HFD) (Figure 5.2)<sup>3</sup>. In the present study, we explored this gene-environment interaction further. Specifically, we examined the molecular mechanisms of the interaction by investigating cellular morphology and genome-wide gene-expression profiles of adipose tissue.



**Figure 5.1** Congenic strain (SHR.1N, also named 1N) and its parental strains, spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Brown Norway (BN.Lx) rats. The studied strains, SHR and SHR.1N, differ only by a segment of chromosome 20 that was transferred from the BN rat (in grey) onto the SHR background (in black) and that contains the Tnf- $\alpha$  gene.

## **5.3 MATÉRIEL AND METHODS**

### **5.3.1 Animals**

Spontaneously hypertensive rats (SHR/Ola) and a congenic strain, SHR.1N, were studied. SHR.1N is derived from SHR and normotensive Brown Norway (BN) rats; it differs from SHR by a segment RNO20 that is of the BN origin and includes the Tnf- $\alpha$  gene<sup>191</sup>.

### **5.3.2 Experimental protocol**

Sixteen-week-old male SHR and SHR.1N rats were placed on a normal diet (ND, 5P14, Prolab 2500; 3.4 Kcal/g; 20% protein, 15% fat and 65% carbohydrates) or HFD (F3282, Bio-Serv; 5.3 Kcal/g; 15% protein, 60% fat and 25% carbohydrates) for 12 weeks (SHR/ND: n=11, SHR/HFD: n=15, SHR.1N/ND: n=9, and SHR.1N/HFD: n=15). The increase in fat content of HFD was mainly due to an addition of saturated and mono-unsaturated FAs; the amount of essential FAs was similar. During the 12-week period, body weight and food consumption was monitored weekly. Blood pressure was measured as described previously<sup>3</sup>. At the end of the intervention, the animals were humanely killed after overnight feeding between 8:00 and 12:00 a.m., and sera and selected tissues were collected and frozen in liquid nitrogen. Sera were used to measure circulating levels of leptin and Tnf- $\alpha$ . Sections of retroperitoneal fat were used for histology and gene/protein-expression analyses.

### **5.3.3 Adipose-tissue morphology analyses**

Number of cells in adipose tissue was assessed with a DNA-based method assuming that each cell has an identical amount of DNA. The cell number in a fat pad was determined as  $\mu\text{g}$  of DNA per 100 mg of adipose tissue multiplied by the weight of the fat pad. To assess the size of adipocytes, adipose tissue was fixed in 3.7% formaldehyde, embedded in paraffin, sliced at 5  $\mu\text{m}$ , and stained with hematoxylin-phloxin-safran. For each animal, a cross-sectional cell area of approximately 80 cells from 4 randomly selected tissue slices was measured

using the Scion Image software (Beta 4.0.2 version, 10x magnification, Olympus IX71 microscope).

#### **5.3.4 Gene-expression analyses in adipose tissue**

**Gene-expression micro array profiling:** Experimental design, sampling, hybridisation, and data analysis and presentation were performed in compliance with "Minimum Information About a Micro array Experiment" (MIAME) guidelines. Total RNA was isolated with Trizol Reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON). The quality of total RNA was evaluated by the Agilent 2100 BioAnalyzer system (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). RNA samples from individual animals were pooled within four experimental groups (1N/ND, 1N/HFD, SHR/ND, and SHR/HFD). These pooled samples were subjected to gene-expression profiling with the Rat RAE-230a GeneChip Set containing 15,923 genes and expressed sequence tags (ESTs, Affymetrix, Santa Clara, CA). The four samples were prepared for hybridisation according to the manufacture's instructions. The MicroArray Suite (Version 5, Affymetrix, Santa Clara, CA) software was used to scale signal intensities across the gene chips to 150 fluorescence units and to determine expression levels for each gene on the chip. GeneSpring 6.0 was used to normalise data per both "chip" (to the median of all elements on each chip) and "gene" (to the median of that gene on all four chips). Only genes that were "present" ( $p < 0.05$ ) were included in further analyses. These genes were searched for those demonstrating both a significant ( $\geq 1.8x$ ) HFD-induced change within each strain and an expression level  $\geq 2.0$  in at least one of the four experimental conditions.

#### **5.3.5 Protein-expression analyses**

**Immunoblotting:** Total protein (100 $\mu$ g) extracted from the retroperitoneal fat pads was subjected to electrophoresis (10%-acrylamide gel, 50V, 2h). The primary antibody used was the mouse anti- $\alpha$ -sarcomeric actin (1:750; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO).

**Immunohistochemistry:** Five-micrometer slices of deep-frozen retroperitoneal fat (3 animals per experimental group) were immunostained with mouse anti- $\alpha$ -sarcomeric-actin). Pictures were taken at 10x magnification with the Olympus IX71 microscope.

**Leptin:** Leptin serum concentrations were measured by radioimmunoassay (Linco Research, Inc., St. Charles, MO).

### 5.3.6 Statistical analyses

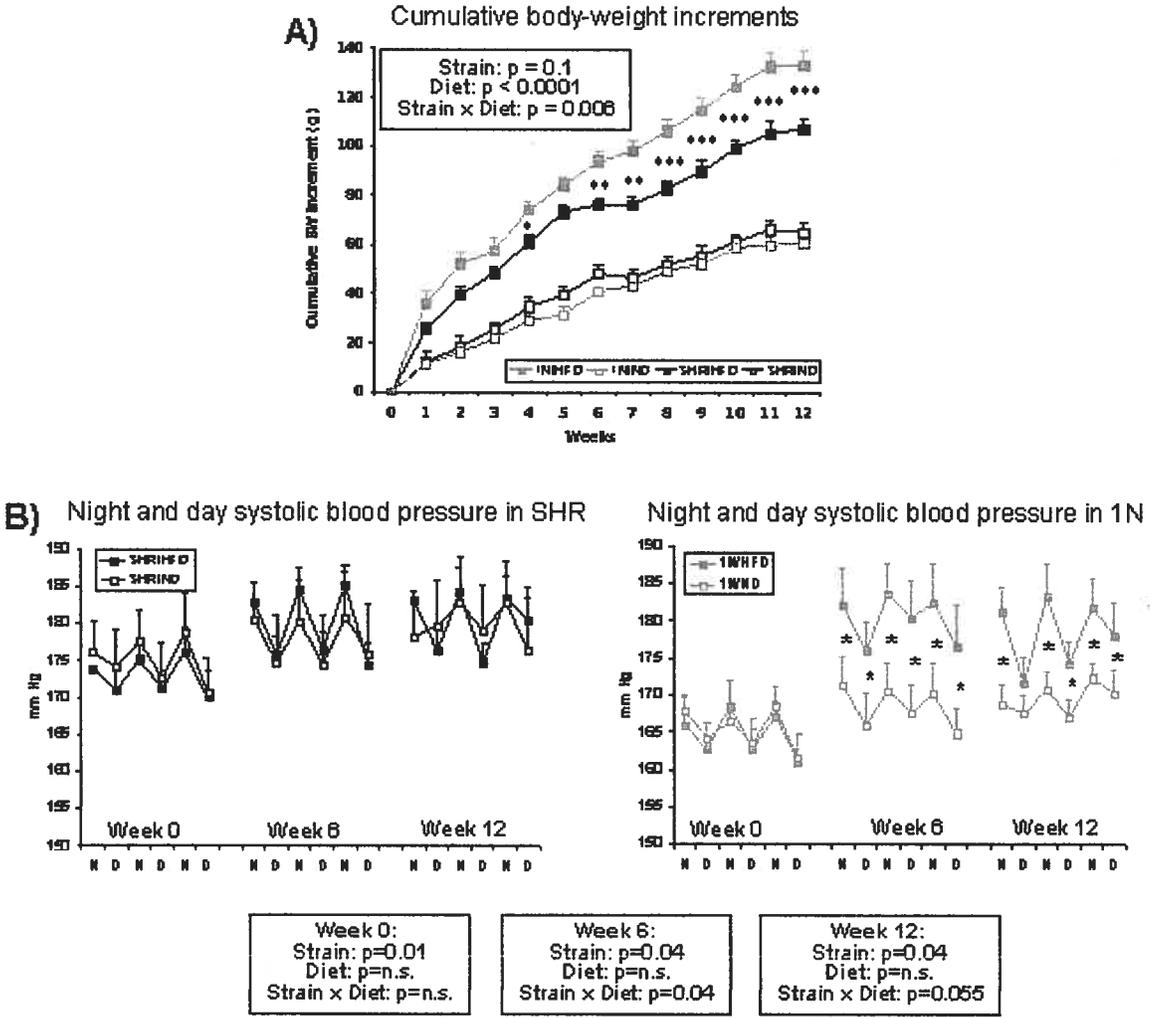
The data were analysed by two-way ANOVA with Strain (SHR vs. SHR.1N) and Diet (ND vs. HFD) as the main factors (SPSS for Windows, v 11.5); simple main effects of Strain within each Diet group were assessed.

## 5.4 RESULTS

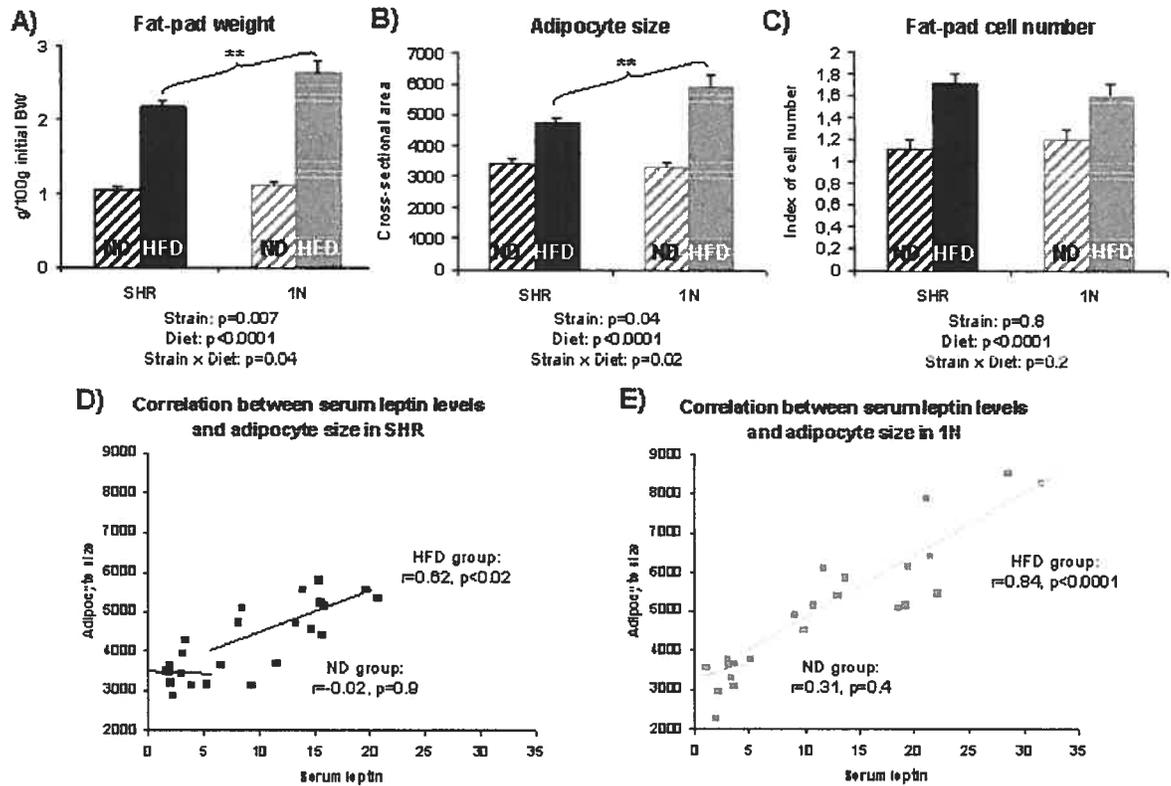
### 5.4.1 Adiposity, adipocyte size, circulating leptin and blood pressure

We have demonstrated previously that, in response to chronic HFD, SHR.1N rats compared with SHR rats gained more body weight, their epididymal fat pads became larger and circulating levels of leptin and blood pressure increased more (Figure 5.2)<sup>3</sup>. In the same set of animals, we show here that adipocyte size and adipose-tissue cell number increased in both strains, but the increase in adipocyte size was greater in SHR.1N than in SHR, whereas the increase in cell number was similar between the two strains (Figure 5.3). Augmented production of leptin coupled with “selective leptin resistance” may represent a pathogenetic link between obesity and hypertension<sup>207</sup>. It has been suggested that the adipocyte production of leptin is an intrinsic property of adipocyte size<sup>120</sup>. Consistent with this proposal, adipocyte size correlated closely with serum leptin levels in the current study (Figure 5.3), with the correlation being highly significant in SHR.1N fed HFD (explaining 71% of variance) and less significant in SHR rats fed HFD (explaining 38% of variance). Taken together, these results suggest that the differential chromosomal segment of SHR.1N contains a gene(s) that regulates adiposity in response to chronic HFD feeding (as we reported previously)<sup>3</sup>, and that this effect is mediated mainly by the

gene(s) impact on adipocyte size. The later, in turn, may be an important determinant of leptin production and the regulation of blood pressure in diet-induced obesity.



**Figure 5.2** (A) Cumulative body-weight increments during a 12-week dietary intervention and (B) 12-hour averages of day [D] and night [N] systolic blood pressure measured by radio-telemetry for at least three consecutive days prior to, in middle and at the end of the intervention. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. This figure is modified from *Hypertension* 41: 1047-1055, 2003.



**Figure 5.3** (A) Weight of epididymal fat pads, (B) adipocyte size, (C) adipose-tissue cell number, and (D and E) correlation between circulating leptin and adipocyte size in SHR and SHR.1N [1N] fed either a high-fat diet (HFD) or normal diet (ND). Figure A is modified from *Hypertension* 41: 1047-1055, 2003.

#### 5.4.2 Adipose tissue gene-expression profiling

To identify genes and molecular pathways regulating adipocyte size (intracellular fat accumulation) in response to chronic HFD, we carried out a genome-wide gene-expression profiling (15,923 genes and ESTs) in adipose tissue (retroperitoneal fat). The results showed that HFD significantly ( $\geq 1.8x$ ) downregulated 150 and 164 genes/ESTs and upregulated 39 and 53 genes/ESTs in SHR and SHR.1N, respectively. Most, but not all, these changes were similar between the two strains and demonstrated a highly co-ordinated pattern, i.e. multiple genes from the same molecular pathways and systems exhibited very similar expression in the four strain and diet groups (Figure 5.4 and Supplemental Table 1 in Annexe section). The pathways influenced by HFD included those

regulating lipogenesis, actin-cytoskeleton, FA catabolism, energy dissipation, and glycerol release. Three main types of gene-expression response to HFD were observed: A) downregulation in both strains, B) upregulation in both strains, and C) strain-opposite response. The first two subsets were further divided into three categories: (a) genes up- or downregulated similarly in SHR and SHR.1N, (b) genes up- or downregulated less ( $\leq 1.8x$ ) in SHR than in SHR.1N, and (c) genes up- or downregulated more ( $\geq 1.8x$ ) in SHR than in SHR.1N (Figure 5.4).

**5.4.2.1 The group of genes downregulated by HFD in both strains** included those controlling lipogenesis and actin-cytoskeleton structure and function. The lipogenic genes were downregulated either similarly in the two strains or significantly more ( $\geq 1.8x$ ) in SHR.1N than in SHR. The cytoskeleton genes, in contrast, were all downregulated significantly more in SHR than in SHR.1N (Figure 5.4A). For lipogenic and actin-cytoskeleton genes, the strain differences at the end of the 12-week dietary intervention were not observed in HFD-fed but in ND-fed animals. In the latter group, the expression of lipogenic genes was higher and the expression of actin-cytoskeleton genes was lower in SHR.1N than in SHR (Figure 5.4A). These results suggest that chronic HFD downregulates lipogenesis and actin-cytoskeleton. They also suggest that, prior to these downregulations, adipocytes of SHR.1N compared to those of SHR could exhibit a greater lipogenic capacity and smaller amount of actin-cytoskeleton, and that these features could contribute to a greater adipocyte size in SHR.1N than in SHR observed in HFD-fed animals at the end of the 12-week dietary intervention (Figure 5.3B). We hypothesise that reduced actin-cytoskeleton mass may represent diminished “mechanical” resistance to intracellular accumulation of fat in adipocytes; it may also lead to an increased glycerol supply for triglyceride synthesis via its effects on glycolysis<sup>209</sup>. The lack of a strain difference in adipocyte size in ND-fed animals may reflect the fact that both lipogenesis and actin-cytoskeleton can only play a role in the regulation of intracellular fat accumulation and adipocyte size in the presence of energy surplus, i.e. in HFD-fed animals.

In more detail, the group of *lipogenic* genes included those of enzymes and transport proteins involved in the regulation of glycerol and FAs supply for triglyceride synthesis. These were proteins of glucose uptake, glycolysis, intermediary metabolism, FA uptake and transport, FA synthesis, elongation and desaturation and triglyceride synthesis (Figure 5.4A). The genes encoding *actin-cytoskeleton* proteins were those typically expressed in striated muscle; these included cytoskeleton-structure proteins forming thin and thick filaments and cytoskeleton-function proteins involved in contraction, relaxation, and energy-supply. The expression of these genes may reflect the presence of adipocytes with “myoid” features. Both adipocytes and myocytes differentiate from a common mesenchymal stem cell, and such, their transcriptomes may overlap. Interestingly, results similar to ours have been reported recently in a micro array study of adipose tissue from mice with diet-induced obesity<sup>210</sup>; a 12-week HFD resulted in a profound downregulation of  $\alpha$ -actin, myosin, troponin and other “myoid” genes in white adipose tissue<sup>210</sup>. To confirm our findings, we detected  $\alpha$ -sarcomeric actin by immunohistochemistry in adipocytes, with its protein expression being similar to that of its mRNA, i.e. adipocytes of SHR rats fed ND showed higher expression than the other three experimental groups (Figure 5.5A). This was further confirmed by quantitative immunoblotting (Figure 5.5B).

**5.4.2.2 The genes significantly upregulated by HFD in both SHR and SHR.1N** included those encoding proteins of fat catabolism (Figure 5.4B). The strain differences were observed mainly in HFD-fed animals (in contrast to genes downregulated by HFD in both strains). Some of the fat-catabolic genes were upregulated similarly between SHR and SHR.1N, whereas others were upregulated more in SHR than in SHR.1N. The former group of genes included the adipose differentiation-related protein (*Adrp*) and FA-binding protein 3 (*Fabp3*) genes. *Adrp* is a lipid droplet-associated protein that plays a role in the formation of the droplets and lipolysis<sup>142</sup>. *Fabp3* is a FA-binding protein that solubilises and protects FAs in aqueous spaces and facilitates their transport across the cytosol

to mitochondria and transcription factors <sup>211, 212</sup>. Both *Adrp* and *Fabp3* genes showed HFD upregulation that was similar in SHR and SHR.1N (Figure 5.4B).

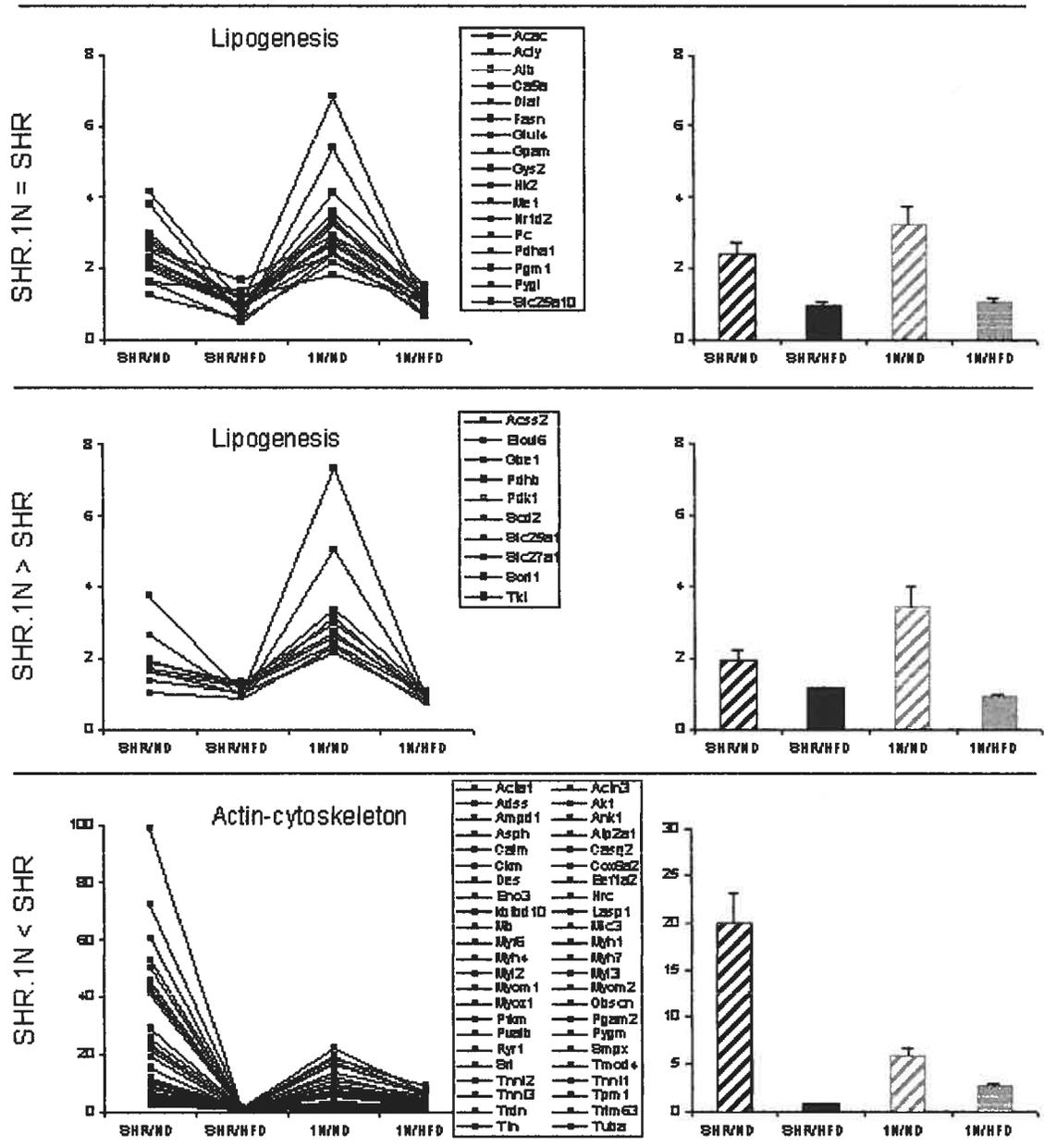
The genes of **lipid catabolism** that were upregulated more in SHR than in SHR.1N were those encoding enzymes of FA oxidation, energy dissipation and mitochondrial biogenesis (Figure 5.4B). These results are in agreement with previous studies demonstrating that chronic HFD feeding in rodents promotes mitochondrial biogenesis in white adipose tissue, along with the capacity to oxidise FAs and dissipate energy as heat <sup>141</sup>. The present study shows a greater upregulation of these FA-oxidising pathways in SHR than in SHR.1N suggesting that these pathways may be involved in the development of smaller adipocytes in this strain in response to chronic HFD (Figure 5.3B).

**5.4.2.3 The genes with strain-opposite HFD-induced changes** included those encoding extracellular matrix, cell membrane, cytoskeleton, and intracellular signalling proteins (Figure 5.4C). Among them, the most pronounced change was observed in expression of the aquaporin 3 (*Aqp3*) gene (significantly upregulated in SHR and downregulated in SHR.1N) (Figure 5.4C). *Aqp3* functions as a plasma-membrane protein that transports glycerol and water <sup>213</sup>. Its adipocyte form (*Aqp7*) has been shown recently to play a role in **cellular glycerol release** <sup>214</sup>. Its upregulation resulted in an augmented glycerol exit from adipocytes, decreased glycerol supply for triglyceride synthesis and smaller adipocyte size <sup>214</sup>. Thus, if *Aqp3* functions in a similar fashion, the upregulation of *Aqp3* observed here would be consistent with its role in decreasing glycerol supply for triglyceride synthesis and, hence, the development of smaller adipocytes in SHR than in SHR.1N in response to chronic HFD.

In summary, the micro array gene-expression analysis of adipose tissue demonstrated a highly co-ordinated response of several molecular pathways to chronic HFD. The downregulated pathways showed strain-differences in ND-fed animals (lipogenesis and cytoskeleton remodelling), whereas the upregulated ones demonstrated strain differences in HFD-fed animals (FA oxidation, energy dissipation and glycerol release). Collectively, the observed strain differences in

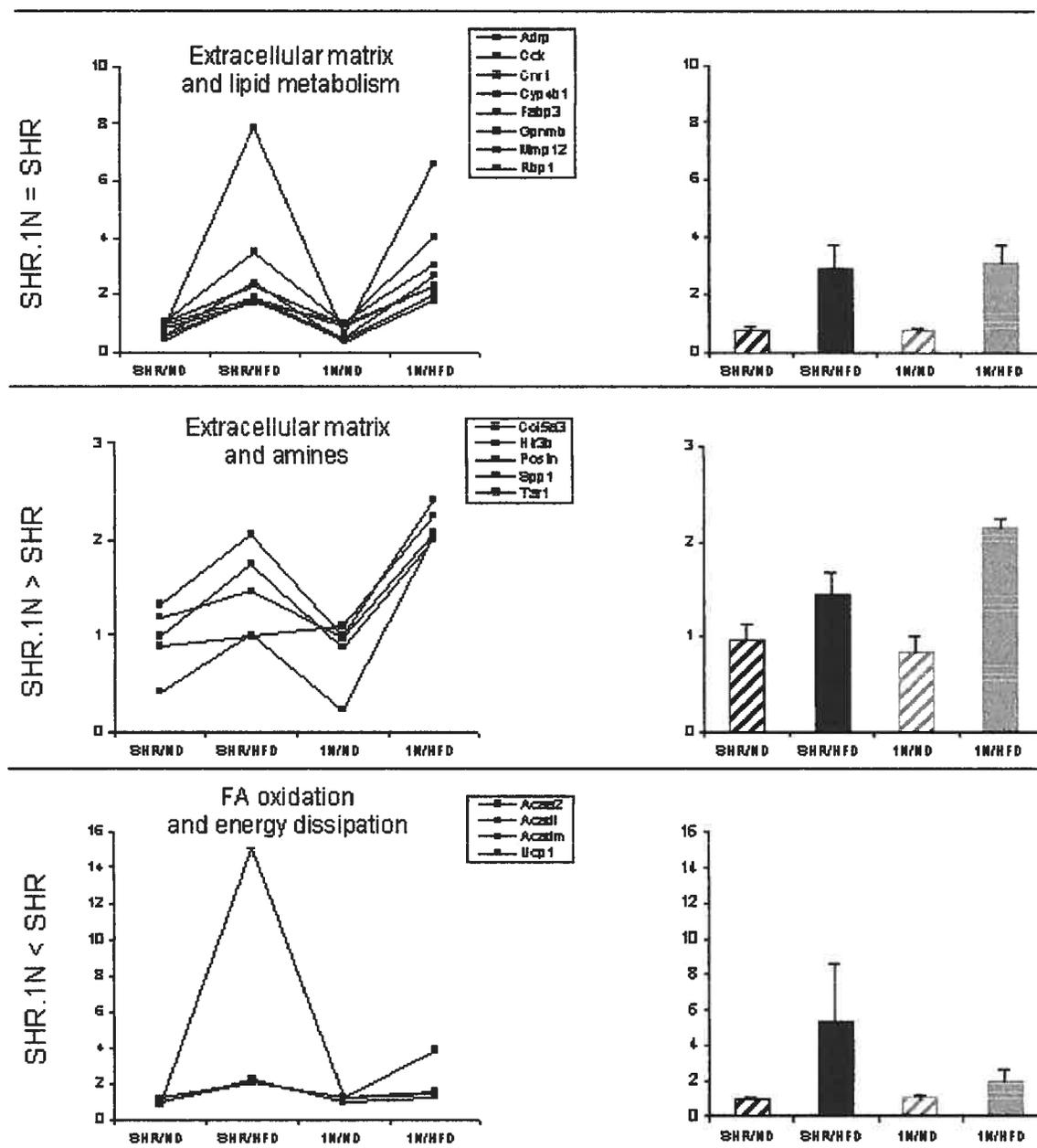
gene expression favoured augmented intracellular fat accumulation in SHR.1N than in SHR, with the former ones being most likely involved at early stages (before their HFD-induced downregulation) and the latter ones at later stages of the 12-week intervention (after their HFD-induced upregulation). Importantly, all these strain differences in gene expression impact on intracellular fat accumulation (and adipocyte size) only in positive energy balance and excess FA intake. This is in agreement with the finding that adipocyte size did not differ between SHR.1N and SHR in ND-fed animals but only in HFD-fed animals.

### A. Genes downregulated by HFD in both strains



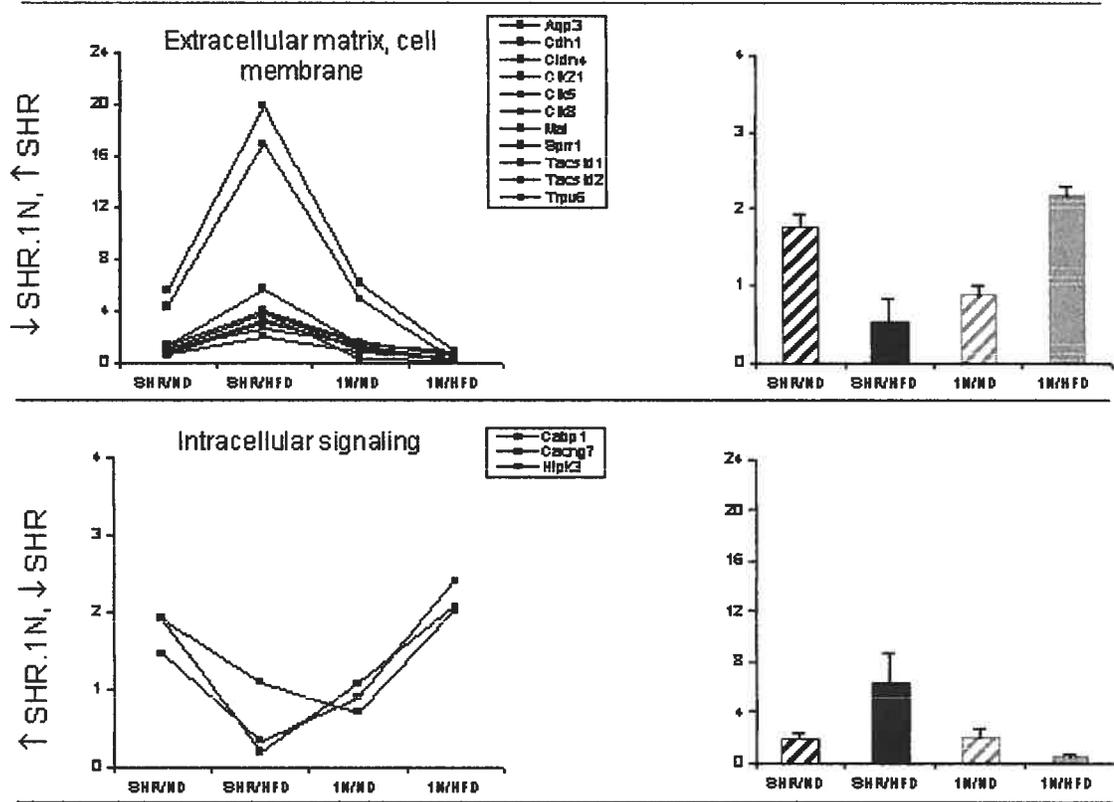
**Figure 5.4 (A)** Microarray gene-expression analysis: (A) genes downregulated by a high-fat diet (HFD) in both strains, (B) genes upregulated by HFD in both strains, (C) genes strain-differential HFD-regulation. For each functional cluster of genes, normalised expression levels of individual genes (left) and their means  $\pm$  SEM (right) for each strain and diet group are shown. Please note that genes demonstrating significant HFD regulation and not shown in this figure are listed in Supplemental Table 1.

## B. Genes upregulated by HFD in both strains

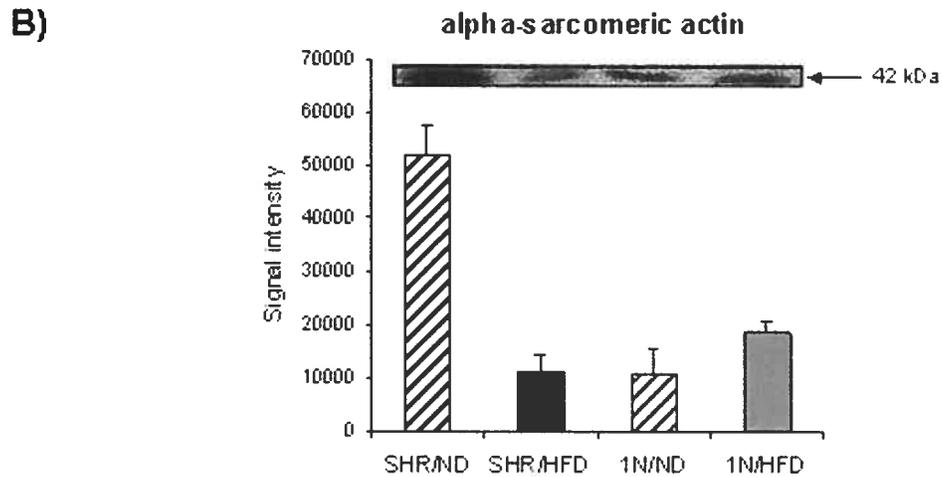
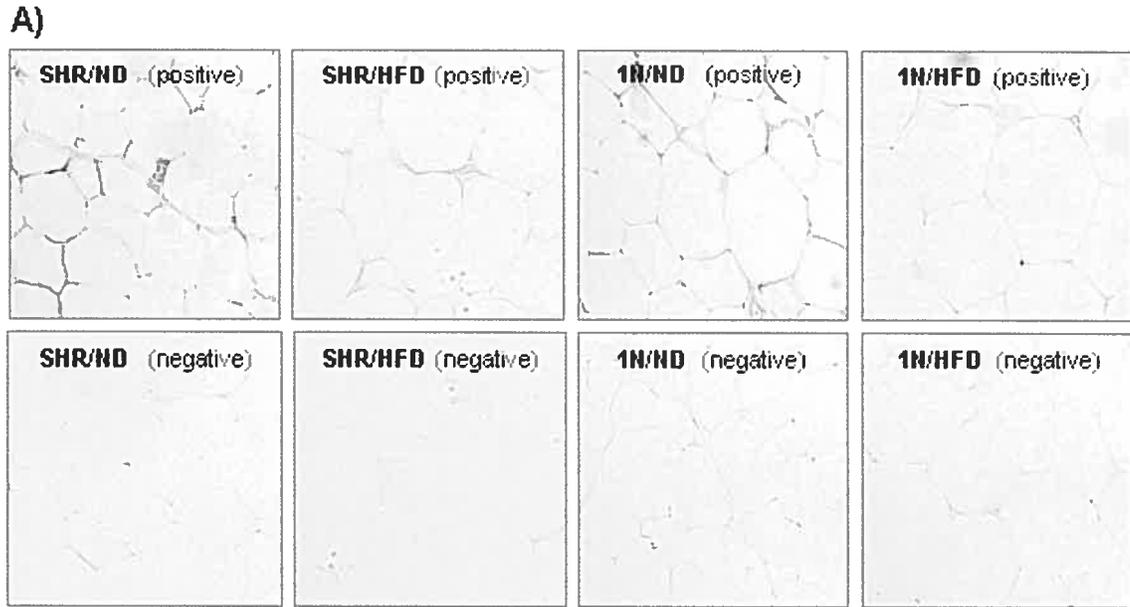


**Figure 5.4 (B)** Microarray gene-expression analysis: (A) genes downregulated by a high-fat diet (HFD) in both strains, (B) genes upregulated by HFD in both strains, (C) genes strain-differential HFD-regulation. For each functional cluster of genes, normalised expression levels of individual genes (left) and their means  $\pm$  SEM (right) for each strain and diet group are shown. Please note that genes demonstrating significant HFD regulation and not shown in this figure are listed in Supplemental Table 1.

### C. Genes with strain-differential HFD-induced regulation



**Figure 5.4 (C)** Microarray gene-expression analysis: (A) genes downregulated by a high-fat diet (HFD) in both strains, (B) genes upregulated by HFD in both strains, (C) genes strain-differential HFD-regulation. For each functional cluster of genes, normalised expression levels of individual genes (left) and their means  $\pm$  SEM (right) for each strain and diet group are shown. Please note that genes demonstrating significant HFD regulation and not shown in this figure are listed in Supplemental Table 1.



**Figure 5.5** (A) Immunohistochemistry (10x magnification) and (B) Western blot analysis of sarcomeric  $\alpha$ -actin in adipose tissue. The latter was carried out in samples pooled from three randomly selected animals per each strain and diet group; an average of two experiments is shown.

### 5.3 DISCUSSION

We demonstrated previously that homologous regions of human chromosome 6 and rat chromosome 20 harbour a gene (or genes) determining the susceptibility to obesity and obesity-associated hypertension<sup>3, 189</sup>. In the rat study, the chromosomal region regulated increases of adiposity, circulating leptin levels and blood pressure in response to chronic HFD<sup>3</sup>. Here, we extended these findings by demonstrating that the increases in adiposity are due to an impact of the gene(s) on adipocyte size. Consistently with this finding, we showed with micro array gene-expression analysis that the chromosomal region regulates physiological processes determining adipocyte size, i.e. lipogenesis, actin-cytoskeleton remodelling, FA burning and, possibly, glycerol release. Expression profiles of genes regulating these processes favoured augmented intracellular fat accumulation in SHR.1N, compared with SHR, with lipogenesis and cytoskeleton remodelling being most likely involved at early stages and FA burning and glycerol release at later stages of the dietary intervention. These results are consistent with a concept of “genetic architecture of a dynamic complex trait”, with different processes (regulated by the same or different genes) being involved at different stages of the dynamic trait. In this case, the dynamic trait is the development of obesity associated with increasing adipocyte size and blood pressure<sup>215</sup>.

The results of the present study are suggestive of the following series of cellular and molecular events. In response to continued energy surplus, adipocytes increase in number and enlarge in size. The latter is accompanied by cytoskeleton remodelling during which actin microfilaments become extensively depolymerised. In fully differentiated adipocytes, the only polymerised actin is the cortical actin underlying the plasma membrane. Furthermore, as adipocytes become “large”, their metabolic activity changes; the capacity for lipogenesis decreases, whereas their ability to oxidise FAs and release glycerol increases<sup>141, 214</sup>. Furthermore, these “large” lipid-laden adipocytes are characterised by augmented production of bioactive molecules, such as leptin, that, in turn, can elevate blood pressure in obese individuals. Accordingly, in the present study, SHR.1N compared to SHR fed HFD demonstrated a greater increase in adipocyte

size and greater circulating levels of leptin with a close positive relationship between them; they also showed a greater increase in blood pressure. Augmented production of leptin in obesity coupled with “selective leptin resistance” may represent a pathogenetic link between obesity and hypertension<sup>207</sup>. Systemic administration of leptin results in elevation of blood pressure in rats<sup>216</sup>. Leptin produced by adipocytes acts mainly on the hypothalamus where it reduces appetite (decreased intake) and increases sympathetic outflow to metabolically active tissues (increased expenditure). Obesity is normally associated with elevated circulating levels of leptin and leptin resistance to these effects<sup>64</sup>. Centrally acting leptin, however, also increases sympathetic outflow to the kidneys and peripheral vasculature and these effects appear to be preserved in obesity-associated hypertension and, as such, may provide a functional link between increased adiposity due to an increase in adipocyte size and elevated blood pressure<sup>206, 207</sup>.

During adipocyte differentiation actin-cytoskeleton becomes extensively depolymerised. Our micro array gene-expression analysis showed that mainly “myoid” isoforms of actin-cytoskeleton were downregulated. Similar results have been reported recently by another study performing genome-wide gene-expression profiling in white adipose tissue of mice with diet-induced obesity<sup>210</sup>. The expression of “myoid” cytoskeleton genes may reflect the presence of adipocytes with “myoid” features. Both adipocytes and myocytes differentiate from a common mesenchymal stem cell and, as such, their transcriptomes may overlap<sup>217, 218</sup>. For example, it has been shown *in vitro* that myoblasts can transdifferentiate into adipocytes in response to thiazolidinediones, FAs and over-expression of key adipogenic transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/ebp) - $\beta$ , C/ebp- $\delta$ , C/ebp- $\alpha$ , and Ppar- $\gamma$ <sup>219-221</sup>. Furthermore, expression of the “myoid” genes has been demonstrated in other non-muscle tissues than in the adipose tissue. Thus, it has been reported that the liver fat-storing cells (lipocytes) express smooth muscle  $\alpha$ -actin, sarcomeric myosin heavy-chain and desmin when “activated” during liver injury<sup>222</sup> and that this activation is associated with the development of contractility of these cells<sup>223</sup>. The functional relevance of

“myoid” isoforms of actin-cytoskeleton being present in adipose tissue is not entirely clear at present. Actins and myosins are ubiquitous proteins that are involved in diverse cellular functions, such as cell contractility, cell motility, cell adhesion, cell division, maintenance of cell shape<sup>224</sup> and glucose metabolism and insulin resistance<sup>209, 225</sup>. Actin-isoform modulation within the same tissue, for example, is an important marker of adaptive and/or pathological change<sup>224</sup>. Thus, given the current understanding, we hypothesise that reduced actin-cytoskeleton mass may represent diminished “mechanical” resistance to intracellular accumulation of fat in adipocytes; it may also lead to an increased glycerol supply for triglyceride synthesis via its effects on glycolysis<sup>209</sup>. The fact that SHR fed ND showed the highest expression of these proteins suggests that SHR compared with SHR.1N adipocytes were initially more resistant to the accumulation of fat and that this contributed to a smaller adipocyte size in this strain observed at the end of the chronic HFD.

Our results suggest that a gene(s) within the RNO20 segment regulate(s) diet-induced increases in adiposity and blood pressure and that this effect may be mediated by its impact on molecular processes leading to increases in intracellular lipid accumulation and adipocyte size. The RNO20 segment is approximately 21-Mb long and contains 536 genes. The region homologous to human chromosome 6 includes 430 genes. From these, 252 sequences are either pseudo genes (n=109), olfactory receptor genes (n=60) or histocompatibility genes (n=83) that are not likely to be involved in determining the above effects. The remaining 178 genes include those with an unknown (n=32) and known (n=146) function (Supplemental table 2). Among the latter ones, two genes, namely, the Tnf- $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor (Ppar)- $\delta$  genes have been previously implicated in the regulation of molecular and cellular processes shown to be influenced by HFD in a strain-differential manner in our micro array analysis. The Tnf- $\alpha$  gene encodes a pluripotent cytokine that inhibits adipocyte differentiation and lipogenesis by suppressing transcription of adipocyte specific genes, such as Ppar- $\gamma$ , FA synthase and Glut4<sup>226</sup>. Tnf- $\alpha$  also inhibits lipogenesis by downregulating adipose tissue lipoprotein-lipase activity by a post-

translational effect<sup>227, 228</sup>. In addition, Tnf- $\alpha$  plays a role in the early stages of myogenesis and muscle regeneration<sup>229, 230</sup>; it stimulates mRNA expression of muscle-specific genes, such as the  $\alpha$ -sarcomeric actin<sup>229</sup>. The Ppar- $\delta$  gene encodes a FA-activated nuclear transcription factor that can induce transdifferentiation of myoblasts into adipocytes<sup>231</sup> and upregulation of FA oxidation, glycerol release, and energy uncoupling in adipose tissue<sup>142</sup>. Consistent with these functions, our micro array gene-expression profiles suggest that both the Tnf- $\alpha$  and Ppar- $\delta$  activities would be higher in SHR than in SHR.1N. The Tnf- $\alpha$ -gene effect (decreased lipogenic capacity and increased actin-cytoskeleton mass), however, would be present only at initial stages of the intervention, before these pathways are downregulated, whereas the Ppar- $\delta$ -gene impact (increased FA oxidation, energy dissipation and glycerol release) would take place mainly at later stages of the intervention when these pathways become upregulated. Furthermore, expression of both these genes is known to be regulated nutritionally<sup>227, 232</sup>. Therefore, to dissect genetic architecture of this complex dynamic trait and identify its underlying genetic variants needs further studies. These would involve the generation of congenic substrains with progressively smaller differential chromosomal segments that would be subjected to both short-term (initial stages) and long-term (later stages) dietary interventions and in whom gene/protein expression profiles would be investigated in various nutritional states (fasted and fed).

In summary, the results of this study suggest that the RNO20 segment regulates adipocyte size through its effects on lipogenesis, actin-cytoskeleton, FA burning and, possibly, glycerol release. The larger size of adipocytes observed in SHR.1N compared with SHR may represent the underlying mechanism of obesity-related hypertension in this experimental model, as "large" compared with "small" adipocytes are thought to produce molecular signals that may increase blood pressure through their effect on, for example, the sympathetic nervous system. Consistently, the larger size of adipocytes we observed in SHR.1N compared with SHR was associated with higher circulating leptin levels (an activator of the

sympathetic nervous system) and blood pressure. The identification of specific genes underlying these effects requires additional studies.

#### **5.4 ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-37915) and the University of Nottingham. The authors would like to thank Prof. Tomas Paus for his helpful comments on the manuscript.

# SUPPLÉMENT : MATÉRIEL ET MÉTHODE / RÉSULTATS

## CHAPITRE 6

### 6.1 Matériel et Méthode

#### 6.1.1 Séquençage des gènes candidats: Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

##### 6.1.1.1 Tnf- $\alpha$

##### 6.1.1.2 Ppar- $\delta$

#### 6.1.2 Analyse d'expression génique/protéique

##### 6.1.2.1 Expression génique de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$ par transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel

##### 6.1.2.2 Expression protéique de Tnf- $\alpha$

##### 6.1.2.3 Expression protéique de Ppar- $\delta$

### 6.2 Résultats

#### 6.2.1 Séquençage des gènes candidats: Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

##### 6.2.1.1 Tnf- $\alpha$

##### 6.2.1.2 Ppar- $\delta$

#### 6.2.2 Analyse de l'expression génique/protéique de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

##### 6.2.2.1 Expression génique Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

##### 6.2.2.2 Expression protéique de Tnf- $\delta$

##### 6.2.2.3 Expression protéique de Ppar- $\delta$

## 6.1 Matériel et Méthode

### 6.1.1 Séquençage des gènes candidats: Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

**6.1.1.1. Tnf- $\alpha$  :** Le gène Tnf- $\alpha$ , ainsi que 600 pb de la région promotrice ont été séquencés et rapportés antérieurement par notre laboratoire<sup>3</sup>.

**6.1.1.2 Ppar- $\delta$ :** Le gène candidat Ppar- $\delta$  n'était que partiellement séquencé (à partir d'ADNc). Nous avons donc complété le séquençage des régions : 5'-UTR, de l'exon 1, de l'exon 2, et 3'-UTR de l'exon 8 ainsi que les régions

promotrices principales soit le 1B et le 1A. L'ADN génomique (100ng) d'au moins 2 rats, choisis au hasard de chaque souche, a été utilisé pour l'amplification par PCR (60°C, 35 cycles). Les amplicons sont séparés sur gel (agarose 2%), purifiés et envoyés pour séquençage au Laboratoire d'analyse et de synthèse d'acides nucléiques, Université Laval, Québec et Service de séquençage du CHUM, Université de Montréal.

### **6.1.2 Analyse d'expression génique/protéique**

**6.1.2.1 Expression génique de Tnf- $\alpha$  et Ppar- $\delta$  par transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel:** La transcription inverse et la réaction de la polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR) est employée pour mesurer l'expression génique des candidats. Les réactions de PCR sont faites en utilisant QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen Inc., Hilden, Allemagne) dans le cycleur Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australie). L'efficacité de réaction est déterminée par des dilutions en série du cDNA et la quantification relative est faite selon la méthode de Pfaffl<sup>233</sup>. Ces PCR en temps réel sont faits avec des échantillons d'animaux individuels.

**6.1.2.2 Expression protéique de Tnf- $\alpha$ :** La quantification protéique de Tnf- $\alpha$  dans le sérum et le tissu adipeux est faite par ELISA à l'aide du BD OptEIA (BD Biosciences, Mississauga, ON).

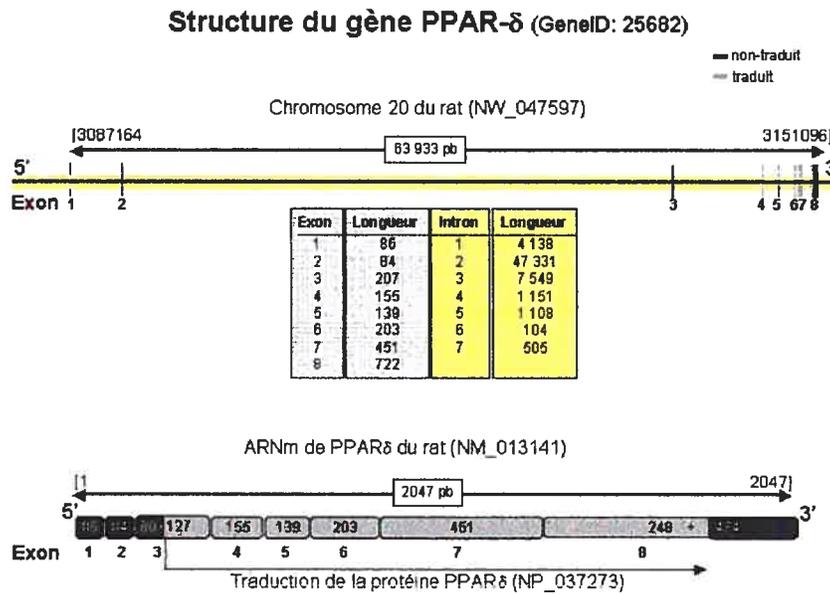
**6.1.2.3 Expression protéique de Ppar- $\delta$  :** L'analyse protéique de ce gène est faite par la technique «Western». Un extrait total de protéines (100 $\mu$ g) provenant du tissu adipeux rétro péritonéal de 3 animaux (afin d'extraire assez de protéines pour la détection) est soumis à une électrophorèse (gel d'acrylamide 10%, 50V, 2h). Trois échantillons par groupes expérimentaux (souches; diète) sont mesurés. L'anticorps primaire utilisé est l'anti-Ppar- $\delta$  de lapin (1:750; ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO).

## **6.2 Résultats:**

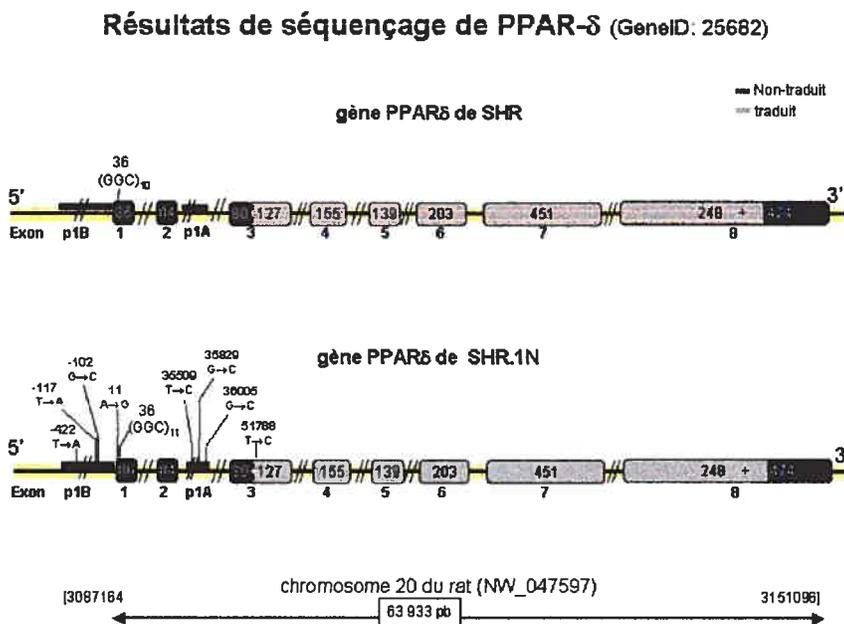
### **6.2.1 Séquençage des gènes candidats: Tnf- $\alpha$ , Ppar- $\delta$**

**6.2.1.1 Tnf- $\alpha$**  : Les différences de séquences entre les SHR et les SHR.1N pour le Tnf- $\alpha$  sont reportées dans un l'article Pausova, Z. et al., 2003<sup>3</sup>; 26 variations sont localisées.

**6.2.1.2 Ppar- $\delta$**  : Le séquençage complété de Ppar- $\delta$  a révélé au total 9 variations entre les souches (Figure 6.1 et 6.2). La position numérique rapportée des mutations est en relation avec le site d'initiation de la transcription. On trouve : 3 mutations dans la région promotrice principale (positions : -422, -117 et -102); 3 dans la région de l'intron 2, possiblement importante comme promoteur secondaire (positions 35509, 35829 et 36005); 2 dans la région non-traduite de l'exon 1 (position 11, 36) et une trouvée dans la région codante de l'exon 3 (position 51788) mais cette dernière est silencieuse et n'affecte pas la structure protéique.



**Figure 6.1** Structure schématique de PPAR- $\delta$  (GeneID: 25682) dans le RNO20 (NW\_047597). Les 8 exons du gène sont assemblés par épissage, formant le transcrit NM\_013141 qui est traduit en la protéine NP\_037273. Les boîtes représentent les exons (grises : régions traduites, noires : régions UTR).



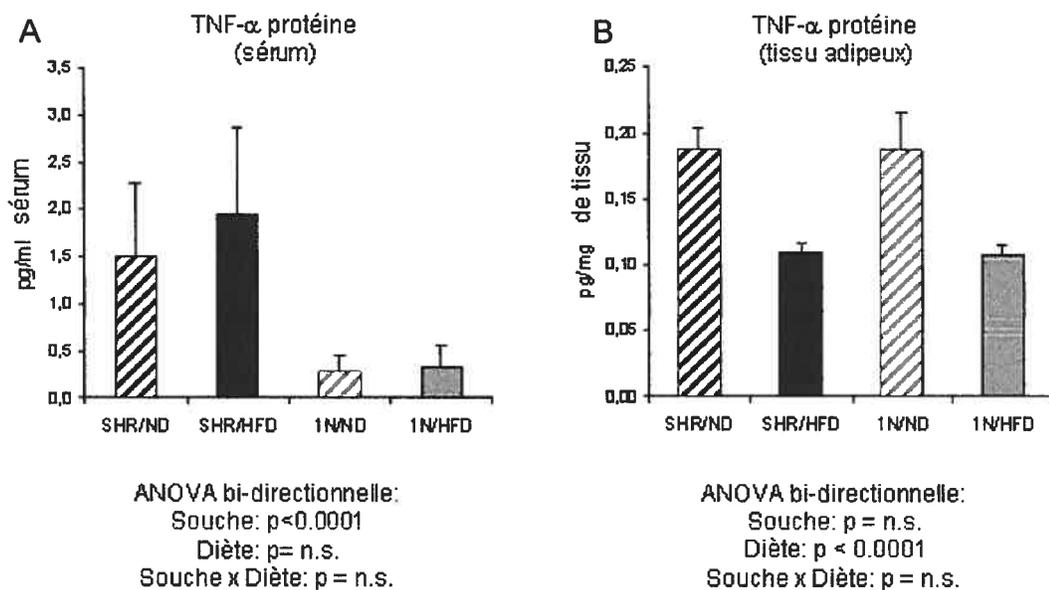
**Figure 6.2.** Résultats de séquençage du PPAR- $\delta$ . Neufs différences entre les SHR et les SHR.1N; 3 dans le promoteur 1B, 2 dans l'exon-1, 3 dans l'intron-2 et 1 dans l'exon 3, une région codante (synonyme). La position numérique est en relation avec le site d'initiation de la transcription. Les boîtes représentent les exons (grises : régions traduites, noires : régions UTRs). Les mutations sont : SHR.1N $\rightarrow$ SHR.

## 6.2.2 Analyse de l'expression génique/protéique de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$ :

**6.2.2.1 Expression génique Tnf- $\alpha$  et Ppar- $\delta$ :** L'analyse de l'ARNm des gènes candidats par technique de biopuce (ARNm rassemblés par groupes expérimentaux) ne révèle pas d'effet significatif ni de la diète, ni de la souche (données non-présentées). Donc, une analyse par RT-PCR est faite sur des échantillons provenant d'animal individuel; aucun effet de souche ou de diète n'est détecté (données sur Tnf- $\alpha$  présentées dans Pausova,Z., et al, 2003<sup>3</sup>; données sur Ppar- $\delta$  non-présentées).

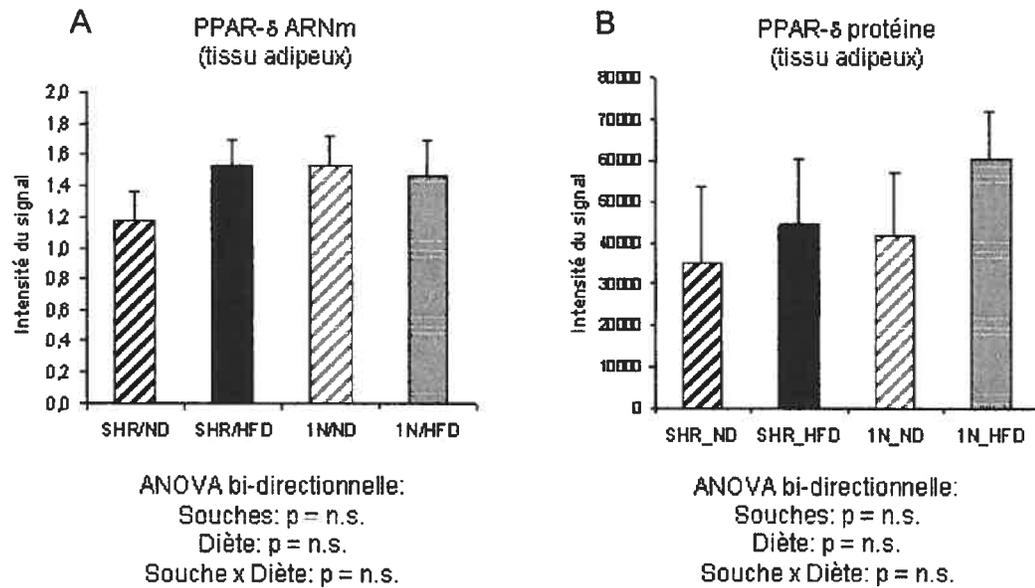
**6.2.2.2 Expression protéique de Tnf- $\alpha$ :** Le niveau de Tnf- $\alpha$  dans le **sérum** est significativement plus élevé dans les SHR comparativement au SHR.1N mais ne montre pas d'effet de diète (Figure 6.3).

L'analyse protéique faite **dans le tissu adipeux** montre que l'expression du Tnf- $\alpha$  n'est pas influencée par la souche, mais elle est régulée à la baisse par la diète HFD (de façon similaire entre les souches) (Figure 6.3).



**Figure 6.3** Analyse de l'expression protéique de TNF- $\alpha$  par ELISA dans (A) le sérum et (B) le tissu adipeux. Données présentées par; moyennes  $\pm$  SEM.

**6.2.2.3 Expression protéique de Ppar- $\delta$ :** Le Ppar- $\delta$  ne montre pas d'impact ni de la souche, ni de la diète (Figure 6.4).



**Figure 6.4** Analyse de l'expression (A) génique et (B) protéique de Ppar- $\delta$  dans le tissu adipeux. Données présentées par; moyennes  $\pm$  SEM.

# DISCUSSION

## CHAPITRE 7

- 7.1 Progression dynamique de l'adipogenèse différentielle entre les souches
- 7.2 « Dysfonction » du tissu adipeux causée par une hypertrophie adipocytaire différentielle entre les souches
  - 7.2.1 Changements métaboliques des adipocytes
  - 7.2.2 Production accrue de molécules bioactives
    - 7.2.2.1 Production accrue de molécules bioactives induite par l'augmentation de la taille adipocytaire, proposition mécaniste
    - 7.2.2.2 Leptine
  - 7.2.3 Remodelage du cytosquelette
- 7.3 Liens proposés entre les protéines structurales et les phénotypes différentiels entre les souches
  - 7.3.1 Changements de l'expression des molécules structurales attribués à la fraction non-adipocytaire du tissu adipeux
    - 7.3.1.1 Expression de molécules structurales myoïdes reflétant le bassin de cellules pluripotentes mésenchymales
  - 7.3.2 Changements de l'expression des molécules structurales attribués à la fraction adipocytaire du tissu adipeux
    - 7.3.2.1 Dépolymérisation de protéines structurales facilitant l'augmentation volumique des adipocytes
    - 7.3.2.2 Dépolymérisation de protéines structurales causant des perturbations dans le métabolisme des adipocytes
- 7.4 Segment différentiel
- 7.5 Indices théoriques de l'implication des gènes candidats : Tnf- $\alpha$  et Ppar- $\delta$ 
  - 7.5.1 Indices théoriques de l'implication du Tnf- $\alpha$ 
    - 7.5.1.1 Indices théoriques de l'implication du Tnf- $\alpha$  circulant
      - 7.5.1.1.1 Effet continu et/ou tardif; effet lipostatique généralisé
    - 7.5.1.2 Indices théoriques de l'implication du Tnf- $\alpha$  tissulaire
      - 7.5.1.2.1 Effet précoce; inhibition de l'adipogenèse
      - 7.5.1.2.2 Effet continu et/ou tardif; régulation à la baisse des gènes structuraux
  - 7.5.2 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$

#### 7.5.2.1 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$ dans le tissu adipeux

7.5.2.1.1 Effet précoce; induction de l'adipogenèse

7.5.2.1.2 Effet continu et/ou tardif; régulation à la baisse des gènes structuraux

7.5.2.1.3 Effet continu et/ou tardif; induction des voies de dissipation des graisses

#### 7.5.2.2 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$ dans le tissu musculaire

7.5.2.2.1 Effet continu et/ou tardif; induction des voies de dissipation des graisses

#### 7.5.2.3 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$ dans d'autres tissus

7.5.2.3.1 Effet continu et/ou tardif; effet de transdifférentiation de cellules non-adipocytaires

### 7.6 Séquençage et analyse d'expression génique/protéique : Preuves de l'implication du Tnf- $\alpha$ et du Ppar- $\delta$ limitées à ce stade

#### 7.6.1 Séquençage de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

#### 7.6.2 Expression génique de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$

#### 7.6.3 Expression protéique de Tnf- $\alpha$

7.6.3.1 Expression protéique de Tnf- $\alpha$  sérique

7.6.3.2 Expression protéique de Tnf- $\alpha$  tissulaire

7.6.3.2.1 Hypothèse reliée à l'infiltration de macrophages expliquant l'absence de hausse d'expression de Tnf- $\alpha$  tissulaire

#### 7.6.4 Expression protéique de Ppar- $\delta$

7.6.5 Limites de l'analyse de l'expression génique/protéique pour les gènes de Tnf- $\alpha$  et Ppar- $\delta$

### 7.7 Ouverture

Les travaux ici exposés continuent l'exploration du rôle du locus génique de Tnf- $\alpha$  dans l'HTA associée à l'obésité induite par la diète. La région RNO20 du rat détermine l'effet inducteur qu'a une exposition chronique de 12 semaines de diète HFD sur l'augmentation de : 1) l'adiposité, 2) du taux de leptine circulant et 3) de la PA<sup>3</sup>. Ces augmentations induites par la diète sont plus marquées chez les SHR.1N que les SHR et résultent d'interactions gène-environnement. Le locus contient donc un ou plusieurs gène(s) capable(s) de provoquer des cascades géniques qui peuvent aboutir aux désordres métaboliques et cardiovasculaires.

Cette étude renforce notre précédente avec des précisions mécanistes. Nous déterminons que l'augmentation de l'adiposité découle de l'impact du segment RNO20 sur la taille des adipocytes. Le segment différentiel régule plusieurs processus physiologiques qui influencent la taille adipocytaire tels que la lipogenèse, le remodelage du cytosquelette, la relâche du glycérol, l'oxydation des AG et la dissipation d'énergie. Les gènes impliqués dans ces processus montrent des régulations coordonnées qui favorisent une accumulation lipidique intracellulaire plus grande chez les SHR.1N que les SHR.

## **7.1 Progression dynamique de l'adipogenèse différentielle entre les souches**

L'obésité induite par la diète est un désordre progressif dynamique qui débute avec l'hypertrophie des adipocytes préexistants suivi d'une phase d'expansion cellulaire pendant laquelle de nouvelles cellules adipeuses sont recrutées pour assurer la gestion de la charge lipidique<sup>118</sup>. Nos résultats concordent avec le nouveau concept «d'architecture génique des caractéristiques dynamiques complexes» où divers processus (régulés par un ou plusieurs gènes) s'entremêlent dynamiquement à des stades temporels différents<sup>215</sup>. Il est possible que les souches aient une progression dynamique différentielle. Par exemple, les adipocytes des SHR.1N pourraient atteindre une taille cellulaire plus grande avant que la phase d'expansion ne se mette en branle. Ainsi, la phase de transition serait coordonnée plus efficacement chez les SHR.

Un retard de la phase d'expansion peut être relié à une capacité réduite d'enclencher le processus d'adipogenèse. Une étude montre que la taille adipocytaire corrèle inversement avec l'expression des gènes régulant l'adipogenèse<sup>119</sup>. Les tissus adipeux composés d'adipocytes de grandes tailles ont une capacité d'adipogenèse déficiente trahie par la faible expression : 1) des gènes responsable de l'initiation du programme d'adipogenèse (système signal Wnt : FZD-1, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenine, LEF-1) et 2) des gènes de différenciation terminal (adiponectine, aP-2)<sup>119</sup>. Ainsi, une déficience de différenciation précoce pourrait expliquer du moins en partie la taille adipocytaire différentielle entre les souches. Un enclenchement efficace du programme adipogénique chez les SHR empêcherait l'engorgement démesuré de leurs adipocytes alors que la coordination de ces processus adaptatifs serait plus déficiente chez les SHR.1N, encourageant l'hypertrophie adipocytaire afin d'accommoder la charge lipidique.

## **7.2 « Dysfonction » du tissu adipeux causée par une hypertrophie adipocytaire différentielle entre les souches**

Plusieurs études récentes suggèrent que le tissu adipeux composé d'adipocytes de grande taille et engorgées de lipides montrent des caractéristiques « dysfonctionnelles ». De plus, l'accumulation de ce type de tissu est reliée à l'HTA associée à l'obésité<sup>5</sup> et un excès de tissu adipeux « dysfonctionnel » peut en devenir un indicateur de risque. En concordance, le tissu adipeux des SHR.1N, comparativement aux SHR, montre plus de caractéristiques morphologiques « dysfonctionnelles » (plus grande hypertrophie adipocytaire). Donc, les SHR.1N seraient affligés des conséquences pathophysiologiques découlant de l'hypertrophie des adipocytes soit: 1) des changements métaboliques, 2) une production accrue de molécules bioactives et 3) un remodelage cytosquelettique.

### **7.2.1 Changements métaboliques des adipocytes**

Les adipocytes volumineux montrent des changements métaboliques tels que 1- une capacité lipogénique diminuée et 2- une habileté augmentée d'oxyder les AG et de relâcher le glycérol<sup>141, 214</sup>. L'expression des gènes régulant l'oxydation des AG et de la biogenèse mitochondriale est augmentée.

### **7.2.2 Production accrue de molécules bioactives**

Comparativement aux petites cellules adipocytaires, les adipocytes de grande taille produisent significativement plus de signaux endocrines, paracrines et autocrines (ex. leptine, angiotensine) capables de stimuler l'activité du SNS, le RAAS, la résistance à l'insuline associée à hyper insulinémie et le stress oxydatif<sup>6</sup>; tous des signaux qui viennent à augmenter la PA des obèses. En concordance, les SHR.1N exposés à la diète HFD (comparativement au SHR) montrent une plus grande hypertrophie adipocytaire qui corrèle positivement avec leur taux de leptine circulant. De plus, les SHR.1N exposés à la diète HFD (comparativement au SHR) montrent une augmentation plus grande de leur PA.

**7.2.2.1 Production accrue de molécules bioactives induite par l'augmentation de la taille adipocytaire, proposition mécaniste :** Une étude montre que l'hypertrophie adipocytaire altère la distribution du cholestérol membranaire<sup>131</sup> où les adipocytes de large taille ont une concentration de cholestérol membranaire relative réduite (comparativement aux cellules de petite taille)<sup>131</sup>. Une déplétion de cholestérol membranaire provoque des changements dans la signalisation cellulaire qui sont reliés à une résistance à l'insuline et une activation du facteur de transcription SREBP-2. L'activation du facteur de transcription SREBP-2 hausse la production adipocytaire de Tnf- $\alpha$ , d'angiotensinogène, d'IL-6 et de synthèse d'AG. Ainsi, nous pouvons vérifier si les adipocytes de nos animaux montrent une déplétion différentielle entre les souches de leur concentration de cholestérol membranaire. Un tel mécanisme peut relier, en partie, la taille adipocytaire aux phénotypes différentiels observés

entre les souches. Ce mécanisme serait induit de façon précoce dans l'intervention diététique étant relié à l'hypertrophie initiale.

**7.2.2.2 Leptine :** Par le principe de résistance sélective à la leptine, la production accrue de cette molécule dans l'obésité peut s'avérer être le lien pathologique entre l'obésité et l'HTA<sup>207</sup>. La résistance sélective à la leptine devra être évaluée dans nos souches à l'étude pour déterminer si ce mécanisme fait partie de la pathogenèse complexe dans notre modèle animal à l'étude.

### 7.2.3 Remodelage du cytosquelette

Lorsque les adipocytes se différencient et augmentent de taille, le cytosquelette subit un remodelage exhaustif<sup>234</sup> où 90% des micro filaments d'actine se dépolymérisent<sup>205</sup>. Seule l'actine corticale sous-jacente à la membrane plasmatique reste polymérisée dans les adipocytes matures<sup>234</sup>. D'après notre analyse des profils d'expressions géniques, la diète HFD induit une régulation à la baisse coordonnée de plusieurs gènes structuraux et enzymatiques typiquement sarcomériques. La présence de tel système sarcomérique dans le tissu adipeux commence tout juste à être rapportée. Des chercheurs analysant des profils d'expression génique dans le tissu adipeux de souris rendues obèses par la diète<sup>210, 235</sup> trouvent une baisse importante de l'expression d'un groupe de gènes cytosquelettiques ou structuraux incluant la myosine et l'actine- $\alpha$ 1. Une analyse protéomique de l'adipogenèse montre aussi une forte régulation à la baisse de protéines cytosquelettiques telles que la tubuline, l'actine et la vimentine<sup>234</sup>. Ainsi, l'expression de gènes cytosquelettiques de type sarcomérique dans notre étude peut refléter la présence d'adipocytes ayant des caractéristiques contractiles.

Il est connue que les adipocytes et les myocytes se différencient à partir d'un ancêtre mésenchymal commun et que leur transcriptome peuvent s'entrecouper<sup>217, 218</sup>. La signification fonctionnelle de l'expression adipocytaire de gènes structuraux de types myoïdes reste embrouillée. Ubiquitaires, les protéines d'actines et de myosines sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la contractilité cellulaire, la motilité cellulaire, le déplacement

intracellulaire de molécules/microsomes/vésicules/organelles, l'adhésion, la division, et le maintien de la forme cellulaire<sup>224, 236</sup> ainsi que dans le métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline<sup>209, 225</sup>. La régulation des isoformes d'actine dans un même tissu peut être un marqueur important de changements adaptatifs et/ou pathologiques<sup>224</sup>.

### **7.3 Liens proposés entre les protéines structurales et les phénotypes différentiels entre les souches**

Ainsi, dans ce contexte, nous proposons des mécanismes qui favoriseraient une accumulation lipidique plus grande chez les SHR.1N que chez les SHR. Les changements d'expression de molécules structurales peuvent être attribués soit à la fraction cellulaire non-adipocytaire ou adipocytaire du tissu adipeux.

#### **7.3.1 Changements de l'expression des molécules structurales attribués à la fraction non-adipocytaire du tissu adipeux**

Le tissu adipeux est composé principalement d'adipocytes mais aussi de plusieurs autres types cellulaires incluant des cellules souches pluripotentes, des préadipocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes et des macrophages.

**7.3.1.1 Expression de molécules structurales myoïdes reflétant le bassin de cellules pluripotentes mésenchymales :** Les cellules pluripotentes mésenchymales sont capables de se différencier en adipocytes, en myoblastes, en ostéoclastes ou en chondroblastes<sup>211</sup>. Dans les stages précoces de différenciation, les lignés cellulaires mésenchymales peuvent transdifférencier entre les divers types cellulaires<sup>231</sup>. En périphérie des adipocytes, il peut se trouver un bassin de cellules pluripotentes à l'interface de différenciation exprimant un large transcriptome qui entrecoupe celui des myoblastes. Ainsi, le taux d'expression génique de molécules structurales « myoïdes » peut refléter la population cellulaire pluripotente mésenchymale présente dans le tissu adipeux.

La présence de ces cellules peut à son tour refléter la capacité du tissu à entreprendre une adipogenèse efficace au besoin.

La surcharge lipidique provoque les cellules gestantes à entreprendre la voie de différenciation adipocytaire. Par conséquent, l'expression des molécules cytosquelettiques myoïdes est abaissée puisque le transcriptome se rétrécit au programme adipocytaire.

Dans notre étude, les animaux gardés sur la diète normale montrent l'expression la plus forte des protéines cytosquelettiques mais la souche SHR.1N (comparativement à la souche SHR) montre une plus faible expression qui peut refléter un plus petit bassin de cellules pouvant être rapidement recrutées à se différencier. Donc, les SHR.1N peuvent avoir, au départ, une capacité de différenciation plus petite et accommodent moins facilement une charge lipidique excessive par la différenciation. Cette hypothèse concorde avec une progression dynamique de l'adipogenèse différentielle entre les souches où un défaut de différenciation précoce chez les SHR.1N pousse leurs adipocytes vers l'hypertrophie provoquant dans cette souche une émergence plus grande de tissu adipeux dysfonctionnel.

Le tissu adipeux des deux souches exposées à la diète HFD exprime moins de protéines structurales myoïdes (comparativement à la diète normale) puisque les cellules pluripotentes ont déjà massivement entrepris la voie de différenciation adipocytaire. Ainsi, à ce point de l'intervention diététique le bassin de cellules pluripotentes présent dans leur tissu adipeux est réduit comparativement aux animaux gardés sur la diète normale. Les animaux sur la diète HFD ont une capacité adipogénique réduite mais elle est plus réduite chez les SHR.1N ayant moins bien géré la charge lipidique au cours de la diète.

Toutefois, les cellules non-adipocytaires s'agglomèrent surtout dans la fraction stromovasculaire<sup>116</sup>. Le marquage immunohistochimique de l'actine- $\alpha$ 1, une protéine typiquement « myoïde », ne concorde pas de façon évidente avec la périphérie vasculaire mais plutôt avec le pourtour des adipocytes. Ainsi, le réseau d'actine cytosquelettique peut être exprimé corticalement par les adipocytes eux mêmes; remettant en question l'implication des cellules non-adipocytaires dans le

changement d'expression génique des protéines structurales de type myoïde. Il est important de déterminer par une autre technique (ex. digestion par collagénase) quelle fraction cellulaire du tissu adipeux (adipocytaire ou stromovasculaire) est responsable de la régulation à la baisse des protéines cytosquelettiques.

### **7.3.2 Changements de l'expression des molécules structurales attribués à la fraction adipocytaire du tissu adipeux**

Nous proposons alternativement que les changements d'expression des molécules structurales de type myoïde sont attribuables à la fraction adipocytaire du tissu adipeux.

**7.3.2.1 Dépolymérisation de protéines structurales facilitant l'augmentation volumique des adipocytes :** La dépolymérisation et la régulation à la baisse des protéines structurales myoïdes peuvent faciliter l'augmentation volumique des adipocytes en réponse à une charge lipidique. L'exposition chronique à un surplus alimentaire pousse l'adipocyte à réduire sa résistance « mécanique structurale » pour favoriser l'accumulation lipidique intracellulaire.

Les animaux SHR.1N sur la diète normale expriment moins de protéines structurales que les SHR sur la même diète. Ainsi, ayant moins de résistance structurale à l'expansion cellulaire, les SHR.1N accommodent plus facilement la charge grasseuse par l'augmentation de la taille de leurs adipocytes; ils accumulent initialement plus rapidement les lipides. Les animaux SHR ont plus de protéines structurales et plus de résistance initiale à l'expansion cellulaire. Cette résistance peut être balancée par l'augmentation des mécanismes de dissipation des graisses (observée chez les SHR) qui empêche la déposition ectopique de graisses.

Ainsi, un mécanisme de ce type peut relier les changements d'expression des molécules structurales avec la différence de taille des adipocytes entre les souches. La présence d'un réseau moléculaire contractile sous-jacent à la

membrane empêche l'expansion démesurée des adipocytes et les protège des dérégulations associées à une grande taille adipocytaire.

**7.3.2.2 Dépolymérisation de protéines structurales causant des perturbations dans le métabolisme des adipocytes :** L'hypertrophie et/ou l'engorgement excessif des adipocytes cause une désorganisation du réseau cortical cytosquelettique d'actine provoquant des perturbations métaboliques. Plusieurs processus demandent des déplacements intracellulaires (ex. microsomes, vésicules, organelles, macromolécules) et nécessitent un remodelage extensif du réseau cortical d'actine adipocytaire<sup>236</sup>. Par exemple, les microsomes contenant la protéine Glut4, une protéine de transport du glucose, subit des cycles de translocation importants (internalisation et fusion à la membrane cytoplasmique) qui requièrent un remodelage continu de l'actine corticale et la formation de structures submembranaires<sup>236</sup>. La baisse d'expression des protéines cytosquelettiques dans les adipocytes devenus hypertrophiés et engorgés peut désorganiser le réseau cortical au point de rendre la cellule sujette à des dérégulations et dysfonctions.

De plus, le réseau cytosquelettique est l'infrastructure de base requise pour la micro compartimentalisation, un phénomène cellulaire important qui rassemble dans un micro compartiment les enzymes d'un système particulier tel que les enzymes glycolytiques<sup>209</sup>. Une désorganisation du réseau cytosquelettique peut donc affecter le métabolisme général des adipocytes.

## **7.4 Segment différentiel**

Les trouvailles de nos études effectuées chez les animaux, celle-ci et la précédente, sont que le segment RNO20 détermine l'augmentation de 1) la taille des adipocytes, 2) le degré d'adiposité et 3) la PA. Toutes les perturbations se trouvent plus marquées chez les SHR.1N que les SHR. Le segment détermine l'augmentation de la taille adipocytaire via son effet sur la lipogenèse, le remodelage cytosquelettique, la relâche du glycérol, l'oxydation des AG et la dissipation d'énergie.

Les profils d'expression génique obtenus par les technologies de biopuces suggèrent que le segment différentiel du chromosome des SHR.1N contient un/des gènes capables d'inhiber la lipogenèse, de désintégrer le réseau d'actine cytosquelettique ainsi que d'activer les voies moléculaires d'oxydation des AG libres, de dissipation de chaleur et de relâche de glycérol en réponse à la diète HFD.

## **7.5 Indices théoriques de l'implication des gènes candidats: Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$**

Les deux gènes candidats, soit le Tnf- $\alpha$  et le Ppar- $\delta$ , ont déjà été impliqués dans la régulation des processus cellulaires identifiés par les profils d'expression génique comme étant influencés par la diète HFD de façon différentielle entre les souches.

### **7.5.1 Indices théoriques de l'implication du Tnf- $\alpha$**

Le gène de Tnf- $\alpha$  encode une cytokine pluripotente qui inhibe fortement la différenciation adipocytaire<sup>237</sup> et la lipogenèse<sup>227, 228</sup>. Ce gène a aussi été impliqué dans les stades précoces de la différenciation myogénique et de la régénération musculaire<sup>229, 230</sup>. Un événement inflammatoire dans le muscle attire au site des macrophages qui facilitent la régénération musculaire via la phagocytose de débris cellulaire et la relâche de facteurs solubles qui incitent la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>229</sup>. La production de Tnf- $\alpha$  par les myofibres corrèle avec la régénérescence musculaire<sup>229</sup> et récemment un rôle physiologique dans la régénérescence a été attribuer au Tnf- $\alpha$ . Une hausse rapide de la synthèse du Tnf- $\alpha$  par des myoblastes venant d'entreprendre la voie de différenciation myoïde est critique pour l'expression de gène spécifiquement musculaire<sup>229</sup>.

#### **7.5.1.1 Indices théoriques de l'implication du Tnf- $\alpha$ circulant :**

##### **7.5.1.1.1 Effet continu et/ou tardif; effet lipostatique généralisé :**

La source principale de Tnf- $\alpha$  circulant sont les macrophages et monocytes

perivasculaires. Le taux sérique plus élevé des SHR peut avoir un effet continu sur le métabolisme lipidique par une plus grande suppression généralisée de l'activité de la lipoprotéine lipase à travers l'intervention diététique. Cet effet continu peut s'accumuler et se démarquer plus tardivement dans la dynamique du développement de l'HTA associée à l'obésité.

#### **7.5.1.2 Indices théoriques de l'implication du Tnf- $\alpha$ local tissulaire :**

**7.5.1.2.1 Effet précoce ; inhibition de l'adipogenèse:** Les SHR.1N, ayant moins de protéines structurales au départ accommoderaient facilement la charge lipidique par l'hypertrophie causant une redistribution du cholestérol membranaire associée à une hausse d'expression du Tnf- $\alpha$ . La hausse d'expression de Tnf- $\alpha$  inhibe l'adipogenèse; ainsi, les SHR.1N pourraient avoir une capacité adipogénique initialement déficiente rendant plus difficile la transition entre la phase hypertrophique et hyperplasique. Leurs adipocytes se trouveraient obligés de continuer à accommoder l'excès lipidique par l'hypertrophie. Ainsi, le tissu adipeux en expansion des SHR.1N développerait les caractéristiques du tissu adipeux dysfonctionnel reliées aux pathophysiologies de l'HTA associée à l'obésité. Dans la dynamique complexe des événements moléculaires, cet effet serait un effet précoce du Tnf- $\alpha$ .

**7.5.1.2.2 Effet continu et/ou tardif; régulation à la baisse des gènes structuraux :** La baisse d'expression du Tnf- $\alpha$  induite par la diète (détectée localement dans le tissu adipeux) peut jouer un rôle dans la régulation négative des gènes myoïdes structuraux. Cette régulation pourrait être un événement moléculaire plus tardif dans la dynamique.

L'action différentielle du Tnf- $\alpha$  entre les souches pourrait accentuer la divergence phénotypique des souches. Ainsi, les effets autocrines, paracrines et endocrines précoces ou tardifs du Tnf- $\alpha$  sérique ou tissulaire pourraient être

responsables de l'initiation et du maintien de tissu adipeux dysfonctionnel lié au développement de l'HTA associée à l'obésité.

### **7.5.2 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$**

Le deuxième gène candidat important trouvé dans le segment différentiel est le Ppar- $\delta$ , un facteur de transcription nucléaire activé par les AG, qui induit la phase initiale de différenciation des adipocytes<sup>231</sup> et l'oxydation des AG, la relâche du glycérol et le découplage énergétique dans le tissu adipeux<sup>142</sup>.

#### **7.5.2.1 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$ dans le tissu adipeux:**

**7.5.2.1.1 Effet précoce ; induction de l'adipogenèse:** Comme vu dans l'article, le Tnf- $\alpha$  inhibe l'adipogenèse par son action sur des gènes adipogéniques importants tel que le Ppar- $\gamma$  et C/ebp- $\alpha$ . L'action adipogénique du Ppar- $\delta$  sur la différenciation cellulaire passe aussi par ces gènes. Ainsi, le résultat physiologique net sur l'adipogenèse dépend de cascades dynamiques où les effets de Tnf- $\alpha$  et de Ppar- $\delta$  se contrebalancent et interagissent. Ainsi, l'expression précoce du Tnf- $\alpha$  suggérée chez les SHR.1N pourrait interagir négativement avec le programme adipogénique du Ppar- $\delta$  alors que la souche SHR bénéficie d'une capacité adipogénique initiale plus forte. Une transition vers l'adipogenèse rapide pourrait protéger les cellules d'une hypertrophie excessive au début de l'intervention diététique.

**7.5.2.1.2 Effet continu et/ou tardif; régulation à la baisse des gènes structuraux :** En fait, des études démontrent que l'activation du Ppar- $\delta$  peut induire des phénomènes de transdifférenciation entre les myoblastes et les adipocytes<sup>231</sup> et donc le Ppar- $\delta$  peut diriger un remodelage cytosquelettique de type myoïde possiblement à travers la modulation des voies de signalisation de Wnt, Frizzled et Rho impliqués

dans le remodelage cytosquelettique et la régulation de l'adipogenèse<sup>204, 234</sup>. Ainsi, les régulations différentielles du groupe de gènes cytosquelettiques de type myoïde pourrait aussi découler d'une action de Ppar- $\delta$ .

**7.5.2.1.3 Effet continu et/ou tardif; induction des voies de dissipation des graisses:** Les événements moléculaires induits par le Ppar- $\delta$  encourageant l'oxydation des AG, la relâche du glycérol et le découplage énergétique dans le tissu adipeux<sup>142</sup> pourraient survenir plus tardivement. Les SHR montreraient une plus forte induction de ces voies et accumuleraient moins de lipides intracellulaires. Ainsi, l'activation de Ppar- $\delta$  pourrait contribuer à la divergence phénotypique entre les souches par l'activation différentielle entre la souche de ces systèmes de dissipation énergétique.

#### **7.5.2.2 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$ dans le tissu musculaire :**

**7.5.2.2.1 Effet continu et/ou tardif; induction des voies de dissipation des graisses:** De plus en plus d'études suggèrent que le Ppar- $\delta$  régule le métabolisme des AG au niveau du muscle, un tissu périphérique important<sup>198, 200</sup>. Contribuant à 40% de la masse corporelle totale, le muscle est un des tissus les plus demandant en terme de métabolisme lipidique<sup>198</sup>. Une étude démontre que l'agoniste spécifique du Ppar- $\delta$ , soit le GW501516, régule directement ou indirectement dans les cellules musculaires la cascade complète de gènes impliqués dans 1) la capture par hydrolyse des TG, 2) la  $\beta$ -oxydation des AG et 3) l'usage préférentiel des lipides dans la dépense énergétique, 4) l'augmentation de la dépense énergétique par thermogenèse<sup>198</sup>.

Un model transgénique a été développé chez la souris où la surexpression de Ppar- $\delta$  dans le muscle est contrôlé par une approche de recombinaison Cre/Lox. Ces souris montrent une hausse de leur capacité

oxydative et une net réduction de leur masse adipeuse corporelle<sup>238</sup>. La surexpression de Ppar- $\delta$  dans le muscle cause un remodelage musculaire, soit une hausse du nombre total de fibres oxydatives lentes, un phénotype ressemblant à celui induit par l'exercice prolongé d'intensité moyenne<sup>238</sup>. L'effet inducteur de fibres musculaires de type-I est même observé dans des souris normales exposées aux agonistes spécifiques de Ppar- $\delta$ <sup>239</sup>. L'activation de Ppar- $\delta$  chez les animaux cause une endurance accrue à l'exercice, une résistance à l'obésité induite par la diète, un meilleur profil métabolique et des adipocytes de plus petites taille due à une capacité oxydative plus grande et cela même en absence d'exercice<sup>239, 240</sup>.

Il a été trouvé que Ppar- $\delta$  doit être activé pour diriger les changements musculaires vers les fibres plus oxydatives<sup>239</sup>. Une étude rapporte que la simple surexpression de Ppar- $\delta$  dans le muscle est insuffisante pour induire le changement de fibres et la résistance à l'obésité<sup>238</sup>. Ceci concorde avec notre modèle où la diète HFD est nécessaire pour faire diverger les phénotypes des souches. Les AG que fournit la diète HFD activeraient le Ppar- $\delta$  de façon différentielle entre les souches.

Nous devons alors étudier le muscle du soléus, composé principalement de fibres de type-I, pour déterminer si les souches montrent une différence relative dans leur quantité de fibres musculaires de type-I versus de type-II. Les muscles des SHR pourraient être composés d'une plus grande quantité de fibres oxydatives que ceux des SHR.1N. Si cela est le cas, la différence physiologique pourrait être causée par une différence d'expression ou d'action de Ppar- $\delta$ . Nous pourrions aussi faire subir des tests physiques aux souches pour déterminer si elles montrent une endurance différentielle. Le tissu musculaire serait très intéressant à étudier.

### **7.5.2.3 Indices théoriques de l'implication du Ppar- $\delta$ dans des autres tissus:**

**7.5.2.3.1 Effet continu et/ou tardif ; effet de transdifférentiation de cellules non-adipocytaires:** Le Ppar- $\delta$  peut aussi moduler la transdifférentiation de certaines cellules non-adipocytaires (fibroblastes, myoblastes) en cellules apparentées aux adipocytes. Il est le médiateur à travers lequel les longues chaînes de AG inhibent la myogenèse des myoblastes et activent leur transdifférentiation en cellules similaires aux préadipocytes<sup>231</sup>. L'activation de Ppar- $\delta$  inhibe l'expression du facteur de détermination myogénique (MyoD)-1 et l' $\alpha$ -actine, abolit le développement de myotubes multi nucléés et induit l'expression de Ppar- $\gamma$ , le maître régulateur de l'adipogenèse; l'activation séquentielle de Ppar- $\delta$  et ensuite de Ppar- $\gamma$  est nécessaire<sup>231</sup>. La transdifférentiation cellulaire en adipocytes a été récemment démontrée dans le cœur humain, et l'apparition ectopique d'adipocytes serait plus fréquent que pensé originalement<sup>201</sup>. De plus, les agonistes de Ppar- $\delta$  favorisent l'absorption et l'emmagasinage des lipides dans les macrophages<sup>198</sup>. L'activation de Ppar- $\delta$  chez les SHR.1N pourrait provoquer plus de transdifférentiation. Leurs cellules non-adipocytaires acquerraient des caractéristiques adipocytaires accroissant leur capacité d'emmagasiner les graisses ectopiquement.

Ainsi, l'activation de Ppar- $\delta$  par la HFD (besoin d'emmagasinage lipidique accru) peut être bénéfique dans une souche (ex. induction de la  $\beta$ -oxydation; adipogenèse précoce) et plutôt destructive dans l'autre (induction de transdifférentiation; régulation à la baisse de protéines structurales) tout dépendant de la voie moléculaire induite et de la balance entre les facteurs de transcription dans les différents tissus. Le Ppar- $\delta$  peut induire plusieurs interactions moléculaires qui activent ou inhibent divers processus cellulaires déterminant le développement (ou non) de l'HTA associée à l'obésité.

## **7.6 Séquençage et analyse d'expression génique/protéique : Preuves de l'implication du Tnf- $\alpha$ et du Ppar- $\delta$ limitées à ce stade**

Au premier regard, nos résultats de séquençage et d'expression génique/protéique ne supportent pas l'implication des gènes candidats dans notre modèle. Parcontre, nos données globales provenant de l'analyse des profils d'expression génique suggèrent que l'activité des gènes Tnf- $\alpha$  et Ppar- $\delta$  puisse être différentielle entre les souches. L'expression de ces gènes est dynamique et temporelle. Il est possible qu'ils aient une régulation transitoire différentielle entre les souches ou bien qu'ils aient une faible différence de régulation à travers l'intervention diététique. Le séquençage et la quantification ici faits nous offrent qu'une image limitée des processus cellulaires mis en branle par la diète HFD surtout en considérant que la régulation de ces protéines est complexe<sup>227, 232</sup>. Nous ne pouvons à ce stade ségréger les effets précoces des effets continus et/ou tardifs des gènes.

### **7.6.1 Séquençage de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$**

Le séquençage de tous les exons et introns des deux gènes candidats principaux identifie plusieurs variations géniques entre les souches. Celles-ci parsèment surtout les régions régulatrices et promotrices pouvant influencer l'expression génique/protéique du Tnf- $\alpha$  et du Ppar- $\delta$ .

### **7.6.2 Expression génique de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$**

Les données obtenues par la technique de biopuce (avec des échantillons d'ARNm combinés par groupes expérimentaux) ne révèlent pas d'interaction souche-diète significative (1,8X) pour les deux gènes candidats. Les PCR en temps réel fait sur les ARNm, provenant d'animaux individuels, ne montrent pas plus d'interaction souche-diète.

Ces données ne sont pas surprenantes considérant qu'il est difficile de corrélérer un impact cellulaire défini aux changements d'expression génique de

facteurs de transcription et/ou de régulation. Leurs activités sont typiquement régulées à plusieurs niveaux (transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel). Par exemple, l'expression génique de Ppar- $\delta$  ne corrèle pas avec son expression protéique et varie grandement entre les divers tissus; l'efficacité de traduction des transcrits de Ppar- $\delta$  est grandement atténuée par le segment 5'UTR de l'ARNm<sup>241</sup>. Dans le muscle, le Ppar- $\delta$  subit une régulation nutritionnelle mais ses niveaux d'ARNm ne changent pas dans le cœur ou le tissu adipeux<sup>200</sup>. Ainsi, il devient important d'évaluer directement l'expression protéique des gènes candidats.

### **7.6.3 Expression protéique de Tnf- $\alpha$**

**7.6.3.1 Expression protéique de Tnf- $\alpha$  sérique :** Normalement, le Tnf- $\alpha$  sérique augmente avec le degré d'obésité<sup>168, 169</sup> mais cet effet n'est pas détecté dans notre étude. Le Tnf- $\alpha$  sérique est plus élevé chez les SHR.1N que les SHR mais ne montre pas d'effet de diète. La différence d'expression protéique entre les souches du Tnf- $\alpha$  sérique peut favoriser un état de base lipostatique plus important dans les SHR que les SHR.1N, menant à une accumulation intracellulaire de lipides plus limitée dans la souche SHR.

**7.6.3.2 Expression protéique de Tnf- $\alpha$  tissulaire :** L'expression protéique de Tnf- $\alpha$ , déterminée localement dans le tissu adipeux, montrent que l'expression protéique de Tnf- $\alpha$  local diminue significativement avec l'exposition à la diète HFD mais que son expression ne diffère pas entre les souches. Ces résultats concordent avec les données d'expression génique de Tnf- $\alpha$  locale recueillies dans notre étude préalable<sup>3</sup>. Par contre, la littérature décrit une hausse d'expression de Tnf- $\alpha$  dans le tissu adipeux avec le développement de l'obésité.

**7.6.3.2.1 Hypothèse reliée à l'infiltration de macrophages expliquant l'absence de hausse d'expression de Tnf- $\alpha$  tissulaire :** Une étude montre que la relâche de 90% des adipokines (Tnf- $\alpha$ , IL-6, VEGF, PAI-1) par le tissu adipeux, à l'exception de l'adiponectine et de la leptine, est attribuable aux cellules non-adipeuses<sup>116</sup>. En fait, les macrophages qui infiltrent le tissu adipeux sont une source majeure de ces facteurs inflammatoires. L'examen histologique des tissus adipeux des animaux rendus obèses par la diète HFD ne révèle pas la formation de couronnes de macrophages entourant les adipocytes. Le phénomène d'infiltration du tissu adipeux par les macrophages pourrait ne pas affecter les souches ici à l'étude. Ceci expliquerait le manque d'augmentation tissulaire locale de Tnf- $\alpha$ . Cependant, cette hypothèse doit être confirmée par des techniques de marquages afin d'identifier la présence ou non de macrophages infiltrants.

Ceci dit, la baisse d'expression protéique du Tnf- $\alpha$  détectée à la fin de l'intervention diététique n'exclut pas la possibilité que la protéine subisse une hausse d'expression transitoire suite à l'hypertrophie initiale. Ainsi, l'hypothèse décrite plus haut reste à ce point de l'étude encore potentiellement valide.

#### **7.6.4 Expression protéique de Ppar- $\delta$**

Due à des limites techniques, l'expression protéique de Ppar- $\delta$  a dû être évaluée par la technique d'immunodétection «Western», une technique à la base quantitative. Par contre, cette méthode ne semble pas optimale pour quantifier ce facteur de transcription; il se peut que sa quantité cellulaire soit plutôt faible ou qu'il soit difficilement séparé des lipides. L'extraction de protéines à partir de tissu adipeux est particulièrement inefficace puisque le procédé peut être gêné par la haute composition lipidique de ce tissu.

Idéalement, une détection quantitativement plus précise pourrait se faire par la mise au point de la méthode ELISA. Plus sensible, cette technique pourrait réduire l'erreur standard et révéler (si cela est le cas) des différences inter-

souches statistiquement significatives. La quantité relative du Ppar- $\delta$  trouvée dans la fraction nucléaire ou cytoplasmique pourrait aussi être déterminée; ce facteur de transcription pourrait avoir une dynamique de translocation nucléaire différente entre les souches à travers les changements nutritionnelles.

### **7.6.5 Limites de l'analyse de l'expression génique/protéique pour les gènes de Tnf- $\alpha$ et Ppar- $\delta$**

Il est reconnu que des changements subtils d'expression de protéines de récepteurs nucléaires mènent à des altérations des paramètres biochimiques marquées<sup>242</sup>. Les différences phénotypiques observées entre les souches (adiposité, tolérance au glucose, et PA) pourraient résulter d'effets cumulatifs de petites différences d'expression des gènes difficilement détectables sans étude longitudinale.

De plus, cette présente étude analyse l'expression génique/protéique seulement dans un état nutritionnel général de post-absorption. En effet, les rats avaient libre accès à leur nourriture durant la nuit avant le sacrifice et ils sont des animaux nocturnes. Le sacrifice est fait dans un état post-prandial afin d'assurer un état physiologique optimal pour la quantification de la leptine. Cependant, il est connu que l'expression protéique des gènes Tnf- $\alpha$  et Ppar- $\delta$  change selon l'état nutritionnel<sup>227, 232</sup>. Par exemple, la protéine du Ppar- $\delta$  devient plus exprimée dans le muscle en état de jeûne alors que son expression diminue au taux basale lors de la prise alimentaire<sup>200</sup>. Nos données d'expression protéique sont à date recueillies seulement dans un état nutritionnel post prandial. Il reste à vérifier si l'expression protéique devient différentielle dans un état de jeûne.

Comme expliqué plus haut, il est très plausible que les souches montrent une différence d'expression génique et/ou protéique dynamique et temporelle selon l'état nutritionnel. Ainsi, des études longitudinales dans le temps devront être faites pour suivre la dynamique de l'expression des deux gènes candidats à travers le changement d'état nutritionnel. Pour venir à disséquer l'architecture génique de notre modèle dynamique, il est important d'évaluer comment la

génétiq ue sous-jacente des souches influence la régulation des protéines qui est induites par l'état nutritionnel.

## **7.7 Ouverture**

Le segment différentiel du chromosome contient plusieurs gènes (Annexe : tableau supplémentaire 2). Ainsi, d'autres gènes peuvent jouer un rôle dans le développement de l'HTA associée à l'obésité dans notre modèle. Il faut surtout considérer que des interactions de potentialisation ou de synergie peuvent survenir entre les gènes trouvés dans le segment et créer toute la gamme de cascades moléculaires qui mènent aux physiopathologies observées telles que l'augmentation prononcée de la taille adipocytaire, de l'adiposité, de l'intolérance au glucose et de la PA. Ainsi, pour répondre à ces interrogations, des souches congéniques, contenant un segment chromosomique différentiel plus restreint, seront créées et étudiées. Ces animaux seront exposés au même type d'intervention diététique mais de courte ou de longue durée afin d'éclaircir les mécanismes mis en place de façon précoce ou tardive.

# CONCLUSION

## CHAPITRE 8

En conclusion, les résultats de la présente étude suggèrent que le segment RNO20 régule la taille adipocytaire, potentiellement via ses effets sur la lipogenèse, le cytosquelette d'actine, la relâche de glycérol, l'oxydation des AG et la dissipation d'énergie. La taille adipocytaire plus grande observée dans les SHR.1N comparativement aux SHR peut représenter un mécanisme sous-jacent à l'HTA associée à l'obésité dans notre modèle expérimental. Ceci est parce que les adipocytes de grande taille plutôt que ceux de petite taille relâchent des signaux moléculaires pouvant augmenter la PA à travers leurs effets sur l'induction du SNS, du RAAS, de la résistance à l'insuline/hyper insulinémie et d'un état proinflammatoire/ prothrombotique. En concordance, la taille adipocytaire augmentée observée chez les SHR.1N comparativement au SHR est associée à une élévation du taux de leptine circulant (un activateur du SNS) et de la PA.

Deux gènes candidats soit le Tnf- $\alpha$  et le Ppar- $\delta$  sont suspectés de provoquer la régulation différentielle entre les souches des processus cellulaires déterminant la taille adipocytaire et ultimement le développement de l'HTA associée à l'obésité. Plusieurs indices théoriques découlant de la littérature supportent l'implication de ces gènes dans notre modèle. Par contre, l'identification de variantes génétiques contenues à l'intérieur du segment RNO20 capables d'induire ses effets requièrent des études plus approfondies.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Pausova Z, Tremblay J, Hamet P. Gene-environment interactions in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:42-50.
- (2) Tillotson JE. America's obesity: conflicting public policies, industrial economic development, and unintended human consequences. *Annu Rev Nutr* 2006;24:617-43.
- (3) Pausova Z, Sedova L, Berube J, Hamet P, Tremblay J, Dumont M, Gaudet D, Pravenec M, Kren V, Kunes J. Segment of rat chromosome 20 regulates diet-induced augmentations in adiposity, glucose intolerance, and blood pressure. *Hypertension* 2003;41:1047-55.
- (4) Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J Anim Sci* 2004;82:935-41.
- (5) Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006 January 1;15:173-8.
- (6) Pausova Z, Jomphe M, Houde L, Vezina H, Orlov SN, Gossard F, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Cowley AW, Bouchard G, Hamet P. A genealogical study of essential hypertension with and without obesity in French Canadians. *Obes Res* 2002;6:463-70.
- (7) Marieb EN. The human body: an orientation - Maintaining life. *Human anatomy & Physiology*. 6 ed. Benjamin Cummings; 2003. p. 1-42.
- (8) Despres JP, Tremblay A, Theriault G, Perusse L, Leblanc C, Bouchard C. Relationships between body fatness, adipose tissue distribution and blood pressure in men and women. *J Clin Epidemiol* 1988;41:889-97.
- (9) Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ* 2001;322:716-20.
- (10) Lemieux I, Pascot A, Couillard C, et al. Hypertriglyceridemic waist: a marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense, LDL) in men? *Circulation* 2000;102:179-84.
- (11) Davy KP, Hall JE. Obesity and hypertension: two epidemics or one? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R803-R813.

- (12) Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton MN, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001;294:2166-70.
- (13) Grundy SM, Brewer B, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-8.
- (14) Eaton SB, Konner M, Shostak M. Stoneagers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am J Med* 1988;84(4):739-49.
- (15) Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *New Engl J Med* 1990;322:1477-82.
- (16) Kern PA. Potential role of TNF $\alpha$  and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr* 1997;127:1917S-22S.
- (17) Khoury MJ, Wagener DK. Epidemiological evaluation of the use of genetics to improve the predictive value of disease risk factors. *Am J Hum Genet* 1995;56:835-44.
- (18) Lawrence VJ, Kopelman PG. Medical consequences of obesity. *Clin in dermatol* 2004;22(4):296-302.
- (19) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
- (20) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2006;365(9468):1415-28.
- (21) Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 2002;23:201-29.
- (22) Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989;38:1595-601.
- (23) Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003;46:1297-312.
- (24) Boucher A, Lu D, Burgess SC, et al. Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue. *J Biol Chem* 2004;279:27263-71.

- (25) Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, et al. Free fatty acid induced beta cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J Biol Chem* 2004;279:15049-56.
- (26) Aubert H, Frere C, Aillaud MF, Morange PE, Juhan-Vague I, Alessi MC. Weak and non-independent association between plasma TAFI antigen levels and the insulin resistance syndrome. *J Thromb Haemost* 2003;1:791-7.
- (27) Marks DB. Lipid Metabolism. In: Nieginski EA, Kelley SE, eds. *Biochemistry*. 2nd ed. Harwal Publishing; 1994. p. 185-221.
- (28) Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Welle B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest* 1995;95:158-66.
- (29) Halle M, Berg A, Baumstark MW, Konig D, Huonker M, Keul J. Influence of mild to moderately elevated triglycerides on low density lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy men with low high density lipoprotein cholesterol levels. *Artherosclerosis* 1999;143:185-92.
- (30) Kwiterovich Jr PO. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol* 2002;90:30i-47i.
- (31) Phillips DI, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, Frayn KN, Borthwick AC, Taylor R. Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 1996;45:947-50.
- (32) Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelly DE. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 1997 January 1;46:1579-85.
- (33) Kruck F, Petersen KF, Bergeron R, Price T, Laurent D, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. Intramuscular glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: a <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:748-54.
- (34) Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;(I):785-9.
- (35) Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998;19:A13-A35.

- (36) van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during acute phase response: loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-67.
- (37) Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 2 and 3. *J Lipid Res* 2000;41:1495-508.
- (38) National institutes of health, National institute of Heart, National institutes of lung, National institute of blood. Detection, evaluation, and treatment of high blood Cholesterol in adults (Adult treatment panel III) Final report. 2002. Report No.: 02-5215.
- (39) Sutherland J, Mckinnley B. The Metabolic Syndrome and Inflammation. *Metab Syndr Rel Disord* 2004;2:82-104.
- (40) Fernandez-Real JM, Ricart W. Insuline resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:278-301.
- (41) Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.
- (42) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
- (43) Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-30.
- (44) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
- (45) Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rosseti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108:1875-81.
- (46) Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:281-9.

- (47) Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the United states, 1988-2000. *JAMA* 2003;290(199):206.
- (48) Masuo K, Makami H, Ogihara T, Tuck ML. Weight Gain-Induced Blood Pressure Elevation. *Hypertension* 2000;35:1135-40.
- (49) Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study. *Prev Med* 1987 January 1;16:235-51.
- (50) Dyer AR, Liu K, Walsh M, Kiefe C, Jacobs Jr DR, Bild DE. Ten-year incidence of elevated blood pressure and its predictors: the CARDIA study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *J Hum Hypertens* 1999;13:13-21.
- (51) Huang Z, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA. Body weight, weight change, and risk for hypertension in women. *Ann Intern Med* 1998;128(2):81-8.
- (52) Juhaeri J, Stevens J, Chambless LE, Tyroler HA, Rosamond W, Nieto FJ, Schreiner P, Jones DW, Arnett D. Association between weight gain and incident hypertension in a bi-ethnic cohort: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26(1):58-64.
- (53) Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension* 2003;42:878-84.
- (54) Staessen J, Fagard R, Amery A. The relationship between body weight and blood pressure. *J Hum Hypertens* 1988;2(4):207-17.
- (55) Jones DW, Kim JS, Andrew ME, Kim SJ, Hong YP. Body mass index and blood pressure in Korean men and women: the Korean National Blood Pressure Survey. *J Hypertens* 1994;12(12):1433-7.
- (56) Narkiewicz K. Diagnosis and management of hypertension in obesity. *Obes Rev* 2006;7(2):155-62.
- (57) Abate NI, Mansour YH, Tuncel M, Arbique D, Chavoshan B, Kizilbash A, Howell-Stamley T, Vongpatanasin W, Victor RG. Overweight and sympathetic overactivity in black Americans. *Hypertension* 2001;38:379-83.
- (58) Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, Davy KP. Sympathetic Neural Activation in Visceral Obesity. *Circulation* 2002;106:2533-6.

- (59) Esler M, Rumantir M, Kaye D, Lambert G. The sympathetic neurobiology of essential hypertension: disparate influences of obesity, stress, and noradrenaline transporter dysfunction? *Am J Hypertens* 2001;14:139S-46S.
- (60) Roumantir MS, Vaz M, Jennings GL, Collier G, Kaye DM, Seals DR, Wiesner GH, Brunner-La Rocca HP, Esler MD. Neural mechanisms in obesity-related hypertension. *J Hypertens* 1999;17:1125-33.
- (61) Huggett RJ, Burns J, Mackintosh AF, Mary DA. Sympathetic neural activation in non-diabetic metabolic syndrome and its further augmentation by hypertension. *Hypertension* 2004 January 1;44:847-52.
- (62) Haynes WG. Role of leptin in obesity-related hypertension. *Exp Physiol* 2005 January 1;90:683-8.
- (63) Rahmouni K, Correia MLG, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension* 2005 January 1;45:9-14.
- (64) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Krauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-5.
- (65) Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-37.
- (66) Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens* 2001;14:103S-15S.
- (67) Haynes WG, Morgan DA, Djalali A, Sivitz WI, Mark AL. Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* 1990 January 1;33 [part II]:542-7.
- (68) Tallam LS, Stec DE, Willis MA, da Silva AA, Hall JE. Melanocortin-4 receptor-deficient mice are not hypertensive or salt-sensitive despite obesity, hyperinsulinaemia, and hyperleptinaemia. *Hypertension* 2005 January 1;46:326-32.
- (69) Correia MLG, Morgan DA, Mitchell JL, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG. Role of corticotrophin-releasing factor in effects of leptin on sympathetic nerve activity and arterial pressure. *Hypertension* 2001 January 1;38:384-8.
- (70) Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:398-403.

- (71) Cases JA, Gabriely I, Ma XH, et al. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. *Diabetes* 2001;50:348-52.
- (72) Seufert J. Leptin effects on the pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004;53:S152-S158.
- (73) Landsberg L. Insulin sensitivity in the pathogenesis of hypertension and hypertensive complications. *Clin Exp Hypertens* 1996;18:337-46.
- (74) Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and Associated Metabolic Abnormalities - The role of insulin Resistance and the Sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996;334:374-81.
- (75) Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987;317:350-7.
- (76) Muntzel M, Morgan DA, Mark AL, Johnson AK. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 1994 January 1;267:R1350-R1355.
- (77) Muntzel M, Beltz T, Mark AL, Johnson AK. Anteroventral third ventricle lesions abolish lumbar sympathetic responses to insulin. *Hypertension* 1994 January 1;23:1059-62.
- (78) Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest* 1991;87:2246-52.
- (79) Sawicki PT, Baba T, Berger M, Starke A. Normal blood pressure in patients with insulinoma despite hyperinsulinemia and insuline resistance. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:S64-S68.
- (80) Scherrer U, Owlya R. Sympathetic-Nerve Activity before and after Resection of an Insulinoma. *N Engl J Med* 1996;335:1240-2.
- (81) Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependant. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994;94:1172-9.
- (82) DeFronzo RA, Cooke RC, Anders R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man. *J Clin Invest* 1975;55:845-55.

- (83) Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Liu X, Sigmund CD, Mark AL, Haynes WG. Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *J Clin Invest* 2004 January 1;114:652-8.
- (84) Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 2000;247:425-31.
- (85) Kuroda S, Uzu T, Fujii T, et al. Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 1999;13:257-62.
- (86) Hall JE. Pathophysiology of obesity hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000;2:139-47.
- (87) Hall JE. The kidney, Hypertension, and Obesity. *Hypertension* 2003;41:625-33.
- (88) Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Inoue S, Ishii M. Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* 1997;10(6):629-33.
- (89) Cooper R, McFarlane AN, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forester T. ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 1997 January 1;11:107-11.
- (90) Goodfriend TL, Kelly DE, Goodpaster BH, Winters SJ. Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obes Res* 1999 January 1;7:355-62.
- (91) Grossman E, Eshkol A, Rosenthal T. Diet and weight loss: their effect on norepinephrine renin and aldosterone levels. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1985;9:107-14.
- (92) Reisin E, Frohlich ED. Effects of weight reduction on arterial pressure. *J Chronic Dis* 1982;35:887-91.
- (93) Sowers JR, Nyby M, Stern N, Berk F, Baron S, Catania R, Vlachis N. Blood pressure and hormone changes associated with weight reduction in the obese. *Hypertension* 1982;4:686-91.
- (94) Reisin E, Weir MR, Falkner B, Hutchinson HG, Anzalone DA, Tuck ML. Lisinopril versus hydrochlorothiazide in obese hypertensive patients: a multicenter placebo-controlled trial. Treatment in Obese Patients With Hypertension (TROPHY) Study Group. *Hypertension* 1997;30:140-5.

- (95) Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1992;262:E763-E778.
- (96) Matsukawa T, Gotoh E, Minamisawa K, Kihara M, Ueda S, Shionoiri H, Ishii M. Effects of intravenous infusions of angiotensin II on muscle sympathetic nerve activity in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1991;261:R690-R696.
- (97) Miyajima E, Shigemasa T, Yamada Y, Tochikubo O, Ishii M. Angiotensin II blunts, while angiotensin converting enzyme inhibitor augments, reflex sympathetic inhibition in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:797-802.
- (98) Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Trevano FQ, Bombelli M, Scopelliti F, Facchini A, Mancia G, CROSS Study. Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals: results of the CROSS study. *J Hypertens* 2003;21(9):1761-9.
- (99) Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:1270-7.
- (100) van Harmelen V, Elizalde M, Ariapart P, Bergstedt-Lindvist S, Reynisdottir S, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringmann S, Arner P. The association of human adipose angiotensinogen gene expression with abdominal fat distribution in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:673-8.
- (101) Massiera F, Bloch-Faure M, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 2001 January 1;15:2727-9.
- (102) Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MGF, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure. *J Clin Invest* 2003 January 1;112:83-90.
- (103) Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. *Hypertension* 2004 January 1;44:248-52.
- (104) Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg R. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 January 1;86:355-62.

- (105) Keaney JF Jr, Larson DF, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 January 1;23:434-9.
- (106) Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002 January 1;26:1159-64.
- (107) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004 January 1;114:1752-61.
- (108) Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005 January 1;8:347-54.
- (109) Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes* 2001;50:159-65.
- (110) Luscher T, Boulanger C, Yang Z, Noll G, Dohi Y. Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and cardiovascular disease. *Circulation* 1993;87:V36-V44.
- (111) Wu K, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996;47:315-31.
- (112) Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 2003;11:1278-89.
- (113) Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini F, Bosello O, Lechi A. Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:936-42.
- (114) Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2548-56.
- (115) Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, MacDonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:875-88.
- (116) Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and

adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-82.

- (117) Gregoire F. Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell. *Exp biol med* 2001;226(11):997-1002.
- (118) Li J, Yu X, Pan W, Unger RH. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E1334-E1341.
- (119) Yang X, Jansson PA, Nagaev I, Jack MM, Carvalho E, Stibrant-Sunnerhagen K, Cam MC, Cushman SW, Smith U. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem Biophys Res Com* 2004;317:1045-51.
- (120) Guo K-Y, Halo P, Leibel RL, Zhang Y. Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 January 1;287:R112-R119.
- (121) Farnier C, Krief S, Blache M, Diot-Dupuy F, Mory G, Ferre P, Basin R. Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003 January 1;27:1178-86.
- (122) Löfgren P, Andersson I, Adolfsson B, Leijonhufvud B-M, Hertel K, Hoffstedt J, Arner P. Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in post-obese state. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 January 1.
- (123) Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moniwa N, Murakami H, Higashiura K, Shimamoto K. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *J Hypertens* 2004 January 1;22:1977-82.
- (124) Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M, Guerre-Millo M, Moustaid-Moussa N, Ferre P, Quignard-Boulangue A. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipocyte cell size and protects from diet induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2005 January 1;54:991-9.
- (125) Mark AL, Correia M, Morgan DA, Shaffer RA, Haynes WG. Obesity-induced hypertension: new concepts from the emerging biology of obesity. *Hypertension* 1999;33:537-41.
- (126) Mertens I, Van Gaal LF. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev* 2002;3:85-101.

- (127) Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54:2277-86.
- (128) Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance, and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004 January 1;28([Suppl 4]):S12-S21.
- (129) Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 January 1;89:463-78.
- (130) Skurk T, van Harmelen V, Blum WF, Hauner H. Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res* 2005;13:969-73.
- (131) Le Lay S, Krief S, Farnier C, Lefrere I, Le Liepvre X, Bazin R, Ferre P, Dugail I. Cholesterol, a cell size dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J Biol Chem* 2001 January 1;276:16904-10.
- (132) Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 January 1;25:2062-8.
- (133) Grunfeld C, Zhao C, Fuler J, Pollock A, Moser A, Friedman J, Feingold K. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product in hamsters: a role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* 1990 January 1;97:2152-7.
- (134) Zumbach MS, Boehme MWJ, Wahl P, Stremmel W, Zeigler R, Nawroth PP. Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 January 1;82:4080-2.
- (135) Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophages: evidence of plasticity. *J Biol Chem* 2003 January 1;278:9850-5.

- (136) Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003;113:147-58.
- (137) Liu J, DeYoung SM, Zhang M, Cheng A, Saltiel AR. Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metabol* 2005 January 1;2:165-77.
- (138) Dobbins RL, Szcapaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes* 2005 January 1;50:123-9.
- (139) Perseghin G, Scifo P, Danna M, Battezzati A, Benedini S, Meneghini E, Del Maschio A, Luzi L. Normal insulin sensitivity and IMCL content in overweight humans are associated with higher fasting lipid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 January 1;283:E556-E564.
- (140) Zurlo F, Lillioja S, Esposito-Del Puente A, Nyomba BL, Raz I, Saad MF, Swinburn BA, Knowler WC, Bogardus C, Ravussin E. Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. *Am J Physiol* 1990 January 1;259:E650-E657.
- (141) Tiraby C, Langin D. Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 2003 January 1;14:439-41.
- (142) Wang X-Y, Lee C-H, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003 January 1;113:159-70.
- (143) Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;[Epub ahead of print].
- (144) Rocchini AP. Cardiovascular regulation in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 1992;(19):156-160.
- (145) Frohlich ED. Clinical management of the obese hypertensive patient. *Cardiol Rev* 2002;10(3):127-38.
- (146) Hall J, Zappe D, Alonso-Galicia M, Granger J, Brands M, Kassab S. Mechanism of obesity-induced hypertension. *News Physiol Sci* 1996;11:255-61.

- (147) Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 2001;321:225-36.
- (148) Wofford MR, Hall JE. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. *Curr Pharm Des* 2004;10(29):3621-37.
- (149) Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:305-13.
- (150) Christoffersen C, Nielsen LB, Andersen CB, Goetze JP, Bartels ED, Lindegaard ML, Bollano E. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 2003;144:3483-90.
- (151) Szczepaniak LS, Dobbins RL, Metzger GJ, Sartoni-D'ambrosia G, Arbique D, Vongpatanasin W, Unger R, Victor RG. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med* 2003;49(3):417-23.
- (152) Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* 2001;276(18):14890-5.
- (153) Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 2003;65:333-47.
- (154) Bosma RJ, Krikken JA, Homan van der Heide JJ, De Jong PE, Navis GJ. Obesity and renal hemodynamics. *Contrib Nephrol* 2006;151(184):202.
- (155) Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsh J, Gafter U. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol renal Physiol* 2000;278:F817-F822.
- (156) Rice T, Province M, Pérusse L, Bouchard C, Rao DC. Cross-trait familial resemblance for body fat and blood pressure: familial correlations in the Québec family study. *Am J Hum Genet* 1994;55:1019-29.
- (157) Allison DB, Heshka S, Neale MC, Tishler PV, Heymsfield SB. Genetic, environmental, and phenotypic links between body mass index and blood pressure among women. *Am J Med Genet* 1995;55:335-41.
- (158) Arner P. The b3-adrenergic receptor - a cause and cure of obesity? *New Engl J Med* 1995;333:382-3.
- (159) Giacobino J-P. Beta3-adrenoreceptor. *Eur J Endocrinol* 1995;132:377-85.

- (160) Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the b3-adrenergic gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 1995;333:348-51.
- (161) Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nature Gen* 1998;18:45-48.
- (162) Benjafeld AV, Jeyasingam CL, Nyholt DRGLR, Morris BJ. G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:1094-97.
- (163) Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, Sharma A.M. G-protein beta3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33:1049-51.
- (164) Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter DN, Cook DG, Cappuccio FP. Association between the C825T polymorphism in the G-protein beta3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 1999;34:1193-1196.
- (165) Moxham C.M., Hod Y, Malbon CC. Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science* 1993;260:991-995.
- (166) Siffert W, Naber C, Walla M, Ritz E. G-protein beta3 subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. *J Hypertens* 1999;17:1095-98
- (167) Spiegelman BM, Hotamisligil GS. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNFa. *Cell* 1993;73:625-7.
- (168) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-a: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
- (169) Saghizadeh M, Ong JM, Barvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNFa by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97:1111-6.
- (170) Price SR, Olivecrona T, Pekala PH. Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by cachectin. *Biochem J* 1986;240:601-4.

- (171) Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science* 1985;229(4716):867-9.
- (172) Pape ME, Kim K-H. Transcriptional regulation of acetyl coenzyme A carboxylase gene expression by tumor necrosis factor in 30A-5 preadipocytes. *Mol Cell Biol* 1989;9:974-82.
- (173) Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997;46:1939-44.
- (174) Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 1994;389:610-4.
- (175) Ventre J, Doebber T, Wu M, Macnaul K, Stevens K, Pasparakis M, Kollias G, Moller DE. Targeted disruption of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene-metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 1997;46:1526-31.
- (176) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409-15.
- (177) Norman RA, Bogardus C, Ravussin E. Linkage between obesity and a marker near the tumor necrosis factor- $\alpha$  locus in Pima Indians. *J Clin Invest* 1995;96:158-62.
- (178) Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernandez-Castaner M, Vendrell J, Richart C, Soler J. The TNF- $\alpha$  gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 1997;46:1468-72.
- (179) Nyui N, Tamura K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Ochiai H, Miyazaki N, Umemura S, Ishii M. Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:859-67.
- (180) Pausova Z, Kunes J, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Tremblay J, Hamet P. Contribution of the TNF  $\alpha$  gene region of rat chromosome 20 to the body temperature response to endotoxin. *Transplant Proc* 1999;31:1622-3.
- (181) Hallenbeck JM, Dutka AJ, Vogel SN, Heldman E, Doron DA, Feuerstein G. Lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor activity in rats with and without risk factors for stroke. *Brain Res* 1991;541:115-20.

- (182) Siren A-L, Heldman E, Doron D, Lysko PG, Yue T-L, Liu Y, Feuerstein G, Hallenbeck JM. Release of proinflammatory and prothrombotic mediators in the brain and peripheral circulation in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Stroke* 1992;23:1643-51.
- (183) Liu Y, Liu T, McCarron RM, Spatz M, Feuerstein G, Hallenbeck JM, Siren AL. Evidence for activation of endothelium and monocytes in hypertensive rats. *Am J Physiol* 1996;270:H2125-H2131.
- (184) Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998;31:643-8.
- (185) Winkler G, Lakatos P, Salamon F, Nagy Z, Speer G, Kovacs M, Harnos G, Dworaks O, Cseh K. Elevated serum TNF- $\alpha$  level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabetic Med* 1999;16:207-11.
- (186) Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:163-7.
- (187) Brasier AR, Li J, Wimbish KA. Tumor necrosis factor activates angiotensinogen gene expression by the Rel A transactivator. *Hypertension* 1996;27(4):1009-17.
- (188) Herrmann S-M, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets J-B, Luc G, Bara L, Parra H-J, Poirier O, Cambien F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor- $\alpha$  gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 1998;28:59-66.
- (189) Pausova Z, Deslauriers B, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Larochelle P, Cowley AW, Hamet P. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2000;36:14-9.
- (190) Sookoian SC, Gonzalez C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor  $\alpha$  gene variant and the phenotypes associated with the metabolic syndrome. *Obes Res* 2005;13(12):2122-31.
- (191) Pravenec M, Klir P, Kren V, Zicha J, Kunes J. An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens* 1989;7:217-22.
- (192) Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factors- $\alpha$ . *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:447-55.

- (193) Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:S53-S55.
- (194) Medina EA, Stanhope KL, Mizuno TM, Mobbs CV, Gregoire F, Hubbard NE, Erickson KL, Havel PJ. Effects of tumor necrosis factor alpha on leptin secretion and gene expression: relationship to changes of glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:896-903.
- (195) Pape ME, Kim K-H. Effect of tumor necrosis factor on acetyl-coenzyme A carboxylase gene expression and preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol* 1988;2:395-403.
- (196) Cornelius P, Enerback S, Bjursell G, Olivecrona T, Pekala PH. Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumour necrosis factor. *Biochem J* 1988;249:765-9.
- (197) Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription *in vivo* reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : implications for insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:3176-88.
- (198) Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat Geo. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 2003;17(12):2477-93.
- (199) Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor: three isoforms for a multitude of functions. *Current Opinion in Biotechnology* 1999;10:564-70.
- (200) Grimaldi PA. Roles of PPAR- $\delta$  in the control of muscle development and metabolism. *Biochemical Society Transactions* 2003;31:1130-2.
- (201) Fredenrich A, Grimaldi PA. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  in skeletal muscle function and adaptation. *Current Opinion Clin Nutr Metab Care* 2004;7:377-81.
- (202) Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi PA. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2004;1740:313-7.
- (203) Lemay DG, Hwang DH. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *Journal of lipid research* 2006;47:1583-7.

- (204) Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 2000;289:950-3.
- (205) Spiegelman BM, Farmer SR. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 1982 January 1;29:53-60.
- (206) Correia MLG, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: evidence from Agouti yellow obese mice. *Diabetes* 2002;51:439-42.
- (207) Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity-hypertension. *Diabetes* 2005 January 1;54:2012-8.
- (208) Fried SK, Zechner R. Cachectin/tumour necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J Lipid Res* 1989;30:1917-23.
- (209) Schmitz H-D, Bereiter-Hahn J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associates with actin filaments in serum deprived NIH 3T3 cell only. *Cell Biol Int* 2002 January 1;26:155-64.
- (210) Jbilo O, Ravint-Trillou C, Arnone MBI, Bribes E, Peleraux A, Penarier G, Soubrie P, Le Fur G, Galiegue S, Casellas P. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005 January 1;19:1567-79.
- (211) Tan N-S, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 20020 January 1;22:5114-27.
- (212) Storch J, Thumser AEA. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006;1486:28-44.
- (213) Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol Cell* 2005;97:479-86.
- (214) Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice. *J Biol Chem* 2005;280:15493-6.

- (215) Wu R, Lin M. Functional mapping - how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits. *Nature Reviews Genetics* 2006 January 1;7:229-37.
- (216) Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. Sustained hyperinsulinemia increases arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 1991;260:R764-R768.
- (217) Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 1992 January 1;12:207-33.
- (218) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001 January 1;7:211-28.
- (219) Teboul M, Gaillard D, Staccini L, Inadera H, Ez-Zoubir A, Grimaldi PA. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol Chem* 1995 January 1;270:28183-7.
- (220) Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBPalpha. *Proc Natl Acad Sci* 1995 January 1;92:9856-60.
- (221) Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 1995 January 1;9:168-81.
- (222) Ogata I, Saez CG, Greenwel P, Ponce Mde L, Geerts A, Leinwand LA, Rojkind M. Rat liver fat-storing cell lines express sarcomeric myosin heavy chain mRNA and protein. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993 January 1;26:125-32.
- (223) Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993 January 1;92:1795-804.
- (224) Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 2004 January 1;204:386-95.
- (225) Bose A, Guilherme A, Robida S, Nicoloro SMC, Zhou QL, Jiang ZY, Pomerleau DP, Czech MP. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature* 2002 January 1;420:821-4.
- (226) Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Parijs LK, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of

preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2002 January 1;51:1319-36.

- (227) Wu G, Brouckaert P, Olivecrona T. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF $\alpha$  is involved. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 January 1;286:E711-E717.
- (228) Wu G, Olivecrona G, Olivecrona T. Extracellular degradation of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *BMC Cell Biology* 2005 January 1;6:4-12.
- (229) Li Y-P, Schwartz RJ. TNF- $\alpha$  stimulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion. *FASEB J* 2001 January 1;15:1413-5.
- (230) Chen S-E, Gerkrn E, Zhang Y, Zhan Y, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li Y-P. Role of TNF- $\alpha$  signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005 January 1;289:C1179-C1187.
- (231) Holst D, Luquet S, Kristiansen K, Grimaldi PA. Roles of peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma in myoblast transdifferentiation. *Exp Cell Res* 2003 January 1;288:168-76.
- (232) Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, Grimaldi PA. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2003 January 1;1633:43-50.
- (233) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001 January 1;29:2002-7.
- (234) Welsh GI, Griffiths MR, Webster KJ, Page MJ, Tavaré JM. Proteome analysis of adipogenesis. *Proteomics* 2004 January 1;4:1042-51.
- (235) Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, Durand P, Naville D, Bégeot M. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 2003;144(11):4773-82.
- (236) Patel N, Rudich A, Khayat ZA, Garg R, Klip A. Intracellular segregation of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate by insulin-dependent actin remodeling in L6 skeletal muscle cells. *Molecular & Cellular Biologie* 2003;23(13):4611-26.
- (237) Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF $\alpha$  in adipocyte metabolism. *Cell & Developmental Biology* 1999;10:19-29.

- (238) Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Sassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor d controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J* 2003 January 1;(2299):2301.
- (239) Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR-d. *PLos Biol* 2004;2(10):1532-9.
- (240) Abou MJ, Yakubu F, Lin D, Peters JC, Atkinson JB, et al. Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats. *Am J Physiol* 1992;262:R684-R688.
- (241) Larsen LK, Amri EZ, Mandrup S, Pacot C, Kristiansen K. Genomic organisation of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor b/d gene: alternative promotor usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency. *Biochem J* 2002.
- (242) Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJA, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell death and differentiation* 2004;11:S126-S143.

## ANNEXE I

- A.1 Tableau supplémentaire 1 - Catégorisation des gènes montrant une régulation d'expression génique induite par la diète [*Supplementale table 1 – Categorized genes showing diet-induced changes in gene expression*]
- A.2 Tableau supplémentaire 2 – Liste de gènes présents dans le segment différentiel [*Supplementale table 2- List of genes present in the differential segment*]

## Supplemental Table 1

### Categorized genes showing diet-induced changes in gene expression

#### A. Genes downregulated by HFD in both strains

Lipogenesis						
probe	SHR/ ND	SHR/ HFD	1N/ ND	1N/ HFD	Gene ID	Gene name
average	3,80	0,62	5,38	0,90	Acac	acetyl-coenzyme A carboxylase
1367854_at	2,98	0,80	3,37	0,63	Acly	ATP citrate lyase
average	2,71	1,09	3,26	1,33	Alb	albumin
1377573_at	2,28	0,81	3,24	1,14	Ca5a	carbonic anhydrase V, mitochondrial
1388194_at	1,82	1,36	2,41	1,14	Dlat	dihydrolipoamide acetyltransferase
average	2,07	0,87	2,47	0,69	Fasn	fatty acid synthase
average	1,95	0,87	2,84	1,08	Glut4	facilitated glucose transporter, member 4
average	2,26	0,94	3,57	1,15	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
1368328_at	2,58	1,65	2,89	1,52	Gys2	glycogen synthase 2 (liver)
1369006_at	1,22	0,60	2,15	1,01	Hk2	hexokinase 2
average	4,14	0,97	6,83	0,92	Me1	malic enzyme 1
1370540_at	1,58	0,49	2,41	0,70	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1386917_at	2,09	1,15	2,74	1,09	Pc	pyruvate carboxylase
1383698_at	2,82	0,86	4,13	1,50	Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
1389473_at	2,51	1,16	1,82	1,09	Pgm1	phosphoglucomutase 1
1368674_at	2,14	1,13	2,66	0,95	Pygl	liver glycogen phosphorylase
1370020_at	2,08	0,95	2,85	1,06	Slc25a10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 10

Lipogenesis						
probe	SHR/ ND	SHR/ HFD	1N/ ND	1N/ HFD	Gene ID	Gene name
1375944_at	1,36	1,07	2,15	0,81	Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (predicted)
1388108_at	3,75	1,08	7,34	0,88	Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids
1389265_at	1,62	1,22	2,61	1,06	Gbe1	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1
1371388_at	1,86	1,34	2,98	1,05	Pdhd	~ to pyruvate dehydrogenase E1 component, beta, precursor
1368079_at	1,69	0,99	3,16	0,78	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
1386889_at	1,03	0,91	2,32	0,72	Scd2	stearoyl-CoA desaturase 2
1367773_at	1,97	1,23	3,38	1,09	Slc25a1	solute carrier family 25 (mitochondrial citrate transporter) member 1
1367789_at	1,62	1,23	2,41	1,01	Slc27a1	fatty acid transport protein
average	1,72	1,30	2,74	0,95	Sor1	~ to sortilin-related receptor, L
average	2,65	0,96	5,04	0,87	Tkt	transketolase

Actin-cytoskeleton						
probe	SHR/ ND	SHR/ HFD	1N/ ND	1N/ HFD	Gene ID	Gene name
1369928_at	45,92	0,08	18,90	8,69	Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle
1367962_at	72,31	1,23	22,22	6,93	Actn3	actinin alpha 3
1374677_at	4,47	1,01	1,51	0,99	Adss	~ to adenylosuccinate synthetase, muscle isotype
1370011_at	2,75	0,59	1,32	1,10	Ak1	adenylate kinase 1
1388306_at	5,49	1,02	3,02	1,27	Ampd1	myoadenylate deaminase (AMP deaminase)
1389398_at	3,20	1,21	1,68	1,27	Ank1	ankyrin 1, erythroid
1379884_at	2,76	1,06	1,42	1,41	Asph	~ to aspartate-beta-hydroxylase
1368108_at	42,85	0,73	17,15	6,20	Atp2a1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1
average	21,67	1,15	5,98	2,70	Calm	calmoduline
1388804_at	10,53	0,95	3,07	1,80	Casq2	~ to CAQC rat calsequestrin, cardiac muscle isoform precursor
average	25,50	0,88	7,72	3,60	Ckm	creatine kinase, muscle
1367782_at	14,96	0,80	6,21	2,39	Cox6a2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2 (heart)
1367600_at	2,18	0,99	1,34	0,87	Des	desmin
1367789_at	4,66	0,55	2,07	1,06	Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
1386907_at	29,04	0,93	6,85	3,35	Eno3	enolase 3 beta, muscle specific
1377499_at	4,40	0,32	2,58	0,40	Hrc	histidine rich calcium binding protein
1368252_at	5,92	1,06	2,74	2,00	Kbtbd10	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10
1381575_at	10,52	1,07	2,95	2,10	Lasp1	~ to LAS1 mouse LIM and SH3 domain protein 1
1387768_at	11,64	1,12	2,23	1,25	Mb	myoglobin
1370033_at	60,57	0,73	16,38	7,00	Mlc3	fast myosin alkali light chain
1387181_at	2,59	0,59	1,04	0,83	Myf6	myogenic factor 6 (herculin)
1370971_at	45,06	0,93	8,75	3,18	Myh1	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult
1370900_at	42,20	1,29	12,57	4,36	Myh4	~ to myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle
average	10,08	0,30	5,39	1,75	Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta

Table continued on next page

average	98,83	0,35	14,01	7,03	Myf2	myosin, light polypeptide 2
1367572_at	15,34	0,68	7,32	4,13	Myf3	myosin light chain 3, alkali, cardiac ventricles
1374895_at	8,66	1,11	0,69	0,21	Myom1	myomesin 1 (skelemin) 185kDa
1373130_at	5,86	0,90	2,75	1,51	Myom2	myomesin 2, skeletal muscle
1376227_at	6,57	0,87	3,04	1,47	Myoz1	~ to myozenin 1
1374951_at	2,12	1,07	1,42	1,28	Obscn	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
average	4,30	0,91	1,72	1,09	Pfkfb	phosphofructokinase, muscle
1367951_at	41,15	0,17	6,51	1,43	Pgam2	phosphoglycerate mutase 2
1370214_at	50,20	0,19	9,01	4,51	Pvalb	parvalbumin (calcium binding protein)
average	53,08	0,89	19,10	5,15	Pygm	glycogen phosphorylase, muscle
1390355_at	8,38	0,23	3,02	1,25	Ryr1	Ryanodine receptor 1, skeletal muscle
1370165_at	2,81	0,97	1,61	1,16	Smpx	small muscle protein, X-linked
1371746_at	4,18	0,42	2,10	1,16	Sri	~ to sarcalumenin
1372407_at	4,18	0,98	1,79	1,37	Tmod4	~ to tropomodulin 4
1367964_at	22,92	1,05	7,34	3,01	Tnni2	troponin I, skeletal, fast 2
1370412_at	4,44	0,31	2,33	1,04	Tnnt1	troponin T1, skeletal, slow
1371247_at	18,97	0,79	8,71	2,67	Tnnt3	fast skeletal TnT gene encoding troponin T isoforms
average	43,82	0,73	10,95	5,47	Tpm1	tropomyosin 1, alpha
1370198_at	5,85	1,11	2,00	1,86	Trdn	triadin
1372639_at	6,58	0,14	2,21	0,87	Trim54	tripartite motif-containing 54
1375518_at	23,17	0,39	9,44	3,67	Ttn	titin
1390766_at	2,32	1,11	1,20	1,11	Tuba	~ to tubulin alpha-8 chain (Alpha-tubulin 8)

#### B. Genes upregulated by HFD in both strains

Extracellular matrix and lipid metabolism						
probe	SHR/ND	SHR/HFD	1N/ND	1N/HFD	Gene ID	Gene name
1390850_at	0,54	2,39	0,34	1,77	Adrp	~ to ADFP_adipophilin (adipose differentiation-related protein)
1387032_at	1,01	2,30	0,96	2,31	Cck	cholecystokinin
1369677_at	0,42	1,87	0,49	2,64	Cnr1	Cannabinoid receptor 1
1370399_at	1,00	3,48	0,96	4,02	Cyp4b1	Cytochrome P450, subfamily IVB, polypeptide 1
1367660_at	0,83	7,86	0,62	6,59	Fabp3	fatty acid binding protein 3
1368187_at	0,52	1,82	0,37	2,00	Gpnmb	glycoprotein (transmembrane)
1368530_at	0,81	1,71	0,99	3,03	Mmp12	matrix metalloproteinase 12
1374863_at	0,98	1,85	0,90	2,27	Rbp1	~ to RET1_rat retinol-binding protein I, cellular

Extracellular matrix and amines						
probe	SHR/ND	SHR/HFD	1N/ND	1N/HFD	Gene ID	Gene name
1368347_at	1,32	2,05	0,99	2,42	Col5a3	collagen, type V, alpha 3
1371077_at	0,89	0,98	1,09	2,25	Htr3b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3b
1373911_at	0,99	1,75	0,87	2,00	Postn	~ to periostin, osteoblast specific factor
1367581_at	0,41	1,00	0,23	2,05	Spp1	osteopontin, secreted phosphoprotein 1
1369567_at	1,18	1,46	0,97	2,07	Tar1	trace amine receptor 1

FA oxidation and energy dissipation						
probe	SHR/ND	SHR/HFD	1N/ND	1N/HFD	Gene ID	Gene name
1368680_at	1,02	2,04	1,13	1,55	Acaa2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial)
1367735_at	1,13	2,05	1,16	1,40	Acadl	Acyl Coenzyme A dehydrogenase, long chain
1367702_at	1,02	2,16	0,94	1,22	Acadm	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight-chain
1387033_at	0,83	15,10	1,20	3,82	Ucp1	uncoupling protein 1

C. Genes with strain-differential HFD-induced regulation

Intracellular signalling						
probe	SHR/ND	SHR/HFD	1N/ND	1N/HFD	Gene ID	Gene name
1376239_at	1,46	0,33	0,89	2,41	Cabp1	R.norvegicus (Wistar) CaBP1
1370771_at	1,93	1,09	0,70	2,03	Cacng7	voltage-dependent calcium channel gamma-7 subunit
1369352_at	1,91	0,19	1,07	2,07	Hipk3	homeodomain-interacting protein kinase 3

Extracellular matrix, cell membrane and cytoskeleton						
probe	SHR/ND	SHR/HFD	1N/ND	1N/HFD	Gene ID	Gene name
1387100_at	4,30	16,96	4,97	0,17	Aqp3	aquaporin 3
1386947_at	0,95	3,78	0,26	0,11	Cdh1	Cadherin 1
1388547_at	0,70	3,11	1,31	0,15	Cldn4	claudin 4
1372153_at	1,43	4,07	1,64	0,52	Clk21	~ to A40452 keratin 21, type I, cytoskeletal
1370863_at	1,05	3,75	1,53	0,65	Clk5	Keratin (K5)
1373900_at	1,36	3,94	1,07	0,25	Clk8	~ to K2C8_rat keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8)
1387040_at	1,23	2,67	1,43	0,77	Mal	MAL protein gene
1371248_at	5,59	19,91	6,18	0,85	Sprr1	~ to CORA_rat comifin alpha (small proline-rich protein 1)
1388199_at	0,91	3,28	1,09	0,20	Tacstd1	Tumor-associated calcium signal transducer 1
1391509_at	1,42	5,74	1,51	0,71	Tacstd2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
1387565_at	0,61	2,04	0,78	0,41	Trpv6	transient receptor potential cation channel, subfamily 5, member 6

Others genes showing diet-induced changes in gene expression

A. Genes downregulated by HFD in both strains

probe	SHR/ND	SHR/HFD	1N/ND	1N/HFD	Gene ID	Gene name
1399054_at	1,48	1,43	2,24	1,06	-	ESTs
1391544_at	4,59	1,28	6,70	1,15	-	ESTs
1390636_at	1,72	1,02	2,28	0,99	-	ESTs
1390498_at	1,68	1,16	2,44	1,03	-	ESTs
1390339_at	2,15	1,07	1,31	1,08	-	ESTs
1390334_at	2,09	1,04	1,86	1,09	-	ESTs
1389673_at	2,31	0,69	1,87	1,11	-	ESTs
1389579_at	1,85	0,91	5,04	0,90	-	ESTs
1389462_at	2,22	0,22	1,66	1,19	-	ESTs
1388916_at	2,65	1,46	2,12	1,24	-	ESTs
1388741_at	18,18	0,45	3,74	0,75	-	ESTs
1387902_at	2,12	0,44	0,66	0,53	-	ESTs
1385889_at	2,00	0,09	2,25	1,95	-	ESTs
1377013_at	1,84	1,22	2,45	1,03	-	ESTs
1375055_at	4,91	0,58	2,86	1,42	-	ESTs
1374932_at	2,04	1,69	3,31	1,11	-	ESTs
1374271_at	1,68	1,29	2,13	1,00	-	ESTs
1372979_at	2,17	1,00	1,32	1,00	-	ESTs
1371927_at	6,82	1,04	3,09	1,67	-	ESTs
1390203_at	1,42	0,88	2,13	0,88	-	EST
1369385_at	1,12	0,99	2,19	1,00	Afap	actin filament associated protein
1371492_at	2,97	1,00	1,40	1,12	Apobec2	~ to apolipoprotein B editing complex 2
1387447_at	1,02	0,54	3,00	1,44	Art3	ADP-ribosylation factor 3
1386867_at	1,90	1,01	2,96	1,03	Brp44l	brain protein 44-like
1373085_at	2,28	1,17	3,03	1,01	Cbr3	~ to carbonyl reductase 3
1377528_at	1,24	0,61	3,21	1,07	Cd47	CD47 (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)
1369658_at	2,14	0,62	2,55	2,01	Cebpa	CAATenhancer-binding protein, DNA-binding protein
1388233_at	0,97	0,62	2,29	1,16	Cieh	cytokine-inducible SH2-containing protein
1398292_at	1,57	0,53	2,21	1,06	Cmkir1	chemokine-like receptor 1

Table continued on next page

1398321_a	2,35	0,23	1,02	0,69	Col12a1	collagen XII alpha 1
1371554_at	23,92	1,00	3,69	2,16	Cuzd1	CUB and zona pellucida-like domains 1
1387511_at	0,43	0,09	2,16	0,95	Cyp2a1	cytochrome P450 IIA1 (hepatic steroid hydroxylase IIA1)
1389079_at	3,62	0,97	1,79	1,64	Dhrs7c	~ to dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7C
1377184_at	1,00	0,61	2,04	1,12	Eaf1	~ to ELL associated factor 1
1371298_at	3,92	1,28	2,22	1,74	H19	H19 fetal liver mRNA (mapped)
1388080_a	7,01	0,85	8,07	1,07	Hrh3	histamine receptor H3
1369012_at	1,26	0,53	2,14	0,46	Inhba	inhibin beta-A
1374167_at	2,39	0,54	1,50	1,09	LOC361399	similar to autoantigen
average	12,45	0,83	2,17	1,02	Mbph	proteoglycan 3
1368815_at	3,76	1,65	1,94	1,34	Mpz	myelin protein zero
1376968_at	14,34	1,50	6,98	0,95	Mybpc2	~ to myosin binding protein C, fast-type
1387336_at	2,35	1,22	1,85	0,96	Nat8	N-acetyltransferase 8 (carnello like)
1387710_at	2,71	0,08	3,85	2,26	Oxtr	oxytocin receptor
1372745_at	5,10	1,18	2,24	1,46	Pdlim5	PDZ and LIM domain 5
1373108_at	2,35	1,18	1,20	0,68	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C
1370488_a	2,90	0,63	2,27	1,58	Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
1389449_at	2,55	0,89	1,93	1,19	RGD130691	~ to CG10671-like
1373920_at	2,62	1,28	1,52	1,41	RGD130784	~ to 106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein
1371763_at	2,13	1,35	3,02	1,11	RGD130953	~ to RIKEN cDNA 4931406C07
1389893_at	1,26	0,96	2,10	1,04	RGD131089	~ to hypothetical protein 3010020C06
1374017_at	2,78	1,31	1,38	0,76	RGD156277	~ to tripartite motif protein 50
1382892_a	1,76	1,07	2,13	0,93	RGD156500	~ to LOC443645 protein
1373873_at	2,16	1,13	1,33	1,25	RGD156532	~ to OTTMUSP00000000621
1368144_at	2,08	0,63	1,30	0,99	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
1376884_a	6,97	0,40	3,11	0,30	Rpl3l	~ to ribosomal protein L3-like
1372296_at	3,82	0,68	1,58	1,08	Sh3bgr	~ to putative SH3BGR protein
1387189_at	2,11	0,95	1,91	0,86	Slc22a3	solute carrier family 22, member 3
1376709_at	2,08	0,74	1,17	0,79	Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8
1377455_at	0,84	0,64	2,54	1,16	Slc6a11	solute carrier family 6 (GABA transporter), member 11
1367998_at	0,96	0,96	2,17	0,72	Slpi	secretory leukocyte protease inhibitor
1375121_at	1,34	0,86	2,12	1,02	Smad6	~ to MAD homolog 6 (Drosophila)
1372318_at	3,94	1,16	8,50	0,72	Snog	~ to NP_035560.1 synuclein, gamma
1369085_s	2,09	0,87	1,08	0,84	Snrpn	Rattus norvegicus SNRPN upstream reading frame
1389171_at	3,07	1,09	1,37	1,19	Tmem38a	~ to transmembrane protein 38a
1368132_at	1,38	1,09	2,09	1,11	Tob1	transducer of ERBB2, 1
1375031_at	3,56	1,06	2,91	1,06	Ttn	titin
1389436_at	2,52	0,22	1,06	0,57	Zmynd17	~ to zinc finger, MYND domain containing 17

B. Genes upregulated by HFD in both strains

probe	SHR/ ND	SHR/ HFD	1N/ ND	1N/ HFD	Gene ID	Gene name
1389118_s	0,62	3,34	0,38	0,41	-	~ to S113 mouse S100 calcium-binding protein A13
1392623_at	0,90	2,74	0,75	2,17	-	ESTs
1389809_at	0,93	2,29	0,98	1,88	-	ESTs
1376637_at	1,40	1,40	1,04	2,07	-	ESTs
1375934_at	0,54	2,12	0,32	1,50	-	ESTs
1368298_at	1,07	2,39	1,64	1,94	Adcy5	adenylate cyclase 5
1376900_at	0,83	2,08	1,00	1,43	Aptx	apratatin
1375043_at	1,02	2,11	0,39	0,96	c-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
1389166_at	0,78	2,02	1,01	1,46	Cib1	calcium and integrin binding family member 2
1367739_at	16,18	35,73	1,57	9,93	Cox8h	Cytochrome c oxidase subunit VIII-H (heart/muscle)
1371224_a	0,99	2,02	0,92	1,21	Drp2	dystrophin-related protein 2 A-form splice variant
1392467_at	0,86	2,06	1,34	1,67	Impa2	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphate 2
1379640_at	1,01	2,45	0,74	1,22	LOC316432	Ica69-related protein
1374594_at	0,78	2,16	0,66	1,33	LOC363060	~ to RIKEN cDNA 1600029D21

C. Genes with strain-differential HFD-induced regulation

probe	SHR/ ND	SHR/ HFD	1N/ ND	1N/ HFD	Gene ID	Gene name
1374434_at	1,29	2,98	1,67	0,73	-	~ to NP_079669.1 S100 calcium binding protein A14
1373352_at	1,35	3,68	1,53	1,22	-	~ to S113 mouse S100 calcium-binding protein A13
1390583_at	0,96	0,87	1,04	2,55	-	ESTs
1390574_at	1,30	2,35	0,82	0,80	-	ESTs
1389730_at	0,98	2,06	2,11	1,90	-	ESTs
1388921_at	0,91	2,09	1,31	0,96	-	ESTs
1376292_at	0,55	2,01	1,15	0,45	-	ESTs
1376062_at	0,97	2,45	0,90	0,59	-	ESTs
1374345_at	8,09	18,34	7,50	0,67	-	ESTs
1386869_at	0,99	2,99	2,85	0,45	Actg2	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
1375917_at	0,32	0,22	0,31	2,10	Gp49b	glycoprotein 49b
1368550_at	1,73	6,33	1,82	0,93	Hfh1	HNF-3/forkhead homolog-1
1388139_at	19,23	0,62	1,14	2,28	Myh4	~ to myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle

## Supplemental Table 2

Rat chromosome 20 (NC\_005119): 55M bp; 827 genes



**Homologous segment\***: 9M bp ; 430 genes

**Differential Segment\*\***: 21M bp; 536 genes

### List of genes annotated by NCBI found in differential segment\*\* (227)

Symbol	Description	Position		
		Start	Stop	Strand
Tmhe	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	19572	56039	+
Clic2_predicted	chloride intracellular channel 2 (predicted)	66518	81543	+
LOC502403	similar to Suppressor of variegation 4-20 homolog 2	85422	89911	+
LOC294165	similar to Elongation factor 2 (EF-2)	492207	498509	+
Dstn_predicted	destrin (predicted)	661337	663184	+
Ubd	ubiquitin D	1475944	1477895	-
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1	1554804	1577774	-
Mog	myelin oligodendrocyte glycoprotein	1601731	1611964	+
Zfp57	zinc finger protein 57	1612084	1617758	-
Znrd1	zinc ribbon domain containing, 1	1687850	1691468	+
Ppp1r11	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11	1694118	1697205	+
Rnf39	ring finger protein 39	1697530	1703019	-
Trim31_predicted	tripartite motif-containing 31 (predicted)	1746132	1757962	-
Trim10	tripartite motif-containing 10	1781953	1790843	-
Trim26	tripartite motif protein 26	1803841	1811269	-
Trim39	tripartite motif protein 39	2091969	2105824	+
Rpp21	ribonuclease P 21kDa subunit (human)	2106819	2108749	+
Gnl1	guanine nucleotide binding protein-like 1	2925741	2940921	-
Prr3	proline-rich polypeptide 3	2941164	2946284	+
Ppp1r10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	2970787	2984397	-
Mrps18b	mitochondrial ribosomal protein S18B	2985999	2992026	+
Ddx16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	3009751	3022942	-
Nrm	nurim (nuclear envelope membrane protein)	3035764	3039259	-
Mdc1	mediator of DNA damage checkpoint 1	3042985	3059237	-
Tubb5	tubulin, beta 5	3060265	3064720	+
Flot1	flotillin 1	3065782	3075543	-
Ler3	immediate early response 3	3076574	3077744	-
Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1	3202228	3214611	+
Gtf2h4	general transcription factor II H, polypeptide 4	3222308	3227915	+
Vars2l	valyl-tRNA synthetase 2-like	3228063	3238909	+
Clic1	chloride intracellular channel 1	3498935	3842473	-
Atp6v1g2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, V1 subunit G isoform 2	3626317	3628571	-
Nfkbil1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	3629241	3644222	+
Lta	lymphotoxin A	3657842	3659848	+
Tnf	<b>tumor necrosis factor superfamily, member 2</b>	<b>3661144</b>	<b>3662783</b>	<b>+</b>
Ltb	lymphotoxin B	3666524	3668369	-
Lst1	leucocyte specific transcript 1	3698568	3701486	+
Ncr3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	3701810	3707278	-

Genes in homologous segment\* (146)

Table continued on next page

Aif1	allograft inflammatory factor 1	3714428	3716325	+
Apom	apolipoprotein M	3754627	3757204	+
G4	G4 protein	3758031	3758912	-
Ly6g5b	lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B	3769818	3770754	+
Ly6g5c	epididymal secretory protein 8	3773183	3777262	-
G6f	G6f gene	3801118	3805988	+
Ly6g6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6E	3808707	3810443	-
Ly6g6d	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D	3813286	3816525	+
Ly6g6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	3817976	3820673	-
G6b	G6b protein	3821900	3823718	+
Ddah2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	3829768	3831770	-
Msh5	mutS homolog 5	3845815	3862015	+
LOC499403	similar to Ng23 protein	3862661	3864422	+
G7c	G7c protein	3863665	3874196	-
Vars2	valyl-tRNA synthetase 2	3874446	3889024	-
Hspa1b	heat shock 70kD protein 1B	3953956	3959552	+
Neu1	neuraminidase 1	3999751	4003659	-
Ng22	Ng22 protein	4005154	4021270	-
C2	complement component 2	4051146	4071909	+
Bf	B-factor, properdin	4072124	4077796	+
Rdbp	RD RNA-binding protein	4077795	4081558	-
Skiv2l	superkiller viralicidic activity 2-like	4084422	4093496	+
Dom3z	DOM-3 homolog Z	4093667	4095822	-
Stk19	serine/threonine kinase 19	4095978	4105509	+
Cyp21a1	cytochrome P450, subfamily 21A, polypeptide 1	4125357	4128518	+
Creb1	cAMP responsive element binding protein-like 1	4192185	4200108	-
Fkbp1	FK506 binding protein-like	4201108	4202576	-
Ppt2	palmitoyl-protein thioesterase 2	4225698	4234652	+
Agpat1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	4237798	4245723	-
Ager	advanced glycosylation end product-specific receptor	4250613	4253540	-
Pbx2	pre-B-cell leukemia transcription factor 2	4254010	4259185	-
Gpsm3	G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans)	4259883	4261744	-
Notch4	Notch homolog 4	4263205	4287312	-
C4-2	complement component 4, gene 2	4300724	4315878	+
Btnl8	butyrophilin-like 8	4403712	4415128	+
LOC502413	similar to envelope protein	4427024	4427299	-
Btnl7	butyrophilin-like 7	4437293	4447525	+
LOC294268	similar to butyrophilin-like protein	4471149	4524984	+
Btnl3	butyrophilin-like 3	4597078	4605122	-
Btnl2	butyrophilin-like 2 (MHC class II associated)	4616510	4625383	-
Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B	4770446	4784488	-
Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8	4786264	4789162	-
Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B	4790803	4800671	-
Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9	4801220	4806608	+
Brd2	bromodomain-containing 2	4864606	4871813	+
Col11a2	procollagen, type XI, alpha 2	4924452	4953310	-
Rxb	retinoid X receptor beta	4954336	4958641	-
Hsd17b8	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	4964860	4966855	+
Ring1	ring finger protein 1	4968251	4972149	+
Vps52	vacuolar protein sorting 52 (yeast)	5074501	5083217	-
Rps18	ribosomal protein S18	5083626	5087304	+
B3galt4	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4	5087884	5089425	+
Rab2l	RAB2, member RAS oncogene family-like	5100262	5108973	-
Tapbp	TAP binding protein	5109807	5117747	-
Znf297	zinc finger protein 297	5118098	5121235	-
Daxx	Fas death domain-associated protein	5122018	5126648	-
Kifc1	kinesin family member C1	5150810	5169264	+
Phf1	PHD finger protein 1	5170270	5175027	+

Table continued on next page

Ubash3a_predicted	ubiquitin associated and SH3 domain containing, A	9565528	9620362	+
Tsga2_predicted	testis specific gene A2 (predicted)	9633454	9688904	-
Slc37a1_predicted	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1 (predicted)	9689661	9745107	+
Pde9a	phosphodiesterase 9A	9815900	9901584	+
LOC499412	similar to WD repeat domain 4	9926481	9942109	-
Mipp65	MIPP65 protein	9951179	9960265	+
Pknox1_predicted	Pbx/knotted 1 homeobox (predicted)	9965848	10041511	+
Cbs	cystathionine beta synthase	10047636	10075520	-
Snf1lk	SNF1-like kinase	10280194	10291791	-
LOC499413	similar to heat shock transcription factor 2 binding protein	10368680	10454111	-
LOC361819	similar to pyridoxal kinase	10499343	10533821	-
Pdxk	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	10541656	10563199	+
Cstb	cystatin B	10576664	10578696	-
Nnp1_predicted	novel nuclear protein 1 (predicted)	10594258	10606945	+
Agpat3_predicted	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	10731300	10747787	+
Tmem1_predicted	transmembrane protein 1 (predicted)	10775111	10833146	+
C21orf33	homolog of zebrafish ES1	10851555	10859652	+
LOC499415	similar to B7-like protein GL50-B	10949433	10954929	-
Dnmt3l	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	10958957	10973422	-
Aire_predicted	autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy) (predicted)	10980089	10995913	+
Pfkl	phosphofructokinase, liver, B-type	11009359	11032511	+
LOC499416	similar to transient receptor potential cation channel subfamily M member 2	11053301	11099740	+
Lrrc3	leucine-rich repeat-containing 3	11107145	11108095	+
Ube2g2_predicted	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (predicted)	11367545	11389252	-
LOC499417	similar to Ubiquitin-like protein SMT3A precursor (Ubiquitin-related protein SUMO-2)	11393957	11404621	-
Pttg1ip_predicted	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	11414678	11432404	-
Itgb2_predicted	integrin beta 2 (predicted)	11446521	11485009	-
RGD1311257_pr	similar to C21orf70 protein (predicted)	11504045	11536945	+
Adarb1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1	11678445	11743941	+
Pofut2_predicted	protein O-fucosyltransferase 2 (predicted)	11763535	11774475	-
Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1	11866432	11981635	+
Slc19a1	solute carrier family 19, member 1	11984284	12001291	-
LOC294334	similar to Adenosylhomocysteinase (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase) (AdoHcyase)	12080218	12165434	-
Pcbp3_predicted	poly(rC) binding protein 3 (predicted)	12224271	12290274	+
LOC294337	similar to collagen alpha1 type VI-precursor	12309334	12338494	+
Col6a2_predicted	procollagen, type VI, alpha 2 (predicted)	12444914	12461339	+
Ftcd	formiminotransferase cyclodeaminase	12470291	12483807	-
Mcm3ap_predicted	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) associated protein (predicted)	12543574	12580874	-
LOC499419	similar to Protein C21orf58	12591636	12602647	-
LOC309692	similar to pericentrin	12607841	12788174	+
S100b	S100 protein, beta polypeptide	12791440	12824508	-
LOC499420	similar to Protein arginine N-methyltransferase 2	12796889	12817018	+
Slc5a4a_predicted	solute carrier family 5, member 4a (predicted)	12876037	12919027	-
Slc5a4b_predicted	solute carrier family 5 (neutral amino acid transporters, system A), member 4b (predicted)	12927025	13006360	+
LOC294344	similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L13	13047846	13048483	+
Vpreb3_predicted	pre-B lymphocyte gene 3 (predicted)	13116109	13119887	-
LOC499421	similar to Homo sapiens fetal lung specific expression-unknown	13121984	13123710	+
MGC105647	similar to Nur77 downstream protein 2	13124662	13126481	-
Mmp11	matrix metalloproteinase 11	13129667	13138449	+

Table continued on next page

	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1			
Smarcb1_predicted	regulator of chromatin, subfamily b, member 1	13140527	13162189	+
LOC361826	similar to carcinoma related gene	13163930	13191289	-
Mif	macrophage migration inhibitory factor	13191986	13192851	+
Gstt2	glutathione S-transferase, theta 2	13221708	13225353	+
Susd2_predicted	sushi domain containing 2 (predicted)	13435903	13442807	-
Cabin1	calcineurin binding protein 1	13444820	13569497	-
Ddt	D-dopachrome tautomerase	13591785	13594256	-
LOC499422	similar to Glutathione S-transferase, theta 3	13596710	13603193	-
Gstt1	glutathione S-transferase theta 1	13604355	13621456	-
Upb1	ureidopropionase, beta	13715993	13743261	-
Adora2a	adenosine A2a receptor	13815719	13825618	-
Bcr_predicted	breakpoint cluster region (predicted)	13973138	14097816	-
Rtdr1_predicted	rhabdoid tumor deletion region gene 1 (predicted)	14132366	14140520	+
Gnaz	guanine nucleotide binding protein, alpha z subunit	14146844	14198514	-
LOC502417	similar to DNA-directed RNA polymerase III 47 kDa polypeptide (RNA polymerase C subunit 4) (RPC4)	14368363	14369678	-
LOC365554	similar to proteasome subunit iota	17487943	17488803	+
LOC499423	similar to pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) isozyme M2 - rat	17543620	17548846	-
Impk	inositol polyphosphate multikinase	17947110	17982281	-
Ube2d1_predicted	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1, UBC4/5 homolog (yeast) (predicted)	18001711	18084627	+
Tfam	transcription factor A, mitochondrial	18100629	18112682	+
Bicc1_predicted	bicaudal C homolog 1 (Drosophila) (predicted)	18348670	18476678	+
Phyh1l_predicted	phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein-like	18808839	18849027	+
Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	20018044	20044030	+
Rhobtb1_predicted	Rho-related BTB domain containing 1 (predicted)	20091917	20132872	-
Tmem26_predicted	transmembrane protein 26 (predicted)	20631151	20679957	-
LOC365556	similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L5	20717654	20822724	+

List of genes annotated by NCBI as immune complex related in differential segment\*\* (83)

Symbol	Description	Position		
		Start	Stop	Strand
RT1-M3	RT1 class Ib, locus M3	1412553	1416692	-
LOC499400	similar to RT1 class I, M5	1638276	1640540	-
LOC309584	similar to MHC class Ib M4 precursor	1643837	1648694	+
RT1-M6-1	RT1 class I, M6, gene 1	1658455	1661371	+
RT1-M6-2	RT1 class I, M6, gene 2	1675509	1678425	+
RT1-M1-4	RT1 class I, M1, gene 4	1978459	1980679	-
RT1-M1-2	RT1 class I, M1, gene 2	1998510	2000712	-
RT1-M10-1	RT1 class I, M10, gene 1	2074830	2076950	+
RT1-P2	RT1 class I, locus P2	2132208	2134721	-
2994a1	class I gene fragment 2994	2177419	2177675	-
2865a2	class I gene fragment 2865	2198985	2199182	-
2976a1	class I gene fragment 2976	2206728	2206964	-
2953a1a2	class I gene fragment 2953	2211828	2212611	+
2959a1	class I gene fragment 2959	2218267	2218503	+
2641a1	class I gene fragment 2641	2242745	2242981	-
2702a1	class I gene fragment 2702	2258136	2258375	+
2705a1	class I gene fragment 2705	2260350	2260547	+
2722a1a2	class I gene fragment 2722	2277609	2278393	+
2927a1	class I gene fragment 2927	2428177	2428445	-
2886a1-a1a2	class I gene fragment 2886	2437549	2438330	+
2920a1a2	class I gene fragment 2920	2461126	2461914	+
2715a1	class I gene fragment 2715	2468911	2469179	-
2941a1a2	class I gene fragment 2941	2479276	2480072	+
2860a1	class I gene fragment 2860	2488154	2488390	-
2848a1a2	class I gene fragment 2848	2497906	2498688	-
2824a1	class I gene fragment 2824	2522566	2522802	-
2812a1a2	class I gene fragment 2812	2535817	2536616	-
2795a1	class I gene fragment 2795	2553083	2553322	-
2788a1a2	class I gene fragment 2788a1a2	2558991	2559773	-
2626a1a2	class I gene fragment 2619	2584663	2585447	-
2619a1	class I gene fragment 2619	2592225	2592492	-
2609a1a2	class I gene fragment 2609	2601901	2602369	-
2600a1a2	class I gene fragment 2600	2611535	2612165	-
RT1-V2	RT1 class I, v2	2642439	2646265	-
RT1-P1	RT1 class I, P1	2650353	2652834	-
2543a1	class I gene fragment 2543	2669580	2669816	-
2539a1a2	class I gene fragment 2539	2673085	2673642	-
2509a1	class I gene fragment 2509	2703404	2703612	-
2464a1	class I gene fragment 2464	2739833	2740047	-
2463a1a2	class I gene fragment 2463	2740821	2741522	-
2461a1a2	class I gene fragment 2461	2743036	2743709	-
2458a2	class I gene fragment 2458	2746624	2746839	-
H2-T18	histocompatibility 2, T region locus 18	2754269	2758358	+
LOC502411	similar to Mature alpha chain of major histocompatibility complex class I antigen	2762458	2766814	+
LOC499402	similar to class I histocompatibility antigen alpha chain - cotton-top tamarin	2772906	2778066	+

Table continued on next page

RT1-N2	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region(N2)	2785625	2788804	+
RT1-S2	RT1 class Ib, locus H2-TL-like (S2)	2794349	2795770	+
RT1-O	RT1 class Ib, locus H2-Q-like, grc region	2799232	2801636	+
RT1-N3	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N3)	2806841	2810079	+
RT1-S3	RT1 class Ib, locus S3	2812209	2820640	+
RT1-149	RT1 class I, T24, gene 4	2829831	2837337	+
2361ex4-5	class I gene fragment 2361	2839209	2839558	-
2331ex4-5	class I gene fragment 2331	2869936	2870460	-
RT1-T24-2	RT1 class I, T24, gene 2	2880113	2884597	-
2310ex4-5	class I gene fragment 2310	2891089	2891438	-
RT1-T24-1	histocompatibility 2, T region locus 24	2907237	2922971	+
RT1-CE7	RT1 class I, CE7	3410094	3413168	+
RT1-CE10	RT1 class I, CE10	3468802	3471756	+
RT1-CE5	RT1 class I, CE5	3510046	3513705	-
RT1-CE4	RT1 class I, CE4	3536446	3539612	-
RT1-CE3	RT1 class I, CE3	3552265	3555613	-
RT1-CE2	RT1 class I, CE2	3576700	3579764	-
RT1-CE1	RT1 class I, CE1	3594830	3598018	-
Bat1a	HLA-B-associated transcript 1A	3611128	3623527	-
Bat2	HLA-B associated transcript 2	3724278	3737617	+
Bat3	HLA-B-associated transcript 3	3739593	3752266	-
Bat4	Bat4 gene	3762794	3763067	-
Bat5	HLA-B associated transcript 5	3782758	3797594	-
Bat8	HLA-B associated transcript 8, rat orthologue	4021679	4033709	-
RT1-Da	RT1 class II, locus Da	4636359	4641280	+
RT1-Db1	RT1 class II, locus Db1	4671513	4681009	-
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	4698033	4702150	+
RT1-Bb	RT1 class II, locus Bb	4730559	4736186	-
RT1-DOb	RT1 class II, locus DOb	4753940	4759648	-
Hla-dmb	major histocompatibility complex, class II, DM beta	4829535	4836675	-
Hla-dma	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	4843463	4846827	-
RT1-DOa	RT1 class II, locus DOa	4890410	4894044	-
RT1-Ha	RT1 class II, locus Ha	4902458	4907742	-
RT1-Ke4	RT1 class I, locus Ke4	4961333	4964650	+
RT1-A3	RT1 class I, A3	4998645	5002204	+
RT1-A2	RT1 class Ia, locus A2	5021816	5025341	+
RT1-A1	RT1 class Ia, locus A1	5056763	5060280	+
Ke2	MHC class II region expressed gene KE2	5097762	5099190	+

List of genes annotated by NCBI as olfactory receptors in differential segment\*\* (60)

Symbol	Description	Position		
		Start	Stop	Strand
Olr1668_predicted	olfactory receptor 1668 (predicted)	92810	93748	-
Olr1670_predicted	olfactory receptor 1670 (predicted)	164658	165596	+
Olr1671_predicted	olfactory receptor 1671 (predicted)	178032	178970	-
Olr1673_predicted	olfactory receptor 1673 (predicted)	196471	197409	-
Olr1675_predicted	olfactory receptor 1675 (predicted)	212579	213517	-
LOC499396	similar to olfactory receptor Olr1680	232311	235995	-
Olr1678_predicted	olfactory receptor 1678 (predicted)	247819	248757	-
Olr1679_predicted	olfactory receptor 1679 (predicted)	261423	262361	-
Olr1680_predicted	olfactory receptor 1680 (predicted)	274512	275555	-
Olr1681_predicted	olfactory receptor 1681 (predicted)	289690	290628	-
Olr1682_predicted	olfactory receptor 1682 (predicted)	305479	306417	-
Olr1683_predicted	olfactory receptor 1683 (predicted)	334752	335690	-
Olr1684_predicted	olfactory receptor 1684 (predicted)	350709	351650	+
Olr1686	olfactory receptor gene Olr1686	416557	417510	-
Olr1687	olfactory receptor 1687	428930	429895	+
Olr1688_predicted	olfactory receptor 1688 (predicted)	540075	541079	+
Olr1689_predicted	olfactory receptor 1689 (predicted)	558685	559656	-
Olr1690_predicted	olfactory receptor 1690 (predicted)	581243	582214	-
Olr1691_predicted	olfactory receptor 1691 (predicted)	609214	610185	-
Olr1692_predicted	olfactory receptor 1692 (predicted)	636663	637631	-
Olr1693_predicted	olfactory receptor 1693 (predicted)	646784	647746	-
Olr1694_predicted	olfactory receptor 1694 (predicted)	664414	665358	-
Olr1695_predicted	olfactory receptor 1695 (predicted)	678312	679277	-
Olr1696	olfactory receptor 1696	697146	698111	-
Olr1697_predicted	olfactory receptor 1697 (predicted)	710764	711729	-
Olr1699_predicted	olfactory receptor 1699 (predicted)	738121	739086	-
Olr1700_predicted	olfactory receptor 1700 (predicted)	747810	748775	-
Olr1701_predicted	olfactory receptor 1701 (predicted)	757027	757983	-
Olr1702_predicted	olfactory receptor 1702 (predicted)	769684	770637	+
Olr1704_predicted	olfactory receptor 1704 (predicted)	783080	784018	+
Olr1705_predicted	olfactory receptor 1705 (predicted)	792620	793558	+
Olr1707_predicted	olfactory receptor 1707 (predicted)	823732	824670	+
Olr1708_predicted	olfactory receptor 1708 (predicted)	831802	832716	+
Olr1709_predicted	olfactory receptor 1709 (predicted)	844022	844960	+
Olr1710_predicted	olfactory receptor 1710 (predicted)	856657	857595	+
Olr1714_predicted	olfactory receptor 1714 (predicted)	1102171	1103100	-
Olr1718_predicted	olfactory receptor 1718 (predicted)	1128750	1129679	-
Olr1720_predicted	olfactory receptor 1720 (predicted)	1142795	1143724	-
Olr1722_predicted	olfactory receptor 1722 (predicted)	1160966	1161895	-
Olr1724_predicted	olfactory receptor 1724 (predicted)	1185189	1186118	-
Olr1726_predicted	olfactory receptor 1726 (predicted)	1199859	1200788	-
Olr1729_predicted	olfactory receptor 1729 (predicted)	1210937	1214120	-
LOC499397	similar to olfactory receptor Olfr104	1220706	1223072	-
Olr1730_predicted	olfactory receptor 1730 (predicted)	1246310	1247263	+
Olr1731_predicted	olfactory receptor 1731 (predicted)	1262201	1264589	-
Olr1733_predicted	olfactory receptor 1733 (predicted)	1280419	1291348	-
Olr1734_predicted	olfactory receptor 1734 (predicted)	1336577	1337518	+
Olr1735_predicted	olfactory receptor 1735 (predicted)	1349773	1350699	+
Olr1736_predicted	olfactory receptor 1736 (predicted)	1364915	1365841	+
Olr1737_predicted	olfactory receptor 1737 (predicted)	1381377	1382303	+
Olr1738_predicted	olfactory receptor 1738 (predicted)	1387403	1388293	+
Olr1739_predicted	olfactory receptor 1739 (predicted)	1407046	1407975	+
Olr1742_predicted	olfactory receptor 1742 (predicted)	1437944	1438873	+
Olr1743_predicted	olfactory receptor 1743 (predicted)	1444984	1445925	-
Olr1744_predicted	olfactory receptor 1744 (predicted)	1461057	1461995	+
LOC502409	similar to olfactory receptor Olfr94	1471064	1475077	+
Olr1746_predicted	olfactory receptor 1746 (predicted)	1489421	1490359	+
Olr1748_predicted	olfactory receptor 1748 (predicted)	1529999	1530937	+
Olr1749_predicted	olfactory receptor 1749 (predicted)	1535909	1536847	+
Olr1750_predicted	olfactory receptor 1750 (predicted)	1542826	1543758	+

List of genes annotated by NCBI as pseudogenes in  
differential segment\*\* (109)

Symbol	Description	Position		
		Start	Stop	Strand
Olr1669-ps	olfactory receptor pseudogene 1669	144374	144802	+
Olr1672-ps	olfactory receptor pseudogene 1672	187014	187953	-
Olr1674-ps	olfactory receptor pseudogene 1674	202715	203531	+
Olr1676-ps	olfactory receptor pseudogene 1676	217782	218721	-
Olr1685-ps	olfactory receptor pseudogene 1685	407207	408170	+
Olr1698-ps	olfactory receptor pseudogene 1698	720631	721596	-
Olr1703-ps	olfactory receptor pseudogene 1703	776107	776463	-
Olr1706-ps	olfactory receptor pseudogene 1706	804622	805559	+
Olr1711-ps	olfactory receptor pseudogene 1711	875321	876245	+
Olr1712-ps	olfactory receptor pseudogene 1712	883448	884386	-
Olr1713-ps	olfactory receptor pseudogene 1713	1099326	1099943	+
Olr1715-ps	olfactory receptor pseudogene 1715	1115139	1115721	+
Olr1716-ps	olfactory receptor pseudogene 1716	1117618	1118548	-
Olr1717-ps	olfactory receptor pseudogene 1717	1126991	1127265	+
Olr1719-ps	olfactory receptor pseudogene 1719	1140800	1141354	+
Olr1721-ps	olfactory receptor pseudogene 1721	1159115	1159571	+
Olr1723-ps	olfactory receptor pseudogene 1723	1183141	1183751	+
Olr1725-ps	olfactory receptor pseudogene 1725	1197207	1198021	-
Olr1728-ps	olfactory receptor pseudogene 1728	1216265	1217170	-
Olr1732-ps	olfactory receptor pseudogene 1732	1288390	1289015	+
Olr1740-ps	olfactory receptor pseudogene 1740	1423527	1424423	+
Olr1741-ps	olfactory receptor pseudogene 1741	1429358	1430068	-
Olr1747-ps	olfactory receptor pseudogene 1747	1504686	1505624	+
Rps15-ps	ribosomal protein S15 pseudogene	1656720	1657206	+
Ppp1cb-ps	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform, pseudogene	1769746	1770661	-
Rpl39-ps	ribosomal protein 39 pseudogene	1780389	1780973	-
Pbp-ps	Pbp pseudogene	1781231	1781689	-
Trim15	tripartite motif-containing 15 pseudogene	1794101	1796854	-
RT1-M10-4	RT1 class I, M10, pseudogene 4	1854092	1856221	-
3298a3	RT1 class I, pseudogene 3298a3	1864459	1864721	-
RT1-M10-3	RT1 class I, M10, pseudogene 3	1875584	1877171	-
3281a3	RT1 class I, pseudogene 3281a3	1881797	1882042	-
3258a2	RT1 class I, pseudogene 3258a2	1906468	1906652	-
3252a3	RT1 class I pseudogene 3252a3	1912772	1912962	-
RT1-M8	RT1 class 1, M8 pseudogene	1914494	1915711	-
RT1-M7	RT1 class 1, M7 pseudogene	1916127	1918309	-
Trim39-ps	Trim39 pseudogene	1989582	1989676	+
RT1-M1-1	RT1 class 1, M1, pseudogene 1	2024952	2027356	-
Ppid-ps	RT1 class 1, Ppid pseudogene	2033306	2033589	-
RT1-M10-2	RT1 class 1, M10, pseudogene 2	2050136	2052283	-
3082ex4-5	RT1 class pseudogene 3082ex4-5	2084977	2085406	-
Rcrg1-ps40	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 40	2147644	2147952	-
Nerg-ps15	EST221625 related pseudogene 15	2148921	2149439	-
Rcrg1-ps24	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 24	2184902	2185210	-
Rcrg1-ps23	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 23	2192299	2192589	-
Rcrg1-ps33	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 33	2201777	2202067	+
Rcrg1-ps15	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 15	2234080	2234399	-
Rcrg1-ps14	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 14	2237647	2237937	-
2747a1a2	2747a1a2 pseudogene	2245830	2246613	+
Rcrg1-ps19	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 19	2264388	2264696	+
Rcrg1-ps22	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 22	2395030	2395320	-
Rcrg1-ps37	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 37	2409039	2409330	+
Rcrg1-ps38	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 38	2412476	2412766	+
Rcrg1-ps39	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 39	2416881	2417188	+
Rcrg1-ps34	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 34	2421377	2421800	-
Nerg-ps10	EST221625 related pseudogene 10	2424510	2425028	+

Table continued on next page

Rcrg1-ps32	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 32	2448418	2448841	+
Rcrg1-ps31	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 31	2476329	2476637	-
Nerg-ps11	EST221625 related pseudogene 11	2509715	2510231	-
Rcrg1-ps28	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 28	2513044	2513274	-
Rcrg1-ps27	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 27	2516494	2516785	-
Rcrg1-ps26	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 26	2545085	2545393	-
Rcrg1-ps25	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 25	2548536	2548827	-
Nerg-ps7	EST221625 related pseudogene 7	2595625	2596141	-
Rcrg1-ps13	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 13	2598950	2599258	-
Rps2-ps4	RT1 class I gene Rps2-ps4	2638372	2639269	-
Rcrg1-ps10	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 10	2676757	2677065	-
Nerg-ps6	EST221625 related pseudogene 6	2678034	2678552	-
Nerg-ps5	EST221625 related pseudogene 5	2694868	2695474	-
Rcrg1-ps9	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 9	2697912	2698007	-
Rcrg1-ps8	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 8	2700031	2700338	-
Rcrg1-ps7	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 7	2704837	2704988	-
Rcrg2-ps6	Riken clone 2210412D01 related pseudogene 6	2706931	2707216	-
Rcrg1-ps6	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 6	2707419	2707832	-
Rcrg2-ps4	Riken clone 2210412D01 related pseudogene 4	2711668	2716451	-
Nerg-ps3	EST221625 related pseudogene 3	2717207	2717799	-
Rcrg2-ps2	Riken clone 2210412D01 related pseudogene 2	2721393	2722065	-
Nerg-ps1	EST221625 related pseudogene 1	2726519	2726789	-
Rcrg1-ps3	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 3	2728560	2728655	-
Rcrg1-ps2	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 2	2728664	2729195	-
Rcrg2-ps1	Riken clone 2210412D01 related pseudogene 1	2731791	2733942	-
Rcrg1-ps1	Riken clone 5830469G19 related pseudogene 1	2735940	2736289	-
Rps2-ps3	RT1 class I gene Rps2-ps3	2768355	2770093	-
Rps2-ps1	RT1 class I gene Rps2-ps1	2798167	2798916	-
Rpl41-ps	RT1 class I Rpl41 pseudogene	2850180	2850536	-
LOC2247331-5	LOC2247331-5 pseudogene	3407226	3407523	+
Cdk2ap1-ps4	Cdk2ap1-ps4 pseudogene	3417384	3418319	+
LOC2247331-6	LOC2247331-6 pseudogene	3423288	3423603	+
LOC2247331-7	LOC2247331-7 pseudogene	3465432	3465739	+
Sacm2l-ps4	Sacm2l-ps4 pseudogene	3502352	3503492	-
LOC2247331-4	LOC2247331-4 pseudogene	3517212	3517514	-
LOC2247331-3	LOC2247331-3 pseudogene	3543106	3543411	-
Cdk2ap1-ps2	Cdk2ap1-ps2 pseudogene	3571493	3572434	-
Sacm2l-ps3	Sacm2l-ps3 pseudogene	3586423	3587561	-
Rps25-ps2	Rps25 pseudogene 2	3799007	3799473	-
G7e	G7e pseudogene	3900726	3901709	+
Ng35	Ng35 pseudogene	4039951	4041349	-
Tnx	tenascin X pseudogene	4133875	4178049	-
Rnf5	ring finger protein 5 pseudogene	4248021	4250316	-
Stk19-ps	serine/threonine kinase 19 pseudogene	4297489	4299675	-
Cyp21a1-ps	cytochrome P450, subfamily 21A, polypeptide 1	4319779	4335827	+
Tesb	Tesb pseudogene	4576147	4580346	-
Arrb2-ps	arrestin, beta 2, pseudogene	4646720	4647697	-
Sacm2l-ps2	Sacm2l-ps2 pseudogene	5011011	5012147	-
LOC2247331-2	LOC2247331-2 pseudogene	5017790	5018073	-
Cdk2ap1-ps1	Cdk2ap1-pseudogene 1	5028877	5029037	+
LOC2247331-1	LOC2247331-1 pseudogene	5045073	5052851	-
Sec61-ps	Sec61 pseudogene	5142707	5143045	-
Rps25-ps1	ribosomal protein S25 pseudogene 1	5148862	5149529	-

List of genes annotated by NCBI with unknown functions  
in differential segment\*\* (57)

Symbol	Description	Position		
		Start	Stop	Strand
LOC294154	similar to hypothetical protein MGC4614	788144	789056	-
LOC502404	similar to OTTMUSP00000000438	795329	795717	-
LOC499399	LOC499399	1617977	1623499	+
LOC499401	similar to RIKEN cDNA 1700022C21	1680854	1683151	-
LOC361786	LOC361786	2827780	2829605	-
FLJ13158	hypothetical protein FLJ13158	2992405	3005364	+
MGC15854	hypothetical protein MGC15854	3005598	3009712	+
LOC361790	similar to 2310014H01Rik protein (predicted)	3025690	3035024	-
E030032D13Rik	E030032D13Rik gene	3244458	3245337	-
LOC497744	hypothetical gene supported by NM_001003965	3251515	3259433	+
CB741658	CB741658 gene	3270124	3273375	-
LOC502412	similar to RIKEN cDNA 2300002M23	3308105	3341130	-
E230034O05Rik	E230034O05Rik gene	3719963	3722120	-
LOC361797	LOC361797	3961053	3964122	+
Bing4	Unknown function	5089611	5097383	-
AA926063	AA926063gene	5128225	5140738	-
LOC499404	LOC499404	5284482	5287016	-
LOC361805	similar to RIKEN cDNA 2900010M23 (predicted)	5358004	5371506	-
LOC499405	similar to hypothetical protein D830007E07	5379966	5391529	-
LOC499406	LOC499406	5505725	5531902	+
LOC294291	hypothetical LOC294291	5773726	5788026	-
LOC499407	similar to LRRGT00097	5964921	5997888	+
LOC309637	similar to hypothetical protein FLJ20302; similar to CG31653-PA (predicted)	6066778	6110306	+
LOC294301	similar to RIKEN cDNA 4930511111 (predicted)	6769891	6780191	+
LOC499408	LOC499408	7171861	7173950	+
LOC499409	LOC499409	7205858	7220025	-
LOC294307	similar to RIKEN cDNA 2410004N11; DNA segment, Chr 17, ERATO Doi 562, expressed (predicted)	7221507	7253138	+
MGC72991	similar to GI:13385412-like protein splice form I	7584512	7610178	+
LOC499410	LOC499410	7644476	7645221	+
LOC502414	similar to hypothetical protein	7882629	7919503	+
LOC499411	hypothetical gene supported by AY380821	7920369	7927828	+
RGD1307801_pr	similar to RIKEN cDNA 1300018I05 (predicted)	7957560	8013992	+
LOC365544	similar to DNA segment, Chr 17, ERATO Doi 488,	9282684	9350087	+
LOC309673	similar to RIKEN cDNA 2600005C20 (predicted)	10454165	10477558	+
LOC499414	LOC499414	10565790	10568806	-
LOC309681_prec	similar to RIKEN cDNA 1810043G02; DNA segment, Chr 10, Johns Hopkins University 13, expressed (predicted)	11034059	11040919	-
LOC365546	similar to chromosome 21 open reading frame 29; TSP-	11119139	11156884	-
LOC502415	LOC502415	11165912	11175017	+

Table continued on next page

LOC365547	similar to chromosome 21 open reading frame 29; TSP-	11202966	11214246	-
LOC502416	LOC502416	11218569	11223144	+
LOC499418	similar to Putative protein C21orf56 homolog	12488956	12498060	-
LOC497745	hypothetical gene supported by NM_031049	12507573	12534612	-
LOC361822	similar to RIKEN cDNA A130042E20; open reading frame 57 (predicted)	12580895	12587449	+
LOC294343	similar to DNA segment, Chr 10, Johns Hopkins University 82, expressed	13028871	13030469	-
LOC365549	similar to SGLT1 protein	13063445	13106903	-
LOC361828	similar to mKIAA0376 protein (predicted)	13838715	13945178	-
LOC361829	similar to CG7980-PA	14111889	14127403	-
LOC365553	LOC365553	14251824	14256377	+
LOC294350	hypothetical LOC294350	14505441	14507952	-
LOC502418	similar to RIKEN cDNA 1700049L16	17281111	17281638	+
LOC365555	LOC365555	17696881	17697470	+
LOC294362	similar to DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 214, expressed (predicted)	17985909	17999370	+
LOC294565	similar to RIKEN cDNA 1200015N20 (predicted)	18850889	19030485	-
LOC361833	hypothetical gene supported by AF065149; AF102552	19160016	19677535	-
LOC294368	similar to RIKEN cDNA 0610012D17	19967762	20000017	+
LOC499424	similar to RIKEN cDNA A930033H14 gene	20165621	20166657	+
LOC361834	similar to RIKEN cDNA 1700040L02 (predicted)	20871987	20981867	+

**Supplemental table 2:** List of genes found in the SHR.1N differential segment\*\* (based on current NCBI database). The segment contains an estimated 536 genes whereas the homologous segment contains approximately 430 genes including the 2 candidate genes TNF- $\alpha$ , PPAR- $\delta$ . The homologous segment\* is the segment of the rat chromosome 20 (RNO20) that is homologous to the human segment (implicated by previous studies). The differential segment\*\* is the whole segment that has been transferred from the BN rats onto the background of the SHR rats creating the SHR.1N congenic strain.

ANNEXE II

A) DÉCLARATION DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant (student identification)

NOM : Bourdon  
PRÉNOM : Céline  
# étudiant : 

2. Nom de l'unité académique (Faculty)

Faculté de médecine

3. Nom du programme (program)

M.Sc. en sciences biomédicales  
2-484-1-0 (option générale)

4. Description de l'article (description of article)

Auteurs en ordre (authors):

Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimir Kren, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

Titre (Title) :

**Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension**

En soumission pour publication à : *Circulation Research*

5. Déclaration des coauteurs (coauthor declaration)

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Céline Bourdon inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : **Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20**

Being a coauthor of the article identified above, I agree that Céline Bourdon can include this article in her Master Degree thesis entitled : **Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20.**

X

  
signature coauteur (coauthor): Zdenka Pausova

July 11, 2006  
date

**ANNEXE II**  
**A) DÉCLARATION DES COAUTEURS**

**1. Identification de l'étudiant (student identification)**

NOM : Bourdon  
PRÉNOM : Céline  
# étudiant : [REDACTED]

**2. Nom de l'unité académique (Faculty)**  
Faculté de médecine

**3. Nom du programme (program)**  
M.Sc. en sciences biomédicales  
2-484-1-0 (option générale)

**4. Description de l'article (description of article)**

**Auteurs en ordre (authors):**

Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimír Křen, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

**Titre (Title) :**

Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension

En soumission pour publication à : *Circulation Research*

**5. Déclaration des coauteurs (coauthor declaration)**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Céline Bourdon inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20

Being a coauthor of the article identified above, I agree that Céline Bourdon can include this article in her Master Degree thesis entitled: Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20

X

[REDACTED]  
Signature coauteur (coauthor): Sara Arab

July/12/2006  
date

**ANNEXE II**  
**A) DÉCLARATION DES COAUTEURS**
**1. Identification de l'étudiant (student identification)**

NOM : Bourdon  
 PRÉNOM : Céline  
 # étudiant : 

**2. Nom de l'unité académique (Faculty)**

Faculté de médecine

**3. Nom du programme (program)**

M.Sc. en sciences biomédicales  
 2-484-1-0 (option générale)

**4. Description de l'article (description of article)**
**Auteurs en ordre (authors):**

Céline Bourdon, Julie Sérubé, Vladimir Kren, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

**Titre (Title):**

Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension

En soumission pour publication à : *Circulation Research*

**5. Déclaration des coauteurs (coauthor declaration)**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Céline Bourdon inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20

Being a coauthor of the article identified above, I agree that Céline Bourdon can include this article in her Master Degree thesis entitled: Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20.

  
 X

signature coauteur (coauthor): Vladimir Kren

17.7.2006  
 date

**ANNEXE II**  
**A) DÉCLARATION DES COAUTEURS**

**1. Identification de l'étudiant (student identification)**

NOM : Bourdon  
PRÉNOM : Céline  
# étudiant : 

**2. Nom de l'unité académique (Faculty)**

Faculté de médecine

**3. Nom du programme (program)**

M.Sc. en sciences biomédicales  
2-484-1-0 (option générale)

**4. Description de l'article (description of article)**

**Auteurs en ordre (authors):**

Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimir Kren, Michel Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

**Titre (Title):**

Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension

En soumission pour publication à : *Circulation Research*

**5. Déclaration des coauteurs (coauthor declaration)**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Céline Bourdon inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat. Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20

Being a coauthor of the article identified above, I agree that Céline Bourdon can include this article in her Master Degree thesis entitled: Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat. Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20.



Signature coauteur (coauthor): Julie Bérubé

12 juillet 2006  
date

ANNEXE II  
A) DÉCLARATION DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant (student identification)

NOM : Bourdon

PRÉNOM : Céline

# étudiant : 

2. Nom de l'unité académique (Faculty)

Faculté de médecine

3. Nom du programme (program)

M.Sc. en sciences biomédicales

2-484-1-0 (option générale)

4. Description de l'article (description of article)

**Auteurs en ordre (authors):**

Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimir Kren, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

**Titre (Title) :**

**Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension**

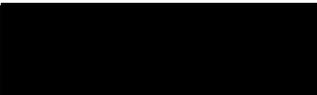
En soumission pour publication à : *Circulation Research*

5. Déclaration des coauteurs (coauthor declaration)

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Céline Bourdon inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : **Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20**

Being a coauthor of the article identified above, I agree that Céline Bourdon can include this article in her Master Degree thesis entitled : **Interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20.**

X

  
signature coauteur (coauthor): Michal Pravenec

*July 17, 2006*  
date

**ANNEXE II**  
**A) DÉCLARATION DES COAUTEURS**
**1. Identification de l'étudiant (student identification)**

NOM : Bourdon  
 PRÉNOM : Céline  
 \* étudiant : 

**2. Nom de l'unité académique (Faculty)**

Faculté de médecine

**3. Nom du programme (program)**

M.Sc. en sciences biomédicales  
 1-484-1-d (option générale)

**4. Description de l'article (description of article)**
**Auteurs en ordre (authors):**

Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimir Kren, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

**Titre (Title) :**

Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension

En soumission pour publication à : *Circulation Research*

**5. Déclaration des coauteurs (coauthor declaration)**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Céline Bourdon inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20

Being a coauthor of the article identified above, I agree that Céline Bourdon can include this article in her Master Degree thesis entitled: interactions gène-environnement dans l'obésité associée à l'hypertension chez le rat: Rôle du locus génique du TNF- $\alpha$  trouvé sur le chromosome-20.

X 

signature coauteur (coauthor): Peter Liu

date

**ANNEXE III**  
**DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES**

**1. Identification de l'étudiant**

NOM : Bourdon  
PRÉNOM : Céline  
# étudiant : 

**2. Nom de l'unité académique**

Faculté de médecine

**3. Nom du programme**

M.Sc. en sciences biomédicales  
2-484-1-0 (option générale)

**4. Liste des articles proposés (1)**

**Auteurs en ordre :**

Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimir Kren, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

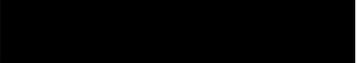
**Titre :**

**Genetic locus on rat chromosome 20, adipocyte size and obesity-related hypertension**

En soumission pour publication à : *Circulation Research*

**5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant les articles**

Je déclare avoir pleinement contribué à l'élaboration de cet article. J'ai participé à plusieurs niveaux dans le protocole expérimental (extraction d'ARN, des protéines, participation à la collection d'organes, séquençage) et dans l'analyse des données (profils d'expression génique, statistiques). J'ai aussi collaboré à la rédaction de l'article et la mise en forme des figures. Ainsi, je voudrais rédiger mon mémoire par article.

  
Céline Bourdon

11-07-2006  
date

**6. Avis du directeur de recherche**

Je suis d'avis que mon étudiante, Céline Bourdon, devrait rédiger son mémoire par article puisque sa contribution était grande à travers toutes les étapes du travail.

  
Zdenka Pausova, Ph.D.

11-07-2006  
date

**7. Décision ou recommandation et signature du directeur du programme**

  
Daniel Lajeunesse, Ph.D.

  
date

## ANNEXE IV

## A) ÉTAT DE L'APPORT ORIGINAL DE L'ÉTUDIANT

1. Identification de l'étudiant

NOM : Bourdon  
 PRÉNOM : Céline  
 # étudiant : [REDACTED]

2. Article

**Auteurs en ordre :** Céline Bourdon, Julie Bérubé, Vladimir Kren, Michal Pravenec, Peter Liu, Sara Arab, Zdenka Pausova

**Titre:** "Genetic locus on rat chromosome 20 and molecular pathways mediating diet-induced increases in adipocyte size and blood pressure"  
 En soumission pour publication à : *Circulation Research*

3. Apport des coauteurs

Julie Bérubé a aussi participé à plusieurs niveaux notamment dans la collecte d'organes, l'extraction d'ARNm, d'ADN et de protéines ainsi que dans l'immunohistochimie.

Vladimir Kren et Michal Pravenec ont créé la souche congénique des SHR.1N que nous avons utilisées dans notre étude.

Peter Liu et Sara Arab ont accompli les aspects techniques des profils d'expression génique (hybridation des ARN, analyse initiale des biopuces, détermination des gènes significativement régulés).

Zdenka Pausova est la principale investigatrice des travaux ici présentés et ma directrice de Maîtrise. Elle a dirigé tout le projet, interprété les résultats et rédigé la grande part de l'article.

4. Apport original de l'étudiant

J'ai pleinement contribué aux travaux présentés dans cet article. Je note ma participation dans le protocole expérimental (test de glycémie, collecte d'organes, extractions d'ARNm, d'ADN et de protéines, etc.). J'ai aussi fait des analyses de données de séquençage, de physiologie (pression sanguine, gain de poids, etc.) et des profils d'expression génique (interprétation et mise en contexte avec la littérature). J'ai aussi collaboré dans la rédaction de l'article et la mise en forme des figures.

[REDACTED]  
 Date : 29-08-2006