

FUN-QUN TOM

**EFFETS DE LA PROTÉINE STIMULANT
L'ACYLATION DANS L'INTERACTION DES
ADIPOCYTES ET DES MACROPHAGES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

© Fun-Qun Tom, 2011

Résumé

L'obésité est maintenant reconnue comme un état inflammatoire chronique de faible ampleur caractérisé par une surproduction anormale de facteurs inflammatoires par le tissu adipeux. La protéine stimulant l'acylation (ASP) stimule la synthèse des triglycérides et le transport du glucose via son récepteur, le C5L2. L'objectif de ce projet était d'examiner les effets de l'ASP dans un contexte inflammatoire relié à l'obésité. Les résultats ont démontré une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après un traitement avec l'ASP chez les adipocytes mais non chez les macrophages. Parallèlement, le C5a (une anaphylatoxine se liant également au C5L2) inhibe en général la sécrétion des adipokines autant chez les adipocytes que chez les macrophages. Un effet synergique de l'ASP sur la production de MCP-1 et de l'adiponectine est observé lorsque les macrophages sont mis en contact direct avec les adipocytes. En contrepartie, l'ajout de l'ASP dans du milieu conditionné de macrophages n'a pas démontré d'effet additionnel sur la sécrétion des adipokines chez les adipocytes. Nos données ont également permis de démontrer que la réponse inflammatoire induite par l'ASP est en partie régulée par les voies de signalisation NF κ B et PI3Kinase chez les adipocytes. Ces résultats suggèrent que l'ASP jouerait un rôle amplificateur dans la réponse inflammatoire des adipocytes, mais pas des macrophages, en stimulant la sécrétion de certains médiateurs inflammatoires via NF κ B et PI3Kinase. Une compréhension détaillée des implications physiologiques de l'ASP permettrait éventuellement de saisir son potentiel thérapeutique.

Abstract

Obesity is now well recognized as a state of chronic low-grade inflammation characterized by an abnormal overproduction of inflammatory factors by adipose tissue. Acylation stimulating protein (ASP) acts through its receptor, C5L2, to stimulate triglyceride synthesis and glucose transport. The aim of this study was to investigate the effects of ASP under inflammatory conditions imitating those associated with obesity. Results showed an increased secretion of pro-inflammatory cytokines after treatment with ASP in adipocytes but not in macrophages. Meanwhile, treatment with C5a (an anaphylatoxin that can also bind C5L2) resulted in an overall inhibition of adipokines secretion in both adipocytes and macrophages. A synergistic effect of ASP on the production of MCP-1 and adiponectin was observed when macrophages and adipocytes were in direct contact. In contrast, addition of ASP in conditioned media from macrophages did not show any significant difference on the secretion of adipokines by adipocytes. Our data also indicate that the pro-inflammatory response induced by ASP is mediated partly by the NF κ B and PI3Kinase signaling pathways in adipocytes. These results suggest that ASP may amplify the inflammatory response by stimulating the secretion of some inflammatory mediators through NF κ B and PI3Kinase. A better understanding of ASP physiological involvements could further clarify its therapeutic potential.

Avant-propos

Ce mémoire, présenté sous forme d'un mémoire par article, inclut les résultats et les conclusions de mon projet de maîtrise. Cet article dont je suis la première auteure s'intitule : **Acylation stimulating protein (ASP) stimulates MCP-1 and KC in 3T3-L1 adipocytes, but not in macrophages**. Au moment du dépôt de ce présent mémoire, cet article a été soumis dans *The Journal of Biological Chemistry*. Ce projet a été supervisé sous la direction de la Dre Katherine Cianflone, ma directrice de recherche. Le co-auteur ayant participé au projet a été Danny Gauvreau, affilié au Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Québec, Université Laval (Québec, Canada).

C'est avec la supervision et le support de la Dre Katherine Cianflone que j'ai réalisé mon projet de maîtrise. J'ai assuré la planification entière du déroulement de mon étude. Tout d'abord, j'ai effectué la conceptualisation, l'élaboration et l'application des protocoles et techniques d'expérimentation. Ensuite, j'ai analysé et interprété les résultats obtenus en fonction des connaissances disponibles à travers la littérature scientifique et finalement, j'ai rédigé l'article.

La réalisation à bon terme de mon projet n'aurait certainement pas été possible sans l'aide et les conseils indispensables de la part de toute mon équipe de laboratoire. En premier lieu, je tiens à remercier sans contredit ma directrice de recherche, Dre Katherine Cianflone, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de faire la connaissance et de travailler avec une merveilleuse équipe comme la nôtre. Un énorme merci également pour sa grande disponibilité, sa grande écoute, sa patience, son expertise, ses nombreux conseils prodigieux ainsi qu'à son grand support tant technique que financier. Dre Cianflone a su me transmettre sa grande passion pour la recherche et m'a apporté une expérience forte enrichissante durant mes études à la maîtrise. Je tiens également à

remercier et à souligner l'aide et le support des autres membres de l'équipe, soient Marc Lapointe, Pierre Miegueu, Mercedes Munkonda, Christian Roy, Alexandre Fisette, Pegah Poursharifi, Reza Rezvani et particulièrement Danny Gauvreau pour son support intellectuel ainsi que ses conseils judicieux tout au long de mon projet. Je remercie évidemment les Instituts de recherche en santé du Canada pour le support financier accordé à ma directrice de recherche qui a servi à m'épauler au cours de mes études de deuxième cycle.

Enfin, je tiens à remercier sincèrement mes parents pour leur support et leurs encouragements tout au long de mes études.

À mes parents et à Martin.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Avant-propos	iv
Table des matières	vii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Chapitre 1 : Introduction	1
1. L'obésité	1
1.1 La pandémie du 21 ^e siècle	1
1.2 Les causes	2
1.3 Les conséquences	3
2. Le tissu adipeux	5
2.1 Organe endocrinien	5
2.2 Relation entre le métabolisme et l'immunité	7
2.3 État inflammatoire chronique	9
3. Les adipokines	12
3.1 L'adiponectine	12
3.2 La protéine chimiotactique des monocytes-1	14
3.3 La protéine stimulant l'acylation	15
3.3.1 La formation	15
3.3.2 Le récepteur C5L2	16
3.3.3 Rôles et effets métaboliques	17
3.3.4 L'ASP chez l'homme	18
3.3.5 L'ASP chez le modèle animal	19
Chapitre 2 : Objectifs et hypothèses	21
Chapitre 3 : Article	23

La protéine stimulant l'acylation stimule la sécrétion de MCP-1 et KC dans les adipocytes 3T3-L1, mais pas dans les macrophages	23
Résumé	23
Abstract	26
Introduction	27
Experimental procedures	29
Results	32
Discussion	35
References	39
Figure legends	42
Chapitre 4 : Conclusion	52
1. Faits saillants	52
2. Regard critique	53
3. Perspectives	54
Bibliographie	56

Liste des figures

- Figure 1 Concept de la balance énergétique entre l'apport alimentaire et la dépense énergétique
- Figure 2 Actions du tissu adipeux sur différents processus biologiques
- Figure 3 Infiltration des macrophages dans le tissu adipeux au cours du développement de l'obésité
- Figure 4 Formation de la protéine stimulant l'acylation (ASP)
- Figure 5 Proposition de la voie de signalisation intracellulaire de l'ASP dans la synthèse des triglycérides (TG)

Liste des abréviations

AdipoR	Récepteur d'adiponectine 1 et 2 (AdipoR1 et R2)
ASP	Protéine stimulant l'acylation
AT	Tissu adipeux
C3	Complément 3
C3a	Fragment du complément 3
C3aR	Récepteur du C3a
C3KO	Invalide pour le gène du complément 3 – Déficient ASP
C5a	Fragment du complément 5
C5aR	Récepteur du C5a
C5L2	Récepteur 2 ressemblant au récepteur C5aR (<i>C5a-receptor-like 2</i> en anglais)
C5L2KO	Invalide pour le gène du récepteur C5L2 – Déficient en C5L2
CCR2	Récepteur de la chimiokine CCL2 (récepteur de MCP-1)
CM	Milieu conditionné
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase
GLUT	Transporteur du glucose
IL	Interleukine
IR	Résistance à l'insuline
KC	Chimiokine dérivée des kératinocytes
KDa	Kilodalton
MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes-1
NFκB	Facteur nucléaire kappa-B
PI3Kinase	Phosphatidyl-inositol-3 kinase
TG	Triglycéride
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-alpha
WT	Type sauvage (<i>wild-type</i> en anglais)

Chapitre 1

Introduction

1. L'obésité

1.1 La pandémie du 21^e siècle

Au cours des dernières décennies, la prévalence du surpoids et de l'obésité a considérablement augmenté à travers le monde. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), il y a actuellement plus de 1 milliard d'adultes souffrant de surpoids ($IMC \geq 25$ kg/m^2) et au moins 300 millions qui sont cliniquement obèses ($IMC \geq 30kg/m^2$) [1].

Plus du deux tiers de la population américaine présentent un surpoids, une condition également commune dans d'autres pays occidentaux [2]. Autrefois considérés comme des problèmes propres aux pays industrialisés, le surpoids et l'obésité augmentent désormais de façon spectaculaire dans les pays en voie de développement. La prévalence de l'obésité s'est également accrue à un rythme alarmant chez la population infantile. On estime que 35% des enfants aux États-Unis sont en surpoids, 11% sont obèses et que près de 70% des adolescents obèses garderont cette condition rendus à l'âge adulte [3].

Ces statistiques impressionnantes démontrent que l'obésité a rapidement atteint des proportions épidémiques dans de nombreuses régions du monde et est devenue l'un des problèmes majeurs de la santé publique.

1.2 Les causes

La cause fondamentale de l'obésité et du surpoids est attribuable à un déséquilibre à long terme entre l'apport alimentaire et la dépense énergétique, conduisant au stockage des calories excédentaires sous forme anormale ou excessive de graisse corporelle [1]. Souvent illustré sous forme de balance énergétique (FIGURE 1), la complexité du phénomène prend toute son ampleur lorsqu'on observe de façon plus attentive les facteurs jouant un rôle sur l'entrée et la sortie de cette énergie.

Du côté «gauche» de la balance, on retrouve l'apport énergétique. Dans les pays occidentaux où l'accès à la malbouffe est universel, une des causes principales de l'augmentation de l'obésité est une plus grande consommation d'aliments hautement caloriques et riches en sucres et en gras. Les portions surdimensionnées et très denses, typiques de la diète des pays industrialisés, contribuent à augmenter la prise alimentaire en plus de faciliter son assimilation dans l'organisme [4].

Du côté «droit» de la balance, il y a la dépense énergétique. En raison de la nature de plus en plus sédentaire de nombreuses formes de travail, de l'évolution des modes de transport et de l'urbanisation et de l'accessibilité facilitée à la nourriture, on assiste à une baisse considérable de la pratique d'exercice physique dans les pays industrialisés. Le mode de vie de plus en plus sédentaire adopté par une forte proportion de la population dans ces pays contribue à diminuer considérablement la dépense calorique.

L'évolution des habitudes en matière d'alimentation et d'exercice physique sont souvent le résultat de facteurs environnementaux et sociétaux liés au développement et d'un

manque de politiques de soutien dans des secteurs tels que la santé, l'industrie agroalimentaire, la distribution et le marketing alimentaires, l'environnement, etc.

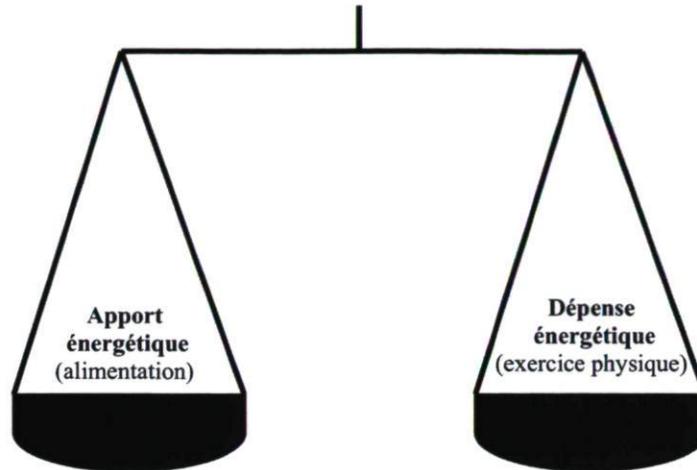


FIGURE 1 – Concept de la balance énergétique entre l'apport alimentaire et la dépense énergétique

1.3 Les conséquences

L'obésité est étroitement liée au développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires ainsi que les complications métaboliques qui y sont associées tels que la stéatose hépatique, l'hyperlipidémie, l'arthrite et certains cancers [5]. En effet, ce qui est couramment appelé le syndrome métabolique est largement corrélé avec l'obésité. Par conséquent, un surplus de poids engendre de nombreuses maladies et complications pour la santé globale. Cependant, chaque organe et tissu est affecté de façon différente par cet excès d'énergie. Parmi ceux-ci, les principaux sont le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie.

Lors du développement de l'obésité, le tissu adipeux est sujet à d'importants changements : augmentation de la taille (hypertrophie) et du nombre des cellules adipeuses (hyperplasie), inflammation chronique liée à l'infiltration de macrophages et sécrétion

altérée de nombreux facteurs endocriniens [6]. Quant au muscle squelettique, une obésité sévère contribue à la résistance à l'insuline et une réduction de l'oxydation des acides gras dans ce tissu [7]. Enfin, le foie est également incapable de réagir adéquatement à l'excédent de substrats, ce qui conduit au développement d'une stéatose hépatique et d'une perte de sensibilité à l'insuline [8].

2. Le tissu adipeux

L'obésité est donc la conséquence d'un déséquilibre énergétique et se définit comme une expansion du tissu adipeux causée par une accumulation excessive du gras au niveau de ce tissu. La compréhension du rôle du tissu adipeux a changé dernièrement, passant du rôle de simple organe d'entreposage d'énergie à un organe actif ayant des fonctions endocrines et immunologiques. Ce chapitre visera à définir le rôle endocrine du tissu adipeux au niveau du métabolisme ainsi que du système immunitaire. De plus, la relation entre le métabolisme et l'immunité sera aussi décrite dans un contexte inflammatoire lors du développement de l'obésité.

2.1 Organe endocrinien

L'obésité se caractérise comme étant un état hétérogène par rapport à la répartition régionale des tissus adipeux dans l'organisme. Deux types de tissu adipeux peuvent être distingués ayant des fonctions antagonistes : le tissu adipeux blanc permet le stockage de l'énergie tandis que le tissu adipeux brun est spécialisé dans la dissipation de l'énergie à travers la production de chaleur (thermogenèse adaptative) [9]. Pour la suite de ce mémoire, il sera question uniquement du tissu adipeux blanc. Il existe deux types de dépôts de tissu adipeux blanc : le tissu sous-cutané et le tissu viscéral. Le tissu sous-cutané est situé entre la peau et les muscles tandis que le tissu viscéral se retrouve dans les cavités principales du corps, principalement dans la cavité abdominale.

Le tissu adipeux a longtemps été défini comme un organe d'entreposage d'énergie et de lipides sous forme de triglycérides, mais depuis une dizaine d'années, le tissu adipeux est maintenant considéré comme un organe endocrinien complexe et très actif. Depuis 1994, avec la découverte de la leptine [10], il est maintenant reconnu que les adipocytes (ou cellules adipeuses) secrètent une grande variété d'hormones et de protéines qui régulent l'homéostasie du corps entier impliquant presque tous les organes et les types de cellules

[11]. En effet, les facteurs sécrétés (hormones, protéines et cytokines) par le tissu adipeux, communément appelées adipokines, agissent au niveau local (autocrine et/ou paracrine) en ayant une action sur le tissu adipeux lui-même et au niveau systémique (endocrine), en ayant une action sur d'autres organes ou tissus.

Les adipokines varient considérablement, non seulement en termes de structure et de fonction, mais également dans leur origine cellulaire. Le tissu adipeux n'est pas seulement constitué d'adipocytes entourés par une matrice de fibres de collagène, il se compose également de fibroblastes, de pré-adipocytes et de cellules endothéliales et immunitaires. Bien que certaines hormones et cytokines sont principalement produites par les adipocytes, d'autres protéines sécrétées sont dérivées de la fraction non-adipocytaire du tissu adipeux, soit la fraction stroma-vasculaire [12]. Les adipokines sont impliquées dans différents processus physiologiques tels que la prise alimentaire, le métabolisme du glucose et des lipides, les processus vasculaires et les fonctions immunologiques et inflammatoires [13], tel que démontré dans la FIGURE 2.

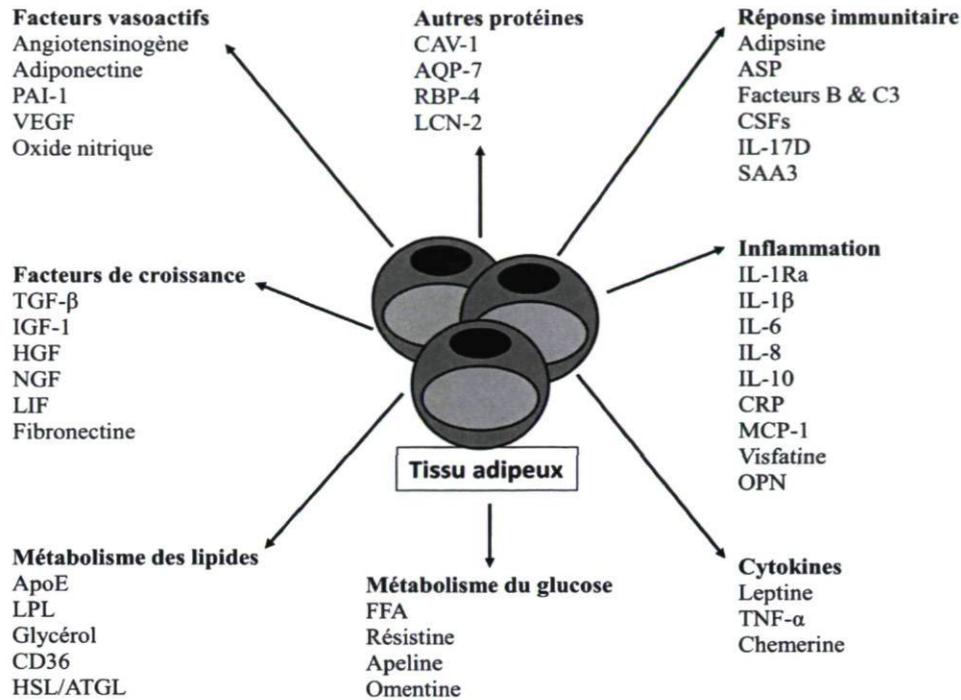


FIGURE 2 – Actions du tissu adipeux sur différents processus biologiques

[PAI-1= Inhibiteur d'activation de plasminogène-1; VEGF= Facteur de croissance vasculaire endothéliale; TGF- β = Facteur de croissance transformant-beta; IGF-1= Facteur de croissance insulino-1; HGF= Facteur de croissance hépatique; NGF= Facteur de croissance neuronal; LIF= Facteur inhibiteur de leucémie; ApoE= Apolipoprotéine E; LPL= Lipoprotéine lipase; CD36= Antigène de différenciation des leucocytes CD36; HSL/ATGL= Lipase hormono-sensible/triglycéride lipase du tissu adipeux; CAV-1= Caveoline-1; AQP-7= Aquaporine-7; RBP-4= Protéine liant le rétinol-4; LCN-2= Lipocaline-2; FFA= Acides gras libres; ASP= Protéine stimulant l'acylation; CSFs= Facteurs de stimulation des colonies; IL-17D= Interleukine-17D; SAA3= Sérum amyloïde A-3; IL-1Ra= Antagoniste du récepteur de l'interleukine-1; IL-1 β = Interleukine-1-beta; IL-6= Interleukine-6; IL-8= Interleukine-8; IL-10= Interleukine-10; CRP= Protéine C-réactive; MCP-1= Protéine chimiotactique des monocytes-1; OPN= Ostéopontine; TNF- α = Facteur de nécrose tumorale-alpha]

(Adapté de Catalán V et al. *Expert Opin. Pharmacother* 2009; 10 (2):239-254.)

2.2 Relation entre le métabolisme et l'immunité

Durant la dernière décennie, de nombreuses évidences ont démontré un lien étroit entre le métabolisme et l'immunité.

L'apparition de désordres métaboliques tel que la résistance à l'insuline, l'hypertriglycéridémie et des niveaux élevés d'acides gras libres et des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont quelques unes des manifestations cliniques diagnostiquées chez un sujet obèse. Cependant, les altérations immunologiques comme l'augmentation de la protéine C-réactive (CRP), le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6) sont fréquemment observées dans les maladies métaboliques comme l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Par conséquent, il est possible que des médiateurs moléculaires de ces désordres métaboliques puissent être des molécules identiques ayant une fonction dichotomique qui ont été développées à partir de facteurs précurseurs communs durant l'évolution liant ainsi le métabolisme et le système immunitaire [11].

L'obésité est maintenant caractérisée par un état inflammatoire chronique de faible ampleur causé par différents médiateurs inflammatoires [14]. La relation entre les facteurs pro-inflammatoires, l'adiposité et la résistance à l'insuline a été proposée la première fois en 1994 par Hotamisligil *et al.* lorsqu'ils ont démontré que la cytokine TNF- α était surexprimée dans le tissu adipeux dans un modèle de rongeurs obèses [15] et qu'elle interférait également avec la signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux [16]. Par la suite, de nombreuses études ont supporté cette hypothèse impliquant d'autres molécules. La protéine C3a, dérivée de la voie alternative du complément du système immunitaire, est une anaphylatoxine produite par les adipocytes et son rôle est d'amplifier la réponse inflammatoire. Toutefois, lorsque C3a est clivé pour générer le C3adesArg (aussi appelé «protéine stimulant l'acylation»), cette dernière devient un régulateur dans la synthèse des triglycérides en stimulant l'activité de la diacylglycérol-acyltransférase (DGAT) dans le tissu adipeux. (Une description plus approfondie de la protéine stimulant l'acylation sera discutée dans la section 3.3.). Cet exemple de C3a-C3adesArg vient démontrer que des changements minimaux au niveau des structures moléculaires sont suffisants pour déterminer si une molécule agira principalement comme un immuno-modulateur ou un effecteur métabolique [11].

2.3 État inflammatoire chronique

Durant le développement de l'obésité, quelques adipokines telles que la leptine, TNF- α , et IL-6 sont davantage sécrétées tandis que les niveaux plasmatiques de l'adiponectine sont diminués [17]. Chez l'homme, cette condition favorise un état inflammatoire chronique de faible ampleur dans le tissu adipeux pouvant contribuer au développement du syndrome métabolique, un ensemble d'anomalies métaboliques caractérisées par une obésité centrale, une dyslipidémie, le diabète de type 2 lié à l'insulino-résistance, l'hypertension et des complications cardiovasculaires [17-19]. Cette inflammation est caractérisée par une infiltration accrue des macrophages dans le tissu adipeux, qui est probablement une réponse directe d'un métabolisme altéré du gras causé par une augmentation de l'adiposité.

L'expansion du tissu adipeux est associée à une hypertrophie des adipocytes. Chez les rongeurs et les humains, la taille des adipocytes est un puissant prédicteur de l'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux [20]. Les conséquences possibles de l'hypertrophie des adipocytes sont une production altérée des adipokines, une nécrose des cellules adipeuses et une hypoxie locale qui sont tous des contributeurs potentiels pour l'infiltration et l'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux. Tel qu'illustré dans la FIGURE 3, pendant le processus d'accumulation de graisse, ces divers changements activent la circulation des monocytes qui transmigrent subséquentement jusqu'au tissu adipeux. Les monocytes se différencient en macrophages et entrent en étroite interaction avec les adipocytes et les cellules endothéliales, ce qui entraîne une production accrue de cytokines et d'adipokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux [21]. La majorité des macrophages infiltrant le tissu adipeux obèse sont localisés autour des adipocytes nécrotiques [22]. Chez l'homme, l'infiltration des macrophages est corrélée avec l'IMC et la taille des adipocytes [20] tandis qu'elle est diminuée après une perte de poids suite à la chirurgie bariatrique chez des patients obèses morbides [23].

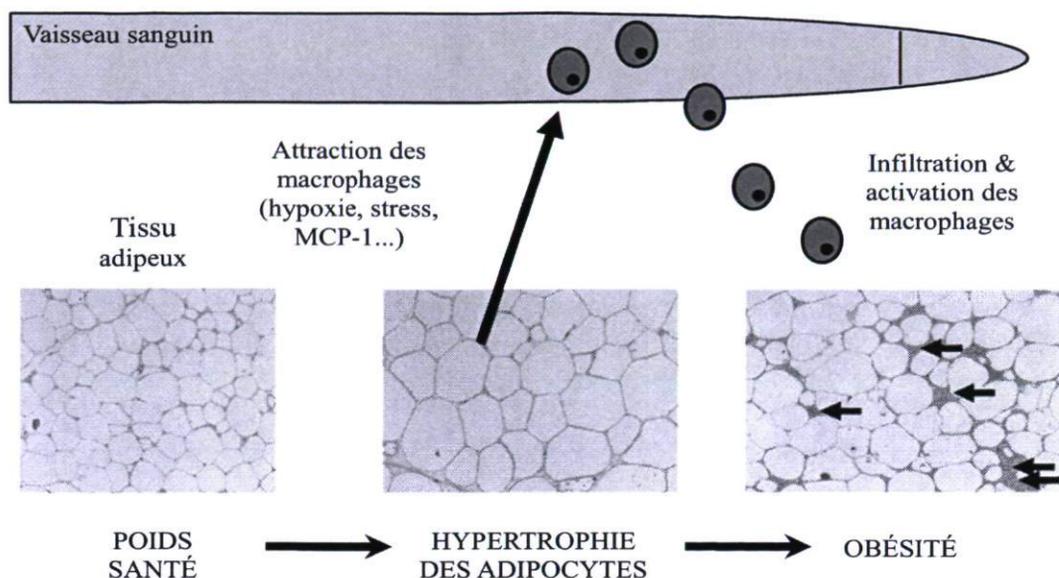


FIGURE 3 – Infiltration des macrophages dans le tissu adipeux au cours du développement de l’obésité
(Adapté de Blüher M. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117: 241-250.)

Dans des conditions obésogènes, le tissu adipeux devient inflammé, un état déterminé principalement par l’interaction entre les adipocytes et les macrophages. L’état inflammatoire de faible ampleur associé à l’obésité se traduit par une augmentation modérée, mais chronique, d’une série de molécules qui possèdent des propriétés pro-inflammatoires. Une des hypothèses émises est qu’une expansion du tissu adipeux et par le fait même, une hypertrophie des adipocytes, durant la prise de poids entraînent le recrutement des macrophages à travers une variété de signaux. Ces signaux incluent l’hypoxie de même que la sécrétion de facteurs chimioattractants ayant un pouvoir attractif sur certaines cellules immunitaires. Des cellules adipeuses plus grosses sécrètent davantage d’adipokines pro-inflammatoires ayant des propriétés chimioattractantes et immunitaires telles que la leptine, TNF- α , IL-6, IL-8 et MCP-1 [24;25].

Les effets des macrophages sur les fonctions des adipocytes ont été démontrés *in vitro*. Une co-culture directe entre adipocytes et macrophages produit une altération de la voie de signalisation de l’insuline dans la stimulation du captage du glucose en inhibant la

translocation de GLUT4 (un transporteur du glucose) à la surface cellulaire [26], suggérant que les facteurs solubles dérivés des macrophages diminuent la sensibilité à l'insuline chez les adipocytes. Une fois que les macrophages sont présents et actifs dans le tissu adipeux, ils agissent de concert avec les adipocytes et autres types de cellules présents dans le tissu adipeux. Ces interactions pourraient perpétuer un cercle vicieux dans le processus de recrutement des macrophages et la production de médiateurs pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux obèse.

3. Les adipokines

Le tissu adipeux sécrète une centaine de molécules biologiquement actives, appelées adipokines, incluant plus de 50 cytokines, chimiokines, facteurs hormonaux et autres médiateurs [14;27;28]. Comme le tissu adipeux est composé de différents types cellulaires autres que des adipocytes tels des cellules provenant de la fraction stroma-vasculaire (pré-adipocytes, macrophages et cellules endothéliales), toutes celles-ci peuvent également contribuer à la production d'adipokines. Parmi ces hormones, on retrouve l'adiponectine, la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1), l'interleukine-8 (IL-8), l'interleukine-6 (IL-6), la protéine stimulant l'acylation (ASP) et bien d'autres [29], tel que décrit dans la FIGURE 2. Ces hormones travaillent en réseau afin de réguler l'inflammation, l'action de l'insuline et le métabolisme du glucose et des lipides au niveau local et systémique. Ce système de réseautage d'adipokines devient altéré lors du développement de l'obésité. Ce chapitre décrira en premier lieu les rôles et effets généraux de deux adipokines aux propriétés antagonistes reconnues pour leur implication majeure dans la réponse inflammatoire associée à l'obésité : l'adiponectine et MCP-1. Par la suite, les implications métaboliques de l'ASP seront détaillées afin de bien comprendre son importance dans ce mémoire.

3.1 L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine presque exclusivement produite et sécrétée par les adipocytes [30]. Sa découverte a été faite originalement par quatre groupes de recherche indépendants [30-33], tandis que ses effets sur la sensibilité à l'insuline ont été identifiés pour la première fois vers le début des années 2000 [34;35]. L'adiponectine appartient à la famille des protéines contenant des séquences homologues au domaine globulaire du complément C1q [30]. Dans la circulation, l'adiponectine existe sous trois formes moléculaires diverses : trimère, hexamère et multimère de haut poids moléculaire [36].

Trois récepteurs peuvent réguler les effets biologiques de l'adiponectine : AdipoR1, AdipoR2 et T-cadhérine. AdipoR1 est ubiquitaire mais davantage exprimé dans le muscle tandis que AdipoR2 est principalement retrouvé dans le foie [37]. T-cadhérine est exprimé dans les cellules endothéliales et le muscle lisse. L'activation des récepteurs AdipoR1 et R2 augmente l'oxydation des acides gras du foie et du muscle, réduit la gluconéogenèse hépatique, augmente le captage du glucose et inhibe l'inflammation et le stress oxydatif [38]. Quant au T-cadhérine, son activation est protectrice pour les cellules vasculaires endothéliales contre le stress oxydatif et est fortement exprimé dans les régions de l'athérosclérose [39].

L'adiponectine est retrouvée en fortes concentrations chez les adultes en santé (entre 2 et 30 $\mu\text{g/ml}$) [38]. À l'inverse, les niveaux plasmatiques de cette adipokine sont nettement inférieurs chez les individus souffrant d'obésité viscérale et d'insulino-résistance. Les niveaux d'adiponectine corrèlent inversement avec la résistance à l'insuline. D'autres études ont également démontré les propriétés anti-inflammatoires de l'adiponectine par ses effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires [40] de même qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans des modèles génétiques de souris obèses ou induits par une diète riche en gras [34;41]. De plus, les gènes influençant les concentrations circulantes d'adiponectine présentent des effets géniques pléiotropiques sur les niveaux sériques de lipoprotéines de haute densité (HDL) et de triglycérides [42]. L'adiponectine exerce ses fonctions anti-inflammatoires à travers l'inhibition de l'expression de $\text{TNF-}\alpha$ et de l'activation de $\text{NF}\kappa\text{B}$, une voie de signalisation cellulaire majeure impliquée dans la réponse inflammatoire et immunitaire, et en interférant avec la fonction des macrophages. Cette hormone induit également la production d'importantes cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1Ra) [43].

Le contrôle du métabolisme énergétique exercé par l'adiponectine est important et de hautes concentrations plasmatiques de cette adipokine sont particulièrement bénéfiques pour la santé. Ces caractéristiques conférées à l'adiponectine permettent de considérer cette molécule comme une approche thérapeutique prometteuse dans la lutte contre l'obésité et les maladies associées.

3.2 La protéine chimiotactique des monocytes-1

La protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1), également appelée CCL2, appartient à la famille des chimiokines à motif CC. Produite principalement par les macrophages et les cellules endothéliales, MCP-1 est un puissant facteur chimiotactique pour les monocytes. Sa principale fonction est de guider les monocytes de la circulation pour devenir des macrophages tissulaires, soit la première étape dans l'initiation de l'inflammation [44]. En recrutant les monocytes, MCP-1 permet l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux et stimule les adipocytes à produire des cytokines inflammatoires tel que TNF- α , IL-6 et IL-1 β [45].

MCP-1 est parmi les plus puissantes cytokines chimioattractantes et exerce ses fonctions pro-inflammatoires via son récepteur CCR2, un récepteur couplé à une protéine G. CCR2 est exprimé dans divers types cellulaires incluant les adipocytes, les cellules musculaires et les macrophages. L'expression basale de MCP-1 est généralement très faible, sauf en présence de stimuli tel que l'IL-1, TNF- α et le lipopolysaccharide (LPS). Par conséquent, dans des conditions normales, les niveaux plasmatiques de MCP-1 sont souvent indétectables [46]. MCP-1 a été décrite initialement comme un produit sécrétoire des monocytes et des cellules endothéliales ayant un rôle dans le développement de l'athérosclérose. L'expression de MCP-1 est augmentée dans les lésions de l'athérosclérose [47] tandis que son inhibition ou celle de son récepteur (CCR2) réduit la formation d'athéromes chez des souris hypercholestérolémiques [48;49], indiquant un rôle important pour MCP-1 dans l'athérogénèse.

L'implication de MCP-1 dans l'obésité a été démontrée chez des rongeurs obèses. MCP-1 atteint également des concentrations plasmatiques significativement plus élevées chez les patients obèses et diabétiques [50]. Inversement, les niveaux circulants de MCP-1 sont fortement diminués après une perte de poids chez des sujets obèses [51]. De plus, la voie MCP-1/CCR2 est un composant majeur dans la résistance à l'insuline. *In vitro*, un traitement de MCP-1 chez les adipocytes 3T3-L1 a démontré une altération du captage du

glucose [52]. Une autre étude a également observé qu'une surexpression de MCP-1 dans le tissu adipeux obèse pouvait réduire la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique via une action endocrine [53]. Ces observations indiquent que MCP-1 pourrait être un lien inflammatoire direct entre l'obésité et l'insulino-résistance.

En raison de leur rôle crucial dans le recrutement des monocytes et des macrophages dans les maladies vasculaires, l'obésité et la résistance à l'insuline, MCP-1 et son récepteur, le CCR2, sont devenus des cibles thérapeutiques importantes en recherches cardiovasculaires et métaboliques.

3.3 La protéine stimulant l'acylation

3.3.1 La formation

La protéine stimulant l'acylation (ASP) est une adipokine produite par les adipocytes, composée de 76 acides aminés avec un poids moléculaire de 8.9 kDa. Elle a été découverte à la fin des années 1980 par Cianflone *et al.* alors qu'ils tentaient d'identifier un composant du plasma qui favorisait la synthèse des triglycérides à partir des acides gras (estérification) [54]. Tel qu'illustré dans la FIGURE 4, l'ASP est le produit final de l'interaction entre le complément 3 (C3), le facteur B et l'adipsine et est identique au C3adesArg. L'ASP dérive d'une protéine du système du complément, une voie majeure du système immunitaire de l'organisme. Cette protéine précurseur est le C3 et sa modification initiale par le facteur B résulte en un complexe de C3*B. L'adipsine effectue ensuite un clivage et mène à la formation irréversible de C3*Bb. Ce complexe, stabilisé par la properdine, permet de couper le facteur C3 en C3a et C3b. Alors que C3b permet à nouveau la formation du complexe C3*Bb et de recommencer le processus, C3a est relâché dans la circulation. Le C3a est une molécule pro-inflammatoire anaphylatoxique pouvant agir par l'entremise de son récepteur, le C3aR. Cependant, la carboxypeptidase B modifie très rapidement le fragment C3a par le clivage de l'arginine 77 N-terminale, inactivant en même temps la

fonction anaphylatoxique de C3a, pour générer le C3adesArg ou ASP [55]. Cette transformation finale empêche l'ASP d'interagir avec le récepteur du C3a (C3aR) et ne peut donc pas remplir le rôle immunitaire de C3a.

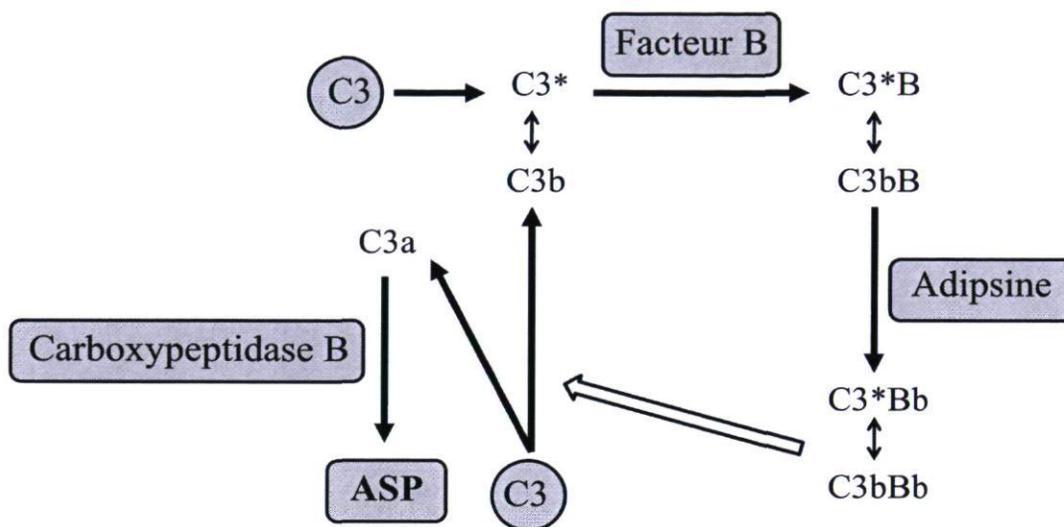


FIGURE 4 – Formation de la protéine stimulant l'acylation (ASP)
(Adapté de Cianflone K et al. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609(2):127-43.)

3.3.2 Le récepteur C5L2

Vers le milieu des années 2000, le récepteur fonctionnel de l'ASP, le C5L2 (aussi appelé GPR77) a été identifié [56;57]. Ce récepteur, constitué de 337 acides aminés, appartient à la famille des récepteurs couplés à une protéine G contenant 7 domaines transmembranaires. Le C5L2 présente une homologie avec les récepteurs du C5a et du C3a, soient C5aR (38%) et C3aR (33%) respectivement [58], tous les deux impliqués dans la réponse inflammatoire innée. Le C5L2 est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme. En effet, l'expression de l'ARNm de ce récepteur est retrouvée dans tous les types de dépôts du tissu adipeux, le muscle, le cœur, le foie, les poumons, le cerveau et les reins [57;59]. Bien que le C5L2 ne semble pas être impliqué dans la réponse chimiotactique

[60], les macrophages et les neutrophiles l'expriment également à leur surface cellulaire, suggérant peut-être un rôle immunologique pour ce récepteur.

En plus de se lier à l'ASP, il a été démontré que le C5L2 peut également lier plusieurs autres molécules dont le C3a, C5a et le C5adesArg avec des affinités variées [56;60;61]. Parmi ces ligands, seuls l'ASP et le C3a ont un effet anabolique lorsque liés au C5L2 [56]. Quant aux anaphylatoxines C5a et C5adesArg, bien qu'ils lient le C5L2 avec une grande affinité [60], ceux-ci n'activent pas ce récepteur et ne compétitionnent pas pour le même site de liaison que l'ASP [56]. Cette dernière caractéristique suggère de nouveau que le récepteur C5L2 pourrait avoir un rôle immunitaire à jouer comme un potentiel agent séquestrant les anaphylatoxines pro-inflammatoires du système du complément.

Il est aussi permis de suggérer que l'expression ubiquitaire de C5L2 laisse présager que le rôle de l'ASP ne se limiterait pas seulement au métabolisme du tissu adipeux.

3.3.3 Rôles et effets métaboliques

L'ASP a été démontrée pouvant avoir des effets anaboliques importants dans le tissu adipeux. Par l'interaction avec son récepteur C5L2, les rôles principaux de l'ASP sont de stimuler la synthèse des triglycérides par une augmentation de l'activité de la diacylglycérol-acyltransférase (DGAT), l'enzyme finale de la lipogénèse, et de diminuer la lipolyse en inhibant l'activité de la lipase hormono-sensible dans les adipocytes [55;62]. L'ASP favorise également le transport du glucose par une translocation plus importante des transporteurs du glucose (GLUT1, GLUT3 et GLUT4) à la surface de la membrane plasmique des cellules adipeuses et musculaires. Ces effets d'ASP ont été démontrés comme étant indépendants et additifs à ceux de l'insuline [63]. Des évidences voulant que l'ASP pourrait être impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique chez l'homme ont été rapportées par des études démontrant que les niveaux d'ASP plasmatiques sont influencés par des gènes qui contrôlent également les niveaux totaux de cholestérol, de lipoprotéines de faible densité (VLDL) et de triglycérides [64].

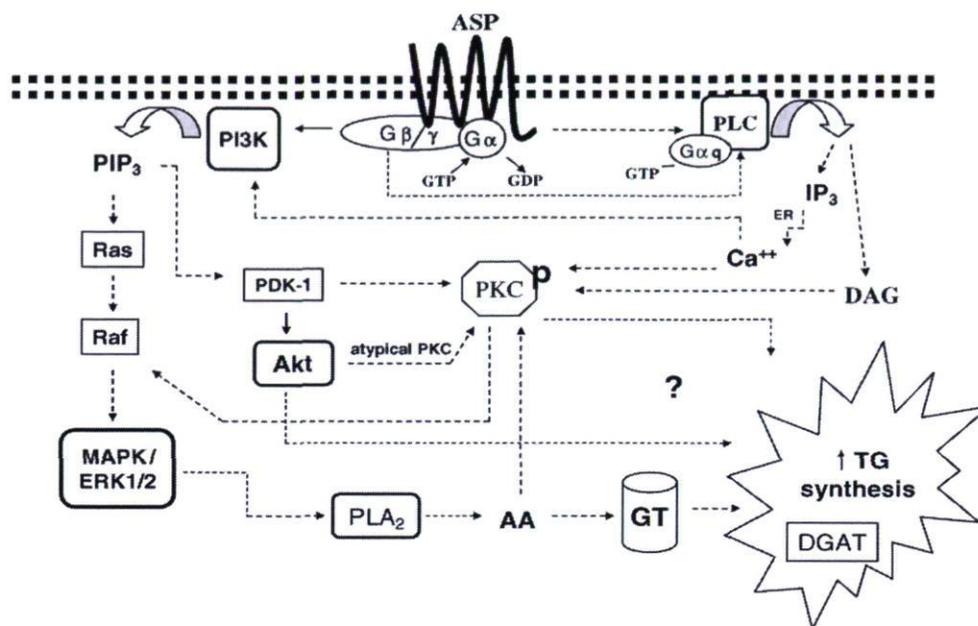


FIGURE 5 – Proposition de la voie de signalisation intracellulaire de l'ASP dans la synthèse des triglycérides (TG)
(Adapté de Maslowska M et al. *J. Lipid Res.* 2006; 47:643-652.)

La voie de signalisation de l'ASP implique plusieurs voies intracellulaires, tel qu'illustré dans la FIGURE 5. L'ASP, après sa liaison avec son récepteur C5L2, active la voie de la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3Kinase)/AKT pour stimuler la synthèse des triglycérides [65]. La voie PI3Kinase/AKT est également reconnue dans son implication dans la réponse à l'insuline dans les adipocytes. La voie de signalisation de l'ASP implique l'activation séquentielle de la PI3Kinase et de la phospholipase C (PLC) de même que l'activation en aval de la protéine kinase C (PKC) et de la protéine kinase activée par les facteurs mitogènes/kinase régulée par un signal extracellulaire (MAPK/ERK_{1/2}). Ces voies conduisent à une stimulation efficace et prolongée de la synthèse des triglycérides par l'ASP.

3.3.4 L'ASP chez l'homme

Dans la population non-obèse, les concentrations plasmatiques normales d'ASP sont d'environ 25 nM, sans différence majeure entre les hommes et les femmes [66]. Cependant, les niveaux d'ASP et de son précurseur, la protéine C3, sont augmentés significativement chez les sujets obèses. En effet, de nombreux désordres métaboliques peuvent moduler les niveaux d'ASP : la présence d'obésité, de diabète, de dyslipidémie ou de maladies cardiovasculaires entraînent une hausse d'ASP pouvant atteindre jusqu'à 400% par rapport à la normale [55]. À l'inverse, l'activité physique, une perte de poids et l'utilisation d'un agent sensibilisant à l'insuline (rosiglitazone) permettent de diminuer les niveaux d'ASP [67;68]. En état post-prandial (après un repas), la production locale adipeuse d'ASP augmente et est corrélée avec la clairance des triglycérides plasmatiques [69]. Par ailleurs, de manière semblable à l'insulino-résistance, un état délétère d'une résistance à l'ASP postulée pourrait également contribuer à l'altération du métabolisme du tissu adipeux et à une dyslipidémie associées au diabète et aux maladies cardiovasculaires [55;69].

3.3.5 L'ASP chez le modèle animal

La création de souris ne possédant pas le gène de la protéine C3, la protéine précurseur de l'ASP, a permis d'étudier les effets physiologiques de l'ASP puisqu'aucune voie alternative ne permet sa synthèse. Ainsi, on observe chez les souris déficientes en ASP (C3KO) plusieurs modifications métaboliques majeures. Tout d'abord, les souris C3KO affichent un profil lipoprotéique altéré caractérisé par un délai significatif dans la clairance des triglycérides sanguins à la suite d'un repas [70;71]. En contrepartie, l'injection d'ASP augmente la clairance des triglycérides et des acides gras libres chez des souris normales et obèses [72], indiquant un rôle potentiel de l'ASP dans l'absorption postprandiale des lipides.

Une déficience en ASP engendre des impacts majeurs sur l'homéostasie de l'énergie et sur l'action de l'insuline. Les souris déficientes en ASP/C3 sont hyperphagiques, mais

ont une réduction significative de leur masse adipeuse et sont résistantes à la prise de poids induite par une diète riche en gras par rapport aux souris de type sauvage (WT) [73]. D'autres études ont aussi indiqué que ces animaux présentaient un poids corporel inférieur comparé au phénotype sauvage et avaient une dépense énergétique plus élevée [74]. D'autre part, les souris ASP/C3KO ont également démontré une insulïnémie à jeun inférieure, ainsi qu'une meilleure tolérance au glucose [70].

En résumé, l'ASP favorise l'entreposage d'énergie sous forme de graisse dans le tissu adipeux tandis qu'une interférence au niveau de la production d'ASP diminue le stockage des lipides et conduit à une résistance de l'obésité et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Ces modifications importantes du métabolisme laissent croire que l'ASP pourrait devenir une cible thérapeutique intéressante visant à contrôler et réduire l'obésité ainsi que les maladies métaboliques qui y sont associées.

Chapitre 2

Objectifs et hypothèses

Les effets métaboliques de la protéine stimulant l'acylation (ASP) sont bien documentés chez les adipocytes. Toutefois, malgré que l'ASP soit un produit de l'activation du système immunitaire, peu d'études jusqu'à présent ont regardé les effets de l'ASP dans un contexte immunitaire. Néanmoins, de plus en plus d'évidences supportent l'existence d'une relation étroite entre le métabolisme et le système immunitaire et que l'obésité est maintenant reconnue comme un état inflammatoire chronique de faible ampleur caractérisé par une surproduction anormale de cytokines pro-inflammatoires. Parallèlement, on retrouve des niveaux d'ASP significativement augmentés autant chez les individus que chez les souris souffrant d'obésité.

Le but de cette étude est de déterminer si l'ASP, en plus de son rôle métabolique, pourrait aussi avoir un effet potentiel sur le plan inflammatoire au niveau du tissu adipeux dans un contexte d'obésité. Pour y arriver, nous avons utilisé des lignées cellulaires murines d'adipocytes (3T3-L1) et de macrophages (J774).

Tout d'abord, nous avons évalué les effets d'un traitement avec l'ASP sur la sécrétion de quatre adipokines, soient MCP-1, KC, IL-6 et l'adiponectine dans les adipocytes, les macrophages et dans l'interaction entre adipocytes et macrophages. Deuxièmement, les effets d'un traitement avec C5a (un autre ligand pouvant se lier avec le récepteur C5L2) ont été comparés avec ceux de l'ASP. Enfin, nous avons étudié les voies mécanistiques impliquant les enzymes PI3K et NF κ B dans l'action potentielle de l'ASP.

Notre hypothèse est que l'ASP pourrait favoriser une réponse inflammatoire au niveau du tissu adipeux étant donné son implication importante sur le métabolisme.

Chapitre 3

Article

La protéine stimulant l'acylation stimule la sécrétion de MCP-1 et KC dans les adipocytes 3T3-L1, mais pas chez les macrophages

L'obésité est caractérisée par un état inflammatoire chronique de faible ampleur avec une augmentation de la production de cytokines inflammatoires par le tissu adipeux. La protéine stimulant l'acylation (ASP) stimule la synthèse des triglycérides et le transport du glucose via son récepteur C5L2 et est augmentée dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique. La présente étude caractérise les effets aigus de l'ASP sur les changements inflammatoires dans les adipocytes 3T3-L1 et les macrophages J774 ainsi que les mécanismes sous-jacents de l'ASP qui sont impliqués. Un traitement pendant 24 h avec l'ASP augmente la sécrétion de MCP-1 (800%, $P < 0.001$) et KC (>150%, $P < 0.01$) de manière dose-dépendante chez les adipocytes, sans effet sur l'IL-6 et l'adiponectine, tandis que l'ASP n'a pas d'effet chez les macrophages. En contrepartie, le C5a, un ligand de C5L2 et de C5aR, démontre des effets différents par rapport à l'ASP. Une co-culture de macrophages avec des adipocytes augmente la sécrétion de MCP-1 et de l'adiponectine et l'ajout d'ASP augmente davantage leur sécrétion ($P < 0.001$ et $P < 0.05$, respectivement). L'ASP augmente la phosphorylation des Ser⁴⁶⁸ et Ser⁵³⁶ de la protéine p65 de NFκB en fonction du temps et de la concentration ($P < 0.05$). Une inhibition de l'activation de la PI3Kinase (avec wortmannin) et de NFκB (avec BAY11-7085) empêche l'action stimulante de l'ASP sur la sécrétion de MCP-1 et de KC dans les adipocytes. Ces résultats

suggèrent que l'ASP pourrait stimuler la sécrétion de cytokines inflammatoires spécifiques chez les adipocytes, mais pas chez les macrophages, à travers les voies de la PI3Kinase et NFκB, favorisant ainsi l'infiltration des macrophages et l'inflammation locale au niveau du tissu adipeux obèse.

ACYLATION STIMULATING PROTEIN (ASP) STIMULATES MCP-1 AND KC SECRETION IN 3T3-L1 ADIPOCYTES, BUT NOT IN MACROPHAGES

Fun-Qun Tom, Danny Gauvreau and Katherine Cianflone

Centre de Recherche Institut Universitaire de Cardiologie & Pneumologie de Québec,
Université Laval, Québec, Canada.

Address for correspondence: Katherine Cianflone, Centre de Recherche IUCPQ, Université Laval, Y4332, 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5. Tel: 418-656-8711 #3731; Fax: 418-656-4749; Email: katherine.cianflone@criucpq.ulaval.ca

KEYWORDS

Cytokines, inflammation, C5a, adipose tissue, obesity

ABBREVIATIONS

ASP, acylation stimulating protein; AdT, adipose tissue; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; KC, keratinocyte-derived chemokine; IL, interleukin; MCM, macrophage conditioned media; NF κ B, nuclear factor kappa-B; PI3Kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; C5aR, C5a receptor

ABSTRACT

Obesity is characterized by chronic low-grade inflammation with increased adipose tissue pro-inflammatory cytokine production. Acylation stimulating protein (ASP) stimulates triglyceride synthesis and glucose transport via its receptor C5L2 with increased ASP in obesity, insulin resistance and metabolic syndrome. The present study examines the acute effects of ASP on inflammatory changes in 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages and the underlying mechanisms involved. Treatment with ASP for 24 h increased MCP-1 (800%, $P < 0.001$) and KC (>150%, $P < 0.01$) secretion in adipocytes in a dose-dependent manner, with no effect on IL-6 or adiponectin, while in macrophages, ASP had no effect. By contrast, C5a, a ligand for both C5L2 and C5aR, had effects different from those of ASP. Coculture of macrophages with adipocytes increased MCP-1 and adiponectin secretion, and addition of ASP further enhanced secretion ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). ASP increased Ser⁴⁶⁸ and Ser⁵³⁶ phosphorylation of p65 NFκB in a time- and concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Both inhibition of PI3kinase (with wortmannin) and NFκB (with BAY11-7085) activation prevented ASP stimulation of MCP-1 and KC secretion in adipocytes. These findings suggest that ASP may stimulate specific inflammatory cytokines in adipocytes but not macrophages, through PI3kinase- and NFκB-dependant pathways, thus further promoting macrophage infiltration and local inflammation in obese adipose tissue.

INTRODUCTION

Recently, it has been widely recognized that adipose tissue (AdT) is not only a storehouse for energy and lipid storage organ in the form of fat, but is also a metabolically active organ producing numerous proteins and enzymes as well as hormones now globally defined as adipokines. These adipokines contribute to whole-body metabolism as well as inflammatory and immune responses (1) that secrete a variety of factors including adiponectin, leptin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), acylation stimulating protein (ASP) and many more (2).

Recent studies have demonstrated a close link between metabolism and immunity. It is now clear that obesity is associated with a state of chronic low-grade inflammation, which is characterized by abnormal cytokine production, and increased synthesis of pro-inflammatory proteins such as C-reactive protein (CRP), MCP-1 and IL-6 (3;4). AdT from obese subjects is characterized by enhanced infiltration of macrophages, which are postulated to be one mediator of the inflammatory response in adipose tissue (4;5). In obese animals, analysis of adipose tissue gene expression demonstrates increased inflammatory markers (6;7), whereas decreased expression (8) and concentration (9) of pro-inflammatory components have been shown after weight loss in obese individuals. Once macrophages are present and activated in adipose tissue, they interact with both adipocytes and non-adipocytes which might perpetuate a vicious cycle of macrophage recruitment and production of pro-inflammatory cytokines in obesity. It is possible that macrophages act synergistically with adipocytes to amplify local inflammation (4).

An additional example of immune adipose overlap is ASP. ASP is an adipokine produced by adipocytes, which is identical to C3adesArg. N-terminal cleavage of complement C3 following its interaction with factor B and adipsin (factor D) generates C3a through the alternative pathway of complement activation (10), a component of the innate immune system. The carboxyl-terminal arginine of C3a is rapidly cleaved by carboxypeptidase B, inactivating the C3a anaphylatoxic function and generating

C3adesArg (ASP) (10). ASP stimulates triglyceride (TG) synthesis and glucose transport in cultured adipocytes and also decreases lipolysis by inhibiting hormone-sensitive lipase (10;11). ASP/C3adesArg interacts with the receptor C5L2, a seven transmembrane G protein-coupled receptor, to stimulate glucose transport as well as diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity, the final enzyme implicated in the TG synthesis pathway (12;13). Surface expression of C5L2 is detected on adipocytes, neutrophils and macrophages (14) as well as in various tissues and organs such as adipose tissue, lung, liver, heart and kidney (15). In addition, C5a, a potent pro-inflammatory factor, is also a high-affinity ligand for C5L2 (16) as well as being a ligand for its receptor C5aR (CD88). By contrast, C5L2 is the only identified receptor for ASP.

In humans, ASP levels are increased with obesity, as well as insulin resistance, diabetes, cardiovascular diseases and metabolic syndrome (10;17-19), all disorders associated with obesity and, conversely, ASP levels are decreased with weight loss (20) or exercise (21). In mice, plasma ASP is also increased with obesity vs. lean mice (22). As obesity is related to a state of low level inflammation with overproduction and release of pro-inflammatory cytokines and ASP levels are increased in obese individuals, we investigated whether ASP could have a potential inflammatory effect in adipose tissue.

Using differentiated 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages, the aims of the present study were (i) to evaluate the acute effects of ASP on the production of inflammatory mediators in adipocytes and macrophages, and in the interaction between adipocytes and macrophages, (ii) to compare to the effects of C5a (an alternate C5L2 ligand), and (iii) to determine the underlying mechanisms of any potential action of ASP.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials- All tissue culture reagents, including Dulbeccos's modified Eagle's medium/F-12 (DMEM/F12), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), trypsin and tissue culture supplies were from Gibco (Burlington, ON, Canada). Protein levels were determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and triglyceride (TG) mass was measured using an enzymatic colorimetric assay (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA). Inhibitors used were wortmannin (Cayman Chemical, Ann Harbor MI, USA) and BAY11-7085 (Sigma, Oakville, ON, Canada).

Cell culture- 3T3-L1 preadipocytes and J774 macrophages were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Preadipocytes (3T3-L1) were cultured using DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS), maintained at low confluency ($\leq 70\%$) and incubated at 37°C in 5% CO_2 incubator. For differentiation, preadipocytes were plated in DMEM/F12 supplemented with 10% bovine calf serum (BCS) on 12-well culture plates ($\approx 1 \times 10^5$ cells/well; trypan blue exclusion) and grown to confluence. Two days later, cells were differentiated with medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 1 μM dexamethasone and 500 μM isobutylmethylxanthine (IBMX) for 2 days. Two days later, the medium was replaced with insulin supplementation only; and 2 days later, it was changed to regular medium (DMEM/F12 with 10% FBS). Differentiated cells, at least 90% of which showed an adipocyte phenotype by accumulation of lipid droplets (as determined by microscopic evaluation), were used on days 8-12 after initiation of differentiation. J774 macrophages were cultured using DMEM/F12 containing 10% FBS and were plated on 12-well culture plates ($\approx 1 \times 10^5$ cells/well; trypan blue exclusion). Macrophage conditioned media (MCM) were collected from J774 macrophage cultures and centrifuged at 10,000 g for 5 min (23) prior to adding to differentiated adipocytes.

Coculture of adipocytes and macrophages- Direct coculture was performed by adding J774 macrophages ($\approx 1 \times 10^5$ viable cell; trypan blue exclusion) into 12-well culture plates containing differentiated 3T3-L1 adipocytes ($\approx 1 \times 10^5$ cells/well). J774 and 3T3-L1 cells of equal numbers to those in the coculture were also plated separately. Adipocytes and

macrophages were in contact in fresh serum-free medium for 2 h before adding any treatments.

Cell treatment- Adipocytes, macrophages, adipocytes with macrophage conditioned media and cocultured cells were incubated for 2 h in serum-free medium (DMEM/F12) prior to stimulation at various concentrations of ASP (50, 200 and 600 nM) or C5a (5, 20 and 60 nM). The concentrations of ASP (18) and C5a (24) range from normal physiological plasma levels to the pathological state. After 24 h of treatment, the culture supernatants were collected and stored at -20°C until analysis. For experiments with inhibitors (wortmannin, BAY11-7085), differentiated 3T3-L1 were switched to serum-free medium for 2 h followed by incubation with inhibitors for 30 min prior to adding ASP for 24 h.

Cytokine Protein Array- The assay was carried out using Proteome Profiler array, mouse cytokine array panel A (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions with cell media from 3T3-L1 and J774 treated with ASP or C5a. Briefly, media were incubated with membranes coated with capture antibodies to detect multiple cytokines. Membranes were then exposed to ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham ECL, GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada) for up to 5.5 min. Membranes were quantified as pixel density with ImageQuant TL (GE Healthcare). Background signals were subtracted from each spot. Signal for controls without treatment (serum-free) were taken as 100% with treatment expressed relative to control. Cytokines with no visible detection were considered negative.

Cytokine analysis- MCP-1, KC, adiponectin and IL-6 concentrations in the culture supernatants were measured by commercial ELISA kits for mouse MCP-1, KC, and adiponectin (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and mouse IL-6 by ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cytokines levels were normalized to total cell triglyceride (TG) for adipocytes or total cell protein (P) for macrophages.

Measurement of NFκB activation- NFκB activation was measured by Fast Activated Cell-based ELISA (FACE) NFκB p65 profiler kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3T3-L1 adipocytes and 3T3-L1 supplemented with MCM were stimulated with ASP in 96-well plates for 3 different incubation times (15, 30 and 45 min), and then cells were fixed. Each well was incubated with a primary antibody specific for phospho-Ser⁴⁶⁸, phospho-Ser⁵³⁶ or total NFκB p65 overnight at 4°C. After washing with PBS, cells were incubated with secondary HRP-conjugated antibody, followed by incubation with developing solution. The levels of NFκB p65 phosphorylation (Ser⁴⁶⁸ and Ser⁵³⁶) were normalized to total NFκB p65 protein and total cell number in each well.

Statistical analysis- Results are expressed as mean ± SEM. Comparison between two groups was determined by Student's *t*-test and comparisons amongst several groups were performed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls or Dunnett's multiple comparison post-test using Prism software (Graphpad Software). Statistical significance was set at $P < 0.05$, where NS indicates not significant relative to the indicated control.

RESULTS

Cytokine secretion screening profiles in 3T3-L1 adipocytes treated with ASP or C5a. To evaluate the effect of ASP and C5a on cytokine secretion, 3T3-L1 and J774 were treated with ASP or C5a for 24 h. Of the 40 cytokines represented on the array, only cytokines which were detectable in the cell culture media are shown in Figure 1. ASP treatment increased secretion of KC, MCP-1 and MIG (monokine induced by interferon-gamma) significantly with a trend for RANTES (Fig. 1A). By contrast with C5a there was no difference in cytokine secretion compared to CTL (Fig. 1B). Note, the concentrations of ASP (18) and C5a (24) range from normal physiological plasma levels to the pathological state. As plasma concentrations of C5a are 10-fold lower than ASP, 10-fold less C5a was used for cell treatments relative to ASP.

Differential cytokine secretion with ASP vs. C5a. The effects of ASP on MCP-1 and KC secretion by 3T3-L1 adipocytes are dose-dependent (Fig. 2A & B). J774 macrophages express C5L2 levels comparable to 3T3-L1 adipocytes (results not shown). Nonetheless, addition of ASP to macrophages had no effect on MCP-1 (Fig. 2A), although J774 macrophages secrete greater levels of MCP-1 than do 3T3-L1 adipocytes (234 ± 33 vs. 8.0 ± 0.8 pg/mL). In J774, KC secretion increased slightly at 50 nM ASP treatment but decreased at higher concentrations (200 and 600 nM ASP) (Fig. 2B). By contrast to ASP, all concentrations of C5a inhibited MCP-1 secretion in J774 and inhibited KC in both 3T3-L1 and J774 cells (Fig. 2C & 2D). Only the lowest concentration of C5a (5 nM) increased MCP-1 secretion in 3T3-L1 adipocytes with no effect at higher doses of C5a (Fig. 2D).

Effects of ASP and C5a treatment on IL-6 and adiponectin secretion in 3T3-L1 and J774 cells. As shown in Table 1, ASP had no effect on IL-6 secretion in both 3T3-L1 and J774 cells at all concentrations tested. By contrast, C5a significantly increased IL-6 production in 3T3-L1 at all concentrations (by 1.6 to 3-fold), with the greater effects at the lowest dose (5 nM). With J774 macrophages, there was no change in IL-6 secretion with C5a compared to control (Table 1). In 3T3-L1 adipocytes, addition of ASP for 24 h had no effect on

adiponectin secretion compared to control for all ASP concentrations (Table 1). By contrast, treatment with C5a significantly increased the secretion of adiponectin at the lowest concentration (5 nM), while the higher doses (20, 60 nM) strongly inhibited adiponectin release by up to 80%. Adiponectin was undetectable in J774 macrophages.

Effect of macrophage conditioned media vs. ASP on cytokine secretion in 3T3-L1 adipocytes. Macrophage conditioned media (MCM) were collected after overnight treatment of J774 in serum-free media. MCM significantly enhanced the secretion of MCP-1 in adipocytes (Fig. 3A). Note, background macrophage-derived MCP-1 already present in the MCM was subtracted. MCM tended to increase IL-6 (Fig. 3C, not significant) (again, background subtracted), but had no effect on either KC (Fig. 3B) or adiponectin (Fig. 3D). Addition of ASP to MCM, however, further increased IL-6 and adiponectin ($P < 0.05$, Fig. 3C & D) but had no additive effect on MCP-1 or KC (Fig. 3A & B).

Effect of direct coculture of macrophage with adipocytes vs. ASP on cytokine secretion in 3T3-L1 adipocytes. As shown in Fig. 4A, macrophage-adipocyte direct contact showed a marked increase of MCP-1 secretion compared to 3T3-L1 alone. Addition of ASP (50 nM) to the direct coculture further increased the production of MCP-1, as compared to coculture alone (Fig. 4A). Similar results were seen with KC (Fig 4C). For both adiponectin and IL-6, while ASP alone had no effect, both coculture and ASP addition to coculture further enhanced adipokine secretion (Fig. 4B and D).

NFκB pathway is involved in ASP action. As shown in Fig. 5A & B, ASP induced phosphorylation of NFκB p65 Ser⁴⁶⁸ and Ser⁵³⁶ after 15 min and 30 min respectively in 3T3-L1 adipocytes. By contrast, ASP had no effect on phosphorylation of NFκB in macrophages (data not shown). The phosphorylated form of NFκB p65 Ser⁴⁶⁸ remained increased up to 45 min (Fig. 5A), while the Ser⁵³⁶ phosphorylation level was transiently increased only at 30 min (Fig. 5B). These effects are comparable to the increased phosphorylation with LPS, a known activator of the inflammatory pathway (25;26). Conditioned media from J774 macrophages alone also induced phosphorylation of NFκB

p65 Ser⁴⁶⁸ (Fig. 5C) and addition of 50 or 200 nM ASP further enhanced the effect. By contrast, MCM alone had no effect on the phosphorylation level of Ser⁵³⁶ but the ASP effect remained present when added to MCM (Fig. 5D).

ASP treatment increased levels of MCP-1 and KC through a PI3Kinase-dependent pathway. Previous studies indicated that PI3Kinase is involved in ASP stimulation of TG synthesis in adipocytes (27). 3T3-L1 adipocytes were pre-treated with wortmannin (a PI3Kinase inhibitor) before stimulation with ASP. As shown in Fig. 6A & B, the ASP stimulatory effect on MCP-1 and KC was inhibited by adding wortmannin.

ASP stimulates MCP-1 and KC secretion via a NFκB-dependant pathway. Since we observed activation of NFκB p65 via increased phosphorylation on Ser⁴⁶⁸ and Ser⁵³⁶ by ASP (Fig. 5), we confirmed our results by adding a pharmacological inhibitor of NFκB, BAY11-7085 (28). 3T3-L1 adipocytes were pre-treated with BAY11-7085 before stimulation with ASP. Treatment with NFκB inhibitor effectively prevented the ASP-stimulatory effect on both MCP-1 (Fig. 6C) and KC (Fig. 6D) secretion in 3T3-L1 adipocytes at all concentrations of ASP.

DISCUSSION

Numerous studies have demonstrated the role of ASP related to lipid and glucose metabolism *in vitro*, with plasma levels of ASP correlating with obesity in humans and mice (10). Here we demonstrate that ASP also has a potential inflammatory effect in adipose tissue using cell models (3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages), specifically on inflammatory cytokine secretion in adipocytes, an effect that is pertinent to macrophage recruitment in obesity.

Interestingly, our results demonstrated that ASP effects are cell specific as well as cytokine specific. Inflammatory response varied in adipocytes versus macrophages in terms of cytokine secretion. Our study demonstrated increased production of MCP-1 and KC after ASP treatment in a dose-dependent manner and appeared to be specific to adipocytes. By contrast, no major changes were observed in macrophages. Several studies have demonstrated obesity-induced macrophage infiltration is associated with increased expression of MCP-1 in adipocytes (29-31). Additionally, increases in MCP-1 expression in AdT contribute to the macrophage infiltration into this tissue as well as to insulin resistance and hepatic steatosis associated with obesity in mice (31). MCP-1 belongs to the CC chemokine family, and its main known function is as a chemoattractant to enhance circulating monocytes transmigration into adipose tissue to become activated macrophages (32), one of the first steps in AdT inflammation. KC is also considered a pro-inflammatory adipokine, inducing adipocyte expression of inflammatory factors and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), a mediator of insulin resistance (33). KC expression is increased in AdT of genetically obese (*ob/ob* mice) and high fat diet-induced obese mouse models (33). Furthermore, KC plays a central role in macrophage accumulation in atherosclerotic lesions in mice (34).

C5L2 is a recently identified receptor for C5a and C5adesArg, as well as ASP/C3adesArg and C3a (35;36). Although C5a binds to C5L2 with high affinity (16), the identification of functional responses is still controversial. It has been proposed that C5L2

may act as a decoy receptor for C5a, sequestering it away from interacting with the C5a receptor (C5aR) and diminishing its corresponding immune response. As a decoy receptor for C5a, C5L2 might negatively regulate the primary inflammatory state (37). As C5a is a powerful pro-inflammatory chemoattractant, we expected increased cytokine secretion in adipocytes. In fact, our data showing overall little effect or inhibition of MCP-1 and KC secretion by C5a in both adipocytes and macrophages provide additional evidence that C5L2 may act as a decoy receptor or functional antagonist of the C5aR since these two receptors (C5L2 and C5aR) are both present on adipocyte and macrophage cell surface (unpublished observations). C5L2 may compete with C5aR for C5a binding, and the balance in C5a occupancy between these two receptors would determine the outcome of pro- or anti-inflammatory state (36). Regardless, our results demonstrated that the actions of ASP and C5a on cytokine secretion are clearly different.

AdT may be a primary tissue producing MCP-1, KC and IL-6 in obese subjects, although the specific cell types responsible for the production of each cytokine are still unclear. Several studies have examined macrophage-adipocyte interaction *in vitro* and the influence of macrophages on adipocyte inflammatory responsiveness. Lumeng *et al.* reported significantly enhanced MCP-1 secretion in macrophage-adipocyte direct cocultures compared to secretion by adipocytes alone, suggesting that cell-cell contact between macrophages and adipocytes potentiates the secretion of MCP-1 and other pro-inflammatory factors (23). Consistent with their results, MCP-1 levels were significantly higher than the sum of macrophages and adipocytes independently. Similarly, the effects of ASP on MCP-1 appeared to be greater in the coculture system than in adipocytes alone, whereas there was no effect at all in macrophages, suggesting both a cell-specificity and a synergistic effect. It might be speculated that in coculture, ASP stimulates the production of some unknown inflammatory factors in macrophages that then has a direct influence on MCP-1 production in adipocytes. It might be also speculated that ASP alone has no effect in macrophages, but that in combination with an unknown factor produced by adipocytes, there is a greater effect on MCP-1 secretion in macrophages. Interestingly, adiponectin levels are also increasing in direct coculture system and addition of ASP potentiates its secretion. Note, adiponectin is only produced by adipocytes, not macrophages. Adiponectin

acts as an anti-inflammatory protein and suppresses cytokine production by macrophages, and adiponectin levels correlate inversely with IR (38;39). However, there might be certain situations in which adiponectin has pro-inflammatory effects. In the presence of LPS, high-molecular-weight (HMW) adiponectin was shown to augment the production of IL-8 (which is the human ortholog of mouse KC (33)) by human macrophages (40).

We provide evidence that ASP regulates inflammation in adipocytes and that this pro-inflammatory activity is at least partially dependent on activation of NF κ B transcription factor as well as the PI3Kinase pathway. NF κ B, a heterodimer composed of p50 and p65 subunits, is a potent activator of gene expression from NF κ B DNA binding sites due to the presence of transactivating domains located in the C-terminal region of the p65 protein (41;42). Current reviews summarize evidence that NF κ B inflammatory pathways promote metabolic diseases such as insulin resistance and atherosclerosis (43). The molecular mechanisms linking both NF κ B and PI3Kinase pathways in ASP signalling network remains to be elucidated. Nevertheless, it has been demonstrated that both PI3Kinase and AKT were able to stimulate the transcriptional activity of NF κ B by stimulating transactivation domain 1 of the p65 subunit in NIH 3T3 cells (44). Similarly, activation of NF κ B by IGF-1 (insulin-like growth factor-1) is mediated through PI3Kinase signalling in fetal lung fibroblasts (45). Several lines of evidence support the critical role of the NF κ B pathway in the development of insulin resistance in obese mice (46) by inhibiting PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) function through nuclear corepressors, resulting in suppression of the gene transcription of CAP (c-Cbl-associating protein) and IRS-2 (insulin receptor substrate-2), which are molecules involved in PI3Kinase signalling of insulin-induced GLUT4 (a glucose transporter) translocation (47).

In summary, the results suggest that ASP enhances the inflammatory response by stimulating the secretion of specific pro-inflammatory cytokines through NF κ B and PI3Kinase pathways in adipocytes, which could further promote infiltration and recruitment of macrophages in adipose tissue. These studies suggest that ASP might be a potential target for the development of new therapeutic approaches for treatment of chronic inflammation in adipose tissues in obesity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from CIHR (# 63336 to KC). K. Cianflone holds a Canada Research Chair in Adipose Tissue. Danny Gauvreau was supported by a fellowship from Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Quebec. The authors appreciate the technical and manuscript assistance of Melanie Cianflone.

REFERENCES

1. Ahima, R. S. and Flier, J. S. (2000) *Trends Endocrinol.Metab* **11**, 327-332
2. Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Rodriguez, A., Salvador, J., and Fruhbeck, G. (2009) *Expert.Opin.Pharmacother.* **10**, 239-254
3. Rull, A., Camps, J., Alonso-Villaverde, C., and Joven, J. (2010) *Mediators.Inflamm.* **2010**,
4. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003) *J.Clin.Invest* **112**, 1796-1808
5. Zeyda, M. and Stulnig, T. M. (2007) *Immunol.Lett.* **112**, 61-67
6. Moraes, R. C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T. F., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., and Begeot, M. (2003) *Endocrinology* **144**, 4773-4782
7. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003) *J.Clin.Invest* **112**, 1821-1830
8. Clement, K., Viguier, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C. A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J. D., Vidal, H., Laville, M., Barsh, G. S., Basdevant, A., Stich, V., Cancellor, R., and Langin, D. (2004) *FASEB J.* **18**, 1657-1669
9. Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., D'Andrea, F., Molinari, A. M., and Giugliano, D. (2002) *Circulation* **105**, 804-809
10. Cianflone, K., Xia, Z., and Chen, L. Y. (2003) *Biochim.Biophys.Acta* **1609**, 127-143
11. Maslowska, M., Sniderman, A. D., Germinario, R., and Cianflone, K. (1997) *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **21**, 261-266
12. Kalant, D., Cain, S. A., Maslowska, M., Sniderman, A. D., Cianflone, K., and Monk, P. N. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 11123-11129
13. Kalant, D., MacLaren, R., Cui, W., Samanta, R., Monk, P. N., Laporte, S. A., and Cianflone, K. (2005) *J.Biol.Chem.* **280**, 23936-23944
14. Chen, N. J., Mirtsos, C., Suh, D., Lu, Y. C., Lin, W. J., McKerlie, C., Lee, T., Baribault, H., Tian, H., and Yeh, W. C. (2007) *Nature* **446**, 203-207
15. Gao, H., Neff, T. A., Guo, R. F., Speyer, C. L., Sarma, J. V., Tomlins, S., Man, Y., Riedemann, N. C., Hoesel, L. M., Younkin, E., Zetoune, F. S., and Ward, P. A. (2005) *FASEB J.* **19**, 1003-1005

16. Cain, S. A. and Monk, P. N. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 7165-7169
17. Cianflone, K., Kalant, D., Marliss, E. B., Gougeon, R., and Sniderman, A. D. (1995) *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **19**, 604-609
18. Maslowska, M., Vu, H., Phelis, S., Sniderman, A. D., Rhode, B. M., Blank, D., and Cianflone, K. (1999) *Eur.J.Clin.Invest* **29**, 679-686
19. Yang, Y., Lu, H. L., Zhang, J., Yu, H. Y., Wang, H. W., Zhang, M. X., and Cianflone, K. (2006) *Int.J.Obes.(Lond)* **30**, 439-446
20. Faraj, M., Havel, P. J., Phelis, S., Blank, D., Sniderman, A. D., and Cianflone, K. (2003) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 1594-1602
21. Schrauwen, P., Hesselink, M. K., Jain, M., and Cianflone, K. (2005) *Int.J.Obes.(Lond)* **29**, 632-638
22. Paglialunga, S., Fisette, A., Yan, Y., Deshaies, Y., Brouillette, J. F., Pekna, M., and Cianflone, K. (2008) *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **294**, E521-E529
23. Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., and Saltiel, A. R. (2007) *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **292**, E166-E174
24. Guo, R. F. and Ward, P. A. (2005) *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 821-852
25. Guha, M. and Mackman, N. (2001) *Cell Signal.* **13**, 85-94
26. Song, M. J., Kim, K. H., Yoon, J. M., and Kim, J. B. (2006) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **346**, 739-745
27. Maslowska, M., Legakis, H., Assadi, F., and Cianflone, K. (2006) *J.Lipid Res.* **47**, 643-652
28. Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., Kamei, Y., and Ogawa, Y. (2007) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **27**, 84-91
29. Takahashi, K., Mizuarai, S., Araki, H., Mashiko, S., Ishihara, A., Kanatani, A., Itadani, H., and Kotani, H. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 46654-46660
30. Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2006) *J.Biol.Chem.* **281**, 26602-26614
31. Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., and Kasuga, M. (2006) *J.Clin.Invest* **116**, 1494-1505

32. Bluher, M. (2009) *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* **117**, 241-250
33. Neels, J. G., Badianlou, L., Hester, K. D., and Samad, F. (2009) *J.Biol.Chem.* **284**, 20692-20698
34. Boisvert, W. A., Rose, D. M., Johnson, K. A., Fuentes, M. E., Lira, S. A., Curtiss, L. K., and Terkeltaub, R. A. (2006) *Am.J.Pathol.* **168**, 1385-1395
35. MacLaren, R., Cui, W., and Cianflone, K. (2008) *Adv.Exp.Med.Biol.* **632**, 1-21
36. Ward, P. A. (2009) *J.Mol.Med.* **87**, 375-378
37. Klos, A., Tenner, A. J., Johswich, K. O., Ager, R. R., Reis, E. S., and Kohl, J. (2009) *Mol.Immunol.* **46**, 2753-2766
38. Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Tenner, A. J., Tomiyama, Y., and Matsuzawa, Y. (2000) *Blood* **96**, 1723-1732
39. Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., and Tilg, H. (2004) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **323**, 630-635
40. Saijo, S., Nagata, K., Nakano, Y., Tobe, T., and Kobayashi, Y. (2005) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **334**, 1180-1183
41. Finco, T. S. and Baldwin, A. S. (1995) *Immunity.* **3**, 263-272
42. Zheng, C., Yin, Q., and Wu, H. (2011) *Cell Res.* **21**, 183-195
43. Baker, R. G., Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2011) *Cell Metab* **13**, 11-22
44. Madrid, L. V., Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Schottelius, A. J., Baldwin, A. S., Jr., and Mayo, M. W. (2000) *Mol.Cell Biol.* **20**, 1626-1638
45. Chetty, A., Cao, G. J., and Nielsen, H. C. (2006) *Pediatr.Res.* **60**, 389-394
46. Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., and Shoelson, S. E. (2001) *Science* **293**, 1673-1677
47. Ye, J. (2009) *Int.J.Obes.(Lond)* **33**, 54-66

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cytokine secretion screening profiles by protein array in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with ASP or C5a for 24 h. Cell culture supernatants were incubated overnight with pre-spotted nitrocellulose membranes spotted with 40 capture antibodies, and detectable cytokines were quantitated. Control (CTL) values were set to 100%. *A.* Secretion of cytokines in cell culture media from 3T3-L1 adipocytes treated with 200 nM ASP. *B.* Secretion of cytokines in cell culture media from adipocytes 3T3-L1 treated with 20 nM C5a. Results are presented as mean \pm SEM (n=3), where * P <0.05 and *** P <0.001 versus CTL.

Figure 2. MCP-1 and KC secretion in 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages with ASP or C5a treatment. Differentiated 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages were treated with various concentrations of ASP (*A* & *B*) or C5a (*C* & *D*) for 24 h. The results were normalized to cell triglyceride (cell TG) for adipocytes and cell protein (cell P) for macrophages. Control (CTL) was set as 100%. *A.* Effect of ASP on MCP-1 secretion in 3T3-L1 and J774 cells. *B.* Effect of ASP on KC secretion in 3T3-L1 and J774 cells. *C.* Effect of C5a on MCP-1 secretion in 3T3-L1 and J774 cells. *D.* Effect of C5a on KC secretion in 3T3-L1 and J774 cells. Results are presented as mean \pm SEM (n=9 wells). ** P <0.01 and *** P <0.001 versus CTL in 3T3-L1; + P <0.05, ++ P <0.01 and +++ P <0.001 versus CTL in J774.

Figure 3. Effect of ASP on cytokine secretion in 3T3-L1 adipocytes supplemented with J774 macrophage conditioned-media (MCM). Differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with ASP, MCM and both for 24 h. Cytokine secretion of MCP-1 (*A*), KC (*B*), IL-6 (*C*) and adiponectin (*D*) with different treatments were measured by ELISA. Levels of each cytokine already present in MCM were subtracted. 3T3-L1 cells cultured in serum-free alone as control (CTL) were set as baseline value of 100%. Results are presented as mean \pm SEM (n=9 wells). * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 versus CTL.

Figure 4. Effect of ASP on cytokine secretion in 3T3-L1 adipocytes-J774 macrophages direct coculture. Differentiated 3T3-L1 adipocytes were cultured alone (1×10^5 cells/well) or cocultured with J774 macrophages (1×10^5 cells/well). Adipocyte and adipocyte-macrophage cocultures were treated with ASP for 24 h. Media cytokine secretion of MCP-1 (A), adiponectin (B), KC (C) and IL-6 (D) were measured by ELISA. Levels of each cytokine measured in macrophage alone were subtracted from the coculture. 3T3-L1 cells cultured in serum-free as control (CTL) were set as 100%. Results are presented as mean \pm SEM (n=9 wells) where * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CTL; # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ versus coculture of 3T3-L1 and J774; NS indicates not significant versus coculture of 3T3-L1 and J774.

Figure 5. ASP effect on nuclear factor kappa-B (NF κ B) activation and phosphorylation in adipocytes. Differentiated 3T3-L1 adipocytes were stimulated with the indicated factors for various times, then fixed cells were subjected to the FACE ELISA NF κ B p65 Profiler kit for determination of serine468 (phospho-Ser⁴⁶⁸) and serine536 (phospho-Ser⁵³⁶) phosphorylation of NF κ B p65 and total p65 protein expression levels. Phosphorylation of Ser⁴⁶⁸ (A) and Ser⁵³⁶ (B) in 3T3-L1 adipocytes treated with ASP (200 nM) and LPS (1 μ g/mL) as a positive control at different times. Protein expression levels for phospho-Ser⁴⁶⁸ and phospho-Ser⁵³⁶ of NF κ B p65, and total p65 were normalized by cell number in each well. Cells without treatment were set as 100% (CTL) and results are shown relative to this where * $P < 0.05$ for ASP treatment versus CTL; + $P < 0.05$ for LPS treatment versus CTL. Phosphorylation of Ser⁴⁶⁸ after 15 min (C) and Ser⁵³⁶ after 30 min (D) in 3T3-L1 for all conditions indicated. Results are presented as mean \pm SEM (n=4) where * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus CTL.

Figure 6. Effect of PI3Kinase and NF κ B inhibition on ASP-stimulated MCP-1 and KC secretion in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated 3T3-L1 adipocytes were pre-treated with serum-free medium containing wortmannin 50 nM, a PI3Kinase inhibitor (A & B) or BAY11-7085 10 μ mol/L, an NF κ B inhibitor (C & D) for 30 min and then stimulated with ASP at various concentrations. Untreated cells (CTL) were set as 100% where relative expression of MCP-1 (A) and KC (B) secretion in 3T3-L1 stimulated with ASP only and

wortmannin 50 nM plus ASP and relative expression of MCP-1 (C) and KC (D) secretion in 3T3-L1 stimulated with ASP only and BAY11-7085 10 $\mu\text{mol/L}$ plus ASP. Results are presented as mean \pm SEM (n=9 wells) where $^+P<0.05$, $^{++}P<0.01$ and $^{+++}P<0.001$ for indicated inhibitor treatment versus no inhibitor (ASP only).

Table 1: Effect of ASP and C5a on IL-6 and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages

	ASP (nM)				C5a (nM)		
	CTL	50	200	600	5	20	60
% IL-6							
3T3-L1	100 ± 7.0	108.3 ± 5.3 <i>p</i> NS	106.8 ± 12.4 <i>p</i> NS	106.0 ± 5.1 <i>p</i> NS	299.7 ± 30.8 <i>p</i> <0.001	176.3 ± 7.2 <i>p</i> <0.05	164.8 ± 7.9 <i>p</i> <0.05
J774	100 ± 6.6	113.5 ± 4.6 <i>p</i> NS	85.3 ± 5.0 <i>p</i> NS	79.5 ± 8.6 <i>p</i> NS	119.9 ± 14.1 <i>p</i> NS	81.2 ± 7.8 <i>p</i> NS	100.3 ± 9.6 <i>p</i> NS
% adiponectin							
3T3-L1	100 ± 1.6	89.2 ± 4.2 <i>p</i> NS	92.3 ± 9.3 <i>p</i> NS	94.7 ± 12.6 <i>p</i> NS	147.2 ± 11.5 <i>p</i> <0.001	22.0 ± 1.0 <i>p</i> <0.001	18.3 ± 0.8 <i>p</i> <0.001
J774			ND			ND	

Differentiated 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages were treated with various concentrations of ASP or C5a for 24 h. The results were normalized to cell triglyceride (cell TG) for adipocytes and cell protein (cell P) for macrophages. Control (CTL) was set as 100% and ASP or C5a treatments were shown relative to this. NS indicates not significant versus CTL. n=9 (3 experiments in triplicate), mean ± SEM. Adiponectin levels in J774 macrophages were not detectable (ND) in cell culture media.

Figure 1

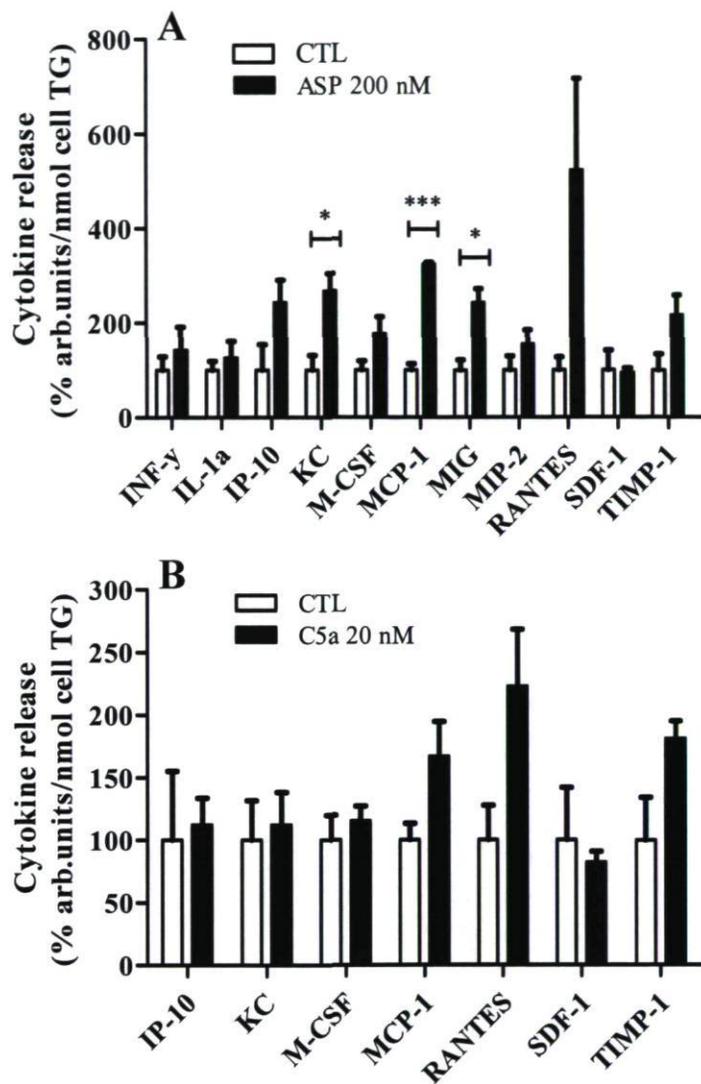


Figure 2

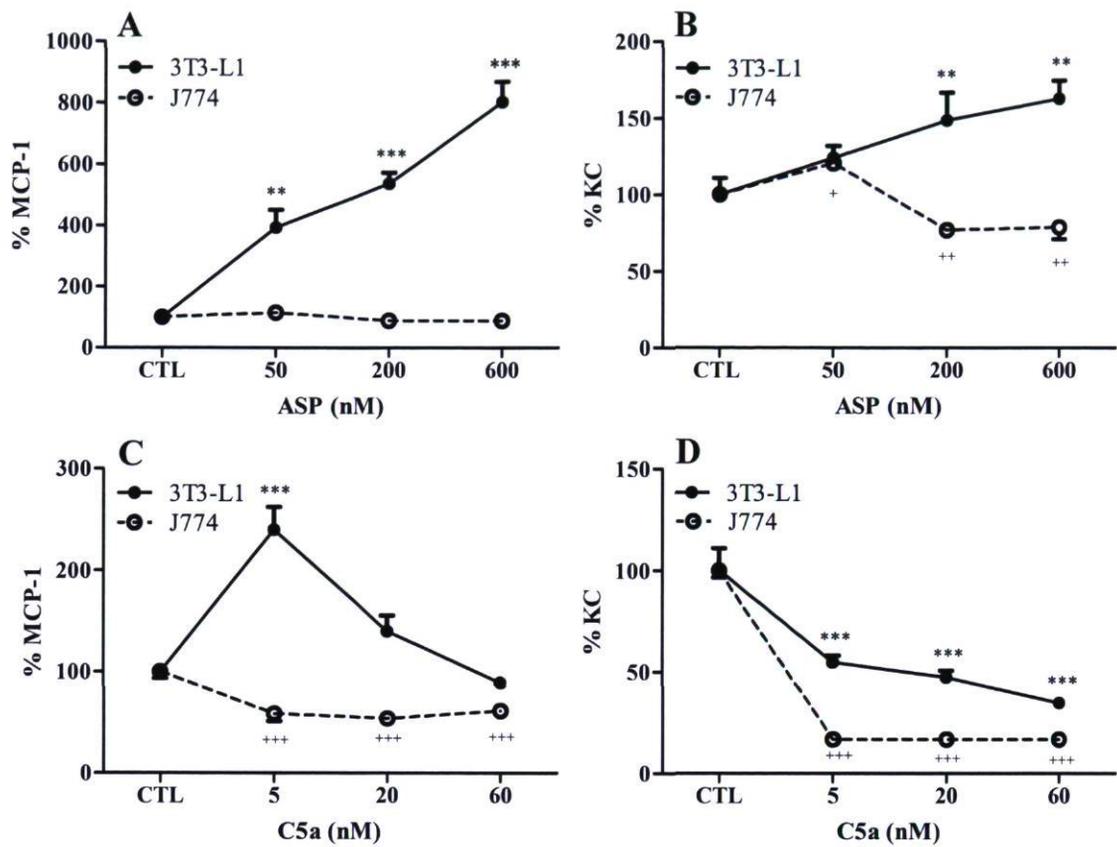


Figure 3

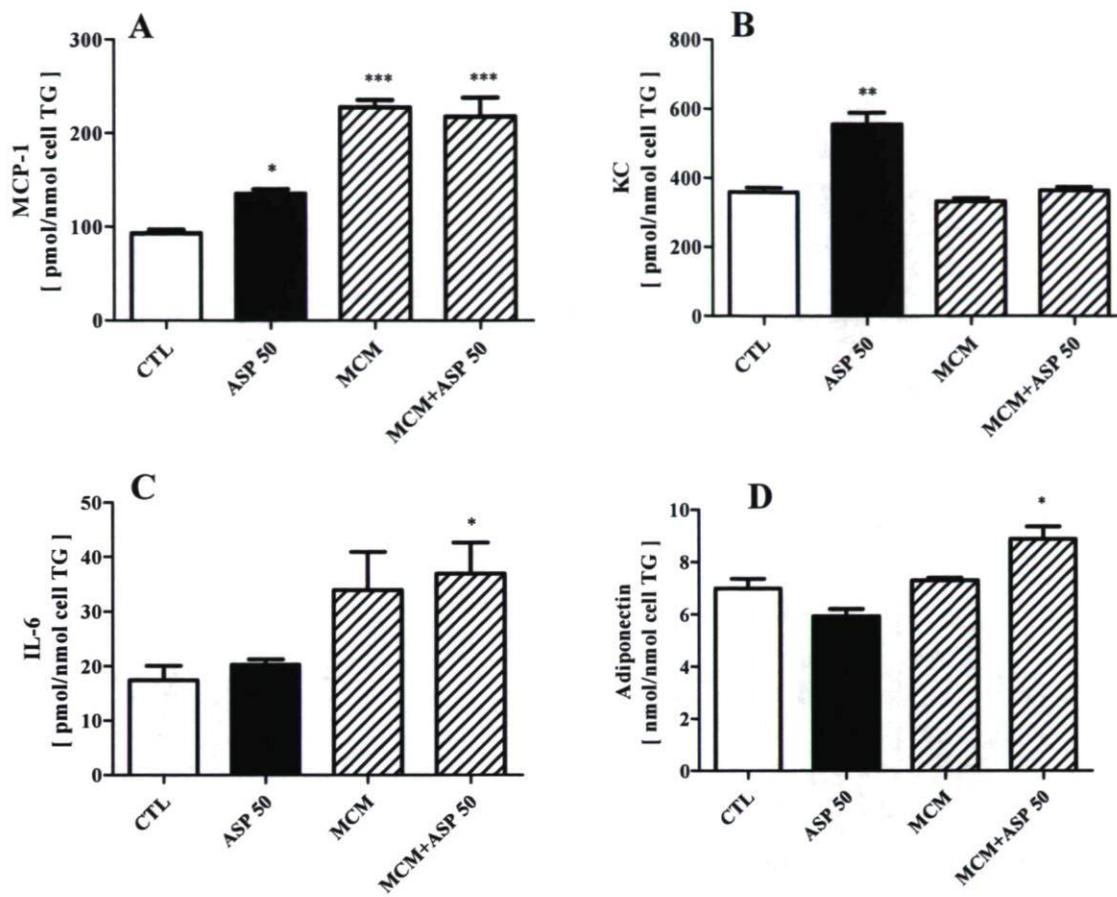


Figure 4

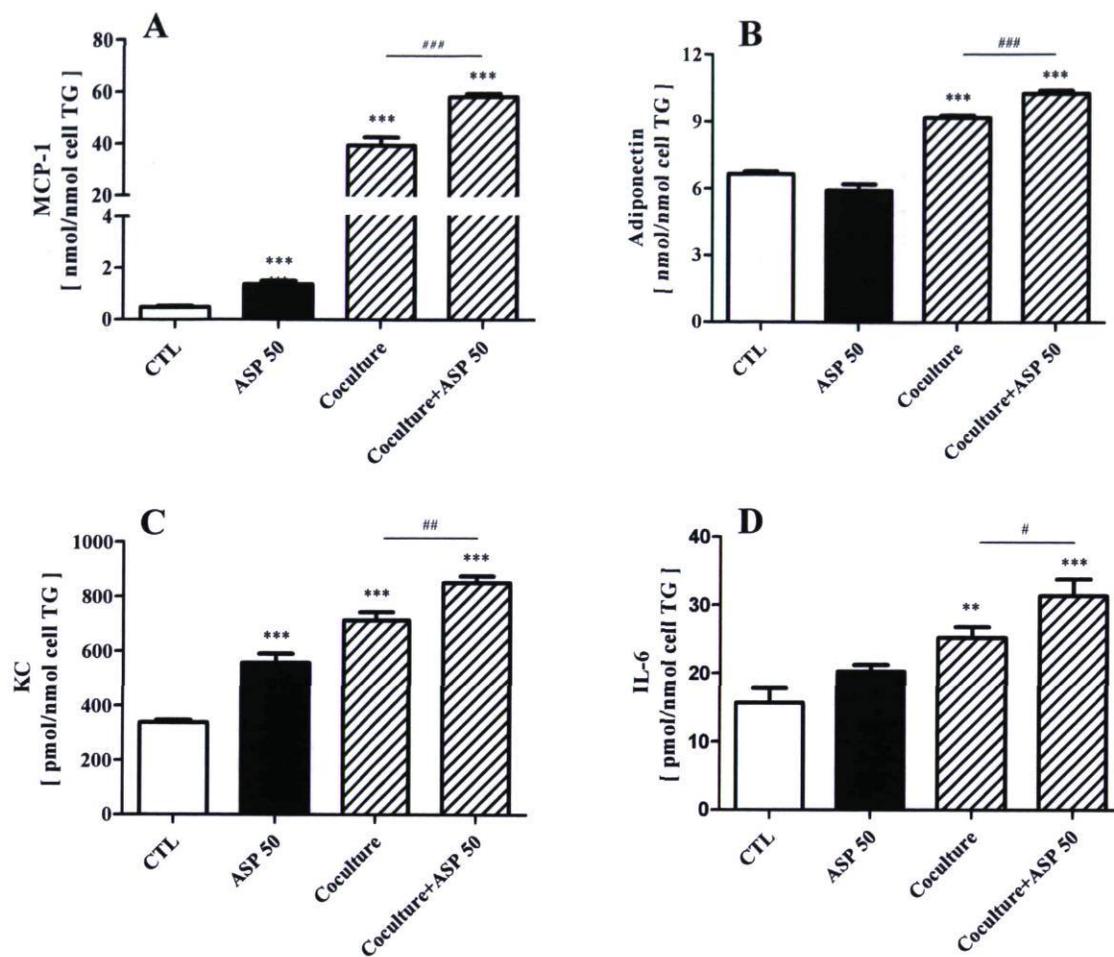


Figure 5

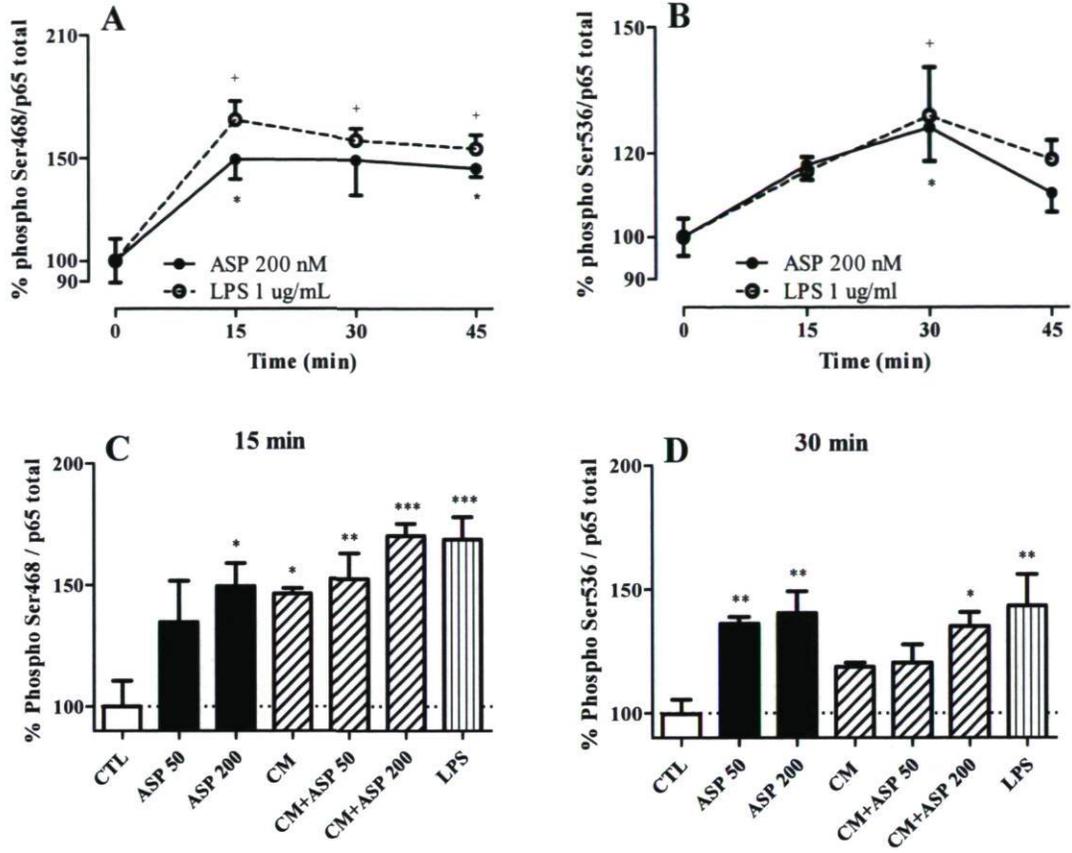
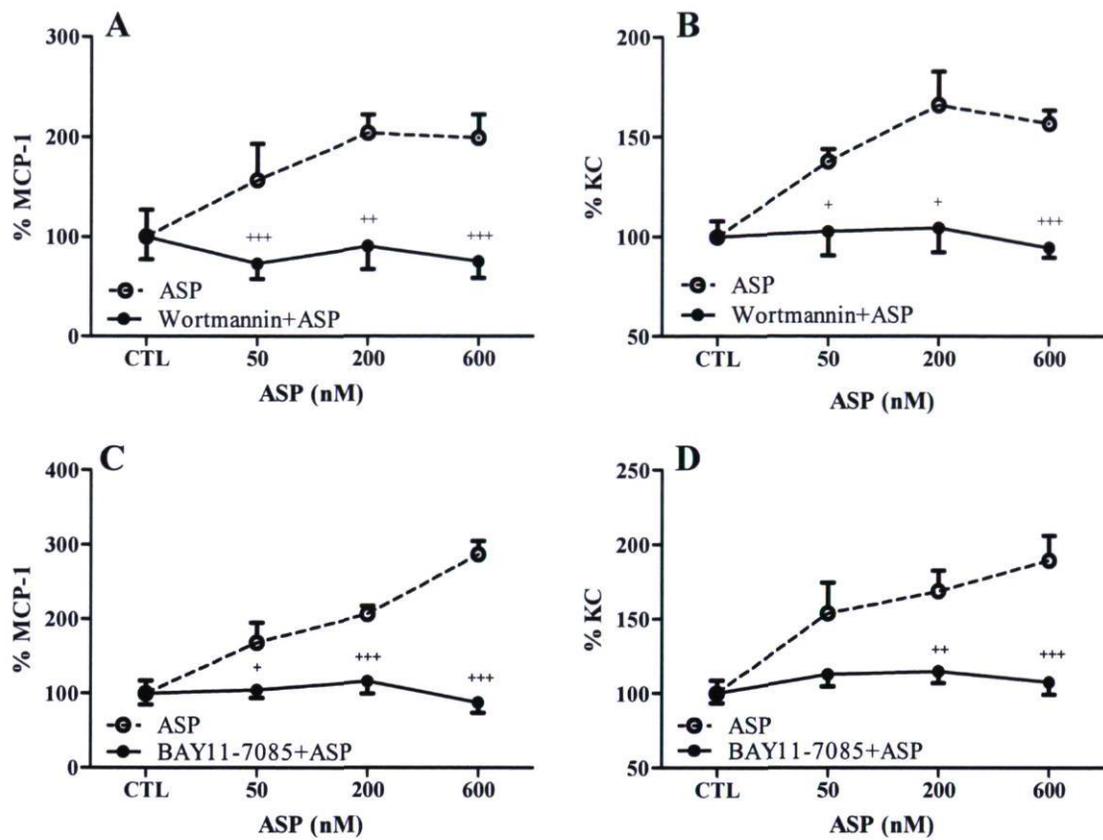


Figure 6



Chapitre 4

Conclusion

Le rôle élargi du tissu adipeux est maintenant bien accepté dans la littérature. D'un organe voué uniquement à l'entreposage d'énergie à un acteur endocrinien majeur, la recherche sur l'obésité effectuée au courant des dernières années aura provoqué un changement d'attitude radicale face au tissu adipeux. Tel que mentionné dans le Chapitre 1 de ce mémoire, les adipokines/cytokines sont responsables de l'état pro-inflammatoire de faible ampleur et de l'infiltration des macrophages associés à l'obésité, de manière directe ou indirecte.

Mon projet de maîtrise a permis de mieux comprendre le mode d'action d'une adipokine, soit la protéine stimulant l'acylation (ASP) sur le plan inflammatoire associé à l'obésité.

1. Faits saillants

Les résultats décrits dans l'article présenté ont démontré qu'en plus de son rôle métabolique important, l'ASP joue également un rôle spécifique sur le plan inflammatoire.

Tout d'abord, on observe que les effets de l'ASP sur la sécrétion des cytokines mesurées, particulièrement pour MCP-1 et KC, diffèrent entre les adipocytes et les macrophages. En effet, l'ASP semble avoir une action pro-inflammatoire sur les adipocytes

seulement. Il est intéressant de noter que le récepteur C5L2 permettant l'activation de l'ASP est exprimé autant chez les adipocytes que chez les macrophages, ce qui suggère que l'action de l'ASP varie dépendamment du type cellulaire. Le second point majeur de cette étude est que l'ASP potentialise son activité pro-inflammatoire lors de l'interaction directe entre les adipocytes et les macrophages. Cet effet synergique de l'ASP est démontré par une très forte augmentation de la sécrétion de MCP-1 et de l'adiponectine dans la co-culture directe. Ce projet a également permis de comprendre davantage les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'ASP dans un contexte inflammatoire associé à l'obésité.

En résumé, les résultats obtenus ont démontré que l'ASP accroît la réponse inflammatoire en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les adipocytes. Cette condition inflammatoire pourrait, à son tour, potentiellement favoriser l'infiltration de même que le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux lors du développement de l'obésité.

2. Regard critique

Évidemment, toute recherche scientifique présente parfois des faiblesses causées soient par des limitations au niveau technique, expérimental ou budgétaire. Malheureusement, mon étude ne fait pas exception et comporte certaines lacunes.

En premier lieu, bien que l'utilisation de lignées cellulaires permette d'obtenir des résultats reproductibles rapidement à faible coût, il n'est toutefois pas possible d'extrapoler les résultats obtenus chez le modèle animal ou chez l'humain. Il est donc impossible d'avoir la certitude que les découvertes effectuées seront transposables chez la souris, voire chez l'homme. La prochaine étape sera d'effectuer des expériences *in vivo* à l'aide de culture primaire. L'utilisation d'adipocytes et de macrophages isolés à partir du tissu adipeux de souris fait partie du plan ultérieur de nos recherches.

La deuxième faiblesse de cette étude réside dans le modèle de co-culture. Bien que ce modèle soit utilisé dans de nombreuses études et qu'il puisse être une bonne représentation de l'interaction entre les adipocytes et les macrophages dans le tissu adipeux dans un contexte inflammatoire associé à l'obésité, la réalité de ce qui se passe dans un organe entier est beaucoup plus complexe. Le tissu adipeux est composé de plusieurs types cellulaires autres que des adipocytes et macrophages. La présence de ces autres cellules et de leurs interactions demeurent, par conséquent, des facteurs importants à considérer lors de l'interprétation des résultats. Dans ce cas-ci, les lignées cellulaires ne nous permettent malheureusement pas d'étudier les interactions entre les différents types cellulaires qui composent un organe. Les données obtenues devront évidemment être confirmées par des études avec des modèles animaux dans le futur.

3. Perspectives

Les résultats présentés dans cet article démontrent pour la première fois l'implication de la protéine stimulant l'acylation dans la réponse inflammatoire chez les cellules adipeuses. Par cette étude, nous avons une fois de plus confirmé cette existence d'un lien étroit entre le métabolisme et l'immunité. Certains auteurs ont même donné une nouvelle appellation à cet état inflammatoire chronique de faible ampleur, soit la «métaflammation» [75].

Le système du complément constitue une des premières lignes de défense du système immunitaire inné en initiant et en intensifiant la réaction inflammatoire. L'activation du système du complément est impliquée dans les infections bactériennes et virales. Nonobstant, ses fonctions s'étendent maintenant bien au-delà de l'élimination des agents pathogènes. En effet, un dysfonctionnement de la voie du complément ou de l'activation de la protéine C3 est associé à une multitude de complications métaboliques reliées à l'obésité comme : l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires [76] ainsi que la résistance à l'insuline [77].

Parallèlement, la protéine stimulant l'acylation est formée uniquement à partir de la voie du complément et du C3. Nos résultats ont démontré que l'ASP augmente la sécrétion de cytokines aux propriétés pro-inflammatoires et chimiotactiques. Il est ainsi permis de s'interroger si une altération au niveau du système du complément pourrait avoir un lien avec l'augmentation accrue de la production d'adipokines/cytokines et par le fait même, l'infiltration des cellules immunes tels les macrophages dans le tissu adipeux obèse? Une évaluation de la réponse inflammatoire chez des souris déficientes en ASP (C3KO) s'avère pertinente dans les perspectives de recherche pour approfondir le rôle immunitaire de l'ASP. En effet, on peut se demander si l'absence d'ASP pourrait permettre de protéger contre l'infiltration des macrophages et de neutraliser l'initiation de la réponse inflammatoire ?

Une deuxième avenue à explorer serait l'implication de la voie de signalisation ASP-C5L2 en utilisant, cette fois-ci, des souris déficientes du gène récepteur C5L2 (C5L2KO). En effet, des études ont associé un possible rôle pro-inflammatoire du C5L2 en observant une forte diminution de médiateurs inflammatoires chez les souris C5L2KO comparés aux souris du groupe contrôle (WT) [78]. D'après les chercheurs, un blocage du récepteur pourrait augmenter le taux de survie dans les cas modérés de septicémie. Il serait donc très intéressant de déterminer si une rupture au niveau de la voie de signalisation ASP-C5L2 module les concentrations d'adipokines circulantes lors du développement de l'obésité.

Nos résultats décrits dans l'article précédent ne sont qu'une infime partie des études relatives aux effets des adipokines. Cette famille d'hormones permet également de comprendre davantage les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'obésité de même que les maladies qui y sont associées. De plus en plus d'évidences prouvent que les adipokines représentent des cibles potentielles dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques ou pharmacologiques pour le traitement de l'obésité.

Bibliographie

1. **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.** *World Health Organ Tech.Rep.Ser.* 2000, **894**:i-253.
2. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM: **Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004.** *JAMA* 2006, **295**:1549-1555.
3. Dehghan M, Akhtar-Danesh N, Merchant AT: **Childhood obesity, prevalence and prevention.** *Nutr.J.* 2005, **4**:24.
4. Prentice AM, Jebb SA: **Fast foods, energy density and obesity: a possible mechanistic link.** *Obes.Rev.* 2003, **4**:187-194.
5. Schelbert KB: **Comorbidities of obesity.** *Prim.Care* 2009, **36**:271-285.
6. Gustafson B: **Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis.** *J.Atheroscler.Thromb.* 2010, **17**:332-341.
7. Houmard JA, Pories WJ, Dohm GL: **Is there a metabolic program in the skeletal muscle of obese individuals?** *J.Obes.* 2011, **2011**:250496.
8. Bray GA: **Medical consequences of obesity.** *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2004, **89**:2583-2589.
9. Saely CH, Geiger K, Drexel H: **Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review.** *Gerontology* 2010.
10. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 1994, **372**:425-432.
11. Schaffler A, Scholmerich J: **Innate immunity and adipose tissue biology.** *Trends Immunol.* 2010, **31**:228-235.
12. 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**:2273-2282.
13. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Salvador J, Fruhbeck G: **Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity.** *Expert.Opin.Pharmacother.* 2009, **10**:239-254.

14. Balistreri CR, Caruso C, Candore G: **The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases.** *Mediators.Inflamm.* 2010, **2010**:802078.
15. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: **Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.** *Science* 1993, **259**:87-91.
16. Hotamisligil GS, Spiegelman BM: **Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link.** *Diabetes* 1994, **43**:1271-1278.
17. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B: **Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance.** *Eur.Cytokine Netw.* 2006, **17**:4-12.
18. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.** *J.Clin.Invest* 2003, **112**:1821-1830.
19. Tilg H, Moschen AR: **Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance.** *Mol.Med.* 2008, **14**:222-231.
20. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J.Clin.Invest* 2003, **112**:1796-1808.
21. Bluher M: **Adipose tissue dysfunction in obesity.** *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 2009, **117**:241-250.
22. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS: **Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans.** *J.Lipid Res.* 2005, **46**:2347-2355.
23. 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**:2277-2286.
24. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H: **Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion.** *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2007, **92**:1023-1033.
25. Maury E, Brichard SM: **Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome.** *Mol.Cell Endocrinol.* 2010, **314**:1-16.

26. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR: **Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins.** *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2007, **292**:E166-E174.
27. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O: **Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation.** *Nat.Clin.Pract.Rheumatol.* 2007, **3**:716-724.
28. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE: **Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article.** *Dig.Dis.Sci.* 2009, **54**:1847-1856.
29. Gauvreau D, Villeneuve N, Deshaies Y, Cianflone K: **[Novel adipokines: Links between obesity and atherosclerosis.]** *Ann.Endocrinol.(Paris)* 2011, **72**:224-231.
30. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: **A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.** *J.Biol.Chem.* 1995, **270**:26746-26749.
31. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: **AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.** *J.Biol.Chem.* 1996, **271**:10697-10703.
32. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K: **cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1996, **221**:286-289.
33. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M: **Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma.** *J.Biochem.* 1996, **120**:803-812.
34. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: **The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity.** *Nat.Med.* 2001, **7**:941-946.
35. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: **The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action.** *Nat.Med.* 2001, **7**:947-953.
36. Tilg H, Moschen AR: **Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.** *Nat.Rev.Immunol.* 2006, **6**:772-783.
37. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: **Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.** *Nature* 2003, **423**:762-769.

38. Robinson K, Prins J, Venkatesh B: **Clinical review: Adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness.** *Crit Care* 2011, **15**:221.
39. Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y, Furihata M: **Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease.** *Med.Mol.Morphol.* 2007, **40**:115-120.
40. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y: **An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls.** *Horm.Metab Res.* 2000, **32**:47-50.
41. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: **Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30.** *J.Clin.Invest* 2001, **108**:1875-1881.
42. Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, Martin LJ, Jacob HJ, Black AE, Maas D, Takahashi M, Kihara S, Tanaka S, Matsuzawa Y, Blangero J, Cohen D, Kissebah A: **The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome.** *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2001, **86**:4321-4325.
43. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H: **Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004, **323**:630-635.
44. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J: **Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism.** *Mediators.Inflamm.* 2010, **2010**.
45. Hemmrich K, Thomas GP, Abberton KM, Thompson EW, Rophael JA, Penington AJ, Morrison WA: **Monocyte chemoattractant protein-1 and nitric oxide promote adipogenesis in a model that mimics obesity.** *Obesity.(Silver.Spring)* 2007, **15**:2951-2957.
46. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA: **Adipose tissue: a regulator of inflammation.** *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 2005, **19**:547-566.
47. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D: **Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991, **88**:5252-5256.
48. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ: **Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.** *Mol.Cell* 1998, **2**:275-281.

49. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF: **Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.** *Nature* 1998, **394**:894-897.
50. Sell H, Eckel J: **Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance.** *Curr.Opin.Lipidol.* 2007, **18**:258-262.
51. Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM: **Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects.** *Int.J.Obes.(Lond)* 2005, **29**:146-150.
52. Sartipy P, Loskutoff DJ: **Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003, **100**:7265-7270.
53. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T: **Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance.** *J.Biol.Chem.* 2006, **281**:26602-26614.
54. Cianflone K, Rodriguez MA, Walsh M, Vu H, Sniderman AD: **The effect of a plasma protein fraction on lipid synthesis in cultured skin fibroblasts from normals and patients with hyperapobetalipoproteinemia.** *Clin.Invest Med.* 1988, **11**:99-107.
55. Cianflone K, Xia Z, Chen LY: **Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents.** *Biochim.Biophys.Acta* 2003, **1609**:127-143.
56. Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, Monk PN: **The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:11123-11129.
57. Kalant D, MacLaren R, Cui W, Samanta R, Monk PN, Laporte SA, Cianflone K: **C5L2 is a functional receptor for acylation-stimulating protein.** *J.Biol.Chem.* 2005, **280**:23936-23944.
58. Cui W, Lapointe M, Gauvreau D, Kalant D, Cianflone K: **Recombinant C3adesArg/acylation stimulating protein (ASP) is highly bioactive: a critical evaluation of C5L2 binding and 3T3-L1 adipocyte activation.** *Mol.Immunol.* 2009, **46**:3207-3217.
59. Gao H, Neff TA, Guo RF, Speyer CL, Sarma JV, Tomlins S, Man Y, Riedemann NC, Hoesel LM, Younkin E, Zetoune FS, Ward PA: **Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2.** *FASEB J.* 2005, **19**:1003-1005.

60. Cain SA, Monk PN: **The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74).** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:7165-7169.
61. Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, Brodbeck RM, Krause JE, Choe HR, Gerard NP, Gerard C: **C5L2, a nonsignaling C5A binding protein.** *Biochemistry* 2003, **42**:9406-9415.
62. Sniderman AD, Maslowska M, Cianflone K: **Of mice and men (and women) and the acylation-stimulating protein pathway.** *Curr.Opin.Lipidol.* 2000, **11**:291-296.
63. Germinario R, Sniderman AD, Manuel S, Lefebvre SP, Baldo A, Cianflone K: **Coordinate regulation of triacylglycerol synthesis and glucose transport by acylation-stimulating protein.** *Metabolism* 1993, **42**:574-580.
64. Martin LJ, Cianflone K, Zakarian R, Nagrani G, Almasy L, Rainwater DL, Cole S, Hixson JE, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG: **Bivariate linkage between acylation-stimulating protein and BMI and high-density lipoproteins.** *Obes.Res.* 2004, **12**:669-678.
65. Maslowska M, Legakis H, Assadi F, Cianflone K: **Targeting the signaling pathway of acylation stimulating protein.** *J.Lipid Res.* 2006, **47**:643-652.
66. Maslowska M, Vu H, Phelis S, Sniderman AD, Rhode BM, Blank D, Cianflone K: **Plasma acylation stimulating protein, adipsin and lipids in non-obese and obese populations.** *Eur.J.Clin.Invest* 1999, **29**:679-686.
67. Schrauwen P, Hesselink MK, Jain M, Cianflone K: **Acylation-stimulating protein: effect of acute exercise and endurance training.** *Int.J.Obes.(Lond)* 2005, **29**:632-638.
68. Tahiri Y, Karpe F, Tan GD, Cianflone K: **Rosiglitazone decreases postprandial production of acylation stimulating protein in type 2 diabetics.** *Nutr.Metab (Lond)* 2007, **4**:11.
69. Cianflone K, Zakarian R, Couillard C, Delplanque B, Despres JP, Sniderman A: **Fasting acylation-stimulating protein is predictive of postprandial triglyceride clearance.** *J.Lipid Res.* 2004, **45**:124-131.
70. Murray I, Sniderman AD, Havel PJ, Cianflone K: **Acylation stimulating protein (ASP) deficiency alters postprandial and adipose tissue metabolism in male mice.** *J.Biol.Chem.* 1999, **274**:36219-36225.
71. Murray I, Sniderman AD, Cianflone K: **Mice lacking acylation stimulating protein (ASP) have delayed postprandial triglyceride clearance.** *J.Lipid Res.* 1999, **40**:1671-1676.

72. Murray I, Sniderman AD, Cianflone K: **Enhanced triglyceride clearance with intraperitoneal human acylation stimulating protein in C57BL/6 mice.** *Am.J.Physiol* 1999, **277**:E474-E480.
73. Murray I, Havel PJ, Sniderman AD, Cianflone K: **Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein.** *Endocrinology* 2000, **141**:1041-1049.
74. Xia Z, Stanhope KL, Digitale E, Simion OM, Chen L, Havel P, Cianflone K: **Acylation-stimulating protein (ASP)/complement C3adesArg deficiency results in increased energy expenditure in mice.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:4051-4057.
75. Hotamisligil GS: **Inflammation and metabolic disorders.** *Nature* 2006, **444**:860-867.
76. Onat A, Can G, Rezvani R, Cianflone K: **Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk.** *Clinica Chimica Acta* 2011, **412**:1171-1179.
77. Muscari A, Antonelli S, Bianchi G, Cavrini G, Dapporto S, Ligabue A, Ludovico C, Magalotti D, Poggiopollini G, Zoli M: **Serum C3 is a stronger inflammatory marker of insulin resistance than C-reactive protein, leukocyte count, and erythrocyte sedimentation rate - Comparison study in an elderly population.** *Diabetes Care* 2007, **30**:2362-2368.
78. Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Kohl J, Gerard C, Sarma JV, Award P: **Functional roles for C5a receptors in sepsis.** *Nature Medicine* 2008, **14**:551-557.

