



Les mécanismes moléculaires du Facteur Trefoil 2 dans le métabolisme énergétique et le développement de l'obésité

Mémoire

Octave Mucunguzi

Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

**Les mécanismes moléculaires du Facteur Trefoil 2 dans le métabolisme
énergétique et le développement de l'obésité.**

Mémoire

Octave Mucunguzi

Jonny St-Amand : Directeur de Recherche

Résumé

L'obésité est une maladie multifactorielle. La prise alimentaire, le mode de vie et la génétique sont les trois facteurs principaux contribuant à son développement. Tff2 est un petit peptide intestinal ayant pour fonction principale, la protection et la maintenance de la muqueuse. Les souris transgéniques déficientes (KO) du gène Trefoil Factor 2 (*Tff2*) sont viables, fertiles et protégées contre l'obésité induite par l'alimentation riche en gras (HIO); leurs comportements alimentaires diffèrent de ceux des souris du type sauvage (WT). Le but de cette étude est d'élucider les mécanismes moléculaires par lesquels le gène *Tff2* contribue au développement de l'obésité. Pour ce faire, on a identifié les principaux régulateurs de transcription des gènes sensibles à l'alimentation riche en gras (HF) et de ceux sensibles à l'alimentation faible en gras (LF) dans l'intestin grêle. Ensuite, les souris *Tff2* KO et les souris WT ont été nourries avec HF et LF à volonté, leur développement a été suivi. Les organes qui participent dans le métabolisme énergétique tels que le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique ont été prélevés pour y mesurer l'expression des gènes et des protéines impliqués dans ce processus.

Les protéines et les gènes tels que CD36/*Cd36*, NUR77/*Nur77* et GLUT4/*Glut4* ont été plus fortement exprimés dans les souris *Tff2*KO que dans les souris WT, tandis qu'aucune différence significative n'a été observée dans les protéines mitochondriales. Nos résultats ont révélé en partie, les voies moléculaires et métaboliques qui mettent en évidence le lien de *Tff2* avec les protéines impliquées dans le métabolisme énergétique. Il serait recommandable de mener la même étude sur les tissus humains afin de souligner le rôle de *Tff2* dans le développement de l'obésité et le prendre pour la nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'obésité.

Abstract

Obesity is a multifactorial disease. Food intake, lifestyle and genetics are the three factors that contribute to its development. Tff2 is a small gut peptide playing protective and maintenance functions. Trefoil factor 2 knockout mice (*Tff2*KO) are viable, fertile and protected from high fat induced obesity (HIO) and their feeding behaviors are different from those of wild type (WT) ones. The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanisms by which Tff2 contributes to the development of obesity. To do this, the principal transcriptional regulators for high fat and low fat responsive genes were identified in the small intestine; then *Tff2* KO and WT mice were fed *ad libitum* with high-fat diet (HF) and low-fat diet (LF), their development has been supervised. Thereafter, energy metabolizing organs such as liver, adipose tissue and skeletal muscle have been harvested in order to measure the expression of genes and proteins involved in energy metabolism.

Proteins and genes such as CD36/*Cd36*, NUR77/*Nur77*, and GLUT4/*Glut4* were more expressed in *Tff2*KO mice than in WT mice, whereas no significant differences were observed in mitochondrial proteins. Our results showed a part of molecular and metabolic pathways that connect Tff2 and energy metabolizing proteins, we hope that Tff2 will be studied in human tissues to emphasize its role in the development of obesity and use it as a new therapeutic target for the treatment of obesity.

Tables des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Tables des matières.....	v
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements	xi
Avant-propos	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de littérature	3
1.1. Le métabolisme énergétique au sein des organes.....	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. L'estomac et signaux de faim.....	3
1.1.3. Le foie et son rôle dans le métabolisme énergétique.....	3
1.1.4 Le muscle squelettique et son implication dans le métabolisme énergétique.....	4
1.1.5. Le tissu adipeux	5
1.1.5.1 Le tissu adipeux un organe endocrine régulant l'homéostasie énergétique.....	5
1.1.5.2 Le tissu adipeux un organe spécialisé dans le stockage d'énergie	5
1.1.6 Le cerveau et l'homéostasie énergétique.....	6
1.2 Obésité et les maladies apparentées	7
1.2.1 Physiopathologie de l'obésité.....	7
1.2.1.1 L'obésité et l'inflammation	7
1.2.1.2 L'obésité et les maladies métaboliques	7
1.2.1.3 L'obésité et le rythme circadien.....	9
1.2.1.4 Obésité et l'épigénétique.....	10
1.2.2 Conséquences de l'obésité	11
1.2.3 La prévention et le traitement de l'obésité	11
1.3 Facteur trefoil 2 (Tff2).....	13
1.3.1 Généralité	13
1.3.2 L'expression génique de Tff2 et pathologie associée à sa surexpression.....	13
1.3.2.1 L'expression génique de Tff2.....	13
1.3.2.2 Pathologie associée à l'expression de Tff2.....	14
1.3.3 Conclusion.....	14
1.4.1 Problématique de cette recherche.	15
1.4.2 Hypothèses et objectifs de cette recherche.....	15
1.4.3 Objectif global.....	16
1.4.4 Méthodologie de recherche de l'étude 1.....	16
1.4.5 Méthodologie de recherche de l'étude 2.....	18
Chapitre2: Résultats de l'étude 1: Identification of the principal transcriptional regulators for low-fat and high-fat meal responsive genes in small intestine	19
2.1 Résumé en Français.....	19
2.2 Participation à l'étude	20
2.3 Corps du texte.....	21
Chapitre 3. Résultats de l'étude 2: Energy and metabolic pathways in trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice beyond the protection from high-fat diet-induced obesity.....	53
3.1 Resumé en français.....	53

3.2 : Participation à l'étude.....	54
3.3 Corps du texte.....	55
Conclusion et perspectives.....	84
Bibliographies.....	88

Liste des figures

FIGURE 1 : PROTÉINES MAL REPLIÉES DANS L'ER ET UPR	8
FIGURE 2 : CYCLES (JOUR-NUIT) ET L'ALIMENTATION	9
FIGURE 3: RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION ET LA MODIFICATION DES HISTONES.	10
FIGURE 4 : RÉSUMÉ DE LA MÉTHODOLOGIE DE RECHERCHE DE L'ÉTUDE 1 :	17
FIGURE 5 : RÉSUMÉ DE LA MÉTHODOLOGIE DE RECHERCHE DE L'ÉTUDE 2 :	18

Liste des abréviations

ACC: cortex cingulaire antérieur
ADN: Acide désoxyribonucléique
AgRP: Agouti related protein
AMP: Adénosine monophosphate
ApoA-IV: Apolipoprotéine A-4
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ATP: Adénosine Triphosphate
ATP5A: ATP synthase sous-unité alpha
AUCC: Association des universités et collèges du Canada
BAT: Tissu adipeux brun
Beta AR: Récepteur adrénérique beta
BMAL1: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein1
CAD: Maladies coronariennes
cAMP: Adénosine monophosphate cyclique
CCK: Cholécystokinine
CD36: Cluster de différenciation 36
cDNA: ADN complémentaire
ChREBP: Carbohydrate-responsive element binding protein
CHU: Centre hospitalier universitaire
CLOCK: Circadian locomotor output cycles kaput
CREB: C-AMP response element-binding protein
CRTC: CREB Regulated transcription factor coactivator 2
CYR: Cryptochrome
DIT: Diet-induced thermogenesis
DMC: Circuit dopamine mésolimbique
DNA: Acide désoxyribonucléique

ER: Reticulum endoplasmique

FDA: Food and drug administration

FOXO1: Forkhead box protein O1

GABA: Acide aminobutyrique gamma

GLUT2: Transporteur de glucose 2

GLUT4: Transporteur de glucose 4

HDL: High density lipoprotein

HF: Alimentation riche en gras

HIO: Obésité induite par l'alimentation riche en gras.

H3K9: Histone3 lysine 9

IL: Interleukine

IMC: Indice de masse corporelle

Ir: Résistance à l'insuline

JHDM2A: Jumonji C-domain-containing histone demethylase 2A

LF: Alimentation faible en gras

MAECD: Ministère d'affaires étrangères, commerce et développement

MC4R: Récepteur mélanocortine 4

Mt-UCP1: Protéine de découplage mitochondriale 1

NAFLD: Stéatose hépatique non alcoolique

NDUFB: Déshydrogénase de NADH (ubiquinone) sous complexe B sous unité 8

NPY: Neuropeptide Y

NUR77: Récepteur nucléaire 77

PAI-1: Activateur de plasminogène-1.

PCBF: Programme canadien des bourses de la francophonie

PER: Period circadian protein

PFC: Cortex préfrontal

PGC-1 α : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes coactivateur alpha

POMC: Proopiomélanocortine

PPAR α : Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosomes

PPAR γ : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes

qRT-PCR: Quantitative real time polymerase chain reaction

RNase: Ribonucléase

SAA: Amyloïde sérique A

SAT: Tissu adipeux sous cutané

SCN: Noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus

SDHB: Succinate déshydrogénase

SF1: Facteur stéroïdogénique 1

SREBP: Sterol regulatory element binding protein

T2D: Diabète du type 2

Tff2: Facteur trefoil 2

Tff2KO: Déficience en Tff2

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

UCP1: Protéine de découplage 1

UCP3: Protéine de découplage 3

UPR : Réponse aux protéines mal repliées

UQCRC2: Ubiquinol-cytochrome C reductase core protein II

VAT: Tissu adipeux viscéral

VLDL: Lipoprotéines à très faible densité

VPa: Pallidum ventral

VTA: Aire tégmental ventral

WAT: Tissu adipeux blanc

WT: Type sauvage

Remerciements

L'accomplissement de cette maîtrise à l'université Laval dans le programme de biologie cellulaire et moléculaire est le résultat des efforts combinés qui vient de m'épanouir dans mon parcours académique et professionnel.

Premièrement, je voudrais sincèrement adresser mes remerciements à mon directeur de recherche, Dr Jonny St-Amand, pour non seulement m'avoir accepté dans son laboratoire mais aussi et surtout pour sa preuve de patience et de compréhension à mon égard en dépit de mes défaillances et mes imperfections. Je remercie également la coordinatrice du laboratoire de Génomiques Fonctionnelles au centre de recherche du CHU de Québec, Dre Mayumi Yoshioka. Grâce à vous et votre équipe de recherche, j'ai accueilli les nouvelles connaissances et développé un bagage scientifique qui complète mes connaissances sur la compréhension des réactions métaboliques qui se déroulent au sein d'un organisme. Recevez sincèrement l'expression ma profonde gratitude.

Mes remerciements se dirigent aussi à mon organisme boursier, le Programme Canadien de Bourses de la Francophonie / l'Association des Universités et Collèges du Canada (AUCC), tous mandatés par le Ministère des Affaires étrangères, Commerce et Développement Canada (MAECD) pour le soutien financier dont j'ai pu bénéficier pour ma formation. Je souligne plus particulièrement ma reconnaissance vers Madame Jeanne Gallagher, ancienne gestionnaire principale du PCBF, pour sa rigueur et son soutien moral durant toute la période de ma formation.

Ma gratitude est aussi dirigée vers toutes/ tous celles/ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de cette formation.

Avant-propos

Pendant mes études de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire faites à l'Université Laval, j'ai collaboré à la réalisation de deux études menées au centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Québec (CHUQ). Les résultats de chacune de ces études, dont l'ensemble constitue ce mémoire de fin d'études, sont présentés dans le présent document sous forme des articles qui occupent le deuxième et troisième chapitre de ce document.

Le premier chapitre comprend une brève introduction et une synthèse bibliographique. On y trouve également la problématique du sujet, des objectifs et des hypothèses ainsi qu'une brève présentation de la méthodologie de chacune de deux études. Les chapitres II à III sont consacrés aux résultats.

La première étude intitulée « identification of the principal transcriptional regulators for low-fat and high-fat meal responsive genes in small intestine » dont je suis premier auteur, est publiée dans le journal de Nutrition & Metabolism en date du 23 octobre 2017. Pour la publication de cet article, j'ai participé dans la rédaction du manuscrit, au déroulement des travaux de laboratoire et à l'analyse des résultats.

La deuxième étude ayant été publiée dans le journal Life Sciences le 15 décembre 2018, sous le titre de « energy and metabolic pathways in trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice beyond the protection from high-fat diet-induced obesity ». Ma contribution générale pour cet article était de mener les travaux de laboratoire, rédiger le manuscrit et d'analyser les résultats.

Enfin, la dernière partie comprend une brève discussion, la conclusion et les perspectives générales.

Introduction

Le métabolisme énergétique est l'ensemble des réactions qui s'accompagnent de la production de l'énergie utilisable par la cellule, ces réactions sont cruciales pour maintenir la vie et se reproduire; leurs dérèglements posent souvent des problèmes de santé. L'obésité étant une maladie causée par le déséquilibre de la balance énergétique, fait aussi partie des problèmes majeurs de santé publique[1]. Les sociétés actuelles favorisent la consommation excessive des aliments riches en gras (HF) et une vie sédentaire, ce qui nuit à l'homéostasie énergétique surtout pour des personnes prédisposées à l'obésité. L'homéostasie énergétique repose sur le contrôle de l'apport et de la dépense énergétique qui sont assurés par plusieurs régions du cerveau, les organes périphériques et les systèmes circulatoires et neuronaux constituant ainsi des réseaux qui communiquent continuellement [2]. Le contrôle de l'appétit et la thermogenèse sont assurés par des réseaux, qui comprennent le circuit dopamine mésolimbique (DMC), les systèmes opioïdes, les systèmes endocannabinoïdes et mélanocortines; leurs activités sont modulées par les hormones du système digestif et du tissu adipeux[3]. Ces hormones informent le cerveau sur l'état nutritionnel et énergétique à travers la circulation sanguine et les voies de signalisations[4]. L'obésité résulte du déséquilibre entre l'apport énergétique et la dépense énergétique qui est induit parfois par l'HF. La palatabilité et la densité calorifique élevées de l'HF ainsi que la faible thermogenèse induite par l'alimentation, entraînent l'insatiété[5].

Au Canada, plus de la moitié de la population est en surpoids tandis que plus 15% des canadiens sont obèses[6, 7]. Les compagnies pharmaceutiques ont fabriqué des médicaments contre l'obésité et les maladies apparentées au cours des dernières années. Certains de ces médicaments ciblent principalement certaines voies de signalisations tandis que les autres stimulent la sécrétion des hormones impliquées dans le métabolisme énergétique. Malgré l'approbation par la Food and Drug Administration (FDA), ces médicaments ont provoqué des effets secondaires graves et parfois mortels[8, 9]. La perte de poids, particulièrement la perte de graisses abdominales, induite par le régime alimentaire, les exercices ou des agents pharmaceutiques aggrave simultanément la plupart des facteurs de risque de coronaropathie, tels que la dyslipidémie, la résistance à l'insuline (Ir) et le syndrome métabolique [10, 11].

Puis que les souris en déficience de Facteur trefoil 2 (*Tff2* KO) sont protégées contre l'obésité induite par l'alimentation riche en gras[12], mais les mécanismes moléculaires par lesquels *Tff2* contrôle cette homéostasie énergétique, restent méconnus. Cette étude a pour objet d'élucider l'effet de *Tff2* dans l'expression génique et protéique des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels *Tff2* contrôle la balance énergétique. La compréhension de ces mécanismes peut contribuer à trouver une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'obésité et les maladies apparentées.

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1. Le métabolisme énergétique au sein des organes

1.1.1. Définition

Pour se maintenir en vie, se reproduire, se développer et répondre aux stimuli de leurs environnements; tous les êtres vivants ont besoin d'énergie. Le métabolisme énergétique est l'ensemble de réactions biochimiques qui se déroulent à l'intérieur de la cellule de l'organisme pour produire cette énergie. Plusieurs organes collaborent pour assurer le contrôle du besoin d'énergie et son métabolisme[13].

1.1.2. L'estomac et signaux de faim

L'estomac vide stimule la sécrétion de la ghréline. Le taux postprandial de cette hormone digestive qui stimule l'appétit diminue, ce qui conduit à la satiété[14]. L'estomac rempli donne les signaux de satiété à travers le nerf vague. Il entraîne ensuite la sécrétion de la cholécystokinine (CCK) et l'apolipoprotéine A-4 (ApoA-IV) par le duodénum intestinal, la bile par le foie et l'insuline par le pancréas. Ces hormones et peptides entrent en circulation et fonctionnent comme des signaux de courte durée[15].

1.1.3. Le foie et son rôle dans le métabolisme énergétique

Le foie est un organe essentiel qui gouverne le métabolisme énergétique. Les hépatocytes occupent une place importante (80%) du foie. Le glucose entre et sort des hépatocytes par le transporteur de glucose 2(GLUT2). La déficience en GLUT2 entrave le métabolisme du glucose[16]. Les acides gras de longues chaînes sont transformés en triacylglycérols, phospholipides et les esters de cholestérol qui, sont stockés dans des gouttelettes et dans des structures membranaires; ils sont aussi sécrétés dans la circulation comme les lipoprotéines à très faible densité (VLDL)[17].

En cas de jeûne, le foie secrète le glucose par glycogénolyse ou glyconéogenèse. Le jeûne stimule également la lipolyse dans les tissus adipeux ce qui donne lieu aux acides gras non -estérifiés qui, sont transformés dans corps cétones par la β -oxydation et la cétogenèse; ce métabolisme est régulé par les récepteurs alpha des oxystérols du foie[18]. Le métabolisme énergétique dans le foie est régulé par les

signaux hormonaux et neuronaux. Le système nerveux sympathique stimule la glyconéogenèse alors que le système nerveux parasympathique l'inhibe[19].

Plusieurs facteurs de transcription et les coactivateurs notamment; les protéines se fixant sur l'adénosine monophosphate cyclique (CREB), forkhead box protein 01(FOXO1), Carbohydre-responsive element- binding protein (ChREBP), les protéines se fixant sur le régulateur de stérol (SREBP), les récepteurs gamma activés par des proliférateurs de peroxyosomes-coactivateurs alpha (PGC-1 α) et les facteurs de transcription régulées par CREB coactivateurs 2(CRTC); contrôlent l'expression des enzymes qui catalysent les réactions de métabolisme énergétique dans le foie[20].

1.1.4 Le muscle squelettique et son implication dans le métabolisme énergétique

Le muscle squelettique étant l'un des tissus périphériques principaux consommateurs d'énergie, il représente environ 40% du poids corporel total et couvre 50% de la dépense énergétique, il est le site primaire d'oxydation du glucose et des acides gras[21]. Le muscle squelettique joue un rôle important dans la sensibilité à l'insuline, dans l'obésité ainsi que dans le profil lipidique[22]. La consommation calorique excessive est détectée par le cerveau, ce dernier induit en même temps une thermogénèse adaptative stimulée par les récepteurs adrénergiques β (Beta-ARs)[23]. Les souris déficientes du gène codant pour Beta-AR développent une obésité sévère, car elles présentent l'atténuation de l'expression des gènes et des protéines associés à la régulation de la dépense énergétique et de l'homéostasie lipidique. Cette atténuation affecte la protéine kinase gamma 3 activée par l'adénosine monophosphate (AMP), la protéine de découplage 3 (UCP3), le cluster de différenciation 36 (CD36) ainsi que le transporteur de glucose 4 (GLUT4) [23, 24]. Le facteur de croissance nerveuse qui est un récepteur nucléaire orphelin (Nur77) joue un rôle important dans le métabolisme des lipides car, sa déficience conduit à une diminution de la lipolyse. NUR77 module l'expression des gènes codant pour des régulateurs principaux du métabolisme des lipides du muscle squelettique[23].

1.1.5. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est un organe central dans le métabolisme et la régulation de l'homéostasie énergétique d'un organisme. Chez l'homme il comporte le tissu adipeux blanc (WAT) qui agit comme un réservoir d'énergie pour d'autres organes et le tissu adipeux brun (BAT). Le WAT comprend le WAT sous-cutané(SAT) et le tissu WAT viscéral (VAT)[25].

1.1.5.1 Le tissu adipeux un organe endocrine régulant l'homéostasie énergétique

Les tissus adipeux secrètent des adipokines qui contrôlent la balance énergétique en régulant les signaux d'appétit qui communiquent avec système nerveux central. La leptine, l'une des adipokines, est sécrétée en réponse de la prise alimentaire et inhibe l'appétit. Elle stimule la satiété en agissant sur les récepteurs de surface des neurones d'Agouti-related protein (AgRP) dans l'hypothalamus latéral et les neurones de pro-opiomélanocortine (POMC) dans l'hypothalamus médiane[26].

1.1.5.2 Le tissu adipeux un organe spécialisé dans le stockage d'énergie

Les organismes vivants ont besoin de stocker l'énergie qui sera utile lorsque les ressources seront épuisées. La fonction physiologique principale du WAT est d'assurer le stockage d'énergie et agir comme un isolant thermique pour garder la température corporelle. Cependant, l'excès de VAT pose des problèmes de santé tels que la résistance à l'insuline(Ir) et le diabète du type 2 (T2D)[27].

1.1.5.3 Tissu adipeux, le régulateur de la température

BAT est généralement vascularisé et formé de gouttelette de lipide multiloculaire plein de mitochondries. Sa fonction principale repose sur la thermogénèse. Bien que le BAT soit aussi riche en mitochondrie que le muscle, il s'occupe principalement de la thermogène par la forte expression de la protéine de découplage mitochondriale 1 (mt-UCP-1), ce qui réduit la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP). Les β -ARs dans le BAT stimulent la lipolyse induite par le froid [28, 29]. Pendant l'exposition au froid, les signaux de β -AR dans le BAT active l'expression de (PGC α -1) qui stimule l'expression d'UCP-1 et des gènes mitochondriaux.

Chez les humains adultes le WAT est majoritairement réparti par rapport au BAT, le rôle physiologique de BAT reste peu connu. Cependant, le BAT est présent chez le nouveau-né où il assure la thermogénèse surtout quand le bébé a froid. Chez les rongeurs et les hibernants, la distribution anatomique et le rôle physiologique du BAT sont bien connus [30].

1.1.6 Le cerveau et l'homéostasie énergétique

Le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique est régulé par la communication entre les circuits autonomes du cerveau et les signaux homéostatiques en circulation. Un réseau formé entre le cortex préfrontal (PFC), le cortex cingulaire antérieur (ACC), cortex insulaire, le stratum pallidum ventral (VPA), l'aire tégmentale ventrale (VTA), l'hypothalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière constitue le centre de contrôle d'appétit et de la thermogénèse [31]. Ces réseaux contiennent également les neurones qui expriment les récepteurs et les médiateurs comme l'acide aminobutyrique- γ (GABA), dopamine, glutamate, opioïdes, endocarbinoïdes, POMC, neuropeptide Y (NPY), AgRP, facteur steroidogénique 1 (SF1) et le récepteur mélanocortine 4 (MC4R) qui contribuent à l'anabolisme ou catabolisme des lipides [31, 32].

1.1.6.1 le contrôle de la prise alimentaire et de l'activité physique

La décision de la prise alimentaire ou de faire un exercice physique est contrôlée par le PFC et l'ACC. La dérégulation du fonctionnement de ceux deux peut entraîner les problèmes liés aux déséquilibres énergétiques. Le circuit de récompense se situant dans le VTA et le noyau accumbens contrôle l'attitude de vouloir et de préférer la nourriture [33].

1.2 Obésité et les maladies apparentées

La majorité de la mortalité associée à l'obésité, résulte des complications métaboliques secondaires comme le diabète, les dyslipidémies et les maladies cardiovasculaires etc... La prédisposition génétique et le mode de vie favorisent le développement de l'obésité[34].

1.2.1 Physiopathologie de l'obésité

L'obésité est une surcharge pondérale due à l'accumulation de la matière grasse résultant du déséquilibre de la balance énergétique. Cet état physiologique survient lorsque la dépense énergétique est de loin inférieure à l'apport énergétique. Quand le stockage progressif, anormal et excessif de la masse adipeuse commence, il faut s'attendre au développement de l'obésité si des mesures préventives ne sont pas prises. La mesure internationale du surpoids est l'indice de masse corporelle (IMC), les individus ayant l'IMC ≥ 30 sont considérés comme obèse[35].

1.2.1.1 L'obésité et l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6), circulent continuellement dans l'organisme d'une personne obèse, les macrophages présents dans les tissus adipeux hypertrophiés produisent TNF- α et IL-6 pour inhiber la lipolyse[36]. Les concentrations systémiques de ces molécules du système immunitaire redeviennent normales par la perte de poids. L'inflammation systémique chronique active les cellules nerveuses surtout les microglies du SNC, par la sécrétion anormale des molécules du système immunitaire notamment; IL-1, IL-6, et IL-18; le TNF- α , l'amyloïde sérique A (SAA) et l'inhibiteur de l'activateur de la plasminogène-1 (PAI-1)[35, 36]. L'association de l'obésité et les maladies neurodégénératives s'explique par l'activation de ces microglies[37].

1.2.1.2 L'obésité et les maladies métaboliques

L'obésité est toujours associée avec les maladies métaboliques, ce qui aggrave les complications de cette pandémie. L'HF diminue la biosynthèse des protéines dans les muscles, la sensibilité à l'insuline et l'adaptation du réticulum endoplasmique à la surcharge[38]. Ces conditions ainsi que les réactions inflammatoires survenues en cas de sursaturation des adipocytes, qui produisent les molécules immunitaires de

l'inflammation; perturbent le fonctionnement du réticulum endoplasmique (ER). Ce dernier est responsable du repliement des protéines et sa perturbation affecte aussi la phosphorylation normale des kératines ainsi que le rapport kératine 8 : kératine 18[39, 40]. Face au stress l'ER engage la réponse aux protéines mal repliées (UPR), l'accumulation de ces protéines mal repliées est associée à plusieurs pathologies notamment l'obésité, le cancer, le diabète de type 2 (T2D) et autres maladies métaboliques[41, 42].

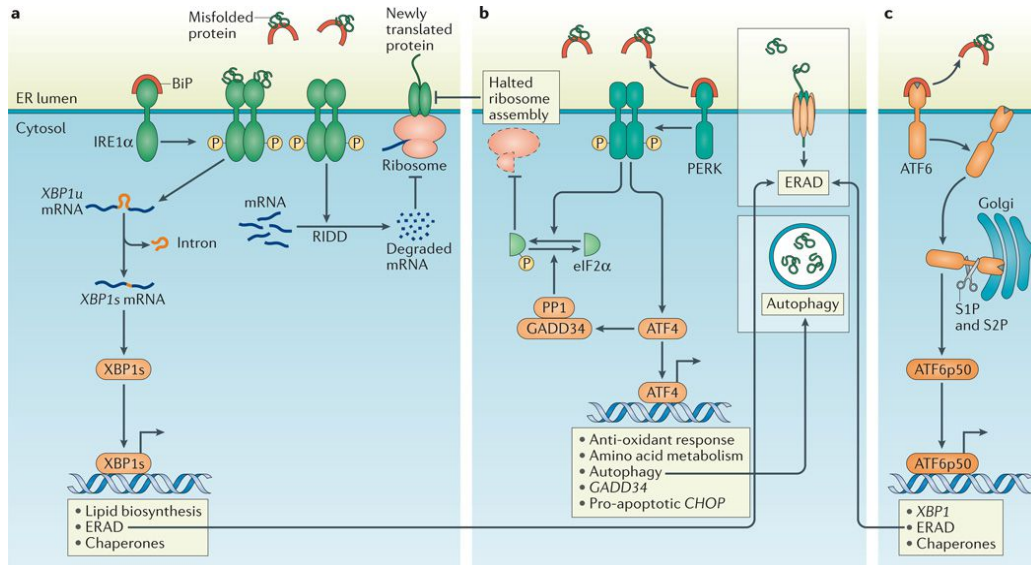


Figure 1 : Protéines mal repliées dans l'ER et UPR

3 voies de l'UPR : a) La dissociation de BiP (binding immunoglobulin protein) d'IRE1 α (Inositol-requiring enzyme 1 α), ou la liaison directe des protéines mal repliées aux IRE1 α , ce qui active le domaine des endonucléases qui assurent l'épissage des XBP1 qui assisteront la dégradation des protéines mal repliées par ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation). b) La phosphorylation de l'eIF2 α par PERK inhibe l'assemblage des ribosomes, ce qui permet à la cellule de gérer temporairement le stress de l'ER, une fois que le stress est maîtrisé et résolu, l'eIF2 α est déphosphorylé par GADD34-PP1 pour restaurer la traduction des protéines, cependant si le stress demeure irréversible, l'UPR terminale est activée induisant à l'apoptose) Pendant la dissociation de BiP venant de l'ATF6 α (activating transcription factor 6 α), ATF6 α migre vers l'appareil de golgi ou l'enzyme S1P(site1 protein et S2P le dégradent en fragment de p50. ATF6p50 fonctionnent comme un facteur de transcription qui activent les activités de l'UPR, figure adaptée de Grootjan J et al. 2016[43].

1.2.1.3 L'obésité et le rythme circadien

Le noyau supra-chiasmatique de l'hypothalamus (SCN) influence les rythmes alimentaires, il est en même temps la principale horloge biologique. Ce rythme se répète normalement durant la journée et le même phénomène s'observe durant une période obscure chez les rongeurs nocturnes[44]. Le régime alimentaire riche en gras peut perturber le rythme alimentaire et les activités locomotives générales, ce qui explique les apnées du sommeil observées chez les personnes obèses. L'ingestion des aliments est la partie essentielle du contrôle de la balance énergétique. Le système de récompense du cerveau détermine la qualité et la palatabilité des aliments. Chez les humains, le changement de comportements notamment l'état dépressif et les apnées du sommeil indiquent une relation étroite entre le système de récompense et le système circadien[45]. Au niveau moléculaire les rythmes circadiens sont codés par une boucle autorégulée composée par les activateurs de transcription (BMAL1/CLOCK) qui induisent l'expression des répresseurs (PER/CRY). Cette boucle induit également l'expression du récepteur nucléaire orphelin[46].

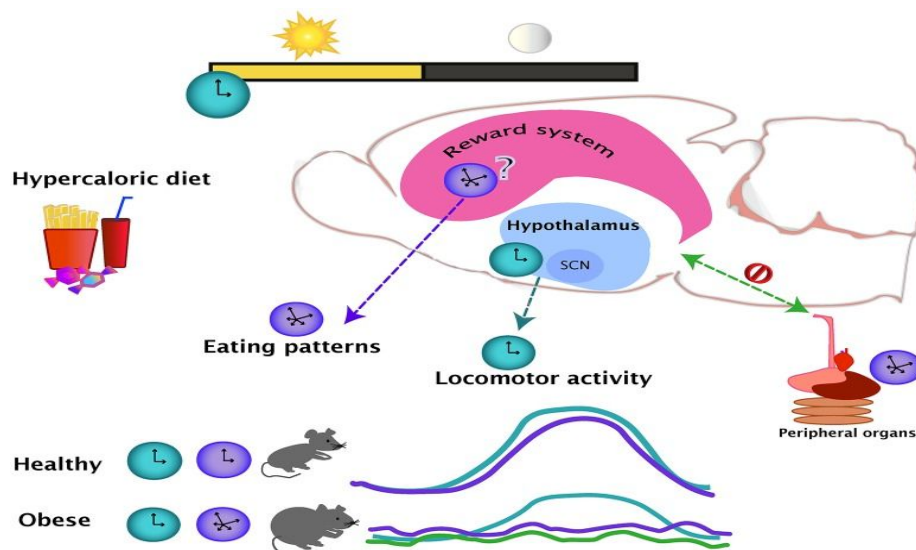


Figure 2 : Cycles (jour-nuit) et l'alimentation

Les cycles jour nuit définissent les oscillations régulières de l'alimentation (ligne violette et l'activité locomotrice (ligne bleue) qui sont couplées chez un sujet en bonne santé. Figure adaptée de Blancas-Velázquez et al. 2017[47].

1.2.1.4 Obésité et l'épigénétique

La différenciation des adipocytes implique plusieurs facteurs de transcription mais le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyssome (PPAR γ) se démarque comme un important facteur de l'adipogenèse. PPAR γ cible plusieurs gènes codant pour les enzymes de la modification de la chromatine ainsi que des gènes du métabolisme et du stockage des lipides. L'obésité et lipodystrophie résultent du dysfonctionnement des adipocytes[48].

Par ailleurs, la déméthylation des histones protège contre l'obésité. La protéine Jumonji qui est l'histone deméthylase spécifique de l'histone3 lysine9 H3K9(JHDM2A) est fortement exprimée dans le BAT, la baisse de son expression affecte la réponse des récepteurs adrénergiques β . Les souris déficientes de JHDM2A, développent l'obésité apparente adulte, hypertriglyceridémie, hypercholestérolémie, hyperinsulinémie et hyperlipidémie qui caractérisent effectivement le syndrome métabolique. PPAR γ et UCP1 sont recrutés avec JHDM2A dans la voie de signalisation β -adrénergique[49-51].

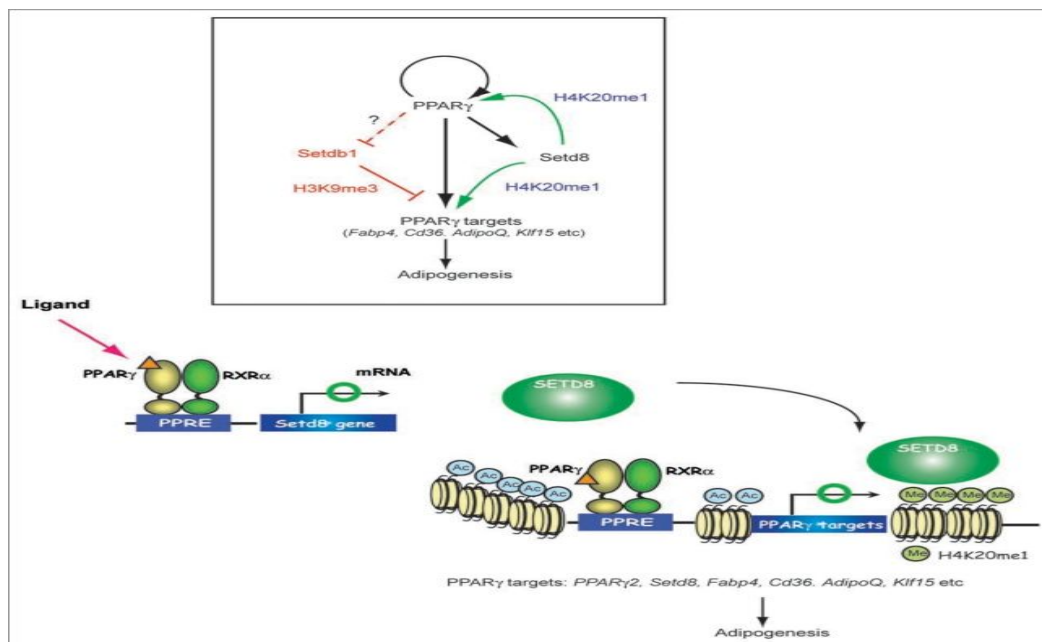


Figure 3 : Régulation de la transcription et la modification des histones.

Modèle pour la régulation coordonnée de la transcription et la modification des histones par PPAR γ pour l'adipogenèse. Figure adaptée d'Okamura et al, 2010[52].

1.2.2 Conséquences de l'obésité

La gravité de l'obésité repose non seulement sur la détérioration de la santé des personnes obèses, mais aussi sur l'aspect socio-économique de la société.

L'obésité présente un lourd fardeau sur la santé. Les personnes atteintes vivent avec les risques accrus des maladies sévères et leurs conditions de santé se détériorent de plus en plus par les maladies métaboliques et psychologiques. L'hypertension, la dyslipidémie, le T2D, la maladie coronarienne (CAD), l'accident vasculaire cérébral, l'ostéoarthrite, l'apnée du sommeil, les problèmes respiratoires, le cancer et la dépression; sont fréquemment associés à l'obésité[53-56]. Les personnes obèses se sentent rejetées par la société, ce qui aggrave des conséquences psychologiques; notamment, les comportements dépressifs et les troubles de beauté[57, 58].

L'obésité touche également l'économie du pays. Les maladies apparentées à l'obésité représentent un fardeau pour la santé publique mondiale et ont un impact important sur l'économie[59]. Les dépenses liées au surpoids et à l'obésité impliquent les coûts des traitements, des mesures préventives, ainsi que la mortalité et la morbidité qui affectent la productivité. Les conséquences sur la productivité quant à elles, impliquent l'absentéisme et le présentéisme[60-62].

Aux États-Unis le coût médical annuel lié à l'obésité était estimé à 147 milliards de dollars en 2008, alors que le coût annuel lié seulement à l'absentéisme était environ 3.8 milliards de dollar[63, 64].

1.2.3 La prévention et le traitement de l'obésité

L'obésité est une maladie qui se traite à long terme et qui nécessite un suivi médical et psychologique adéquat, sa prévention requiert le contrôle de la balance énergétique pour conserver un poids normal. L'alimentation régulière basée sur le respect des heures du repas, permet non seulement de contrôler l'alimentation mais aussi de maintenir le rythme circadien[47, 65].

L'obésité qui se présente aujourd'hui comme une maladie multifactorielle, plusieurs pratiques sont en cours pour trouver la thérapie adéquate de l'obésité.

Les aliments à restriction calorifique permettent de réduire le poids systématiquement. Le régime méditerranéen, le régime hyperprotéiné, le jeûne intermittent font preuve de la réduction du poids mais leur efficacité est controversée [66, 67]. Les activités physiques elles seules peuvent être envisageables pour la perte de poids mais leur combinaison avec un régime à restriction calorifique s'avère plus efficace[67]. Il est recommandé de faire une activité physique sans oublier les facteurs socio-psychologiques comme le plaisir de manger ensemble.

Pour traiter l'obésité et réduire le surpoids, les compagnies pharmaceutiques fabriquent des médicaments qui ciblent soit des gènes, soit des voies de signalisations cellulaires. Certains de ces produits pharmaceutiques ciblent le système de récompense du cerveau tandis que d'autres ciblent le système de sécrétion des signaux de la faim[68, 69]. Il y a d'autres qui augmentent le métabolisme énergétique ainsi que d'autres qui diminuent l'absorption des lipides. Bien que ces médicaments sur le marché sont plus ou moins efficaces pour la baisse du poids, ils ont des effets secondaires graves parfois mortels pour certaines personnes[70].

En 2014 la FDA a approuvé la contrave qui est une combinaison de bupropion et naltrexone comme traitement de l'obésité, chacun de ces molécules est efficace pour la perte de poids et leur combinaison procure un effet synergique. La FDA ne cesse de montrer que ce médicament pourrait avoir les effets secondaires de changement d'humeur, ce qui conduirait même au suicide[9, 71] .

Dans certains cas, la chirurgie bariatrique peut servir à la restriction de l'absorption des aliments, pour diminuer l'apport de calories journalier. Il peut s'agir aussi de la suppression d'une partie de l'estomac qui secrète la ghréline qui est l'hormone de sensation de la faim[72].

1.3 Facteur trefoil 2 (Tff2)

1.3.1 Généralité

Facteur trefoil 2 est l'un des membres de la famille Facteur trefoil caractérisé par la présence d'au moins d'une copie d'un motif trefoil ayant un domaine de 40 acides aminés qui contiennent trois ponts disulfures conservés, est un polypeptide spasmodique composé de 106 acides aminés qui est exprimé et sécrété par les cellules épithéliales de la muqueuse gastro-intestinale où il assure une fonction de protection et de réparation[73-75]. Le Tff2 est exprimé dans le cerveau et dans les glandes pituitaires[76].

Dans le but d'identifier les signaux périphériques de l'appétit dans la muqueuse duodénale, des centaines de gènes modulés après l'ingestion d'HF ou LF ont été identifiés à l'aide de l'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE)[77]. L'analyse et le criblage génétique ont Tff2 révélé parmi les nouveaux gènes candidats les mieux classés. Plus encore, les résultats préliminaires avaient révélé l'expression de Tff2 dans l'hypothalamus avec la modulation d'HF et LF[78]. Les souris déficientes en Tff2 démontrent l'expression accrue de A-IV(Apoa4), un signal de satiété[79, 80]. Ainsi, Tff2 se démarque comme un gène qui régule le comportement alimentaire comme un signal périphérique du SNC aussi bien comme un régulateur dans l'hypothalamus. En effet, le gène Tff2 a été choisi grâce au son potentiel décrit en haut.

1.3.2 L'expression génique de Tff2 et pathologie associée à sa surexpression

1.3.2.1 L'expression génique de Tff2

L'expression génique désigne l'ensemble des processus biochimiques par lesquels l'information héréditaire stockée dans un gène est lue pour aboutir à la fabrication de molécules qui auront un rôle actif dans le fonctionnement cellulaire, comme les protéines ou les ARNs. Cette expression est régulée par plusieurs facteurs notamment les facteurs de transcription, les activateurs, les inhibiteurs, qui fonctionnent suivant les conditions de l'état cellulaire comme l'hypoxie ou le jeûne[81, 82].

1.3.2.2 Pathologie associée à l'expression de Tff2

L'expression des gènes survient souvent pour répondre au besoin cellulaire de l'organisme mais dans les conditions pathologiques, certains gènes sont atténués alors que d'autres se surexpriment. Leberherz-Eichinger et ses collaborateurs ont prouvé la forte expression de Tff2 dans les patients atteints d'une insuffisance rénale chronique, en se servant de Tff2 comme biomarqueur, ils ont pu démontrer que le niveau sérique de Tff2 était significatif dans les patients ayant le stade avancé de la maladie. Son expression a été observée également dans certaines pathologies comme le cancer[74, 83, 84].

Cependant, De Giorgio et al. ont démontré que les souris *Tff2* KO sont protégées contre la HIO ce qui serait une bonne nouvelle[73].

1.3.3 Conclusion

En plus d'être protégées contre la HIO les souris *Tff2* KO sont fertiles, viables et moins sédentaires que les souris WT; leurs habitudes alimentaires changent également[73]. TFF2 est le centre du métabolisme énergétique qui conduit au développement de l'obésité mais les mécanismes centraux et périphériques par lesquels le Tff2 agit, sont méconnus. Il est possible de démontrer ces mécanismes, compte tenu que le processus général du métabolisme énergétique est connu, ça aiderait à préciser l'implication de Tff2 dans chacune des étapes de ce métabolisme. Cette étude est la continuité d'autres études faites au laboratoire de génomiques fonctionnelles du centre de recherche du CHU de Québec qui portera un accent sur les régulateurs de la transcription des gènes modulés après l'ingestion du HF et LF dans l'intestin et l'effet de déficience de Tff2 sur des niveaux d'expression des gènes et protéines impliqués dans le métabolisme énergétique tout en cherchant les voies de signalisations empruntées par TFF2 dans le développement de l'obésité.

1.4 Problématique, hypothèses, objectifs et méthodologies de recherche

1.4.1 Problématique de cette recherche.

Puis que ses conséquences touchent tous les aspects de la vie et la santé en général, l'obésité se présente comme un problème majeur de la santé publique. Elle modifie le métabolisme normal en rendant sa victime susceptible à d'autres maladies.

En outre, la croissance en mortalité, l'obésité a un impact particulier sur la psychologie du patient ainsi que sur la société. Elle constitue un fardeau financier qui découle de sa prévention et son traitement pour les personnes atteintes[85]. La prédisposition à l'obésité est héréditaire et polygénique mais il est toujours possible de trouver une cible thérapeutique qui peut contrer son développement[86].

Au cours des années, les compagnies pharmaceutiques ont fabriqué les médicaments pour traiter l'obésité mais la plupart d'entre eux ont été retirés du marché à cause de leurs effets secondaires néfastes. Ceux qui restent sur le marché présentent toujours d'autres effets secondaires[9].

1.4.2 Hypothèses et objectifs de cette recherche

Plusieurs facteurs interviennent dans le développement de l'obésité. Le facteur génétique se démarque dans cette pathologie[86]. Puis que les souris transgéniques *Tff2KO* sont protégées contre la HIO, TFF2 jouerait un rôle dans le métabolisme énergétique particulièrement celui des lipides; il y aurait des gènes qui réagiraient dans l'état postprandial d'HF qui servirait à trouver les processus métaboliques qui encerclent le rôle de TFF2. Nos objectifs englobent l'identifier les principaux régulateurs de la transcription pour les gènes qui réagissent à l'ingestion de l'HF et trouver les processus métaboliques et moléculaires par lesquels TFF2 contrôle la prise alimentaire et son rôle dans le métabolisme énergétique.

1.4.3 Objectif global.

L'objectif global de ce mémoire est de caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels TFF2 intervient dans le métabolisme énergétique et le développement de l'obésité.

1.4.4 Méthodologie de recherche de l'étude 1

L'analyse en série de l'expression des gènes est une technique de biologie moléculaire qui consiste à analyser la population d'ARN messagers ARNm d'un échantillon donné. Elle est basée sur l'isolation des séquences spécifiques de chaque ARNm afin de produire les ADN complémentaires (cDNAs) correspondants par la transcription inverse. La production d'ADN synthétique comportant tous les cDNAs et son séquençage, permettent de construire des banques des gènes qui relient chaque séquence à un gène spécifique. L'analyse statistique permet de déterminer le nombre d'apparitions de chaque gène dans un échantillon.[87]. Une application de bioinformatique basée sur le web nommée ingenuity pathway analysis (IPA) permet aux chercheurs d'y téléverser les résultats des données d'analyse qui proviennent d'expériences à haut débit telles que les micropuces d'ARNs, Next Generation Sequencing et tant d'autres, afin d'y faire l'analyse fonctionnelle. IPA permet donc de déterminer fonction du gène[88].

Un groupe de souris a été sacrifié après le jeûne, les autres ont été nourries à volonté de LF ou HF et ont été sacrifiées 30 min, 1 h et 3 h après le début du repas. Une analyse transcriptomique de la muqueuse duodénale des 7 groupes a été réalisée en utilisant à la fois une méthode de micropuce et d'analyse en séries de l'expression des gènes SAGE suivie d'ingenuity pathway analysis IPA et la confirmation par immunobuvardage des protéines.

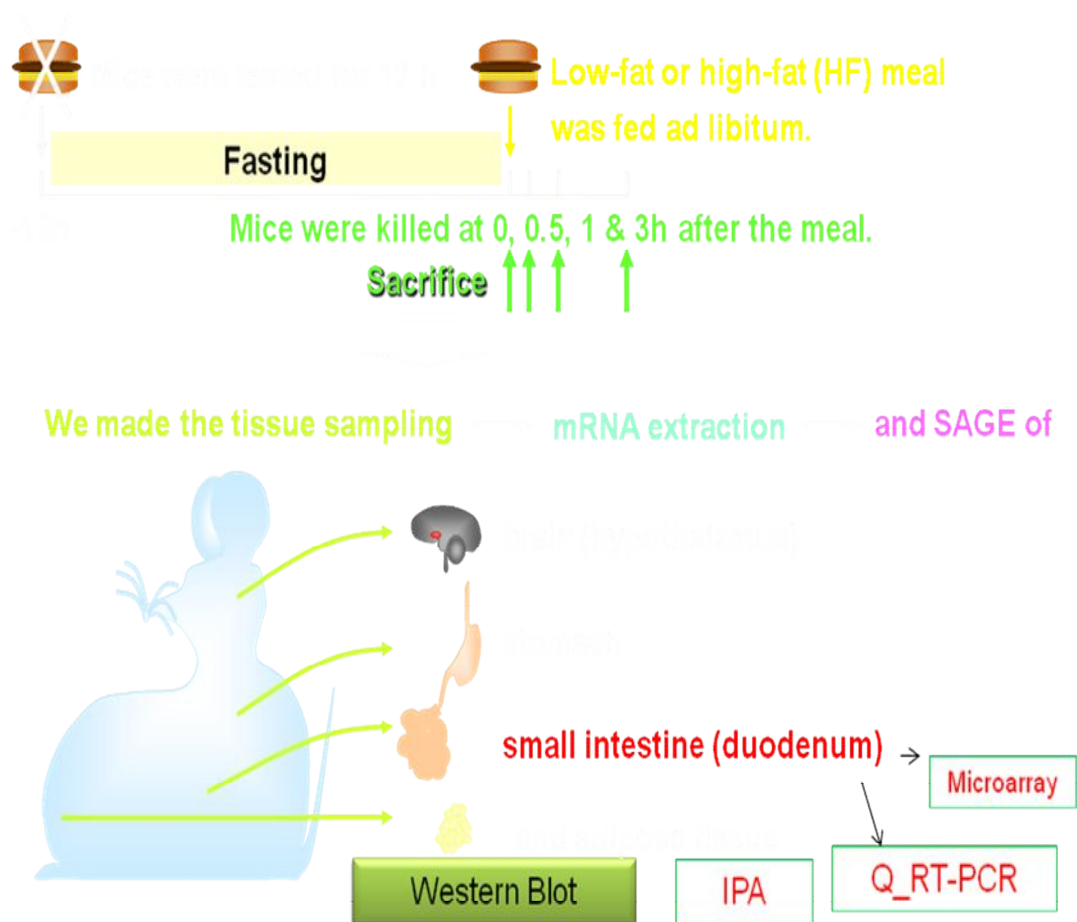


Figure 4 : Résumé de la méthodologie de recherche de l'étude 1 :

Identification of the principal transcriptional regulators for low-fat and high-fat meal responsive genes in small intestine.

1.4.5 Méthodologie de recherche de l'étude 2

A fin de caractériser les mécanismes centraux et périphériques par lesquels TFF2 contrôle l'équilibre énergétique et d'explorer son rôle dans l'obésité, les souris *Tff2* KO et les souris du type sauvage ont été nourries une alimentation riche gras (HF) et une alimentation standard (LF), les composants sériques ont été mesurés et les niveaux d'expression des gènes et protéines impliqués dans le métabolisme énergétique ont été mesurés dans le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux.

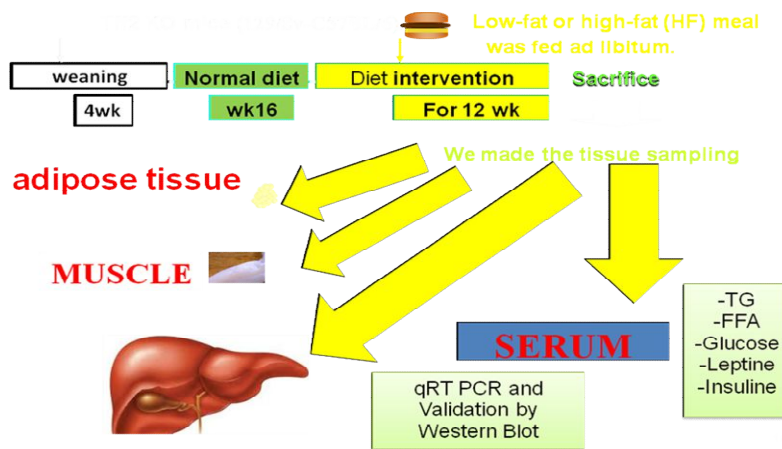


Figure 5 : Résumé de la méthodologie de recherche de l'étude 2 :

Energy and metabolic pathways in trefoil factor family member 2 (*Tff2*) KO mice beyond the protection from high-fat diet-induced obesity.

Chapitre2: Résultats de l'étude 1: Identification of the principal transcriptional regulators for low-fat and high-fat meal responsive genes in small intestine

2.1 Résumé en Français

Contexte: Le régime alimentaire riche en gras (HF) est une cause bien connue d'obésité. Pour identifier les principaux régulateurs de la transcription qui pourraient être des cibles thérapeutiques de l'obésité, nous avons étudié la modulation transcriptomique dans la muqueuse duodénale suivant l'ingestion du repas faible en gras (LF) et du repas riche en gras HF.

Méthodologie: Un groupe de souris a été sacrifié après le jeûne, les autres ont été nourris à volonté de LF ou HF et ont été sacrifiées 30 min, 1 h et 3 h après le début du repas. Une analyse transcriptomique de la muqueuse duodénale des 7 groupes a été réalisée en utilisant à la fois une méthode de micropuce d'ADN et d'Analyse en Série de l'expression des gènes (SAGE) suivie d'ingenuity pathway analysis (IPA).

Résultats : SAGE et micropuce ont montré que 896 transcrits ont été modulés dans la muqueuse duodénale après LF et / ou HF, par rapport aux conditions de jeûne. L'IPA a identifié le métabolisme lipidique, le transport moléculaire et la biochimie des petites molécules comme les trois principales fonctions moléculaires et cellulaires pour les gènes réagissant et les gènes spécifiques d'HF, gènes de délai d'HF et les gènes différents LF-HF. En outre, le régulateur transcriptionnel principal pour les gènes réactifs et les gènes spécifiques à la HF était le récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosome (PPAR α). D'autre part, les gènes réactifs au LF et les gènes spécifiques de LF étaient liés au métabolisme des glucides, à la fonction de maintenance cellulaire et à la mort cellulaire / croissance cellulaire et à la prolifération cellulaire, et les principaux régulateurs de la transcription étaient (FOXO1) (CREB1), respectivement.

Conclusion : Ces résultats aideront à comprendre les mécanismes moléculaires de la réponse intestinale après l'ingestion à LF et HF et contribueront à identifier les cibles thérapeutiques pour l'obésité et les maladies apparentées.

2.2 Participation à l'étude

Ma contribution à cette étude est d'effectuer les expériences au laboratoire, analyser les résultats et rédiger en collaboration avec l'équipe de recherche.

2.3 Corps du texte

Identification of the principal transcriptional regulators for low-fat and high-fat meal responsive genes in small intestine

Octave Mucunguzi,^{1,2} Aicha Melouane,^{1,2} Abdelaziz Ghanemi,^{1,2} Mayumi Yoshioka,¹ André Boivin,¹ Ezequiel-Luis Calvo¹ and Jonny St-Amand^{1,2}

¹CREMI, CHU de Québec Research Center, Quebec, Quebec, G1V 4G2, Canada

²Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Quebec, G1V 0A6, Canada

omucunguzi@gmail.com

Aicha.Melouane@crchudequebec.ulaval.ca

Abdelaziz.ghanemi.1@ulaval.ca

Mayumi.Yoshioka@crchudequebec.ulaval.ca

andre.boivin@hotmail.ca

ecalvo.omics@gmail.com

Jonny.St-Amand@crchudequebec.ulaval.ca

Corresponding author: Jonny St-Amand, Ph.D.

Functional Genomics Laboratory

CREMI, CHUL-CHU de Québec Research Center

2705 Boul. Laurier

Québec (PQ) G1V 4G2 Canada

Tel: +1-(418) 654-2296

Fax: +1-(418) 654-2761

E-mail: Jonny.St-Amand@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract

Background: High-fat (HF) diet is a well-known cause of obesity. To identify principle transcriptional regulators that could be therapeutic targets of obesity, we investigated transcriptomic modulation in the duodenal mucosa following low-fat (LF) and HF meal ingestion.

Methods: Whereas one group of mice was sacrificed after fasting, the others were fed *ad libitum* with LF or HF meal, and sacrificed 30 min, 1 h and 3 h after the beginning of the meal. A transcriptome analysis of the duodenal mucosa of the 7 groups was conducted using both microarray and serial analysis of gene expression (SAGE) method followed by an Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

Results: SAGE and microarray showed that the modulation of a total of 896 transcripts in the duodenal mucosa after LF and/or HF meal, compared to the fasting condition. The IPA identified lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry as top three molecular and cellular functions for the HF-responsive, HF-specific, HF-delay, and LF-HF different genes. Moreover, the top transcriptional regulator for the HF-responsive and HF-specific genes was peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α). On the other hand, the LF-responsive and LF-specific genes were related to carbohydrate metabolism, cellular function and maintenance, and cell death/cellular growth and proliferation, and the top transcriptional regulators were forkhead box protein O1 (FOXO1) and cAMP response element binding protein 1 (CREB1), respectively.

Conclusions: These results will help to understand the molecular mechanisms of intestinal response after LF and HF ingestions and contribute to identify therapeutic targets for obesity and obesity-related diseases.

Key words: low-fat diet, high-fat diet, duodenum, mucosa, serial analysis of gene expression, microarray.

Background

High-fat (HF) diet contributes to increase daily energy intake and body fatness [1, 2]. Thus, controlling fat intake is an important determinant within the etiology of obesity. It has been reported that some protective mechanisms against diet-induced obesity are blunted after an establishment of obesity [3, 4]. Therefore, the study of established obesity may not reveal the primary cause which has led to its development which makes it important to acquire knowledge on the initial events responsible for the development of obesity. In order to identify peripheral signals (appetite and satiety signals from the digestive tract to the central nervous system) that can be therapeutic targets of obesity, we have already investigated transcriptomic changes in the duodenum mucosa after a HF or low-fat (LF) meal ingestion using the serial analysis of gene expression (SAGE) method [5].

Gene profiling approaches allow gaining global insights into the transcriptome. Commercial software is now widely available to analyze relevant functions, pathways, networks and transcriptional regulators. Several studies attempted to characterize the intestinal transcriptional responses after a HF diet by using microarrays [6-11], but all used a LF diet as a control. Therefore, no transcriptional information is available regarding the intestinal responses to the LF diet. Moreover, results obtained by SAGE and microarray in previous studies were only partially comparable, and some authors have suggested that these approaches may be rather complementary to each other in the study of transcriptome [12, 13].

In order to identify the principal transcriptional regulators for LF- and HF-meal responsive genes, which could be therapeutic targets for obesity and related diseases, the present study has used our previous data with SAGE method [5], as well as data

obtained by microarray. Then, we have analyzed the relevant pathways, networks and transcriptional regulators using the Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

Methods

Animals, diet and samples preparation

Detailed experimental procedures including amount of energy and macronutrients ingested have been reported elsewhere [5]. Briefly, a total of 140 male C57BL6 mice (12 wks-old, 24.5 ± 2.2 (mean \pm SD) g body weight, Charles River Canada Inc., St Constant, QC, Canada) were fed a LF diet (Research Diet # 12450B: 10% calories from fat, New Brunswick, NJ, USA) for two wks, fasted for 12 h, and randomly distributed into seven groups (20 mice per group). One group of fasted mice was sacrificed (fasting group) in the morning, whereas the remaining six groups were fed *ad libitum* with a LF or HF (Research Diet # 12492: 60% calories from fat) meal until they were sacrificed 30 min, 1 h and 3 h after the beginning of the meal (Six groups: LF30min, LF1h and LF3h, HF30min, HF1h, and HF3h). Each five mice per group were assigned for the sacrifice per day (9h00 - 12h00), and a mouse from each group was randomly sacrificed during each 35 min. The fasting/meal starting time of each mouse was adjusted according to the assigned group. Immediately after the sacrifice, duodenum (first 5 cm of small intestine) was opened vertically, flushed clean with saline, and the mucosa was removed by scrapping with a glass microscope slide. The samples were rapidly collected and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA and protein extractions.

Total RNA preparation

Total RNA, isolated from pooled duodenum mucosa for each group (n=20) by Trizol (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) [5], was used for both SAGE

and microarray analysis. The quality of total RNA was monitored by micro-capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada).

SAGE analysis

Previously published SAGE data (two-fold change, $P \leq 0.05$) [5] were used for functional classification, gene expression pattern identification as well as the IPA.

Microarray analysis

Experiments were performed in duplicate by using pooled RNA from each group of mice. Total RNA (10 μg) was used for cDNA synthesis according to the Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) manual. Hybridization to GeneChips MOE 430 v2.0 arrays representing 45,101 transcripts and expressed sequence tags followed by probing and scanning was performed according to the Affymetrix manual. The background subtraction and normalization of probe set intensities were performed using the method of Robust Multiarray Analysis described by Irizarry et al. [14]. To identify differentially expressed genes, gene expression intensity in HF and LF groups was compared to the fasting condition using a moderated t -test and a Bayes smoothing approach [15]. To correct the effect of multiple testing, the false discovery rate, was estimated from p values derived from the moderated t -test statistics [16]. The analysis was performed using the affyGUI Graphical User Interface for the limma microarray package [17]. Genes were significantly differentially expressed if P -values were < 0.05 . Under these conditions, a minimal mean ratio of 2-fold was used as threshold for induced or repressed genes by the LF or HF ingestion.

Validation of gene expressions by quantitative real-time PCR (Q_RT-PCR)

The confirmation of several SAGE data by Q_RT-PCR has already been published [5]. The validation of microarray data is shown in the Supplemental Figure 1.

Functional classification of LF- and/or HF- meal responsive genes

For both the SAGE and microarray data, functional classification of the genes modulated after the LF- and HF ingestions was based upon the genome directory [18], the SOURCE (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>) and the OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as well as previously published literatures.

Compared to the fasting condition, SAGE detected 369 transcripts and microarray detected 685 other transcripts, all significantly modulated after LF- and/or HF-meal ingestion. These 1054 transcripts classified under 13 functions: Digestion, hormone/peptide, receptor, transport, signaling, RNA/DNA processing, protein metabolism, growth, cytoskeleton, metabolism, homeostasis, immunity, and others/unknown (Supplemental Fig. 2). The Chi² test was used to identify the significant differences ($P<0.05$) in the distributions on the total number of transcript species classified under each function.

Pattern identification of LF- and/or HF-meal responsive genes

After excluding the unknown 158 SAGE transcripts (from the 1054), the remaining 896 transcripts, obtained from both the SAGE and microarray, were classified into six patterns: LF-specific (modulated only in the LF condition), HF-specific (modulated only in the HF condition), meal-responsive (modulated by both HF

and LF meals at the same time point and in the same direction), LF-delay (modulated by both HF and LF meals in the same direction but showing delay of modulation in the LF condition), HF-delay (modulated by both HF and LF meals in the same direction but showing delay of modulation in the HF condition), and LF-HF different (modulated by both HF and LF meals but at different time points and/or in opposite direction) patterns. The transcripts in each gene expression pattern were classified into 13 functions except for the LF-delay pattern which contains only 5 genes (Fig. 1). The Chi² test was used to identify the significant differences ($P<0.05$) in distributions on total number of transcript species classified in each function.

IPA

Significantly modulated canonical pathways, molecular and cellular functions, networks and transcriptional regulators after the LF and HF meal ingestions were analyzed using the web-based bioinformatics tool, IPA (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). First, data obtained from the SAGE and microarray were separately analysed using the GenBank accession number information in order to compare the difference of detected transcripts between them. Then, these data were combined for the analysis of the LF- and HF- responsive genes using the GenBank accession number information ($n=896$). The transcripts which were not mapped to the GenBank accession number were excluded ($n=129$). Only 767 mapped transcripts were then matched in the IPA database. As a result, a total of 629 matched genes were used in our analysis: genes detected by SAGE, genes detected by microarray, LF-responsive genes, HF-responsive genes, LF-specific genes, HF-specific genes, meal-responsive genes, LF-delay genes, HF-delay genes, and LF-HF different genes. For the LF-delay genes analysis, since only four genes were available, their IPA results were excluded.

Fisher's exact test was used to calculate a P -value determining the probability that the association between the genes in the dataset and the function (canonical pathway, molecular and cellular function, network and transcriptional regulator) is explained by chance alone ($P < 0.001$).

Validation of transcriptional regulator expressions by western blot

The principal transcriptional regulators identified by the IPA were validated by western blot ($n=9$, 8 and 7 for the fasting, LF-3h and HF-3h conditions, respectively). Total proteins were extracted using a RIPA buffer and protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON, Canada). Five to 30 μg of proteins were separated by SDS-PAGE using the TGX Stain-Free FastCast acrylamide solutions (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada), and trihalo compound in the gels was activated under UV. Then, total proteins were transferred onto PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories Ltd.), and visualized under UV using the AlphaImagerTM 1220 (Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, USA). Membranes were blocked using the PierceTM Protein-Free (TBS) blocking buffer (Life Technologies Inc.), incubated with primary (Supplemental Table 1) and secondary antibodies (sc-2004 or sc-2005, 1/10000 dilution: Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA), and visualized with the ClarityTM Western ECL Blotting Substrate on a film (Bio-Rad Laboratories Ltd.). The visualized total proteins on the membranes (loading control) and target proteins on the films were quantified using the ImageJ software. Prior to the western blot, pooled samples were used to determine the quantity of loading proteins (0 - 40 μg) and dilution of primary antibody (1/200-1/9000). The same pooled sample was loaded in each gel, and used as a positive control (PC) to normalize the differences between each

membrane. The density of each lane on the membrane (DM) and on the film (DF) was expressed as a ratio to each PC on the same membrane/film. Then, the quantity of protein loaded was normalized by dividing DF by DM, as previously suggested [19]. Results are expressed as mean \pm SEM. Differences between diet conditions were evaluated through one-way ANOVA followed by the Fisher's Protected LSD post hoc tests ($P<0.05$). In a case of a transcriptional regulator for the meal-responsive genes, *t*-test was used to identify the significant difference ($P<0.05$) between the fasting condition and fed condition (LF-3h plus HF-3h).

Results

LF- and HF-responsive genes

The IPA revealed that the main molecular and cellular functions controlled by the LF-responsive genes were cell death, cellular function and maintenance, and carbohydrate metabolism (Table 1). The top transcriptional regulator was forkhead box protein O1 (FOXO1) (Table 1), and the reduced protein expression after a LF meal was confirmed by western blot (Fig.2). On the other hand, the HF-responsive genes were related to lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) was found to be the top transcriptional regulator (Table 1).

LF-specific, HF-specific, meal-responsive, HF-delay and LF-HF different genes

A significant canonical pathway, namely extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) signaling, and top three transcriptional regulators for the LF-specific genes were reflected as the top molecular and cellular functions (Table 2 and Supplemental Table 2).

The top three molecular and cellular functions for the HF-specific, HF-delay and LF-HF different genes were similar as the HF-responsive genes (Table 2). However, there was no common transcriptional regulator between the HF-specific genes (Supplemental Table 3) and HF-delay and LF-HF different genes (Supplemental Tables 4 and 5, respectively). Expression of the top transcriptional regulator for the HF-specific genes, PPAR α , was significantly higher in the HF-3h condition than in the LF-3h condition (Fig. 2).

The meal-responsive genes were related to cellular function and maintenance, post-transcriptional modification, and protein folding (Table 2). The top transcriptional regulator was FOXO1 (Table 2 and Supplemental Table 6), and its expression was higher in fed condition (HF-3h plus LF-3h) compared to the fasting condition.

The functional distribution analysis of significantly modulated genes in each gene expression pattern indicates that both HF-delay and LF-HF different genes had a higher proportion of genes related to digestion (Fig. 1). In addition, LF-HF different genes had also a higher proportion of genes related to hormone/peptide (Fig. 1).

SAGE and microarray

As shown on the Supplemental Figure 2, SAGE methods revealed a lower number of modulated transcripts in the receptor, signaling, and RNA/DNA processing but a higher number of transcripts of the cytoskeleton, and others/unknown. On the other hand, microarray detected a higher number of transcripts in both signaling and RNA/DNA processing, as well as a lower number of transcripts of the cytoskeleton and others/unknown functions.

The top three molecular and cellular functions detected by SAGE (lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry) were also detected as the top four by microarray, and both SAGE and microarray revealed lipid metabolism and development related networks within the top three networks (Supplemental Table 7). In the SAGE-detected genes, 53% of identified transcription factors were represented in those of the microarray detected genes or 63% for vice versa (Supplemental Tables 8 and 9).

Significantly modulated genes from the SAGE analysis have been published [5].
The genes from the microarray analysis were presented in the Supplemental Table 10.

Discussion

As expected, IPA revealed that “lipid metabolism” represents the main characteristic of both HF-responsive and HF-specific genes. Previous transcriptomic studies of the small intestine have used only microarray analysis and LF diet as a control [6-11], which will not allow a direct comparison with our data. However, most of the studies have pointed “lipid metabolism” as a key modulated function after several wks of HF feeding [7-11]. Our results and those of de Wit et al. [8-10] emphasize PPAR α as a principal transcriptional regulator after a HF-meal ingestion. Indeed, the higher expression of PPAR α protein after a HF meal was confirmed via a comparison with LF condition. Moreover, de Vogel-van den Bosch et al. [20] have also demonstrated, using PPAR α -null mice, that PPAR α is an important factor controlling expressions of intestinal barrier genes (multiple transmembrane transporter genes) following fatty acids (FA) ingestion. In the current results, molecular transport was placed at the top three of the molecular and cellular functions both in the HF-responsive and HF-specific genes. An average of 11% of the molecules found in the first and second networks contained these genes after the HF-meal ingestion, whereas no gene was found in the top two networks after the LF-meal ingestion (Supplemental Figures 3-6). Furthermore, data from Steengena et al. [11] have shown that lipid metabolism and small molecule biochemistry are the two major molecular and cellular functions after two wks of HF intake, whereas these two were in the top three in our acute HF-feeding results (both in the HF-responsive and HF-specific genes). Therefore, the previous results from the long-term HF feeding [7-11] and acute FA ingestion [20] support well our acute HF-feeding data.

Our study demonstrated that “carbohydrate metabolism” was one of the main characteristics after the LF meal ingestion, and FOXO1 and cAMP response element binding protein 1 (CREB1) as a principal transcriptional regulator for the LF-responsive and LF-specific genes, respectively. Both FOXO1 and CREB have been reported as two key transcriptional regulators for hepatic gluconeogenic program [21]. Under fasting condition, increased secretion of pancreatic glucagon triggers activation of protein kinase A (PKA), which phosphorylates CREB, leading to an increased expression of gluconeogenic genes such as glucose 6-phosphatase (G6Pase) [21]. Both in the liver and small intestine, Gautier-Stein et al. [22] have demonstrated that CREB binds to the G6Pase promoter after fasting but not in the postprandial state. On the other hand, FOXO1 stimulates G6Pase promoter activity through insulin response element (IRE) and increases its rate of transcription [23]. However, when phosphorylated, it is excluded from the nucleus [24], where it is then ubiquitinated and degraded [25]. After a high-carbohydrate-diet feeding, elevated blood glucose stimulates insulin secretion, which leads to the activation of insulin signaling pathways in the liver. The IRE mapped on the promoter of G6Pase is critical in mediating the insulin/Akt-dependent inhibition of gene expression in hepatic gluconeogenesis [23, 26]. In the present study, higher expressions of FOXO1 and phosphorylated CREB1 (a trend, $P=0.058$) were seen in the fasting condition than in the LF-3h condition, suggesting an elevated gluconeogenic pathway in the duodenum of fasting mice. In addition to the metabolism, FOXO transcription factors regulate cellular differentiation, growth, survival, cell cycle, stress and tumor suppression pathways [27]. Together with nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (NR5A2), which has emerged as a key regulator of intestinal function such as cell renewal and local immune function [28], these top 2 transcriptional regulators represent other molecular features of the LF-responsive genes, cellular

function and maintenance as well as cell death. To our knowledge, there is no global investigation into the LF-responsive genes, since LF diet has been often used as a control [6-11]. Therefore, this is the first study reporting the characteristics of the LF-responsive genes with fasting condition as reference.

The present study identified ERK5 as a significant canonical pathway of the LF-specific genes. ERK5 signaling plays important roles in many cellular processes including cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis by activating transcription factors including CREB1. CREB1 is known to interact with CCAAT/enhancer-binding protein beta (CEBPB, the second transcriptional regulator) which regulates genes involved in immune and inflammatory responses as well as maintenance of muscle function via macrophages [29, 30]. Together with the third transcriptional regulator FOXO1, these three transcriptional regulators and canonical pathway reflect the top three molecular and cellular functions, namely, carbohydrate metabolism, cellular function and maintenance, and cellular growth and proliferation.

Both HF-delay and LF-HF different transcriptomes were characterized by a higher proportion of genes related to digestion, and there were three common transcriptional regulators between the HF-delay and LF-HF different genes, namely recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region-like (RBPJL), pancreas specific transcription factor 1a (PTF1A) and NR5A2. The RBPJL and PTF1A are transcription factors involved in the maximal production of digestive enzymes [28]. NR5A2 co-regulates an exocrine pancreas-specific transcriptional network of digestive function [22]. Thus, these common transcriptional regulators reflect well the common physiological function between the HF-delay and LF-HF different genes, “digestion”. Moreover, four (among seven) target molecules of these transcription factors in our data set, namely carboxyl ester lipase (*Cel*), chymotrypsinogen B2 (*Ctrb2*), trypsin 4 (*Try4*)

and carboxypeptidase A2 (*Cpa2*), encode pancreatic digestive enzymes. The significance of these genes expressions remains unknown, however, the pancreatic digestive enzymes have been already reported to be expressed in normal epithelial cells of the duodenum [31].

In addition, the LF-HF different genes were also characterized with a higher proportion of genes related to hormone/peptide, such as islet amyloid polypeptide (*Iapp*), insulin I (*Ins1*) and insulin II (*Ins2*). After excluding the three transcriptional regulators common to LF-HF and HF-delay different genes, the remaining three transcriptional regulators in the top seven of this classification were related to pancreatic development and/or exocrine/endocrine pancreas-specific transcriptional network. More specifically, the pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) is a transcription factor necessary for pancreatic development [11, 32]. PDX1, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MAFA) and homeobox protein Nkx-2.2 (NKX2-2) are necessary for β -cell maturation [32-34]. Furthermore, MAFA is a transcription factor for the insulin gene [35]. These transcriptional regulators represent the second characteristic of the physiological functional classification, “hormone/peptide”.

To our knowledge, there is no previous transcriptomic study investigating and analyzing the meal-responsive genes the way we did. Indeed, our data showed that the main molecular and cellular functions as well as the canonical pathway of meal-responsive genes are related to cellular function and maintenance as well as aldosterone signaling in epithelial, respectively. Aldosterone regulates electrolyte and water balance through its effects on ion transport in the epithelial cell. Ion channels and transporters play a critical role in ion and fluid homeostasis and thus in normal animal physiology. Our data indicate that only this classification had a higher number of significant

transcriptional regulators which contain heat shock proteins (HSP) as target molecules (data not shown, $\text{Chi}^2 = 15.9$). This reflects an importance of protein folding in the cells of duodenum after a meal ingestion, which is concordant with the third molecular and cellular function of meal-responsive genes, “protein folding”.

The gastrointestinal system plays a central role in immune system homeostasis [36]. It is the main route of contact with the external environment and is overloaded every day with exogenous stimuli, including dangerous pathogens and toxic substances [36]. Indeed, the small intestine is a xenobiotic-metabolizing organ [24]. Within this context, our transcriptional regulation analysis of the meal-responsive genes also highlighted the importance of xenobiotic-metabolism, namely aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) and aryl hydrocarbon receptor (AHR). In contrast to the meal-responsive genes, Van den Bosh et al. [25] have reported that fasting (12-24h) modulates the expression of genes related to the xenobiotic-metabolism (phase I metabolic enzyme). In addition, they also reported changes in ATP binding cassette (ABC) superfamily of transporters (Abca1 and Abcg8) as a consequence of fasting [25]. When we compared the proportion of modulated genes related to transporters and phase I/II metabolic enzymes, the meal-responsive genes had a higher proportion of ABC transporters compared to other classifications (data not shown, $\text{Chi}^2 = 10.5$). Although Van den Bosh et al. [25] have only focused on genes related to transporters and phase I/II metabolic enzymes, and used the AIN-93M diet (LF diet) and fasted up to 24h as well as whole small intestine instead of duodenum mucosa, their results supports well our data.

Wang et al. [37] have reported that dietary carbohydrate source (sucrose vs cornstarch, 52.3% dietary weight) affects gene expression profile of intestinal epithelium in mice, primarily metabolic pathways related to carbohydrate metabolism.

In our study, sucrose content in the LF and HF meals are 33% and 9% weights, respectively, whereas glucose polymer contents are 35% and 18%, respectively. Moreover, LF groups consumed 2.7 to 4.1 times more sucrose than the corresponding HF groups, whereas only 1.4 to 2.3 times more glucose polymer was ingested in the LF groups [5]. On average, 1.6 times less sucrose than glucose polymer was consumed in HF-fed mice compared to the corresponding LF-fed mice. These may influence the results of present study. When we compared 95 individual genes listed in their study [37] to ours (896 transcripts), only two genes (namely growth factor receptor-bound protein 7 and stearoyl-Coenzyme A desaturase 2) from the microarray data and one gene (aldolase 1, A isoform) from the SAGE data were overlapped, representing 0.3% of our data set. Therefore, the effects should be minimum. In addition, since Wang et al. investigated long-term (10 wks) feeding effects and only used microarray data, the results cannot be compared directly. However, both studies agree with carbohydrate metabolism as one of the most modulated pathways after a high-carbohydrate diet. SAGE and microarray use different approaches to detect, identify and quantify transcripts. SAGE method is based on the recognition of specific mRNA by the sequencing of short expressed tags (SAGE tags) that have been converted to cDNA, linked into concatemers and cloned [38]. The frequency of a SAGE tag in a biological sample is a precise measure of the amount of mRNA generated from a gene because all tags are simultaneously amplified without alteration in their relative proportions and without reference to an internal standard. However, cDNA without a specific restriction site such as *NlaIII* do not generate tags, and a large number of tags must be sequenced to observe significant differences between groups for low abundance mRNA [39]. In contrast to the SAGE, microarray technology is not limited by cDNA sequencing or by the presence of a restriction site in a transcript. Microarray is used to simultaneously

detect a large number of mRNA species by their hybridization to nucleotide probes, which are synthesized *in situ*, on a chip [40]. Hybridization intensities can be used to compare mRNA between experimental groups, but microarray does not give an absolute estimate of genes expression level. In the present study, SAGE detected more transcripts in cytoskeleton whereas microarray detected more in signaling and RNA/DNA processing. Moreover, only 29 gene species (68 transcripts, 8%) in 896 modulated transcripts by the LF- and/or HF-meal ingestion were commonly modulated in both SAGE and microarray analysis, which demonstrates that SAGE and microarray detect different transcript species (92% of total modulated transcripts). However, only a negligible number of transcript ($n=1$, 0.1%) reveals unexplainable contradicted result between them: Majority (20 genes) showed a similar or exactly the same expression pattern, whereas only two genes had opposite results and one of which detected by microarray does not contain SAGE tag, suggesting a different spliced product from the same gene. Even though SAGE and microarray detected different transcript species, majorities of the transcriptional regulators, the top five molecular and cellular functions, and the top three networks were represented in both methods. These results suggest that SAGE and microarray lead to the similar conclusion when the transcripts are globally analyzed. Therefore, SAGE and microarray complement each other, and combining the results will identify more variety of transcripts species that cannot be detected by SAGE or microarray alone.

Conclusions

Our transcriptomic analysis using SAGE and microarray data highlighted lipid metabolism (PPAR α) as the first molecular and cellular function (transcriptional regulator) of the HF-responsive and HF-specific genes. On the other hand, the first molecular and cellular functions of the LF-responsive and LF-specific genes as well as meal-responsive genes were carbohydrate metabolism (FOXO1 and CREB1, respectively) as well as cellular function / maintenance (FOXO1), respectively. We also characterized the common physiological function of the HF-delay and LF-HF different genes as digestion. Importantly, our results will contribute to the understanding of the LF and HF meal responsive mechanisms in the intestine and might allow the development of novel therapeutic approaches for obesity and the related disorders and disease. Indeed, PPAR α deficient mice fed a HF diet exhibit an obese-phenotypic characterization [41] whereas an activation of PPAR α transcriptional activity leads to protections from adiposity and insulin resistance [37, 42], which shows potential application for treatment of insulin resistance and obesity.

In addition, our pathway and network analysis indicate that the main gene expression in the duodenum shifts toward metabolisms corresponding to the major macronutrients ingested within 3h after a meal and that there is a delay of digestion-related-genes modulation after a HF meal ingestion. These knowledges of the direct link between post-prandial duodenum gene expression and ingested meal as well as the delayed responses become useful for nutritionists and clinicians who would need to adjust the diet of their patients depending on their therapies. Since our study is about the short-term effects (up to 3 h), such aspect will be more important for drugs that are taken after meals and during the period when diet-induced metabolic variations are still

active. For instance, a patient under therapies should avoid the diet that could deactivate the drug or prevent the metabolism of drug, especially if it is a prodrug, which could lead to either a loss of therapeutic efficiency or induce a pharmacotoxicity. Moreover, our results could also allow the nutritionists to better optimize the diet of patients suffering from divers metabolic diseases by considering the possible biochemical outcomes of the interactions between the ingested diet and the pathways induced by that diet depending on its ratio of lipids.

List of abbreviations

ABC, ATP binding cassette; **AHR**, aryl hydrocarbon receptor; **AIP**, aryl hydrocarbon receptor interacting protein; **CEBPB**, CCAAT/enhancer-binding protein beta; **Cel**, carboxyl ester lipase; **Cpa2**, carboxypeptidase A2; **CREB**, cAMP response element binding protein; **Ctrb2**, *chymotrypsinogen* B2; **DF**, density of each lane on the film; **DM**, density of each lane on the membrane; **ERK5**, extracellular signal regulated kinase 5; **FA**, fatty acids; **FOXO1**, forkhead box protein O1; **HF**, high-fat; **G6Pase**, glucose 6-phosphatase; **HSP**, heat shock proteins; **Iapp**, islet amyloid polypeptide; **Ins1**, insulin I; **IPA**, Ingenuity Pathways Analysis; **IRE**, insulin response element; **LF**, low-fat; **MAFA**, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A; **NKX2-2**, homeobox protein Nkx-2.2; **NR5A2**, nuclear receptor subfamily 5 group A member 2; **PC**, positive control; **PDX1**, pancreatic and duodenal homeobox 1; **PKA**, protein kinase A; **PPAR**, peroxisome proliferator-activated receptor; **PTF1A**, pancreas specific transcription factor 1a; **Q_RT-PCR**, quantitative real-time PCR; **RBPJL**, recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region-like; **SAGE**, serial analysis of gene expression; **Try4**, trypsin 4.

Declarations

Ethics approval

All animal experimentation was conducted in accord with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Protection Committee of Laval University.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare no financial and non-financial competing interest.

Consent for publication

Not applicable.

Funding

This study was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

Acknowledgements

Not applicable.

Author's contributions

JS designed and supervised the study; MY conducted research; OM, AM, MY and EC analyzed data; OM, AG, MY and AB wrote the paper. JS had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Lissner, L., et al., *Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects*. Am J Clin Nutr, 1987. **46**(6): p. 886-892.
2. Schutz, Y., J.P. Flatt, and E. Jequier, *Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity*. Am J Clin Nutr, 1989. **50**(2): p. 307-314.
3. Liu, M., et al., *Obesity induced by a high-fat diet downregulates apolipoprotein A-IV gene expression in rat hypothalamus*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(2): p. E366-70.
4. Ziotopoulou, M., et al., *Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(4): p. E838-45.
5. Yoshioka, M., et al., *High-fat meal-induced changes in the duodenum mucosa transcriptome*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(10): p. 2302-7.
6. Cui, J., et al., *Lipoic acid attenuates high fat diet-induced chronic oxidative stress and immunosuppression in mice jejunum: a microarray analysis*. Cell Immunol, 2009. **260**(1): p. 44-50.
7. Desmarchelier, C., et al., *C57Bl/6 N mice on a western diet display reduced intestinal and hepatic cholesterol levels despite a plasma hypercholesterolemia*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 84.
8. de Wit, N.J., et al., *The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice*. BMC Med Genomics, 2008. **1**: p. 14.
9. de Wit, N.J., et al., *Dose-dependent effects of dietary fat on development of obesity in relation to intestinal differential gene expression in C57BL/6J mice*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19145.
10. de Wit, N., et al., *Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(5): p. G589-99.
11. Steegenga, W.T., et al., *Structural, functional and molecular analysis of the effects of aging in the small intestine and colon of C57BL/6 J mice*. BMC Med Genomics, 2012. **5**(1): p. 38.
12. Ishii, M., et al., *Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis*. Genomics, 2000. **68**(2): p. 136-43.
13. Feldker, D.E., et al., *Serial analysis of gene expression predicts structural differences in hippocampus of long attack latency and short attack latency mice*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(2): p. 379-87.
14. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
15. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. **3**: p. Article3.
16. Benjamini, Y., et al., *Controlling the false discovery rate in behavior genetics research*. Behav Brain Res, 2001. **125**(1-2): p. 279-84.
17. Wettenhall, J.M., et al., *affyLmGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data*. Bioinformatics, 2006. **22**(7): p. 897-9.

18. Adams, M.D., et al., *Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence*. *Nature*, 1995. **377**(6547 Suppl): p. 3-174.
19. Taylor, S.C. and A. Posch, *The design of a quantitative western blot experiment*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 361590.
20. de Vogel-van den Bosch, H.M., et al., *PPARalpha-mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 231.
21. Yasuda, Y., I. Akiguchi, and M. Kameyama, *[A case of herpes zoster myelitis improved with acyclovir]*. *Rinsho Shinkeigaku*, 1990. **30**(4): p. 452-4.
22. Holmstrom, S.R., et al., *LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function*. *Genes Dev*, 2011. **25**(16): p. 1674-9.
23. Schmoll, D., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36324-33.
24. Kaminsky, L.S. and Q.Y. Zhang, *The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ*. *Drug Metab Dispos*, 2003. **31**(12): p. 1520-5.
25. van den Bosch, H.M., et al., *Gene expression of transporters and phase I/II metabolic enzymes in murine small intestine during fasting*. *BMC Genomics*, 2007. **8**: p. 267.
26. Salih, D.A. and A. Brunet, *FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 126-36.
27. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(11): p. 1978-86.
28. Fernandez-Marcos, P.J., J. Auwerx, and K. Schoonjans, *Emerging actions of the nuclear receptor LRH-1 in the gut*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(8): p. 947-55.
29. Chen, Y., et al., *Synergism between calcium and cyclic GMP in cyclic AMP response element-dependent transcriptional regulation requires cooperation between CREB and C/EBP-beta*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(12): p. 4066-82.
30. Ruffell, D., et al., *A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(41): p. 17475-80.
31. Terada, T., et al., *Expression of pancreatic digestive enzymes in normal and pathologic epithelial cells of the human gastrointestinal system*. *Virchows Arch*, 1997. **431**(3): p. 195-203.
32. D'Amour, K.A., et al., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(11): p. 1392-401.
33. Pauls, S., et al., *Function and regulation of zebrafish nkx2.2a during development of pancreatic islet and ducts*. *Dev Biol*, 2007. **304**(2): p. 875-90.
34. Doyle, M.J. and L. Sussel, *Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet*. *Diabetes*, 2007. **56**(8): p. 1999-2007.
35. Olbrot, M., et al., *Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 6737-42.
36. Vighi, G., et al., *Allergy and the gastrointestinal system*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **153 Suppl 1**: p. 3-6.

37. Wang, B., et al., *Dietary carbohydrate source alters gene expression profile of intestinal epithelium in mice*. Nutr Cancer, 2009. **61**(1): p. 146-55.
38. Velculescu, V.E., et al., *Serial analysis of gene expression*. Science, 1995. **270**: p. 484-487.
39. Ding, C. and C.R. Cantor, *Quantitative analysis of nucleic acids--the last few years of progress*. J Biochem Mol Biol, 2004. **37**(1): p. 1-10.
40. Duggan, D.J., et al., *Expression profiling using cDNA microarrays*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 10-4.
41. Kono, Y., et al., *Multicenter Prospective Study on the Safety of Upper Gastrointestinal Endoscopic Procedures in Antithrombotic Drug Users*. Dig Dis Sci, 2017.
42. Zhuang, H., et al., *FADD is a key regulator of lipid metabolism*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(8): p. 895-918.

Figure legends

Figure 1 Comparison of the transcripts number detected in each functional classification among five expression patterns.

*Significant difference from the expected distribution of number of modulated transcripts ($P<0.05$).

Abbreviations: **HF**, high-fat; **LF**, low-fat.

Figure 2 Western blot analysis of transcriptional regulators expressions.

*Significant difference between two conditions ($P<0.05$).

**Data are shown as a ratio to the loading control on the same membrane/film and mean \pm SEM.

Abbreviations: **CREB1**, cAMP response element binding protein; **FOXO1**, forkhead box protein O1; **HF**, high-fat; **LF**, low-fat; **pCREB1**, phosphorylated CREB1; **pFOXO1**, phosphorylated FOXO1; **PPAR**, peroxisome proliferator-activated receptor.

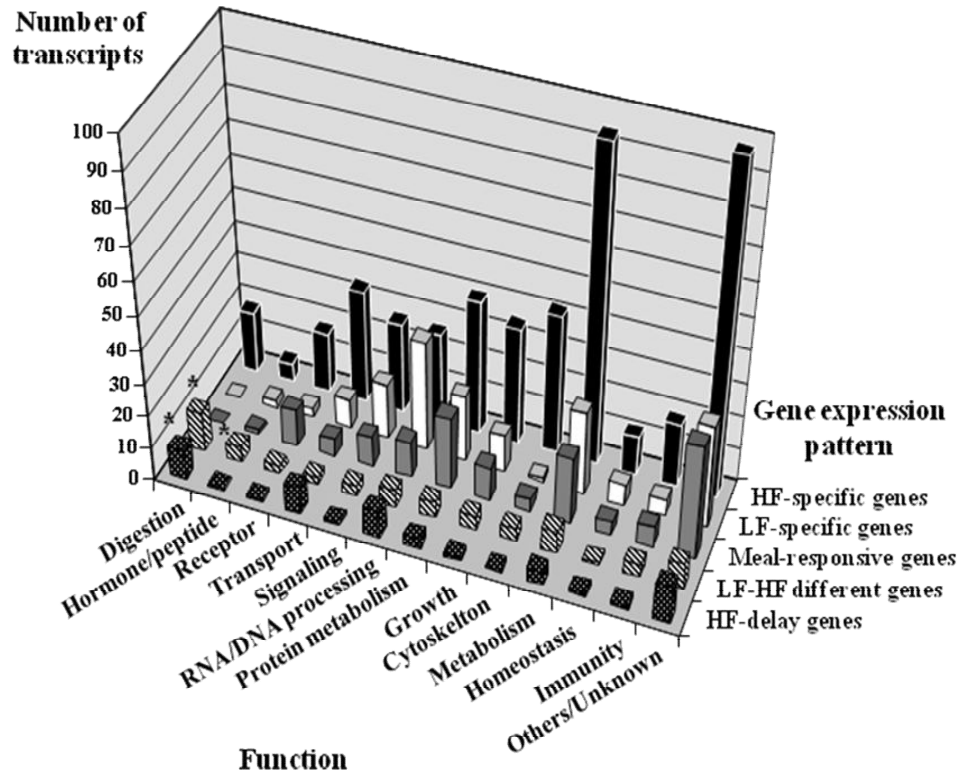


Fig1: Comparison of the transcripts number detected in each functional classification among five expression patterns.

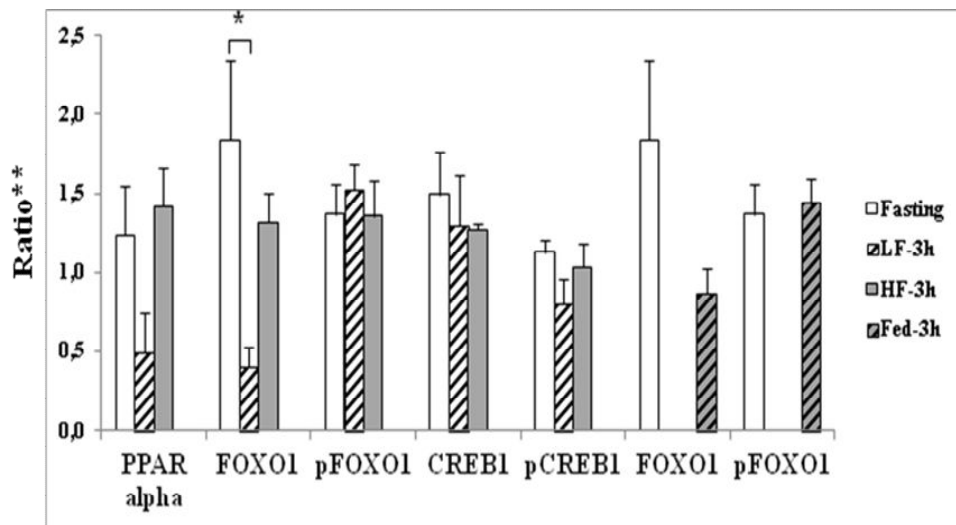


Figure 2 Western blot analysis of transcriptional regulators expressions.

Table 1 Comparison of significantly modulated molecular and cellular functions, and transcription regulators after low-fat (LF) and high-fat (HF) meal ingestion.

	LF-responsive genes	HF-responsive genes
Top 3 molecular and cellular functions		
1	Cell death	Lipid metabolism
2	Cellular function and maintenance	Molecular transport
3	Carbohydrate metabolism	Small molecule biochemistry
Top 3 transcription regulators		
1	FOXO1	PPARA
2	NR5A2	PPARGC1A
3	EPAS1	NR4A1

Abbreviations: EPAS1, endothelial PAS domain-containing protein 1; FOXO1, forkhead box protein O1; NR4A1, nuclear receptor subfamily 4 group A member 1; NR5A2, nuclear receptor subfamily 5 group A member 2; PPARA, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPARGC1A, PPAR gamma coactivator 1-alpha.

Table 2 Significantly modulated canonical pathways, molecular and cellular functions, and transcription regulators for low fat (LF)-specific, high fat (HF)-specific, meal-responsive, HF-delay, and LF-HF-different genes.

LF-specific genes	HF-specific genes	Meal-responsive genes	HF-delay genes	LF-HF different genes
Top 3 canonical pathways				
1 ERK5 signaling	Calcium signaling	Aldosterone signaling in epithelial cells		Glycerolipid metabolism
2	LXR/RXR activation	Protein ubiquitination pathway		Actin cytoskeleton signaling
3	LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function			
Top 3 molecular and cellular functions				
1 Carbohydrate metabolism	Lipid metabolism	Cellular function and maintenance	Lipid metabolism	Lipid metabolism
2 Cellular function and maintenance	Small molecule biochemistry	Post-translational modification	Molecular transport	Small molecule biochemistry
3 Cellular growth and proliferation	Molecular transport	Protein folding	Small molecule biochemistry	Molecular transport
Top 3 transcription regulators				
1 CREB1	PPARA	FOXO1	RBPJL	NR5A2
2 CEBPB	SMAD3	AIP	PTF1A	RBPJL
3 FOXO1	PPARGC1A	HIF1A	MLX	Pdx1

Abbreviations: AIP, aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein; CEBPB, CCAAT/enhancer-binding protein beta; CREB1, cAMP responsive element binding protein 1; ERK5, extracellular signal regulated kinase 5; EPAS1, endothelial PAS domain-containing protein 1; FOXO1, forkhead box protein O1; HIF1A, hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit; IL-1, interleukin 1; LPS, lipopolysaccharides; LXR, liver X receptor; MLX, Max-like protein X; NR4A1, nuclear receptor subfamily 4 group A member 1; NR5A2, nuclear receptor subfamily 5 group A member 2; Pdx1, pancreatic and duodenal homeobox 1; PPARA, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPARGC1A, PPAR gamma coactivator 1-alpha; PTF1A, pancreas transcription factor 1 subunit alpha; RBPJL, recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region-like; RXR, retinoid X receptor.

Chapitre 3. Résultats de l'étude 2: Energy and metabolic pathways in trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice beyond the protection from high-fat diet-induced obesity.

3.1 Résumé en français

CONTEXTE / OBJECTIFS : Le trefoil factor 2 (TFF2) est un petit peptide intestinal impliqué dans l'obésité induite par le régime alimentaire riche en gras (HF). Une récente étude dans notre laboratoire a démontré que les souris déficientes de *Tff2* (*Tff2* KO) sont protégées contre l'obésité induite par le régime HF par rapport aux souris du type sauvage (WT). L'exploration des voies moléculaires et métaboliques connexes des souris *Tff2* KO aux niveaux génomiques, protéiques et biochimiques nous permettrait d'élucider les processus régissant les résultats observés dans l'étude de Giorgio et al¹.

SUJETS / MÉTHODES : Pour explorer les effets métaboliques et énergétiques de la déficience de *Tff2*, nous avons utilisé l'échantillon du sang provenant des souris mâles utilisées dans l'étude précédente¹ pour mesurer les niveaux d'acides gras non-liés (FFA), de glucose, de glycérol et de triglycérides dans le sérum. Les niveaux d'expression des gènes et des protéines sélectionnés impliqués dans le métabolisme énergétique dans le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux ont également été mesurés.

RÉSULTATS : Après 12 semaines d'alimentation des souris *Tff2* KO et WT avec HF ou un régime faible en gras (LF), les souris *Tff2* KO présentaient des taux de glycémie, de triglycéridémie et de glycérol sérique inférieurs. Il est à noter que la Q-RT-PCR et l'immunobuvardage des protéines ont révélé que les niveaux d'expression des gènes et des protéines sélectionnés sont liés au faible stockage de gras, l'augmentation de la dépense énergétique, la phosphorylation oxydative ainsi qu'à l'utilisation des lipides et du glucose.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES : Nos résultats nous permettent de cartographier, au moins une partie des voies métaboliques et des processus biochimiques, y compris le métabolisme des lipides et du glucose impliquant le tissu adipeux, le foie, le muscle squelettique et le système nerveux sympathique. Ces découvertes, sur la façon dont les changements significatifs à plusieurs niveaux d'équilibre énergétique protègent les souris *Tff2* KO contre l'obésité induite par le régime HF, mettent en évidence les voies liées au gène *Tff2* en tant qu'importantes cibles moléculaires basées sur les génomiques fonctionnelles pour développer des nouvelles thérapies contre l'obésité.

3.2 : Participation à l'étude

Ma contribution à cet article scientifique est de mener les expériences de laboratoire, analyser les résultats et de rédiger le manuscrit en collaboration avec l'équipe de recherche.

3.3 Corps du texte

Energy and metabolic pathways in trefoil factor family member 2 (*Tff2*) KO mice beyond the protection from high-fat diet-induced obesity

Abdelaziz Ghanemi^{1,2}, Aicha Melouane^{1,2}, Octave Mucunguzi^{1,2}, Mayumi Yoshioka¹ and Jonny St-Amand^{1,2}

¹CREMI, CHU de Québec Research Center, Quebec, Quebec, G1V 4G2, Canada

²Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Quebec, G1V 0A6, Canada

Running title: *Tff2* deficiency and energy metabolism

Corresponding author: Jonny St-Amand, Ph.D.

Functional Genomics Laboratory

CREMI, CHUL-CHU de Québec Research Center

2705 Boul. Laurier

Québec (PQ) G1V 4G2 Canada

Tel: +1-(418) 654-2296

Fax: +1-(418) 654-2761

E-mail: Jonny.St-Amand@crchudequebec.ulaval.ca

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

Abstract

BACKGROUND/OBJECTIVES: Trefoil factor family member 2 (TFF2) is a small gut peptide involved in high-fat (HF) diet-induced obesity. A previous study from our laboratory[1] has shown that *Tff2* knock out (KO) mice are protected from the HF diet-induced obesity when compared to wild type (WT). Exploring the related molecular and metabolic pathways of *Tff2* KO mice at the genomic, proteinic and biochemical levels would allow us to elucidate the processes behind the results seen in the study of Giorgio et al.[1]

SUBJECTS/METHODS: To explore the metabolic and the energetic effects related to *Tff2* deficiency, we used sampled blood from the male mice used in the previous study[1] to measure levels of free fatty acids (FFA), glucose, glycerol and triglycerides in serum. Expression levels of selected genes and proteins related to energy metabolism in the skeletal muscle, liver and adipose tissue were also studied.

RESULTS: Following the 12-week challenging of *Tff2* KO and WT mice with both HF and low-fat (LF) diet, *Tff2* KO mice had lower levels of serum glucose, triglycerides and glycerol. Importantly, western blotting and Q_RT-PCR revealed that the expression levels of selected genes and proteins are toward less fat storage and increased energy expenditure, oxidative phosphorylation as well as lipid and glucose utilization.

CONCLUSIONS and PERSPECTIVES: Our results allow us to map, at least a part of, the metabolic pathways and biochemical processes including lipids and glucose metabolisms and involving the adipose tissue, the liver, the skeletal muscle and the sympathetic nervous system. These explanations, on how significant changes at numerous levels of energy balance protect *Tff2* KO mice from the HF diet-induced obesity; highlight *Tff2*-related pathways as potential functional genomics-based molecular targets to develop novel obesity therapies.

Key words: Trefoil factor family member 2, low-fat diet, high-fat diet, energy metabolism, obesity protection.

Abbreviations

ADRB2, β -2 adrenergic receptor; **AgRP**, agouti-related protein; **WAT**, white adipose tissue; **BAT**, brown adipose tissue; **BW**, body weight; **CD36**, fatty acids translocase; **CNS**, central nervous system; **FM**, fat mass; **FFA**, free fatty acids; **GLUT2**, glucose transporter 2 (solute carrier family 2); **GLUT4**, glucose transporter type 4; **HF**, high-fat; **KO**, knockout; **LF**, low-fat; **MTCO1**, mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (Cytochrome c oxidase I); **NDUFB8**, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8; **NUR77**, nerve growth factor IB or NGFIB; **OXPHOS**, oxidative phosphorylation; **PPARA**, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *Ppargc1a*, PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α); **Q_RT-PCR**, quantitative real-time PCR; **SDHB**, succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit (iron-sulfur subunit of complex II); **SNS**, sympathetic nervous system; **TFF2**, trefoil factor 2; **TG**, triglyceride; *Ucp1*, mitochondrial uncoupling protein1; **WT**, wild type.

INTRODUCTION

Obesity can result from the accumulated effect of minor imbalances between energy intake and expenditure[2]. In functional genomics, exploring genes-related energy metabolism variations represents a key step to understand the underlying mechanisms of obesity and identify potential therapeutic targets. Within this context, trefoil factor family member 2 (TFF2), expressed in the gastrointestinal mucosa [3], represents, beyond its roles in divers biological functions, a peptide which has been linked to food intake[4], specifically high-fat (HF) intake in mice [5]. Thus, TFF2 may regulate feeding behaviour and energy metabolism as a peripheral signal to the central nervous system (CNS).

Our previous study highlighted *Tff2* knock out (KO) mice as protected from HF diet induced obesity and that *Tff2* expression in hypothalamus is modulated by HF and low-fat (LF) meal[6]. Importantly, although *Tff2* KO mice had higher energy intake, they had less body weight and fat mass but a higher percentage of lean mass. This study demonstrated that TFF2 is involved in all components of energy balance: energy intake (+650 kJ in *Tff2* KO mice compared to WT mice during 12-wks feeding), expenditure (+608 kJ) and excretion (+129 kJ)[1]. Importantly, energy loss from energy excretion in *Tff2* KO mice accounted only 17.5% whereas the majority (82.5%) was from energy expenditure[1]. However, the pathways beyond these results are yet to be identified. Herein, to characterize the mechanisms by which TFF2 is controlling energy balance and the roles of TFF2 within obesity and related diseases, the current work further explores selected energy metabolic parameters via genes and proteins expression combined to biochemical measures.

MATERIAL AND METHOD

Experimental design and diet specifications

Our study has been carried out on male mice of our previous work[1]. Briefly, at the age of 16 wks, the mice, divided into four groups: wild-type (WT)-LF (n=7), WT-HF (n=7), KO-LF (n=7), KO-HF (n=9), were fed with the corresponding diets (HF or LF) and provided tap water ad libitum for 12 wks. Blood was collected from the mandibular vein at the 8th week of diet using a needle stick . Mice were sacrificed at the end of the 12-wk diet by cardiac puncture after being anesthetized with a commensurate dose of ketamine-xylazine. The blood and tissues were collected. The selected tissues were the adipose tissue, the skeletal muscle and the liver which are important targets for metabolic therapies. [7]

Quantitative real-time PCR (Q_RT-PCR)

Total RNA was extracted from the skeletal muscles and the Q_RT-PCR method, with the technical specifications previously described,[6, 8] was used for the quantification of mRNAs corresponding to the following genes: nerve growth factor IB (*Nur77*), fatty acids translocase (*Cd36*), glucose transporter type 4 (*Glut4*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (*Ppargc1a*), uncoupling protein 3 (*Ucp3*) and mitochondrially encoded cytochrome C oxidase I (*MtCoI*). See the Appendix 1 for the related information on GenBank accession numbers, sizes, regions used for primers pairs and primers sequences.

Western blotting

Total proteins were extracted from the skeletal muscles, the liver and the adipose tissue using a radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer and protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON, Canada). Five to thirty µg of proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the TGX Stain-Free FastCast acrylamide solutions (Bio-Rad Laboratories

Ltd., Mississauga, ON, Canada), and trihalo compound in the gels was activated under UV. Then, total proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories Ltd. Mississauga, ON, Canada), and visualized under UV by using the AlphaImager™ 1220 (Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, USA). Membranes were blocked using the Pierce™ Protein-Free (TBS) blocking buffer (Life Technologies Inc., ON, Canada), incubated with 1/100-1/400 dilution of primary antibodies from Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA and secondary antibodies (sc-2004 or sc-2005, 1/10000 dilution: Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA), and visualized with the Clarity™ Western ECL Blotting Substrate on a film (Bio-Rad Laboratories Ltd. Mississauga, ON, Canada). The visualized total proteins on the membranes and target proteins on the films were quantified using the ImageJ software.[9] Prior to the western blot, pooled samples were used to determine the quantity of loading proteins (0 - 40 µg) and dilution of primary antibody (1/100-1/800). The same pooled sample was loaded in each gel, and used as a positive control (PC) to normalize the differences between each membrane. The density of each lane on the membrane (DM) (loading control) and on the film (DF) was expressed as a ratio to each PC on the same membrane/film. Then, the quantity of protein loaded was normalized by dividing DF by DM, as previously suggested.[10, 11] Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

For the oxidative phosphorylation (OXPHOS)-related proteins, some different western blotting conditions were applied. Indeed, we used a pre-casted ready Tris-HCL gel (161-1124, Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada) for the proteins separation. After the electrophoresis, gel was soaked in the N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS) transfer buffer (C2632, Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON, Canada) for thirty min before assembling the transfer sandwich. Following the transfer, the membrane was soaked in CAPS transfer buffer then in TrueBlot enhancer solution before being placed in 5% TrueBlot Blocker (in TrueBlot Assay Buffer) overnight at 4^o C. For the primary antibodies, we used the OXPHOS rodent western blot (WB) antibody cocktail (Abcam Inc., Toronto, ON, Canada) at a dilution of 1/250.

The changes in the expression levels of one or more of the following proteins: β -2 adrenergic receptor (ADRB2), nerve growth factor IB (NUR77), fatty acids translocase (CD36), glucose transporter type 4 (GLUT 4), glucose transporter 2 (GLUT2) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA) and selected mitochondrial OXPHOS-related enzymes and proteins were studied for each of the three key metabolic tissue.

Blood and serum analysis

Serum for free fatty acids (FFA) measurement was collected at the 8th week of diet (following 12 h fasting), whereas blood glucose measurement and the collection of the serum for insulin, triglyceride (TG) and glycerol measurement were performed at week 12 of the diet, following a 4-h fasting at sacrifice.

Serum insulin levels were measured by immunoassay ELISA kits (ALPCO, Salem, NH, USA). Glucose was measured with a glucometer (Accu-Chek[®] Aviva, Roche, Basel, Switzerland). Serum TG and glycerol concentrations were measured by a colorimetric enzymatic method, using the Triglyceride Quantification Kit (BioVision, Inc., CA, USA). Measurement of FFA by a colorimetric kit (Abcam Inc., Toronto, ON, Canada) has also been performed.

Statistical analyses

The data were analyzed by the two-way (genotype and diet) ANOVA ($p < 0.05$). When the ANOVA revealed a significant interaction between two variables, the Tukey Kramer post-hoc test was performed to identify the significant difference between the two groups ($p < 0.05$).

RESULTS

Increased expression of genes and proteins related to glucose and lipids uptake and utilization in the skeletal muscle of *Tff2* KO mice

Following the 12 wks of diet, both gene and protein expressions levels have been studied in the skeletal muscle. The obtained results (Figure 1), put together, indicate an increase in the both glucose and lipid metabolism. Indeed, the expression of membrane transporters and metabolic enzymes of glucose are more expressed in *Tff2* KO mice.

Decreased expression of energy metabolism related proteins in the liver and adipose tissue of *Tff2* KO mice

The two-way ANOVA analysis of the western blotting data of liver (Figure 2 A) and adipose tissue (Figure 2 B) revealed the impact of *Tff2* deficiency in these two tissues. The metabolic markers indicate a decrease in the proteins involved in the energy metabolism in these two tissues of *Tff2* KO mice compared to WT mice (Figure 2).

***Tff2* KO mice have decreased gastrocnemius muscle, mesenteric adipose tissue and liver mass whereas increased percentage of gastrocnemius muscle mass**

Mice were sacrificed at the end of the 12-wk diet and after 4 h fasting and tissues weights were analyzed via the two-way ANOVA. The analysis revealed significant effects of genotype for both gastrocnemius muscle mass (KO<WT) and mass percentage (KO>WT) and an effect of diet (HF<LF) for the gastrocnemius muscle mass percentage. For the mesenteric adipose tissue (both mass and masse percentage), we noticed significant effects of both genotype (KO<WT) and diet (HF>LF). The statistics showed also significant effects of genotype (KO<WT) for the liver weight, diet (HF<LF) for the liver mass percentage. Significant effects of genotype × diet interaction were also revealed for both mesenteric adipose tissue and liver masse (HF: KO<WT) (Table 1).

***Tff2* KO mice have lower blood glucose as well as serum FFA, TG, glycerol and insulin levels**

The analysis of the data of the blood and serum (sampled at the 8th wk of diet and following 12 h fasting) by the two-way ANOVA showed a trend ($p < 0.1$) in effect of genotype (KO>WT) for the FFA and no effect of glucose. At 12 wks diet, it revealed a significant effect of genotype (KO<WT) for glucose, TG and glycerol levels. The glucose levels were higher in HF groups. A genotype \times diet interaction (KO<WT in LF-fed mice) was observed for TG levels. A trend in the effect of genotype (KO<WT) was also showed for insulin levels at the week 12 of the diet (Table2).

DISCUSSION

From a biochemical viewpoint, obesity is mainly related to both lipidic and glucidic metabolism. Therefore, the current study selected genes, proteins and biochemicals that are specifically involved within the lipidic and/or glucidic pathways. In addition, selected tissues have been weighed to further map the *Tff2* deficiency-related pathways in mice. Therefore, our discussion focuses on the variations seen in *Tff2* KO mice compared to WT mice with a comparison to related data previously reported.

Elevated energy expenditure

Leptin enhances energy expenditure and decreases food intake [12]. This explains why *Tff2* KO mice, with decreased leptin levels, had higher food intake[1]. However, despite the decreased leptin concentration[1], *Tff2* KO mice had a higher energy expenditure which is due to leptin-independent energy expenditure pathways, including mitochondrial uncoupling protein1 (*Ucp1*)-dependent energy expenditure. Indeed, the *Ucp1* gene higher expression in the brown adipose tissue (BAT) [1] indicates that the mitochondrion oxidation is uncoupled from ATP production and the energy is dissipated as diet-induced thermogenesis resulting from the sympathetic nerves system (SNS) activity after β -adrenergic stimulation[13]. This explains the higher energy expenditure observed in *Tff2* KO mice[1] following the excessive caloric intake probably detected by the brain. Indeed, the higher expression of agouti-related protein (*Agrp*) in the hypothalamus of *Tff2* KO mice[1] indicates an increased feeding stimulation rather than an obesity pattern [14, 15] because *Tff2* KO mice were lean but with a higher energy intake[1]. These changes further highlight the involvement of the central regulation in energy metabolism of *Tff2* KO mice. Herein, we mention that since leptin is produced by adipose tissue[16], the lower fat mass of *Tff2* KO mice also correlates with their decreased leptin level.

The increased *Ucp1* expression leading to diet-induced thermogenesis involves pathways similar to cold-response in BAT[17, 18]. Importantly, these stimulations in BAT include an increased uptake of glucose[19] as well as an accelerated plasma clearance of triglycerides[20]. This correlates with the lower glycemia and TG level in the

serum of *Tff2* KO mice and the higher glucose uptake (higher GLUT4 expression) in skeletal muscle despite the lower insulin concentration indicating an improvement in insulin sensitivity.

Additionally, our observation is in accordance with the fact that BAT activity during cold exposure is more important in the lean subjects than in obese subjects,[21] since the lean *Tff2* KO mice had an increased *Ucp1* expression.

Within this context, it seems logic to suppose that the decreased body fat mass seen in *Tff2* KO mice concerns mainly adipose tissues other than BAT. Indeed, BAT of *Tff2* KO mice had higher total RNA contents whereas no difference of protein contents was found in the mesenteric adipose tissue. Moreover, *Tff2* KO mice had less white adipose tissue (WAT) (data not shown), probably reflecting the increased metabolic activity within the BAT.

Stimuli such as diet, including long-chain fatty acids, induce UCP1 expression in BAT [22]. Therefore, upregulation of *Ucp1* expression observed during increased caloric intake can stimulate BAT thermogenesis, since BAT represents a key tissue of energy conversion into heat[23]. In addition, increased *Ucp1* expression in *Tff2* KO mice BAT also indicates a higher antioxidant activity via lowering superoxide production[24], which is another positive impact of *Tff2* deficiency that could have therapeutic implications.

On the other hand, studies showed that during fasting FFA increase in serum following increased SNS activity (β -adrenergic stimulation)[25, 26] which correlates with the FFA elevation (trend) and the non-modification of glucose level following the 12 h fasting (week 8)

Increased glucose and lipid uptake and utilization in the skeletal muscle

The increased expression of CD36/*Cd36* and GLUT4/*Glut4* show the important uptake of the fatty acids and glucose respectively. The increased expression of the mitochondrial protein NDUFB8 (Complex I of the mitochondrial respiratory chain) reflects a higher oxidative phosphorylation and therefore, a higher utilization of the imported glucose, lipids (FFA and TG) and glycerol within the mitochondrion. This is

confirmed by the decreased concentrations of glucose, TG and glycerol in the serum confirming that three “fuels” are imported into the skeletal muscle. This elevated energy production is required to cover, among other needs, the energy required for the enhanced spontaneous locomotor activity observed for the *Tff2* KO mice[1]. Especially that the skeletal muscle accounts for an important ratio (50%) of energy expenditure of the body and around 40% of the body mass and is responsible for around 70% to 80% of insulin-stimulated postprandial glucose uptake[27, 28]. Thus, showing that *Tff2* KO mice had a high energy production in the skeletal muscle, as well as an important energy utilization which further contribute to the global energy expenditure. It worth mentioning that *Tff2* KO mice had increased percentages of both gastrocnemius muscle mass and lean body mass. In addition, the increased energy expenditure and percentages of both gastrocnemius muscle mass and lean body mass correlate with the increased locomotor activity of *Tff2* KO mice[1].

The muscular metabolic activity is confirmed by the higher expression of both the gene *Nur77* and its protein NUR77 in the skeletal muscle of *Tff2* KO mice. Indeed, this shows a higher lipolysis[29] as well as an enhanced oxidative metabolism in the skeletal muscle[30] with a regulation of expression of genes linked to glucose metabolism.[31] This is supported by the increased expression of both CD36 and GLUT4 (trend)/*Glut4* (in HF-fed mice) in the skeletal muscle due to its role in both fatty acid oxidation and glucose utilization. Importantly, in the skeletal muscle *Nur77*, which plays roles in glucose[31] and lipid metabolism[29], can be induced by the exercise[32]. This means that both *Tff2* deficiency and exercise have similar effect on *Nur77* expression.

Although *Tff2* KO mice had a lower insulin concentration (trend), they had a higher uptake and utilization of the glucose in muscles which indicates a higher insulin sensitivity. Such fact might be of a significant importance for a possible *Tff2*-targeting therapy for diseases involving insulin resistance. The decreased insulin concentration in *Tff2* KO mice could be the consequence of the implication of TFF2 in pancreatic β -cells proliferation[33].

Decreased lipids uptake and increased lipolysis in adipose tissue

Whereas adipocyte differentiation is inhibited by NUR77[34], the inhibition of Nur77 expression has not effect on the adipogenesis. [35] This correlates with the decreased NUR77 expression in the adipose tissue of *Tff2* KO mice. In addition, the lower *Tff2* KO mice serum insulin concentration is also in accordance with this observation due to the facts that insulin was shown to induce *Nur77* adipocytes[36] in addition to the role of insulin in the stimulation of adipogenesis[37] and the uptake and storage of lipids[38].

In order to map the pathways, it is important to describe the role that SNS plays in controlling TG metabolism[39] especially in the WAT[40]. Indeed, the effects of the SNS on the adipose tissue, such as lipolysis of stored TG[40] and the release of free fatty acids,[41] explains the increased FFA and the decreased TG in *Tff2* KO mice serum. In addition, decreased expression of NUR77 in *Tff2* KO mice adipose tissue also indicate a hyperactivity of the SNS in the *Tff2* KO mice. Indeed, whereas β adrenergic agonist increases the expression of NUR77 in the epididymal WAT but not in the visceral adipose tissue[42], our results show a decreased expression of NUR77 mesenteric adipose tissue.

On the other hand, there is no change in the FFA acid uptake (CD36) in the adipose tissue but our results show also an increase in the FFA uptake in the skeletal muscle indicating that lipid uptake (mainly FFA released by WAT) and utilization is shifted toward the muscles rather than the adipose tissue. This would cover the metabolic needs of the muscles especially with the increased locomotor activity of *Tff2* KO mice[1]. These results, put together, suggest decreased adipogenesis as well as increased lipolysis in the adipose tissue of *Tff2* KO mice leading to reduced fat storage as well as the adjustment of the excessive uptake of the FFA by the skeletal muscle via secreting FFA into the blood. This would explain the reduced body fat mass and the smaller retroperitoneal fat cell diameter[1] in the *Tff2* KO mice.

Importantly, GLUT4 is involved in the glucose uptake in the adipose tissue.[43] In addition, the glucose is an important source of fat storage via insulin-induced lipogenesis. However, in this study, GLUT4 expression in the adipose tissue was not increased in *Tff2* KO mice which indicates that there is no glucose-dependent energy storage in the adipose

tissue and therefore, less body fat mass. In addition, there is no change in the expression of GLUT4. Thus, the rate of adipogenesis in the adipose tissue is minimal.

For the WT group, *NUR77* is more expressed in HF-fed mice than in LF-fed mice which is supported by the data showing an upregulation of nuclear receptors (including *NUR77*) in human obesity.[7]

Decreased lipolysis and glycolysis in the liver

The decrease of the *PPARA* expression, a transcription factor involved in the lipid metabolism[44], indicate a reduced lipid metabolism (β oxidation) in the liver. In addition, unaltered expression of *CD36* involved in importing FFA into hepatocyte in *Tff2* KO mice indicate that there is no difference of the FFA uptake even though increased fasting serum FFA levels were found in *Tff2* KO mice. Therefore, *Tff2* KO mice hepatocyte had comparable uptake of FFA than WT mice but had a reduced β oxidation rate for FFA. This makes *Tff2* deficiency worth exploring to underhand metabolic syndrome such as nonalcoholic fatty liver disease for which obesity is one of the main risk factor[45].

It has been shown that hepatic β -adrenergic receptors play a key role in the stimulation of both gluconeogenesis and glycogenolysis [46], which result in an elevated glycemia. In our study, *Tff2* KO mice showed a decreased expression of *ADRB2* in the liver especially in HF-fed conditions whereas no change has been seen in the skeletal muscle. This correlates with previous works. Indeed, it has been shown that a mechanism of downregulation of the β -adrenergic receptors is observed following agonist stimulation[47] and in such phenomenon, the *ADRB2* downregulation is more important in liver compared to muscle[48]. Furthermore, injection β -adrenergic receptor agonists stimulate the expression of *Nur77* in the liver [42] . Importantly, *Nur77* induction in the liver increase the gluconeogenesis.[49] Such facts explain our observed data in term of decreased expression of *ADRB2* and no change in *NUR77* expression in the liver of the *Tff2* KO mice. Indeed, these suggest reduced gluconeogenesis and glycogenolysis in the hepatocytes that also contributes to maintain the glycemia. In addition, there is no change in glucose uptake by *GLUT2*, which further contributes to the glycemia maintenance.

In addition, while less gluconeogenesis correlates with the limited uptake of FFA, that are mainly imported and used by the skeletal muscle, the reduced glycogenolysis corresponds well with the lower glycemia. The lower weight of liver in *Tff2* KO mice could indicate a lower hepatic storage of glycogen [50] as well as water in hydrated glycogen [51] which further support that *Tff2* KO mice has less tendency to store energy.

Mapping *Tff2* deficiency-related pathways and conclusive perspectives

Our results, combined with our previous study[1], allow us to map hypothetic pathways (Figure 3) to illustrate the metabolic variations seen in *Tff2* KO mice compared to WT mice which highlights the impact of *Tff2* deficiency on energy balance leading to anti-obesity effect. Indeed, although *Tff2* KO mice had a higher energy intake, they also had an increased energy utilization and expenditure and a lower energy storage behind which *Tff2* KO mice had an increased uptake and utilization of cell “fuels”, mostly lipids and glucose, mainly by the skeletal muscle and BAT which explain the decreased level of glucose, TG and glycerol levels in the serum. Moreover, the high TG fecal concentration [1] explains, in part, the de lower serum TG concentration in *Tff2* KO mice.

Interestingly, the fact that *Tff2* KO mice had less fat mass and WT mice had less lean mass percentage [1] might highlight a possible involvement of *Tff2* is sarcopenia especially that sarcopenia is related to age[52] and in elderly an age-related weight loss due to anorexia of aging was reported[53]. *Tff2* KO mice showed increased appetite and food intake [1] which points another aspect of anti-obesity consequences, herein muscle loss, that *Tff2* deficiency might have.

PERSPECTIVES

Obesity, and other related disorders, result from metabolic imbalances. The metabolic consequences of *Tff2* deficiency, shown in our studies, reveal the key pathways leading to energy storage and therefore highlight *Tff2* as an obesity-inducing gene. In addition to contributing to our knowledge about TFF2 via studying *Tff2*-deficient models, this work shows *Tff2*-related pathways as potential functional genomics-based molecular targets to develop novel therapies for obesity and the related disease, including diabetes, metabolic syndromes and hyperlipidemia, and hopefully overcome the undesirable side effects known for the long-term obesity treatment either currently used[54] or withdrawn.[55] Proceeding to similar investigations of the other trefoil factors could also lead to new starting points for anti-obesity drugs development especially that they are also related to food intake and share similar biological functions with TFF2.[56]

Importantly, our works further highlight the great input that functional genomics provides for the development of a new generation of therapeutical options based on a dynamic study of genes expression. Thus, this study shows how functional genomics is efficient as target identification approaches.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Nikolaus Blin for providing our research group with three couples of each *Tff2* KO and WT mice with the same genetic background. We also thank Nesrine Nachi for performing a part of the western blot.

This work was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. De Giorgio, M.R., et al., *Trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice are protected from high-fat diet-induced obesity*. *Obesity*, 2013. **21**(7): p. 1389-1395.
2. Jequier, E., *Leptin signaling, adiposity, and energy balance*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 379-88.
3. Madsen, J., et al., *Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3*. *J Histochem Cytochem*, 2007. **55**(5): p. 505-13.
4. Bolduc, C., M. Yoshioka, and J. St-Amand, *Acute Molecular Mechanisms Responsive to Feeding and Meal Constitution in Mesenteric Adipose Tissue*. *Obesity*, 2010. **18**(2): p. 410-413.
5. Yoshioka, M., et al., *High-fat Meal-induced Changes in the Duodenum Mucosa Transcriptome*. *Obesity*, 2008. **16**(10): p. 2302-2307.
6. De Giorgio, M.R., M. Yoshioka, and J. St-Amand, *Feeding induced changes in the hypothalamic transcriptome*. *Clin Chim Acta*, 2009. **406**(1-2): p. 103-7.
7. Veum, V.L., et al., *The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss*. *Int J Obes (Lond)*, 2012. **36**(9): p. 1195-202.
8. Luu-The, V., et al., *Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction*. *Biotechniques*, 2005. **38**(2): p. 287-93.
9. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Meth*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
10. Taylor, S.C., et al., *A defined methodology for reliable quantification of Western blot data*. *Mol Biotechnol*, 2013. **55**(3): p. 217-26.
11. Taylor, S.C. and A. Posch, *The Design of a Quantitative Western Blot Experiment*. *BioMed Research International*, 2014. **2014**: p. 8.
12. Halaas, J.L., et al., *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. *Science*, 1995. **269**(5223): p. 543-6.
13. Matthias, A., et al., *Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25073-81.
14. Harrold, J.A., G. Williams, and P.S. Widdowson, *Changes in hypothalamic agouti-related protein (AGRP), but not alpha-MSH or pro-opiomelanocortin concentrations in dietary-obese and food-restricted rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **258**(3): p. 574-7.
15. Ollmann, M.M., et al., *Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein*. *Science*, 1997. **278**(5335): p. 135-8.
16. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. **372**(6505): p. 425-432.
17. Depocas, F., *THE CALORIGENIC RESPONSE OF COLD-ACCLIMATED WHITE RATS TO INFUSED NORADRENALINE*. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1960. **38**(2): p. 107-114.
18. Heaton, G.M., et al., *Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation*. *Eur J Biochem*, 1978. **82**(2): p. 515-21.
19. Orava, J., et al., *Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin*. *Cell Metab*, 2011. **14**(2): p. 272-9.
20. Bartelt, A., et al., *Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance*. *Nat Med*, 2011. **17**(2): p. 200-205.

21. van Marken Lichtenbelt, W.D., et al., *Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(15): p. 1500-1508.
22. Fedorenko, A., P.V. Lishko, and Y. Kirichok, *Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria*. Cell, 2012. **151**(2): p. 400-13.
23. Rothwell, N.J. and M.J. Stock, *Influence of noradrenaline on blood flow to brown adipose tissue in rats exhibiting diet-induced thermogenesis*. Pflugers Arch, 1981. **389**(3): p. 237-42.
24. Oelkrug, R., et al., *Uncoupling protein 1 decreases superoxide production in brown adipose tissue mitochondria*. J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 21961-8.
25. Paschoalini, M.A. and R.H. Migliorini, *Participation of the CNS in the control of FFA mobilization during fasting in rabbits*. Physiology & Behavior, 1990. **47**(3): p. 461-465.
26. Klein, S., et al., *Effect of short- and long-term beta-adrenergic blockade on lipolysis during fasting in humans*. Am J Physiol, 1989. **257**(1 Pt 1): p. E65-73.
27. DeFronzo, R.A., et al., *The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization*. Diabetes, 1981. **30**(12): p. 1000-7.
28. Nuutila, P., et al., *Effect of antilipolysis on heart and skeletal muscle glucose uptake in overnight fasted humans*. Am J Physiol, 1994. **267**(6 Pt 1): p. E941-6.
29. Maxwell, M.A., et al., *Nur77 regulates lipolysis in skeletal muscle cells. Evidence for cross-talk between the beta-adrenergic and an orphan nuclear hormone receptor pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12573-84.
30. Chao, L.C., et al., *Skeletal muscle Nur77 expression enhances oxidative metabolism and substrate utilization*. J Lipid Res, 2012. **53**(12): p. 2610-9.
31. Chao, L.C., et al., *Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(9): p. 2152-63.
32. Mahoney, D.J., et al., *Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1498-500.
33. Orime, K., et al., *Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic beta-cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation*. Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 54-64.
34. Chao, L.C., et al., *Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(12): p. 2596-608.
35. Au, W.S., et al., *The NR4A family of orphan nuclear receptors are not required for adipogenesis*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(2): p. 388-92.
36. Fu, Y., et al., *NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31525-33.
37. Klemm, D.J., et al., *Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28430-5.
38. Frayn, K.N., et al., *Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. E308-17.
39. Geerling, J.J., et al., *Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies*. J Lipid Res, 2014. **55**(2): p. 180-9.

40. Bartness, T.J. and C.K. Song, *Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue*. J Lipid Res, 2007. **48**(8): p. 1655-72.
41. Rosell, S., *Release of free fatty acids from subcutaneous adipose tissue in dogs following sympathetic nerve stimulation*. Acta Physiol Scand, 1966. **67**(3): p. 343-51.
42. Myers, S.A., et al., *Beta-adrenergic signaling regulates NR4A nuclear receptor and metabolic gene expression in multiple tissues*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **309**(1-2): p. 101-8.
43. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 248-57.
44. Wahli, W., O. Braissant, and B. Desvergne, *Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more*. Chem Biol, 1995. **2**(5): p. 261-6.
45. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1221-31.
46. Schmelck, P.H. and J. Hanoune, *The hepatic adrenergic receptors*. Mol Cell Biochem, 1980. **33**(1-2): p. 35-48.
47. Benovic, J.L., et al., *Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 405-28.
48. Auman, J.T., et al., *Beta-adrenoceptor-mediated cell signaling in the neonatal heart and liver: responses to terbutaline*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **281**(6): p. R1895-901.
49. Pei, L., et al., *NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism*. Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1048-55.
50. Leveille, G.A. and K. Chakrabarty, *Diurnal variations in tissue glycogen and liver weight of meal-fed rats*. J Nutr, 1967. **93**(4): p. 546-54.
51. Kreitzman, S.N., A.Y. Coxon, and K.F. Szaz, *Glycogen storage: illusions of easy weight loss, excessive weight regain, and distortions in estimates of body composition*. Am J Clin Nutr, 1992. **56**(1 Suppl): p. 292S-293S.
52. Rosenberg, I.H., *Summary comments*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1989. **50**(5): p. 1231-1233.
53. Morley, J.E., *Protein-energy malnutrition in older subjects*. Proc Nutr Soc, 1998. **57**(4): p. 587-92.
54. Gadde, K.M. and Y. Pritham Raj, *Pharmacotherapy of Obesity: Clinical Trials to Clinical Practice*. Curr Diab Rep, 2017. **17**(5): p. 34.
55. Ioannides-Demos, L.L., L. Piccenna, and J.J. McNeil, *Pharmacotherapies for obesity: past, current, and future therapies*. J Obes, 2011. **2011**: p. 179674.
56. Ge, H., et al., *Trefoil Factor 3 (TFF3) Is Regulated by Food Intake, Improves Glucose Tolerance and Induces Mucinous Metaplasia*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0126924.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 Effect of *Tff2* deficiency on genes (A) and protein (B) expression in the skeletal muscle after 12 weeks of HF or LF diet.

[A] For the muscular genes expression, the two-way ANOVA revealed a significant effect

of genotype^a (KO>WT) for *Cd36* and a trend effect ($p < 0.1$) of genotype^a (KO>WT) for *Nur77*. Significant effects of diet^b (HF>LF) for *Cd36* and diet x genotype^c for *Nur77*, *Cd36* and *Glut4* (KO>WT in HF-fed mice by the Tukey-Kramer post-hoc test) were also revealed. [B] For the protein expression in the skeletal muscle, the same statistical approach showed a significant effect of genotype^a (KO>WT) for NUR77, CD36 and NDUFB8, in addition to trend effects ($p < 0.1$) of genotype^a (KO>WT) for GLUT4.

All data are mean \pm SEM. Number of mice: WT-LF (7), WT-HF (6), KO-LF (7) and KO- HF (9).

Abbreviations: ADRB2, β -2 adrenergic receptor; CD36/*Cd36*, fatty acids translocase; GLUT4/ *Glut4*, glucose transporter type 4; HF, high-fat, KO, knockout; LF, low-fat; MTCO1/*MtCo1*, mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I; NDUFB8, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8; NUR77/*Nur77*, nerve growth factor IB; *Ppargc1a*, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; SDHB, succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit (iron-sulfur subunit of complex II); *Tff2*, trefoil factor 2; *Ucp3*: mitochondrial uncoupling protein 3; WT, wild type.

Figure 2 Effect of *Tff2* deficiency on proteins expression in the liver (A) and adipose tissue (B) after 12 weeks of HF or LF diet.

[A] In the liver, we report significant effects of genotype^a (KO<WT) and diet^b (HF>LF) for the protein PPARA along with significant effects of diet × genotype^c (KO<WT in HF-fed mice by the Tukey-Kramer post-hoc test) for the PPARA and ADRB2. In addition, trend in effects (p<0.1) of genotype^a (KO<WT) for the ADRB2, of diet^b (HF>LF) for CD36 were also observed. [B] For the adipose tissue our data point a trend in effect (p<0.1) of genotype^a (KO<WT) and significant effect of genotype × diet^c (KO<WT in HF-fed mice and HF>LF in WT mice by the Tukey-Kramer post-hoc test) for the NUR77.

All data are mean ± SEM. Number of mice: WT-LF (7), WT-HF (7), KO-LF (7) and KO-HF (9).

Abbreviations: ADRB2, β-2 adrenergic receptor; CD36, fatty acids translocase; GLUT2, glucose transporter 2 (solute carrier family 2); GLUT4, glucose transporter type 4; HF, high-fat; KO, knockout, LF, low-fat; NUR77, nerve growth factor IB; PPARA, peroxisome proliferator- activated receptor alpha; *Tff2*, trefoil factor 2, WT, wild type.

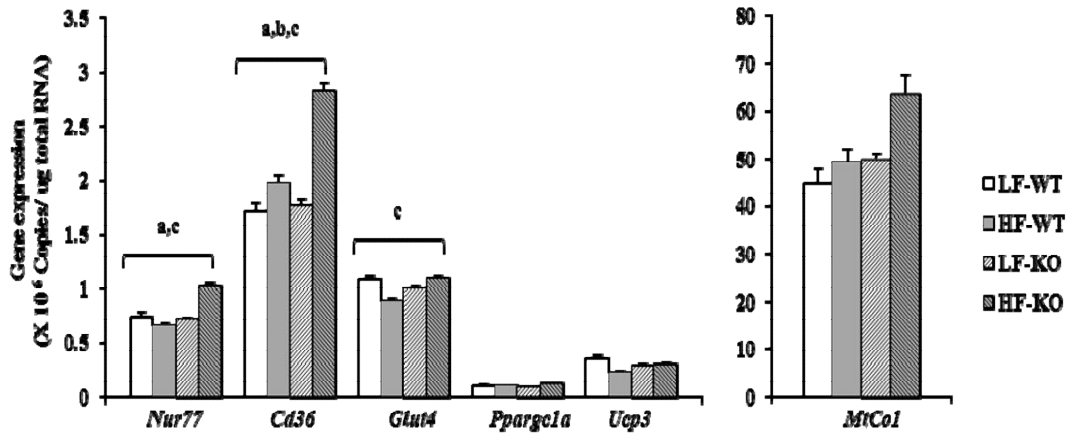
Figure 3 Hypothetic metabolic pathways variations seen in *Tff2* KO mice, compared to WT, and explaining the protection from high-fat diet-induced obesity.

Briefly, increased nervous (SNS) and decreased hormonal (leptin and insulin) signals acting on diverse organs (liver, muscle, BAT, WAT and CNS) leading to metabolic pathways and biochemical processes toward increased energy intake, energy expenditure, energy excretion, as well as glucose and lipidic metabolism. Resulting in, for *Tff2* KO mice, a decreased body weight, increased percentage of the lean mass, more developed skeletal muscles (weight percentage), less fat storage and

with smaller adipose tissue. In the serum *Tff2* KO mice have lower blood glucose as well as serum TG, glycerol and insulin.

Abbreviations: ADRB2, β -2 adrenergic receptor; *Agrp*, agouti-related protein; ARC, arcuate nucleus of the hypothalamus; BAT, brown adipose tissue; CD36, fatty acids translocase; CNS, central nervous system; FFA, free fatty acids; GLUT2, glucose transporter 2 (solute carrier family 2); GLUT4, glucose transporter type 4; HF, high fat; KO, knockout; NDUFB8, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8; NUR77, nerve growth factor IB or NGFIB; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; SNS, sympathetic nervous system; *Tff2*, trefoil factor 2; TG, triglyceride; *Ucp1*, mitochondrial uncoupling protein1; WAT, white adipose tissue; WT, wild type.

[A]



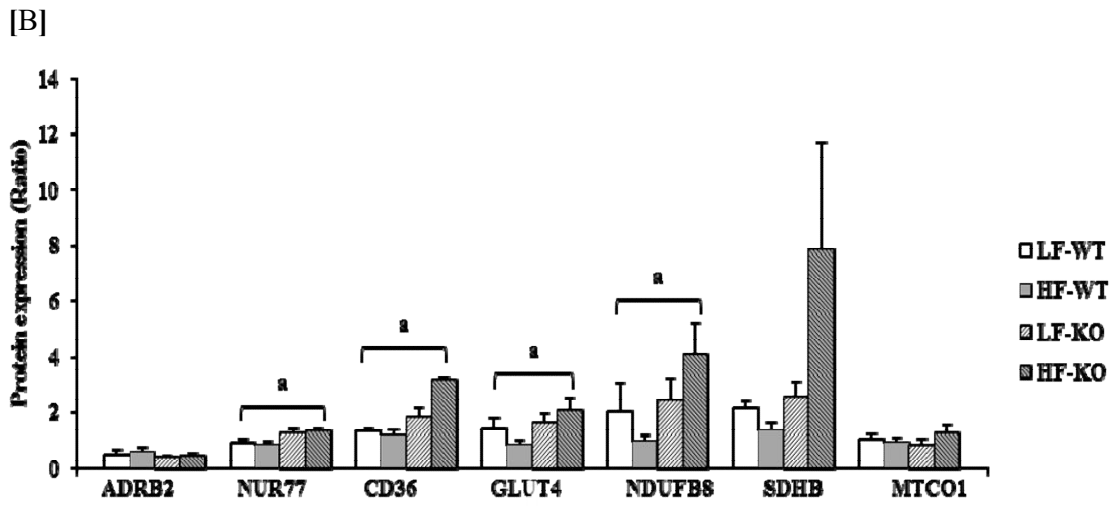


Fig 1.

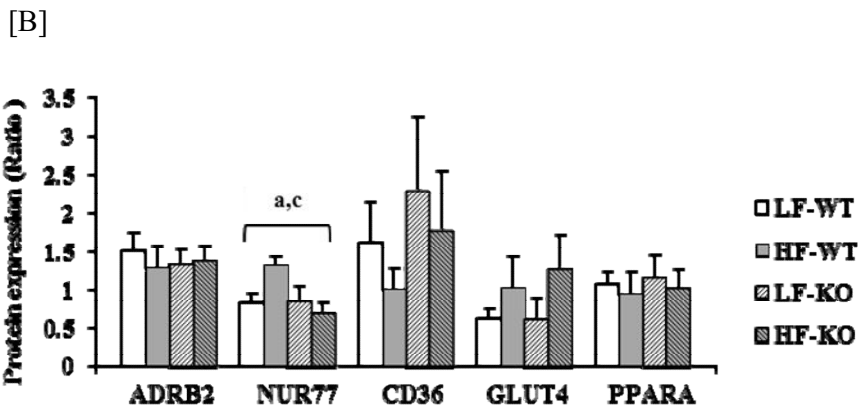
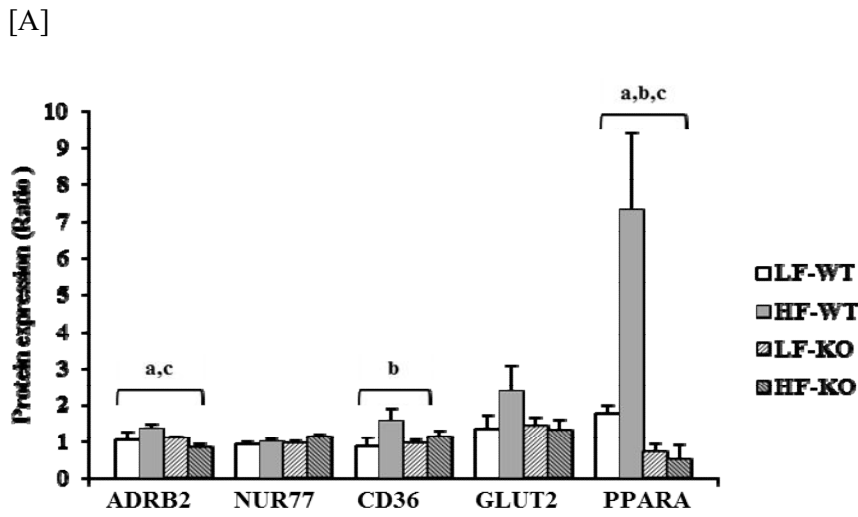


Fig 2.

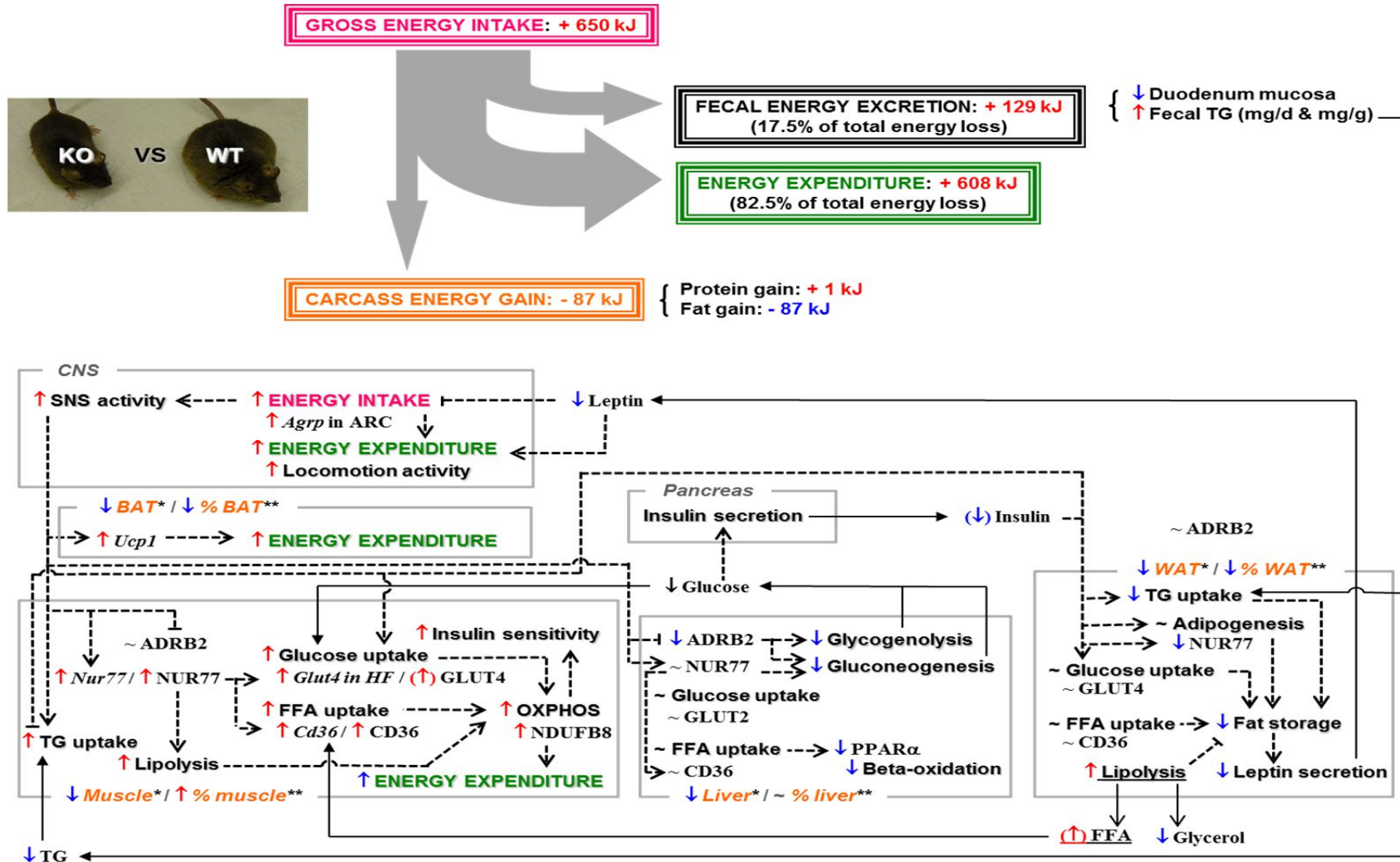


Fig 3.

Table1: Tissues weights of Tff2 KO and WT mice fed LF and HF diet

	WT-LF		WT-HF		KO-LF		KO-HF		2-way ANOVA		
									Genotype	Diet	Genotype* Diet
Body weight (g)	32.4±	1.0	41.9±	2.1	28.0±	0.5	31.6±	1.2	KO<WT	HF>LF	HF: KO<WT
Mesenteric adipose tissue (g)	0.40±	0.05	1.15±	0.20	0.27±	0.03	0.50±	0.06	KO<WT	HF>LF	HF: KO<WT
Mesenteric adipose tissue (%)	1.20±	0.14	2.68±	0.45	0.96±	0.10	1.42±	0.17	KO<WT	HF>LF	HF: KO<WT*
Brown adipose tissue (g)	0.12±0.03		0.25±0.03		0.13±0.02		0.16±0.02		KO<WT	ns	ns
Brown adipose tissue (%)	0.62±0.06		0.59±0.05		0.46±0.06		0.50±0.05		KO<WT	ns	ns
Liver(g)	1.27±0.03		1.55±0.19		1.21±0.05		1.06±0.05		KO<WT	ns	HF:KO<WT
Liver (%)	3.90±0.08		3.60±0.26		4.30±0.20		3.40±0.18		ns	HF<LF	LF: KO>WT*
Spleen (g)	0.101±0.005		0.088±0.004		0.090±0.005		0.067±0.006		ns	HF<LF	ns
Spleen (%)	0.31±0.02		0.21±0.01		0.32±0.02		0.21±0.021		ns	HF<LF	ns
Gastrocnemius muscle(g)	0.141±0.004		0.144±0.007		0.126±0.004		0.133±0.002		KO<WT	ns	ns
Gastrocnemius muscle (%)	0.44±0.02		0.35±0.02		0.45±0.01		0.43±0.02		KO>WT	HF<LF	HF: KO>WT*

Data are mean ± SEM. Number of mice: WT-LF (7), WT-HF (7), KO-LF (7) and KO-HF (9).

ns : No significant effect.

*Trend (p<0.09).

Abbreviations

Tff2, trefoil factor 2; HF, high-fat, KO, knockout; LF, low fat; WT, wild type.

Table 2. Serum analysis of selected energy metabolism-related biochemicals of *Tff2* KO and WT mice depending on the type of diet.

		WT-LF	WT-HF	KO-LF	KO-HF	2 –Way ANOVA		
						Genotype	Diet	Genotype* Diet
8 weeks of feeding: 12h of fasting								
Glucose	(mmol/L)	6,10±0,44	6,40±0,56	5,33±0,36	6,43±0,49	ns	ns	ns
Free fatty acids	(mmol/L)	0,02±0,01	0,08±0,05	0,15±0,05	0,10±0,05	KO>WT *	ns	ns
12 weeks of feeding: 4h of fasting								
Glucose	(mmol/L)	8,03±0,56	9,36±0,57	6,64±0,18	7,84±0,40	KO<WT	HF>LF	ns
Insulin	(pmol/L)	214±46	667±326	81±10	172±26	KO<WT*	ns	ns
Triglyceride	(mmol/L)	1,18±0,13	0,60±0,08	0,94±0,130	79±0,13	KO<WT	ns	ns
Glycerol	(mmol/L)	0,64±0,11	0,54±0,12	0,33±0,07	0,44±0,05	KO<WT	ns	ns

Data are mean ± SEM. Number of mice: WT-LF (7), WT-HF (7), KO-LF (7) and KO-HF (9).

ns : No significant effect.

*Trend (p<0.01).

Abbreviations

Tff2, trefoil factor 2; HF, high-fat, KO, knockout; LF, low fat; WT, wild type.

Conclusion et perspectives

Plusieurs recherches ont été menées pour trouver la thérapie durable et adéquate de l'obésité. Il y a des recherches qui visent le contrôle des signaux périphériques de l'état nutritionnel et de la demande énergétique de l'organisme et d'autres qui ciblent les régions du cerveau qui assurent la balance énergétique et la thermorégulation[89, 90].

Les recommandations préventives combinant les activités physiques et les régimes alimentaires contenant moins de gras, ont été envisageables mais la solution efficace pour les gens génétiquement prédisposés à l'obésité, n'a pas encore été trouvée. Ce problème peut s'expliquer par le fait que la dépense énergétique ne se fait pas que dans l'activité physique et la restriction alimentaire, mais aussi dans le métabolisme basal qui joue un rôle important en consommant 60-75% d'énergie, alors que les activités physiques et la thermogénèse induite par l'alimentation (DIT) s'occupent du reste [91, 92].

Les études menées dans le présent mémoire démarquent PPAR α comme l'un des principaux régulateurs transcriptionnels qui est modulé après l'ingestion des HF. Ce régulateur de transcription est un récepteur nucléaire des fibrates utilisés pour traiter la dyslipidémie en diminuant les niveaux des triglycérides sériques et en augmentant les niveaux de cholestérol HDL[93]. PPAR α est un facteur important pour l'expression des gènes de barrière intestinale après l'ingestion d'aliment riche en gras [94], ce qui souligne son rôle primordial dans le combat contre l'obésité. L'ingenuity Pathway Analysis (IPA) a révélé que le métabolisme des lipides est la principale caractéristique des gènes réactifs et des gènes spécifiques à l'alimentation riche en gras. Ce métabolisme implique les gènes et les protéines CD36/*Cd36* et NUR77/*Nur77*.

Ces études ont démontré que le métabolisme des glucides était l'une des caractéristiques principales après l'ingestion du repas LF. FOXO1 et CREB1 sont deux principaux régulateurs transcriptionnels pour les gènes réactifs de LF et les gènes spécifiques de LF respectivement. FOXO1 et CREB1 ont été également signalés comme deux régulateurs transcriptionnels clés pour la gluconéogenèse hépatique. En condition de jeûne, la sécrétion accrue de glucagon pancréatique déclenche l'activation de la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle CREB, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de gènes de la gluconéogenèse comme glucose-6-

phosphatase (G6Pase)[95]. PKA active également la kinase du récepteur adrénérgique beta, qui a le récepteur adrénérgique β comme cible [96]. Rappelons que la gluconéogenèse implique la synthèse du glucose à partir des substrats non glucidiques ce qui conduirait au métabolisme accru des lipides.

Biochimiquement, l'obésité est liée au métabolisme des lipides et celui des glucides. L'effet de la déficience de *Tff2* dans le métabolisme énergétique a été évalué en mesurant le niveau d'expression des gènes et protéines impliqués dans le métabolisme énergétique.

La concentration sanguine de leptine qui stimule la dépense d'énergies et la satiété[97], est faible chez les souris *tff2*KO, ce qui explique leur prise alimentaire élevée. Cependant, malgré cette prise alimentaire élevée, les souris *Tff2* KO présentent la dépense énergétique élevée qui serait due aux mécanismes métaboliques indépendants de leptine, incluant les voies métaboliques des récepteurs adrénérgiques β et des protéines mitochondriales *Ucp1*.

En effet, la forte expression du gène *Ucp1* dans le tissu adipeux brun (BAT), montre que l'oxydation mitochondriale est découplée à la production d'ATP et que l'énergie est dissipée sous forme de thermogénèse induite par l'alimentation, résultant de l'activité du système nerveux sympathique stimulé par Beta Ar[98].

Ces stimulations dans le BAT, impliquent l'absorption du glucose ainsi que celle des triglycérides plasmatiques [99, 100], ce qui explique la faible glycémie et la faible concentration des triglycérides sériques trouvées chez les souris *Tff2*KO. Quant à forte absorption de glucose et à la faible concentration de l'insuline, Hirano et al. Nous renseigne sur la sensibilité à l'insuline des muscle squelettique qui n'est pas observée chez les souris WT-HF [101]. Il est à considérer que le phénotype non obese observé chez les souris *Tff2*KO, repose principalement sur l'activité du tissu adipeux brun(BAT), tel que discuté dans la revue de la littérature[28]

La déficience en translocase des acides gras (glycoprotéine IV ou CD36) est un bagage génétique pour les maladies cardiovasculaires humaines[101]. La forte expression de *CD36/Cd36*, *NUR77/Nur77* et *GLUT4/Glut4* explique la forte absorption des acides gras et du glucose dans les souris *Tff2*KO et la protection de ces derniers contre l'obésité induite par l'alimentation (DIO).

Les souris du type sauvage WT présentent une faible expression de CD36/*Cd36*, NUR77/*Nur77* dans les muscles squelettiques par rapport au souris *Tff2KO*; ce qui appuie nos résultats des composantes sanguines où les niveaux les triglycérides sériques et le glucose sanguin étaient élevés dans les souris du type WT. Les découvertes de Hirano et al. Donnent accent aussi bien aux traits physiques des souris WT-HF qu'à leur susceptibilité à développer les maladies métaboliques.

Les niveaux du glucose sanguin élevé et les niveaux d'insuline sérique qui tendent à s'élever dans le même groupe des souris WT nourries d'HF (WT-HF) reflètent la résistance à l'insuline qui est induite par l'alimentation riche en gras. Une tendance à la forte expression de GLUT4 dans les souris *Tff2KO* par rapport aux souris WT explique les niveaux élevés de glucose sanguin dans les souris WT. Ce travail supporte également celui réalisé par Perez-Sieira et al. qui ont pu mettre en évidence l'effet de la déficience de NUR77 dans le développement de DIO [73, 102]. Outre les résultats précédemment discutés, le laboratoire de génomiques fonctionnelles du CHU de Québec avait déjà démontré qu'en plus d'être protégées contre HIO, les souris *Tff2KO* avait une forte excrétion d'énergie dans les matières fécales ce qui suggère que les fonctions autonomes sont plus actives chez les souris *Tff2KO*.

La faible expression du NUR77 dans le tissu adipeux des souris *Tff2KO* résulte sur le fait que NUR77 est un inhibiteur de la différenciation des adipocytes [103]. La faible concentration d'insuline sérique s'explique par son rôle dans la stimulation de l'adipogenèse et le stockage des lipides. Puis que dans les souris *Tff2KO*, la concentration sérique d'acides gras non liés est forte tandis que celle des triglycérides est faible; cela explique l'effet du système nerveux sympathique sur le tissu adipeux, la lipolyse de triglycérides stockés and la libération des acides gras non lié ce qui appuie nos résultats [104].

La faible expression de PPARA, souligne le métabolisme des lipides (β -oxydation) réduit dans le foie. En plus, l'expression de CD36 dans le foie, révèle qu'aucune différence significative n'existe dans la translocation des acides gras non liés chez les souris *Tff2KO*. La gluconéogenèse et la glyco-génolyse sont stimulées par Beta AR hépatique, ce qui entraîne l'hyperglycémie. Chez les souris *Tff2KO*, l'expression de Beta Ar est faible, ce qui appuie les résultats du glucose sanguin.

En effet, la cartographie de la signalisation moléculaire observée chez les souris déficientes de *Tff2*, schématise la contribution de mémoire dans des mécanismes moléculaires du développement de l'obésité. Cependant, il serait recommandable de vérifier les mécanismes moléculaires de Tff2 dans développement de l'obésité dans les tissus humains.

Bibliographies

1. Galgani, J. and E. Ravussin, *Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation*. International journal of obesity, 2008. **32**: p. S109-S119.
2. Richard, D., *Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity*. Nature Reviews Endocrinology, 2015. **11**(8): p. 489-501.
3. Ootsuka, Y., et al., *Brown adipose tissue thermogenesis heats brain and body as part of the brain-coordinated ultradian basic rest-activity cycle*. Neuroscience, 2009. **164**(2): p. 849-861.
4. Berthoud, H.-R., *Neural control of appetite: cross-talk between homeostatic and non-homeostatic systems*. Appetite, 2004. **43**(3): p. 315-317.
5. Erlanson-Albertsson, C., *Fat-rich food palatability and appetite regulation*. 2010.
6. Katzmarzyk, P.T., *The Canadian obesity epidemic: an historical perspective*. Obesity Research, 2002. **10**(7): p. 666-674.
7. Rosmond, R., *Association studies of genetic polymorphisms in central obesity: a critical review*. International journal of obesity, 2003. **27**(10): p. 1141-1151.
8. Greenway, F.L., et al., *Rational design of a combination medication for the treatment of obesity*. Obesity, 2009. **17**(1): p. 30-39.
9. Citrome, L., *Lorcaserin, phentermine topiramate combination, and naltrexone bupropion combination for weight loss: the 15-min challenge to sort these agents out*. International journal of clinical practice, 2014. **68**(12): p. 1401-1405.
10. Wood, P.D., et al., *Changes in plasma lipids and lipoproteins in overweight men during weight loss through dieting as compared with exercise*. New England Journal of Medicine, 1988. **319**(18): p. 1173-1179.
11. Despres, J.P., et al., *Loss of abdominal fat and metabolic response to exercise training in obese women*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1991. **261**(2): p. E159-E167.
12. De Giorgio, M.R., et al., *Trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice are protected from high-fat diet-induced obesity*. Obesity, 2013. **21**(7): p. 1389-1395.
13. Pace, N.R., *The universal nature of biochemistry*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(3): p. 805-808.
14. Tamboli, R.A., et al., *Metabolic responses to exogenous ghrelin in obesity and early after Roux-en-Y gastric bypass in humans*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2017.
15. Woods, S.C., et al., *Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2006. **361**(1471): p. 1219-1235.
16. Seyer, P., et al., *Hepatic glucose sensing is required to preserve β cell glucose competence*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(4): p. 1662-1676.
17. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Comprehensive physiology, 2014.
18. Hu, T., et al., *Hepatic peroxisomal fatty acid β -oxidation is regulated by liver X receptor α* . Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5380-5387.
19. Jeoung, N.H., et al., *Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation*. Biochemical Journal, 2006. **397**(3): p. 417-425.

20. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*. *Nature*, 2001. **413**(6852): p. 179-183.
21. Hultman, E. and P. Greenhaff, *Skeletal muscle energy metabolism and fatigue during intense exercise in man*. *Science Progress (1933-)*, 1991: p. 361-370.
22. Cartee, G.D., *Mechanisms for greater insulin-stimulated glucose uptake in normal and insulin-resistant skeletal muscle after acute exercise*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2015. **309**(12): p. E949-E959.
23. Maxwell, M.A., et al., *Nur77 Regulates Lipolysis in Skeletal Muscle Cells EVIDENCE FOR CROSS-TALK BETWEEN THE β -ADRENERGIC AND AN ORPHAN NUCLEAR HORMONE RECEPTOR PATHWAY*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(13): p. 12573-12584.
24. Jimenez, M., et al., *β 1/ β 2/ β 3-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting*. *FEBS letters*, 2002. **530**(1-3): p. 37-40.
25. Choe, S.S., et al., *Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders*. *Frontiers in endocrinology*, 2016. **7**.
26. Vaisse, C., et al., *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice*. *Nature genetics*, 1996. **14**(1): p. 95-97.
27. Konrad, D., *Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited*. *Obesity Reviews*, 2012. **13**(S2): p. 30-39.
28. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. *Front Biosci*, 2011. **16**: p. 1233-1260.
29. Cohen, P. and B.M. Spiegelman, *Brown and beige fat: molecular parts of a thermogenic machine*. *Diabetes*, 2015. **64**(7): p. 2346-2351.
30. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **360**(15): p. 1509-1517.
31. Berthoud, H.R., H. Zheng, and A.C. Shin, *Food reward in the obese and after weight loss induced by calorie restriction and bariatric surgery*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012. **1264**(1): p. 36-48.
32. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 661-671.
33. Vainik, U., et al., *Neurobehavioural correlates of body mass index and eating behaviours in adults: a systematic review*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2013. **37**(3): p. 279-299.
34. Reddon, H., et al., *Physical activity and genetic predisposition to obesity in a multiethnic longitudinal study*. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 18672.
35. santé, O.m.d.l., *Obésité: prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale*. Vol. 894. 2003: World Health Organization.
36. Maldonado-Ruiz, R., et al., *Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes*. *Nutrition & diabetes*, 2017. **7**(3): p. e254.
37. Thameem Dheen, S., C. Kaur, and E.-A. Ling, *Microglial activation and its implications in the brain diseases*. *Current medicinal chemistry*, 2007. **14**(11): p. 1189-1197.
38. Chanseume, E., et al., *Enhanced Muscle Mixed and Mitochondrial Protein Synthesis Rates after a High-fat or High-sucrose Diet*. *Obesity*, 2007. **15**(4): p. 853-859.
39. Pluquet, O., A. Pourtier, and C. Abbadie, *The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic*

- reticulum stress signaling in health and disease*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2015. **308**(6): p. C415-C425.
40. Denk, H., et al., *Alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis*. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 2004. **89**: p. 137-143.
 41. Hetz, C., et al., *The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α* . Physiological reviews, 2011. **91**(4): p. 1219-1243.
 42. Jang, H.-J., et al., *Toll-like receptor 2 mediates high-fat diet-induced impairment of vasodilator actions of insulin*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2013. **304**(10): p. E1077-E1088.
 43. Grootjans, J., et al., *The unfolded protein response in immunity and inflammation*. Nature Reviews. Immunology, 2016. **16**(8): p. 469.
 44. Albrecht, U., *Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks*. Neuron, 2012. **74**(2): p. 246-260.
 45. Ulrich-Lai, Y.M., et al., *Stress exposure, food intake and emotional state*. Stress, 2015. **18**(4): p. 381-399.
 46. Shimba, S., *The roles of clock genes in obesity*. Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine, 2013. **71**(2): p. 244-248.
 47. Blancas-Velazquez, A., et al., *Diet-induced obesity and circadian disruption of feeding behavior*. Frontiers in Neuroscience, 2017. **11**.
 48. Rosen, E.D., et al., *C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway*. Genes & development, 2002. **16**(1): p. 22-26.
 49. Tateishi, K., et al., *Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 757-761.
 50. Inagaki, T., et al., *Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice*. Genes to Cells, 2009. **14**(8): p. 991-1001.
 51. Koza, R.A., et al., *Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice*. PLoS Genet, 2006. **2**(5): p. e81.
 52. Okamura, M., et al., *Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity*. Organogenesis, 2010. **6**(1): p. 24-32.
 53. Bhaskaran, K., et al., *Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5· 24 million UK adults*. The Lancet, 2014. **384**(9945): p. 755-765.
 54. Kasen, S., et al., *Obesity and psychopathology in women: a three decade prospective study*. International Journal of Obesity, 2008. **32**(3): p. 558-566.
 55. Luppino, F.S., et al., *Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies*. Archives of general psychiatry, 2010. **67**(3): p. 220-229.
 56. Roberts, R.E., et al., *Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study*. International journal of obesity, 2003. **27**(4): p. 514-521.
 57. Wadden, T.A. and A.J. Stunkard, *Social and psychological consequences of obesity*. Annals of Internal Medicine, 1985. **103**(6_Part_2): p. 1062-1067.
 58. Enzi, G., *Socioeconomic consequences of obesity*. Pharmacoeconomics, 1994. **5**(1): p. 54-57.
 59. Wolf, A.M. and G.A. Colditz, *Current estimates of the economic cost of obesity in the United States*. Obesity, 1998. **6**(2): p. 97-106.
 60. Wolf, A.M., *What is the economic case for treating obesity?* Obesity research, 1998. **6**(S1): p. 2S-7S.

61. Hammond, R.A. and R. Levine, *The economic impact of obesity in the United States*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2010. **3**(1): p. 285-95.
62. Asay, G.R.B., et al., *Peer Reviewed: Absenteeism and Employer Costs Associated With Chronic Diseases and Health Risk Factors in the US Workforce*. Preventing Chronic Disease, 2016. **13**.
63. Finkelstein, E.A., et al., *Annual medical spending attributable to obesity: payer- and service-specific estimates*. Health affairs, 2009. **28**(5): p. w822-w831.
64. Trogdon, J.G., et al., *Indirect costs of obesity: a review of the current literature*. Obesity Reviews, 2008. **9**(5): p. 489-500.
65. Atger, F., et al., *Regulation of mammalian physiology by interconnected circadian and feeding rhythms*. Frontiers in Endocrinology, 2017. **8**.
66. Truby, H., et al., *Randomised controlled trial of four commercial weight loss programmes in the UK: initial findings from the BBC "diet trials"*. Bmj, 2006. **332**(7553): p. 1309-1314.
67. Adams, S., et al., *Weight loss: a comparison of group and individual interventions*. Journal of the American Dietetic Association, 1986. **86**(4): p. 485-490.
68. Bray, G.A., *Use and abuse of appetite-suppressant drugs in the treatment of obesity*. Annals of internal medicine, 1993. **119**(7_Part_2): p. 707-713.
69. Fong, T. and S. Heymsfield, *Cannabinoid-1 receptor inverse agonists: current understanding of mechanism of action and unanswered questions*. International Journal of Obesity, 2009. **33**(9): p. 947-955.
70. McBride, R., *Genzyme-Spinout Peptimmune Files for Chapter 7 Liquidation*. Xconomy Boston. Available at: <http://www.xconomy.com/boston/2011/03/23/genzyme-spinout-peptimmunefiles-for>, 2011.
71. Plodkowski, R.A., et al., *Bupropion and naltrexone: a review of their use individually and in combination for the treatment of obesity*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2009. **10**(6): p. 1069-1081.
72. Robinson, M.K., *Surgical treatment of obesity—weighing the facts*. 2009, Mass Medical Soc.
73. Giorgio, M.R., et al., *Trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice are protected from high-fat diet-induced obesity*. Obesity, 2013. **21**(7): p. 1389-1395.
74. Lebherz-Eichinger, D., et al., *Increased trefoil factor 2 levels in patients with chronic kidney disease*. PloS one, 2017. **12**(3): p. e0174551.
75. Tomasetto, C., et al., *The gene encoding the human spasmodic protein (SML1hSP) is in 21q 22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCE1pS2*. Genomics, 1992. **13**(4): p. 1328-1330.
76. Hinz, M., et al., *Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum*. Peptides, 2004. **25**(5): p. 827-832.
77. Yoshioka, M., et al., *High-fat meal-induced changes in the duodenum mucosa transcriptome*. Obesity, 2008. **16**(10): p. 2302-2307.
78. DE GIORGIO, M.R., *IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL SIGNALS REGULATING FEEDING BEHAVIOR AND ENERGY BALANCE*.
79. Tso, P., W. Sun, and M. Liu, *Gastrointestinal Satiety Signals IV. Apolipoprotein A-IV*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2004. **286**(6): p. G885-G890.

80. Baus-Loncar, M., et al., *Trefoil factor 2 (TFF2) deficiency in murine digestive tract influences the immune system*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2005. **16**(1-3): p. 31-42.
81. Martirosyan, A., et al., *Probing the limits to microRNA-mediated control of gene expression*. PLoS Comput Biol, 2016. **12**(1): p. e1004715.
82. Latchman, D.S., *Transcription factors: an overview*. The international journal of biochemistry & cell biology, 1997. **29**(12): p. 1305-1312.
83. Dhar, D.K., et al., *Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer*. Laboratory investigation, 2003. **83**(9): p. 1343-1352.
84. Kosriwong, K., et al., *Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(12): p. 1631-1641.
85. Jönsson, E., et al., *Diabetes Resolution and Work Absenteeism After Gastric Bypass: a 6-Year Study*. Obesity Surgery, 2017: p. 1-7.
86. Choquet, H. and D. Meyre, *Genetics of obesity: what have we learned?* Current genomics, 2011. **12**(3): p. 169-179.
87. Velculescu, V.E., et al., *Serial analysis of gene expression*. Science, 1995. **270**(5235): p. 484-487.
88. Krämer, A., et al., *Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis*. Bioinformatics, 2013. **30**(4): p. 523-530.
89. Bjenning, C., et al., *G protein-coupled receptors as therapeutic targets for obesity and type 2 diabetes*. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000), 2004. **5**(10): p. 1051-1062.
90. Reimann, F. and F.M. Gribble, *G protein-coupled receptors as new therapeutic targets for type 2 diabetes*. Diabetologia, 2016. **59**(2): p. 229-233.
91. McMurray, R.G., et al., *Examining variations of resting metabolic rate of adults: a public health perspective*. Medicine and science in sports and exercise, 2014. **46**(7): p. 1352.
92. Vogel, H., et al., *Genetic predisposition to obesity affects behavioral traits including food reward and anxiety-like behavior in rats*. Behavioural Brain Research SreeTestContent1, 2017.
93. Staels, B., M. Maes, and A. Zambon, *Fibrates and future PPAR α agonists in the treatment of cardiovascular disease*. Nature clinical practice Cardiovascular medicine, 2008. **5**(9): p. 542-553.
94. Bünger, M., et al., *PPAR α -mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression*. BMC Genomics, 2008. **9**(1): p. 231.
95. Yasuda, Y., I. Akiguchi, and M. Kameyama, *A case of herpes zoster myelitis improved with acyclovir*. Rinsho shinkeigaku= Clinical neurology, 1990. **30**(4): p. 452-454.
96. Pitcher, J., et al., *Desensitization of the isolated. beta. 2-adrenergic receptor by. beta.-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms*. Biochemistry, 1992. **31**(12): p. 3193-3197.
97. Halaas, J.L., et al., *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. Science, 1995. **269**(5223): p. 543-546.
98. Matthias, A., et al., *Thermogenic responses in brown fat cells are fully Ucp1-dependent UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(33): p. 25073-25081.

99. Orava, J., et al., *Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin*. Cell metabolism, 2011. **14**(2): p. 272-279.
100. Bartelt, A., et al., *Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance*. Nature medicine, 2011. **17**(2): p. 200.
101. Hirano, K.-i., et al., *Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency*. Trends in cardiovascular medicine, 2003. **13**(4): p. 136-141.
102. Perez-Sieira, S., et al., *Female Nur77-deficient mice show increased susceptibility to diet-induced obesity*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53836.
103. Chao, L.C., et al., *Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1*. Molecular endocrinology, 2008. **22**(12): p. 2596-2608.
104. Rosell, S., *Release of Free Fatty Acids from Subcutaneous Adipose Tissue in Dogs Following Sympathetic Nerve Stimulation 1*. Acta physiologica Scandinavica, 1966. **67**(3-4): p. 343-351.