



Impact de la citrulline sur le métabolisme du tissu adipeux

Nolwenn Joffin

► **To cite this version:**

Nolwenn Joffin. Impact de la citrulline sur le métabolisme du tissu adipeux. Physiologie [q-bio.TO]. Université René Descartes - Paris V, 2015. Français. <NNT : 2015PA05T006>. <tel-01191472>

HAL Id: tel-01191472

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01191472>

Submitted on 4 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ECOLE DOCTORALE 562 Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

INSERM UMR-S 1124 Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation cellulaire, Pr Robert Barouki

THESE DE DOCTORAT spécialité **PHYSIOLOGIE**

Impact de la citrulline sur le métabolisme du tissu adipeux

Présentée et soutenue publiquement le 29 Janvier 2015 par

Nolwenn JOFFIN

Devant un jury composé de :

RICQUIER Daniel	Professeur des Universités	Président
MORIO Béatrice	Directeur de recherche	Rapporteur
DUGAIL Isabelle	Directeur de recherche	Rapporteur
FEVE Bruno	Professeur des Universités	Examineur
JAUBERT Anne-Marie	Maître de conférences HDR	Examineur
NOIREZ Philippe	Maître de conférences HDR	Co-directeur de thèse
FOREST Claude	Directeur de Recherche	Directeur de thèse

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ECOLE DOCTORALE 562 Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

INSERM UMR-S 1124 Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation cellulaire, Pr Robert Barouki

THESE DE DOCTORAT spécialité **PHYSIOLOGIE**

Impact de la citrulline sur le métabolisme du tissu adipeux

Présentée et soutenue publiquement le 29 Janvier 2015 par

Nolwenn JOFFIN

Devant un jury composé de :

RICQUIER Daniel	Professeur des Universités	Président
MORIO Béatrice	Directeur de recherche	Rapporteur
DUGAIL Isabelle	Directeur de recherche	Rapporteur
FEVE Bruno	Professeur des Universités	Examineur
JAUBERT Anne-Marie	Maître de conférences HDR	Examineur
NOIREZ Philippe	Maître de conférences HDR	Co-directeur de thèse
FOREST Claude	Directeur de Recherche	Directeur de thèse

Thèse réalisée au sein de l'unité INSERM UMR-S 1124

Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation Cellulaire

Dirigée par le Professeur Robert Barouki



A l'Université Paris Descartes



Ecole Doctorale 562 Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)



Résumé

L'obésité s'accompagne de pathologies comme le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, liées à des dérégulations métaboliques et endocriniennes du tissu adipeux blanc (TAB). Au cours du vieillissement, la perte de masse musculaire peut être associée à l'obésité et définit le concept d'obésité sarcopénique. Les traitements mis en œuvre pour contrecarrer ces pathologies n'ont qu'un succès très partiel. Il est donc opportun de développer des stratégies alternatives originales qui pourraient aboutir à des thérapies ciblées. Notre équipe étudie les régulations métaboliques du TAB, source majeure de stockage de l'énergie de l'organisme. Les triglycérides stockés sont libérés à jeun grâce à la lipolyse qui libère les acides gras non-estérifiés (AGNE) et le glycérol dans le sang, comme source d'énergie des autres tissus. En plus de la β -oxydation des AGNE, leur ré-estérification partielle intervient pour limiter leur libération lors de la lipolyse. La glycéronéogenèse est nécessaire à la ré-estérification en situation de jeûne. Des études préalables ont montré que l'administration de citrulline (CIT) pendant trois mois à des rats vieillissants induit une diminution d'environ 40% de la masse viscérale du TAB. Cet acide aminé non protéique est un complément alimentaire donné au cours du vieillissement ou à des sportifs pour augmenter la masse musculaire. Nous avons étudié les effets de la CIT sur des cultures d'explants de TAB de rats. *Dans la première partie de ce travail*, nous montrons que la CIT a un effet direct lipolytique et anti-glycéronogénique sur les explants des rats qu'ils soient jeunes ou âgés. Cependant, la libération des AGNE du TAB des rats jeunes est limitée par une augmentation de la capacité oxydative du tissu. Avec l'âge, la masse du TAB augmente en parallèle à l'augmentation d'un état pro-inflammatoire. Afin de comprendre l'influence de ces deux paramètres indépendamment de l'âge, nous avons étudié dans *la deuxième partie de ce travail*, les effets de la CIT sur les explants de TAB de rats jeunes soumis à un régime contrôle (CD) ou hyperlipidique (HFD). Nous observons une augmentation, induite par la CIT, de la lipolyse et de la capacité β -oxydative du TAB des rats quel que soit le régime, alors que la glycéronéogenèse est diminuée. Toutefois, les AGNE sont sélectivement libérés par le TAB de rats HFD, en relation avec une réduction drastique de leur ré-estérification. Le NO est un médiateur de ces effets. *Dans une troisième partie*, nous démontrons que la CIT agit directement sur le TAB de rats CD et HFD pour induire l'expression de la protéine découplante, UCP1, en lien avec le « brunissement » potentiel du TAB par cet acide aminé. Ces effets ne sont pas observés au sein du TAB des rats âgés. L'ensemble de nos résultats établit les bases pour de futures investigations visant à élucider les mécanismes par lesquels la CIT réduit la masse adipeuse et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour lutter contre le surpoids et l'obésité sarcopénique.

Mots clés : Citrulline, tissu adipeux, métabolisme, acides gras, lipolyse, glycéronéogenèse, ré-estérification, β -oxydation, UCP1, obésité, vieillissement

Abstract

Title: Citrulline effect on adipose tissue metabolism

Obesity is frequently associated with type 2 diabetes and cardiovascular diseases, related to metabolic and endocrine dysregulation of white adipose tissue (WAT). During aging, the loss of muscle mass may be associated with obesity and defines the concept of sarcopenic obesity. Treatments implemented to counteract these conditions showed a very partial success. It is therefore appropriate to develop original alternative strategies that could lead to targeted therapies. Our team studies the metabolic regulation of WAT, the major source of energy storage in the body. Non-esterified fatty acids (NEFA) and glycerol are released in the blood from stored triglycerides through lipolysis and used as a source of energy for other tissues. In addition to their β -oxidation, NEFA are re-esterified in part, a process that limits their release in the blood. Glyceroneogenesis is the pathway necessary to NEFA re-esterification in the fasting state. Previous studies showed that administration of citrulline (CIT) for three months to aging rats induced a decrease of approximately 40% of the visceral WAT mass. This non-protein amino acid is given as a dietary supplement during aging or sports to increase muscle mass. We studied the effects of CIT on explant cultures of rat WAT. In the first part of this work, we show that CIT exerts a direct lipolytic and anti-glyceroneogenic effect on explants from rats whether young or old. However, the release of NEFA from the explants of young rats is limited by an increase in the oxidative capacity of the tissue. During aging, WAT mass augments in parallel to the increase in a pro-inflammatory state. To understand the influence of these two parameters regardless of age, we studied in the second part of this work, the effects of CIT on WAT explants from young rats fed a control (CD) or high fat (HFD) diet. We show an CIT-induced increase in lipolysis and beta-oxidative capacity of WAT from rats whatever the diet, while glyceroneogenesis is reduced. However, NEFA are selectively released from WAT of HFD rats, in connection with a drastic reduction of their re-esterification. NO is a mediator of these effects. In the third part of this work, we show that CIT acts directly on WAT from CD and HFD rats to induce the expression of uncoupling protein, UCP1, in line with the potential "browning" of WAT by this amino acid. These effects were not observed in explants from old rats. Altogether our results establish the basis for future investigations aimed at elucidating the mechanisms by which CIT reduces body fat and open new therapeutic perspectives to fight overweight and sarcopenic obesity.

Keywords: Citrulline, adipose tissue, metabolism, fatty acids, lipolysis, glyceroneogenesis, re-esterification, β -oxidation, UCP1, obesity, aging

A mes parents,

A ma grand-mère,

Pour votre amour et votre soutien qui m'ont donnés la force de réaliser ce projet.

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Robert Barouki, Directeur de l'unité INSERM UMR-S 1124, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée dans la gestion du projet Allofattox qui m'a permis de terminer ma thèse plus sereinement.

Je remercie le Professeur Xavier Coumoul, de m'avoir intégré dans son équipe, pour sa disponibilité et ses conseils scientifiques. Je le remercie également de m'avoir confiée le projet Allofattox.

J'adresse mes sincères remerciements à mon Directeur de Thèse, le Docteur Claude Forest. Aucun mot n'exprime suffisamment la gratitude que je lui porte. Je vous remercie pour votre soutien, votre implication dans ce projet de thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre rigueur scientifique et pour tout le temps et l'énergie que vous m'avez consacrés tout au long de cette Thèse.

Je remercie mon co-directeur de Thèse, le Docteur Philippe Noirez. Je vous remercie pour votre implication dans ce projet de thèse et pour toutes nos discussions scientifiques qui m'ont permis d'avancer dans ce travail. Je vous remercie pour votre aide dans la gestion du projet Allofattox.

Je remercie les Docteurs Isabelle Dugail et Béatrice Morio, Directrices de Recherche, qui ont accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour l'intérêt et l'énergie que vous avez consacrés pour juger ce manuscrit. Vos commentaires m'ont aidée dans la rédaction et la réflexion de ce travail.

Je remercie Daniel Ricquier, Professeur des Universités, qui me fait l'honneur de présider cette Thèse et le Professeur Bruno Fève qui a accepté de faire partie du jury de cette Thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Anne-Marie Jaubert. Sans toi rien n'aurait été possible. Je te remercie pour ton implication, le temps consacré. Je te remercie pour tous tes bons conseils et ton encadrement. Tu m'as aidée, soutenue et encouragée durant toutes ces années.

Je remercie le Docteur Sylvie Durant. Je te témoigne toute ma gratitude pour l'intérêt que tu as porté à ce projet, merci pour l'aide que tu m'as apportée pour cette Thèse et surtout pour la correction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Docteur Erwan Floch, PDG de la société Newmed Publishing Services. Je le remercie de m'avoir pris comme consultante scientifique pendant les deux premières années de ma Thèse. Ce travail m'a permis non seulement d'être financée pendant ma Thèse mais il m'a aussi appris beaucoup autant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie l'ensemble des personnes de l'unité 1124 qui m'ont accueillie chaleureusement, pour leurs conseils scientifiques et tous les bons moments que nous avons pu partager tous ensemble. Je remercie particulièrement mon équipe « l'équipe 1 » et mes camarades

thésardes, Ludmila, Eléonore et Alix (Devrais-je dire Dr Leblanc☺) avec qui j'ai pu trouver du soutien et partager de bons moments.

Merci à Jessica B. J'ai pris plaisir à t'encadrer lors de ton M2 et j'ai découvert une personne formidable avec qui j'ai pu me lier d'amitié.

Je remercie également ma Tata d'adoption, Solenn. Je devrais écrire une deuxième thèse pour te dire à quel point je suis très heureuse de te connaître. Merci pour les del arte, les Mama et les starbucks, les fou rires, les pleures (de joie), les 100 millions de sms par jour. Merci d'avoir été et d'être là.

Je remercie ma Clem, pour tous les bons moments passés au labo et en dehors. Merci pour ton rire enchanteur et pour ta bonne humeur communicative. Merci pour ton oreille attentive et tes bons conseils. Ton amitié m'est précieuse.

Merci à Péril, benim deęerli inci. Ton amitié m'est indispensable. Merci pour ton écoute et ton soutien pour ma Thèse mais aussi pour le quotidien en général. Seni seviyorum aşkim.

Merci à Anwer, ton amitié est inestimable. Je te remercie d'être toujours là pour moi depuis tant d'années. Merci pour ton soutien et ta présence. Et puis tu sais que je t'adore plus que toi ☺

Je remercie Nassim. J'en serais à ma troisième thèse si je devais exprimer tout ce que je ressens pour toi. Merci d'être là, merci de croire en moi, merci de respecter mes choix et de faire de mes rêves une priorité. Merci pour les bons moments passés, présents et futurs. Less than three you.

Un immense merci à ma famille. Merci à ma Maman. Merci pour ton amour, ton soutien, les sacrifices que tu as fait et ton dévouement pour tes enfants. On peut grandir, et même vieillir, mais pour sa maman on est toujours un petit enfant. Merci à mon Papa, merci pour tous les sacrifices que tu as fait et pour ton amour. Merci à vous deux pour les valeurs et l'éducation que vous m'avez données, merci de m'avoir toujours soutenue et d'avoir cru en moi. Je vous aime. Merci à ma deuxième maman, ma grand-mère, je sais qu'une étoile brille au-dessus de moi. Tu me manques chaque jour. Merci à mon frère et à ma sœur, mes aînés, vous êtes pour moi des modèles. Je vous aime. Je voulais remercier mes nièces car vous êtes mes rayons de soleil, Sophie, Gabriella et Ava. Je vous aime comme mes filles.

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	9
LISTES DES TABLES	12
LISTE DES ILLUSTRATIONS	13
ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
I. LES TISSUS ADIPEUX	17
I.1. LE TISSU ADIPEUX BLANC	17
I.2. LOCALISATIONS	18
I.2.1 LE TISSU ADIPEUX SOUS-CUTANE.....	18
I.2.2 LE TISSU ADIPEUX VISCERAL	18
I.3. REGULATION DE LA DISTRIBUTION DU TISSU ADIPEUX	19
I.3.1 INFLUENCE DU SEXE ET DE L'AGE.....	19
I.3.2 INFLUENCE HORMONALE	20
I.3.3 INFLUENCE DES FACTEURS GENETIQUES.....	21
I.4. ROLE ENDOCRINE	21
I.4.1 LA LEPTINE.....	22
I.4.2 L'ADIPONECTINE	23
I.4.3 LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES : TNF-A ET IL-6.....	24
I.4.4 CYTOKINE ANTI-INFLAMMATOIRE : IL-10	25
I.5. ROLE METABOLIQUE	26
I.5.1 METABOLISME POSTPRANDIAL	26
I.5.1.1 Transport des acides gras.....	27
I.5.1.2 Stockage des acides gras	27
I.5.2 METABOLISME EN PERIODE DE JEUNE	29
I.5.2.1 La lipolyse	29
I.5.2.2 Glycéronéogenèse et ré-estérification.....	29
I.5.2.3 La β -oxydation	30
I.6. LE TISSU ADIPEUX BRUN	32
I.6.1 LOCALISATION	32
I.6.2 ROLE METABOLIQUE.....	32
I.6.2.1 La thermogénèse sans frisson	33
I.6.3 REGULATIONS ENDOCRINES	35
I.7. HETEROGENEITE CELLULAIRE	37
I.7.1 LA FRACTION STROMA-VASCULAIRE.....	38
I.7.2 LA FRACTION ADIPOCYTAIRE : ADIPOCYTE BLANC ET ADIPOCYTE BRUN	38
I.7.3 LE BROWNING ET ADIPOCYTE « BRITE ».....	40
I.7.4 LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DU BROWNING	43

II. DEREGLATIONS DU TISSU ADIPEUX.....	44
II.1. OBESITE, VIEILLISSEMENT	44
II.1.1 OBESITE	44
II.1.1.1 Définition.....	44
II.1.2 ETIOLOGIE DE L’OBESITE	44
II.1.2.1 Bases génétiques de l’obésité	45
II.1.2.2 Environnement.....	45
II.1.2.2.1 Facteurs nutritionnels	45
II.1.2.2.2 Influence de l’écosystème.....	45
II.2. SURPOIDS ET OBESITE : PHYSIOPATHOLOGIE	46
II.2.1 INFLAMMATION, PERTURBATIONS METABOLIQUES ET ENDOCRINIENNES	46
II.2.2 DIABETE DE TYPE II.....	47
II.2.3 MALADIES CARDIOVASCULAIRES	48
II.2.4 PROBLEMES OSTEO-ARTICULAIRES	49
II.2.5 CANCERS	49
II.3. CAS PARTICULIER : LE VIEILLISSEMENT ET L’OBESITE SARCOPENIQUE.	53
II.3.1 DEFINITION DU VIEILLISSEMENT	53
II.3.2 VIEILLISSEMENT ET SARCOPENIE.....	54
II.3.3 OBESITE SARCOPENIQUE	55
II.3.4 VIEILLISSEMENT ET TISSU ADIPEUX BRUN	57
II.3.5 L’OBESITE : UN ACCELERATEUR DU VIEILLISSEMENT	57
II.3.6 VIEILLISSEMENT ET INFLAMMATION.....	58
II.3.7 MITOCHONDRIES ET VIEILLISSEMENT	62
II.3.7.1 La mitochondrie	62
II.3.7.2 La dysfonction mitochondriale.....	62
II.3.8 VIEILLISSEMENT ET CANCER.....	64
II.3.9 VIEILLISSEMENT ET RISQUES CARDIOVASCULAIRES.....	64
III. STRATEGIES NUTRITIONNELLES.....	66
III.1. LA RESTRICTION CALORIQUE.....	66
III.2. CHIRURGIE BARIATRIQUE	67
III.3. LES ACIDES AMINES ET LEURS DERIVES	67
III.3.1 LES DERIVES D’ACIDES AMINES	68
III.4.1.1 L-carnitine.....	68
III.4.1.2 La bétaine	69
III.3.2 LES ACIDES AMINES	69
III.4.2.1 La L-Arginine.....	69
III.4.2.2 La L-Leucine	70
III.4.2.3 La L-Glutamine.....	71
III.4.2.4 La L-Citrulline.....	72
III.4.2.4.1 La citrullination des peptides	73
III.4.2.4.2 La citrulline et le cycle de l’urée.....	74
III.4.2.4.3 Biochimie et physiologie de la citrulline.....	75
III.4.2.4.4 La citrulline en physiopathologie	77

IV. MONOXYDE D'AZOTE (NO) ET METABOLISME.....	80
IV.1. LA SYNTHÈSE DU NO DANS LES CELLULES ANIMALES.....	80
IV.2. LA REACTIVITÉ DU NO.....	81
IV.3. NO ET METABOLISME	82
IV.4. NO ET METABOLISME DU TAB : EXEMPLE DE LA LEPTINE :ARTICLE 1.....	84
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	92
RESULTATS.....	94
I. RESULTATS COMPLEMENTAIRES <i>IN VIVO</i>	94
II. ARTICLE 2	99
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRE <i>IN VITRO</i> CHEZ LE RAT AGE.....	111
IV. ARTICLE 3.....	113
V. RESULTATS COMPLEMENTAIRES <i>IN VITRO</i> CHEZ LE RAT JEUNE HFD	125
VI. ARTICLE 4.....	134
CONCLUSION-DISCUSSION.....	157
I. RAPPEL DES RESULTATS.....	157
II. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	160
II.1. DIFFERENCE RATS AGES / RATS JEUNES HFD	160
II.2. MECANISME D'ACTION DE LA CITRULLINE	163
II.2.1 IMPLICATION DU NO DANS LES EFFETS DE LA CITRULLINE	164
II.2.1.1 CIT, NO et lipolyse	166
II.2.1.2 CIT, NO et glycéronéogenèse	166
II.2.1.3 CIT, NO et fonction mitochondriale	167
II.2.1.4 CIT, NO, inflammation et métabolisme.....	168
II.2.1.5 CIT, leptine et adiponectine	170
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173
ANNEXE 1 : LISTE DES COMMUNICATIONS.....	202

Listes des Tables

Tableau 1 : Sécrétion et concentration de différentes adipokines.	22
Tableau 2 : Transport des acides gras dans les adipocytes.	27
Tableau 3 : Caractéristiques des adipocytes blancs et des adipocytes bruns.	39
Tableau 4 : Caractéristiques des différentes isoformes des NOS.	81

Liste des illustrations

Figure 1 : Le tissu adipeux blanc (TAB) a un rôle endocrine.....	25
Figure 2 : métabolisme postprandial dans l'adipocyte.....	28
Figure 3 : Métabolisme en période de jeûne dans l'adipocyte.....	31
Figure 4 : La chaîne respiratoire et découplage par la protéine UCP1	34
Figure 5 : Activation du gène UCP1 via les récepteurs B-3 adrénérgiques dans l'adipocyte	36
Figure 6 : Le tissu adipeux est un tissu hétérogène.....	37
Figure 7 : Origines des adipocytes blancs et bruns.....	42
Figure 8 : Conséquences de l'obésité.....	52
Figure 9 : Conséquences physiopathologiques de l'inflammation au cours du vieillissement	61
Figure 10 : Les transporteurs d'acides aminés dans l'adipocyte.....	73
Figure 11 : Le cycle de l'urée.....	74
Figure 12 : Métabolisme de la citrulline.....	75
Figure 13 : Le cycle arginine-citrulline-NO.....	77
Figure 14 : Effets du NO à des concentrations physiologiques sur le métabolisme énergétique.....	83
Figure 15 : Effet <i>in vivo</i> de la CIT sur le poids corporel et la masse des tissu adipeux épididymaire et rétropéritonéal de rats âgés sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois.....	94
Figure 16 : Effet <i>in vivo</i> de la CIT sur la libération de glycérol et de NEFA ainsi que sur l'expression des gènes codant ATGL, HSL et GyK du TA EPI et du TA RET de rats âgés...	95
Figure 17 : Effet <i>in vivo</i> de la CIT sur la glycéronéogenèse et sur l'expression des gènes codant PEPCK-C et PPAR γ 2 du TA RET de rats âgés.....	96
Figure 18 : Effet <i>in vivo</i> d'un régime enrichi en CIT sur l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation et des marqueurs de macrophages sur le TA RET.	97

Figure 19 : Effets <i>in vivo</i> de la citrulline sur le tissu adipeux rétropéritonéal de rats âgées de 22 mois alimentés pendant 3 mois avec un régime supplémenté en citrulline.	98
Figure 20 : Effet de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme du tissu adipeux rétropéritonéal de rats jeunes et de rats âgés.....	111
Figure 21 : Effets <i>in vitro</i> de la CIT sur le métabolisme des explants de TA RET de rats âgés dans d'autres conditions de cultures.....	112
Figure 22 : Effet <i>in vitro</i> de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme du tissu adipeux rétropéritonéal de rats CD ou de rats HFD.	125
Figure 23 : Effets du HFD et de CIT sur l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation et des marqueurs de macrophages du tissu adipeux épидидymaire de rats CD ou HFD.....	127
Figure 24 : Effet de la CIT et implication du NO dans la libération de glycérol et des NEFA du tissu adipeux épидидymaire de rats CD et HFD	130
Figure 25 : Effet de la CIT et implication du NO sur la glycéronéogenèse et PEPCK-C d'explants de tissu adipeux epидидymaire de rats CD et de rats HFD.....	132
Figure 26 : Effet <i>in vitro</i> de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme du tissu adipeux épидидymaire de rats CD ou de rats HFD.....	133
Figure 27 : Représentation schématique des effets de la CIT sur le métabolisme du tissu adipeux.	159
Figure 28 : Répartition des enzymes impliquées dans le cycle ARG-CIT-NO dans le tissu adipeux.	165

Abréviations

AANE	acides aminés non-essentiels
AGNE	acide gras non estérifié
AGS	acide gras synthase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
AQ7	aquaporine-7
ARG	arginine
ASL	argininosuccinate lyase
ASS	argininosuccinate synthase
ATGL	triglycéride lipase des adipocytes
BMP7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>
BPA	bisphénol A
BRITE	<i>brown-in-white</i>
CD	régime contrôle
CIT	citrulline
CPT 1-b	<i>carnitine palmitoyl transférase 1 b</i>
DT2	diabète de type 2
EPI	épididymaire
ER	<i>estrogen receptor</i>
ERO	espèces réactives de l'oxygène
FTO	<i>fat mass and obesity-associated</i>
G3P	glycérol-3-phosphate
GLN	glutamine
GLU	glutamate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GyK	glycérol kinase
HFD	<i>high fat diet</i>
HSL	lipase sensible aux hormones
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
IL-10	interleukine-10
IL-6	interleukine-6
IMC	indice de masse corporelle
KSR2	<i>kinase suppressor of ras 2</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPL	lipoprotéine lipase
MGL	monoglycéride lipase
mtDNA	ADN mitochondrial
Myf5	<i>myogenic factor 5</i>
NO	monoxyde d'azote
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
NPC1	protéine Niemann-Pick type C
OAT	ornithine aminotransférase

OCT	ornithine carbamoyl transferase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORN	ornithine
ORNT1	antiport ornithine/CIT
PAD	Peptidyl Arginine Déiminase
PALO	glycylglycine Δ -N-(phosphonacetyl)-L-ornithine
PEPCK-C	phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique
PGC-1α	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1α</i>
PKA	protéine kinase A
POP	polluants organiques persistants
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PRDM16	coactivateur <i>PR domain containing 16</i>
RAR	<i>retinoic acid response element</i>
RET	rétropéritonéal
SNC	système nerveux central
TA	tissu adipeux
TAB	tissu adipeux blanc
TABr	tissu adipeux brun
TASC	tissu adipeux sous-cutané
TAV	tissu adipeux viscéral
TFAM	<i>mitochondrial transcription factor A</i>
TG	triglycérides
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMEM26	<i>transmembrane protein 26</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor α</i>
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i>
UCP3	<i>uncoupling protein 3</i>
VEGF	facteur de croissance endothéliale vasculaire
VLCAD	<i>very long chain acyl CoA dehydrogenase</i>

INTRODUCTION

I. Les tissus adipeux

Classiquement, on distingue deux types de tissus adipeux (TA) chez le mammifère : le blanc (TAB) et le brun (TABr). Le stockage de l'énergie se fait au niveau du TAB. Le brun dissipe l'énergie sous forme de chaleur grâce à une protéine qui lui est spécifique, la protéine découplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*). Cette protéine intervient dans le découplage de la chaîne respiratoire de l'ATP synthase. Bien que les adipocytes blancs et bruns dérivent d'un même précurseur, ils restent très distincts l'un de l'autre. De plus, un nouveau type d'adipocyte « brite » (« brown-in-white ») a été identifié (voir plus loin). Ces tissus ont un intérêt tout particulier chez l'Homme. Ils deviennent une cible thérapeutique importante pour lutter contre les maladies métaboliques liées à l'obésité ou au vieillissement (**Carrière et al., 2013**).

I.1. Le tissu adipeux blanc

Le TAB représente la principale source de stockage d'énergie de l'organisme. Comme nous le verrons dans la partie I.3 le TAB assure plusieurs fonctions. Sa première fonction est une fonction métabolique où il joue un rôle essentiel dans l'homéostasie énergétique. Capable de stocker l'énergie sous forme de triglycérides (TG) durant la période postprandiale, il restitue cette énergie en libérant les acides gras non-estérifiés (AGNE) lors de période de jeûne ou lorsque la dépense énergétique est importante. Ces processus sont régulés par des cytokines, des hormones ou d'autres facteurs. Le tissu adipeux permet ainsi la sécrétion d'adipokines qui agissent soit localement (action paracrine) soit à distance (action endocrine). Le TAB intervient également dans des fonctions neuroendocrines, immunitaires et inflammatoires.

I.2. Localisations

Le TAB possède des particularités anatomiques et histologiques ce qui fait de lui un organe atypique (**Guerre-Millo, 2006**). Tout d'abord, il possède plusieurs localisations anatomiques réparties en dépôts non contigus. Les capacités métaboliques et endocrines du TAB diffèrent d'une localisation anatomique à l'autre. Cependant, la capacité de produire et la contribution de sécréter tel ou tel facteur ne sont pas encore bien établies (**Guerre-Millo, 2006**).

Chez les mammifères, le TAB se compose de différents dépôts qui sont innervés et vascularisés. Au sein du tissu adipeux blanc on retrouve deux catégories le TAB sous-cutané, lui-même composé du TAB sous-cutané superficiel et du TAB sous-cutané profond, et le TAB viscéral ou profond (**Anghel and Wahli, 2007**).

I.2.1 Le tissu adipeux sous-cutané

Parmi ces différents tissus, le TAB sous-cutané (TASC) représente 80 à 90% du TAB (**Lafontan and Berlan, 2003**). Les dépôts sous-cutanés sont organisés en lobules réguliers et métaboliquement plus stables que le TAB viscéral (TAV). Le TASC intervient essentiellement dans le stockage des AGNE sous forme de TG et en cas de balance énergétique positive, les adipocytes vont s'adapter en s'hypertrophiant, il s'ensuivra une multiplication de cellules précurseurs, phénomène d'hyperplasie. Ce tissu est moins sensible à l'action lipolytique des catécholamines que son homologue viscéral. Ainsi, une augmentation du TASC semble améliorer la sensibilité à l'insuline chez l'homme comme chez la souris (Kim et al., 2007; Porter et al., 2009).

I.2.2 Le tissu adipeux viscéral

Ce tissu profond est réparti en différents dépôts. Cette répartition est identique chez le rongeur et chez l'Homme. Le premier dépôt est situé au niveau rétropéritonéal et représente 25% du TAV. Il s'étend entre la limite postérieure des intestins et la limite ventrale du rein. Le

deuxième dépôt profond est localisé au niveau intrapéritonéal. La distinction entre ces deux dépôts est délicate. Le TAV ne représente que 5 à 20% du TAB total. Il ne constitue pas un lieu de stockage privilégié d'où sa faible capacité de prolifération, contrairement à son homologue sous-cutané. Les AG qu'il stocke sont donc soumis à un renouvellement rapide. En effet, les adipocytes du TAV sont le siège d'une lipolyse intense et sont résistants à l'action anti-lipolytique de l'insuline. Ces mêmes cellules sont cependant plus sensibles aux catécholamines et à leurs effets lipolytiques que les adipocytes sous-cutanés (**Meek et al., 1999**). Le développement du TAV contribue au développement du syndrome métabolique. La dérégulation de la sécrétion des adipokines, la toxicité des AG en excès ainsi que les différences spécifiques entre TAV et TASC montrent que l'obésité abdominale est un acteur principal dans le développement de la résistance à l'insuline, ainsi que du diabète et des maladies cardiovasculaires (**Phillips and Prins, 2008**).

I.3. Régulation de la distribution du tissu adipeux

Le développement du TAB chez l'Homme est gouverné par de nombreux paramètres. Parmi lesquels l'âge, le sexe, la génétique et les facteurs hormonaux sont les plus influents.

I.3.1 Influence du sexe et de l'âge

Bien qu'il existe une obésité infantile, la puberté est une période charnière dans le développement du TAB. Entre les hommes et les femmes la répartition du TAB est disparate. Ainsi, le rapport sous-cutané/viscéral est plus élevé chez la femme que chez l'homme puis diminue avec l'âge chez les deux sexes. Alors que chez la femme, les lipides ont tendance à s'accumuler au niveau du TASC, notamment dans la région fémoro-glutéale : adiposité gynoïde, c'est dans le TAB abdominal que les hommes stockent préférentiellement les lipides : adiposité androïde (**Enzi et al., 1986**). A la ménopause, ce scénario change. Ainsi, le TAV se développe chez la femme avec l'âge ce qui conduit à l'augmentation d'une adiposité de type androïde (**Ley et al., 1992; Lemieux et al., 1993**). L'augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires avec l'âge peut s'expliquer

par cette modification de la répartition du TAB. De plus, cette augmentation de l'adiposité viscérale est corrélée avec des altérations métaboliques au niveau des lipoprotéines et dans l'homéostasie glucidique chez la femme âgée (**Tchernof and Després, 2013**).

Ces observations suggèrent l'implication des hormones sexuelles dans le développement du TAB en fonction de sa localisation anatomique.

I.3.2 Influence hormonale

L'adipocyte est connu pour exprimer les 2 isoformes du récepteur aux œstrogènes : *estrogen receptor* (ER) α et ER β (**Pedersen et al. 2001**). La répartition de ces deux récepteurs est spécifique du sexe et des dépôts mais reste indéterminée (**Björntorp, 1996; Pedersen et al., 1996**). Chez les rongeurs, les œstrogènes jouent un rôle inhibiteur sur la prise alimentaire. Ainsi une ovariectomie provoque une hyperphagie et un gain de poids considérable chez ces animaux (**Brown and Clegg, 2010**). La délétion du récepteur α chez la souris femelle ou mâle augmente l'adiposité indépendamment de la prise alimentaire (**Heine et al., 2000**). Les œstrogènes sont capables de stimuler la prolifération et la différenciation des pré-adipocytes de manière dépôt spécifique plus prononcé chez la femme que chez l'homme (**Anderson et al., 2001; Dieudonné et al., 2004**). L'œstradiol au niveau cérébral agit sur les voies de signalisations neuronales et contribue à réguler la balance énergétique chez l'Homme (**Brown and Clegg, 2010**). Ainsi l'administration exogène d'œstradiol chez la femme pré-ménopausée diminue l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) dans le TAB des régions inférieures. De plus, une faible concentration d'œstradiol diminue de la même manière la LPL au niveau sous-cutané et augmente la lipase sensible aux hormones (HSL) à forte dose (**Palin et al., 2003**). Les œstrogènes, produits principalement par les ovaires chez la femme, peuvent être également synthétisés de manière périphérique chez la femme ménopausée ou chez l'homme par aromatisation des hormones androgènes dans différents tissus, notamment le TAB (**Bélangier et al., 2002; Mattsson and Olsson, 2007**). La réduction des niveaux d'œstrogènes chez la femme ménopausée est associée

avec une augmentation de l'adiposité de façon générale mais aussi d'une accumulation de masse adipeuse au niveau viscéral (**Gambacciani et al., 1997; Toth et al., 2000**).

I.3.3 Influence des facteurs génétiques

Les facteurs génétiques (gènes, polymorphismes et mutations) en lien avec les facteurs environnementaux (comportements culturels et alimentaires) peuvent influencer la répartition du TAB, particulièrement du TAV (**Henkin et al., 2003**). La distribution anatomique du TAB au sein de l'organisme humain implique plusieurs gènes d'où la nature polygénique de cette répartition.

I.4. Rôle endocrine

Le TAB possède des fonctions endocrines. Il a la capacité de sécréter un certain nombre d'hormones appelées adipokines (**Tableau 1 et Figure 1**). Certaines ont une action endocrine, d'autres autocrine ou paracrine. Leur sécrétion dépend des variations de la masse du TAB (**Fietta and Delsante, 2013**). Le TAB est un tissu hétérogène, comme nous pourrions le décrire plus en détails dans la partie I.7, ce tissu contient une fraction adipocytaire et une fraction stroma-vasculaire. Certaines adipokines sont spécifiquement produites par l'adipocyte, c'est le cas de la leptine et de l'adiponectine alors que TNF- α et IL-6 émanent principalement de la fraction stroma-vasculaire (**Fain, 2006; Cao, 2014**). Ces différentes molécules peuvent avoir une action pro ou anti-inflammatoire et peuvent réguler le métabolisme glucido-lipidique. La table 1 donne une vision non exhaustive des adipokines sécrétées par le TAB et la quantité produite en fonction de la fraction adipocytaire ou stroma-vasculaire. Les adipokines jouent un rôle dans les complications de l'obésité. Dans des cas d'obésité, le TAB subit de profondes modifications cellulaires. Ainsi, l'excès de stockage des AG en TG provoque une hypertrophie des adipocytes. De plus, chez l'obèse l'infiltration du TAB par des macrophages augmente. Ces phénomènes bouleversent le fonctionnement du TAB notamment sa fonction sécrétoire (**Lanthier and Leclercq, 2014**). Dans ce mémoire, seul un nombre restreint d'adipokines est présenté.

Adipokines/Cytokines	Produites par les adipocytes (pmol/g)	Produites par les cellules non adipeuses (pmol/g)
IL-8	87	1120
PAI-1	18	78
MCP-1	9,2	74
IL-6	5,1	66
Adiponectin	4,1	6
SAA 1et 2	1,8	1,2
Leptin	1,8	0,1
IL-1Ra	0,14	4,1
Resistin	<0,04	1,8
IL-10	0,02	0,53
TNFalpha	0,012	0,22

Tableau 1 : Sécrétion et concentration de différentes adipokines.

D'après (Fain, 2006)

I.4.1 La leptine

La leptine est une hormone spécifique du TAB. Elle joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique, sa synthèse est corrélée positivement à la quantité de TAB ainsi qu'à l'indice de masse corporelle (IMC ou indice de Quetelet).

Cette protéine de 16 kDa est retrouvée en concentration plus modérée dans différents tissus comme l'estomac, le placenta, les os, les glandes mammaires, le foie et le muscle. La leptine active le récepteur Ob-Rb qui appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe 1. La leptine agit sur le système nerveux central au niveau de l'hypothalamus pour réguler la prise alimentaire en inhibant la voie de signalisation orexygène et en stimulant la voie de signalisation anorexigène. Du fait de la présence de son récepteur Ob-Rb au sein de différents tissus, cette adipokine est capable de jouer un rôle périphérique en plus de son rôle central. La leptine active la β -oxydation des AG dans les tissus périphériques et réduit ainsi le stockage ectopique. Cette activation de la β -oxydation nécessite la diminution du malonyl-CoA cellulaire via l'inhibition de l'acétyl CoA carboxylase. Parallèlement, la leptine favorise le stockage des AG sous forme de TG dans le TAB. La leptine est également capable d'augmenter l'expression de la protéine découplante UCP1, ainsi que des UCP2 et

3 dans le TAB et dans le muscle (**Commins et al., 1999; Sarmiento et al., 1997; Scarpace et al., 1998**). De par l'ensemble de ces effets, la leptine joue un rôle insulino-sensibilisateur. La concentration plasmatique de leptine est proportionnelle à la masse du TAB (**Pénicaud et al., 2012**). Des modèles animaux possédant une altération du signal leptine sont hyperphagiques (**Hausman et al., 2012**). Chez l'Homme des mutations génétiques au sein du gène codant la leptine amène au développement d'obésité (**Farooqi et al., 2002**). L'augmentation de la leptinémie est corrélée à l'obésité et au développement d'une insulino-résistance. Ainsi, les personnes obèses sont hyperleptinémiques mais résistantes à l'action de la leptine.

1.4.2 L'adiponectine

L'adiponectine ou adipoQ, Acrp 30 (complement-related protein 30), ou apMI (adipose most abundant gene transcript) est une hormone de 30 kDa synthétisée par le TAB découverte dans les années 1990 par différents groupes de recherche (**Scherer et al., 1995**). Elle est sécrétée par les adipocytes et se présente dans la circulation sous forme de dimère, trimère ou de complexe protéique à la concentration de 5 à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ chez l'Homme. Contrairement à celle de la leptine, la sécrétion d'adiponectine est corrélée de manière négative à la masse adipeuse et à l'IMC (**Ailhaud, 2006**). Cette corrélation négative est plus prononcée au niveau du TAV qu'au niveau sous-cutané (**Matsuzawa, 2006**). Le facteur *tumor necrosis factor α* (TNF- α) est connu pour être un inhibiteur fort de l'activité de l'adiponectine en agissant directement via le promoteur de son gène. La corrélation négative entre quantité de TAV et synthèse d'adiponectine peut être expliquée par une sécrétion importante de TNF- α par le TAV (**Matsuzawa, 2006**). L'adiponectine est hypoglycémiante ; elle diminue la production de glucose hépatique, et augmente la captation du glucose ainsi que l'oxydation des AG dans le muscle squelettique. De plus, l'adiponectine augmente la biogenèse mitochondriale via PPAR α dans le foie et le muscle notamment (**Berg and Scherer, 2005**). Ainsi, l'adiponectine augmente la β -oxydation des AG et réduit le stockage des TG dans le

muscle conduisant à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Maeda et al., 2008; Yamauchi and Kadowaki, 2013**). D'autre part, l'adiponectine induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles qu'IL-10, par les macrophages ou les myocytes (**Carbone et al., 2012**).

I.4.3 Les cytokines pro-inflammatoires : TNF- α et IL-6

TNF- α et l'interleuline-6 (IL-6) sont des cytokines synthétisées par le TAB qui régulent la sensibilité à l'insuline. Ces cytokines interviennent de manière locale, paracrine ou autocrine. Produites en excès ces deux adipokines peuvent être associées avec le développement du diabète de type 2 (DT2). Le TAB est capable de sécréter des facteurs pro-inflammatoires participant à l'attraction des macrophages.

TNF- α est principalement sécrété par les macrophages chez l'Homme alors que chez le rongeur sa synthèse provient aussi de l'adipocyte (**Fain et al., 2004**). Elle intervient dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. TNF- α est la première cytokine du TAB pour laquelle il a été démontré une relation entre développement de l'insulino-résistance et obésité (**Katsuki et al., 1998; Peraldi and Spiegelman, 1997**). L'obésité est associée à une surexpression de cette cytokine pro-inflammatoire aussi bien chez le rongeur que chez l'Homme. En diminuant la phosphorylation du récepteur à l'insuline IRS, elle limite la sensibilité à l'insuline. Cette cytokine est un agent lipolytique. Des études *in vitro* montrent que TNF- α inhibe LPL, elle diminue alors la captation des AG par l'adipocyte. Ceci conduit à l'accumulation des AGNE dans la circulation sanguine (**Kawakami et al., 1987**).

IL-6 est une cytokine de 27KDa. Entre 10 et 30% de l'IL-6 est produite par le TAB. Les adipocytes comme la fraction stroma-vasculaire (FSV) synthétisent cette cytokine (**Fain et al., 2004**). Cependant, il existe une différence de sécrétion selon la localisation du dépôt adipeux. Ainsi, le TAV produit beaucoup plus d'IL-6 que le TASC (**Fried et al., 1998**).

I.4.4 Cytokine anti-inflammatoire : IL-10

L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires. Chez le sujet obèse, cette cytokine circule à des concentrations élevées (**Fain, 2006**). Son expression diminue à la suite d'une restriction calorique (**Clément et al., 2004**). Bien que l'adipocyte sécrète cette cytokine, la fraction non-adipocytaire en est la principale source. IL-10 inhibe la synthèse des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et TNF- α via la voie JAK/STAT (**Moore et al., 2001**).

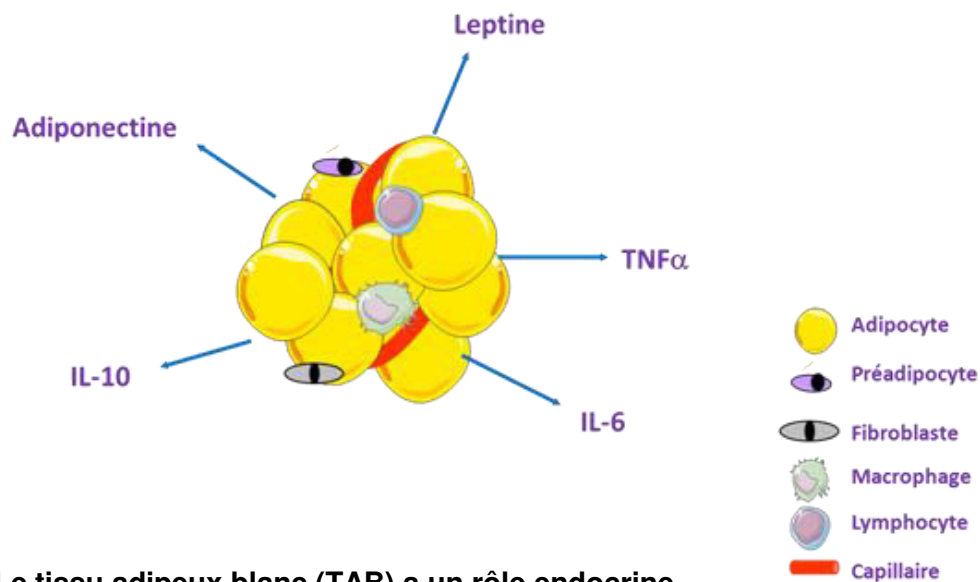


Figure 1 : Le tissu adipeux blanc (TAB) a un rôle endocrine.

Le TAB sécrète plusieurs facteurs parmi lesquels des cytokines pro-inflammatoires : l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), des cytokines anti-inflammatoires : l'interleukine-10 (IL-10), et des hormones : la leptine et l'adiponectine. Le tissu adipeux est hétérogène. Il est constitué d'une fraction adipocytaire et d'une fraction stroma-vasculaire (fibroblastes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales capillaires). Certaines des adipokines sont sécrétées sélectivement par les adipocytes (leptine, adiponectine) alors que d'autres comme TNF- α et IL-6 émanent principalement de la fraction stroma-vasculaire. Ces différentes molécules peuvent avoir une action pro ou anti-inflammatoire et peuvent réguler le métabolisme glucido-lipidique.

I.5. Rôle métabolique

I.5.1 Métabolisme postprandial

Le TAB est un acteur central dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Le rôle principal du TAB est un rôle de stockage lors de l'apport alimentaire et un rôle de libération des AG pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. En période postprandiale, les AG sont stockés dans l'adipocyte sous forme de TG. Lors du jeûne, le TAB a un rôle pour fournir de l'énergie en libérant les AG stockés. Les AG sont le substrat majeur des organes périphériques tels que le foie ou le muscle, ainsi le TAB leur permet de fonctionner pendant le jeûne. Dans le cas d'obésité, il existe une élévation de la concentration d'AG circulant qui peut être à l'origine du développement de l'insulino-résistance des tissus. En effet, lorsque qu'une certaine quantité (0.6µg de TG par îlots pancréatique) de TG s'accumule dans la cellule pancréatique β , on parle de lipotoxicité. Ce phénomène implique la synthèse de céramides à partir des acyl-CoA. Ces derniers activent la forme inducible de la NO synthase (NOS II) provoquant une hausse importante des concentrations de NO responsable de l'apoptose des cellules pancréatiques β . Tout ceci amène au cours du temps à une hyperglycémie. Les AG circulant sont donc lipotoxiques et jouent un rôle dans l'apparition des pathologies de l'insulino-résistance et du DT2.

Le stockage des AG en TG nécessite l'apport de glycérol-3-phosphate (G3P). En période postprandiale, ce dernier est issu du glucose. Le glucose alimentaire est capté par l'adipocyte via deux récepteurs GLUT1 et GLUT4. Le jeûne permet la libération des AG dans la circulation. Leur concentration plasmatique après libération est finement régulée par trois processus métaboliques faisant intervenir la glycéronéogenèse, la ré-estérification, et la β -oxydation.

I.5.1.1 Transport des acides gras

En période postprandiale, les TG des lipoprotéines sont hydrolysés par la LPL. L'adipocyte, peut alors capter les AG (**Large et al., 2004**). Après un repas, l'insuline stimule la sécrétion de LPL dans la circulation, favorisant le stockage des AG dans l'adipocyte (**Preiss-Landl et al., 2002**). Au cours de l'obésité, la réponse à l'insuline étant diminuée, la LPL n'est plus stimulée et les AG s'accumulent dans la circulation sanguine (**Wang and Eckel, 2009**). Dans les macrophages, la LPL intervient dans le développement des plaques d'athérome au cours de l'athérosclérose. Différents transporteurs adipocytaires interviennent dans le passage des AG dans l'adipocyte ainsi que dans leur transport intracellulaire (**Table 2**).

Nom	Abbréviation	Localisation	Rôle	Références
Plasma membrane Fatty acid binding protein	FABPpm	membrane face externe	augmente l'affinité des AG à la membrane.	Stremmel 1988 ; Zhou 1992
fatty acids translocase CD36	FAT CD36	transmembranaire	transport des AG à chaîne longue et des AG dans la mitochondrie	Abumrad, el-Maghrabi et al. 1993
Fatty acid transport protein 1 Fatty acid transport protein 4	FATP1 FATP4	transmembranaire	Captage irréversible des AG Transformation des AG en acyl CoA	Schaffer and Lodish 1994
cytoplasmic Fatty Acid Binding Protein	FABPc	Membrane face interne	Captage des AG dans la cellule et orientation vers la mitochondrie	Spitsberg, Matitashvili et al. 1995
fatty acid binding protein 4	FABP4 ou ap2	intracellulaire	Transport intracellulaire des AG	Zimmerman et al. 2002

Tableau 2 : Transport des acides gras dans les adipocytes.

(**Abumrad et al., 1993; Spitsberg et al., 1995; Stremmel, 1988; Zhou et al., 1992; Zimmerman and Veerkamp, 2002**)

I.5.1.2 Stockage des acides gras

En période postprandiale, la synthèse des TG de stockage provient de l'estérification des AG activés en acyl-CoA (**Richards et al., 2006**). Le G3P nécessaire à cette estérification provient du glucose alimentaire puisque la phosphorylation du glycérol via la glycérol kinase (GyK) est faible dans ce tissu. Le G3P permet aux acyl-CoA de se greffer sur ce squelette carboné et former des TG s'accumulant dans la vacuole lipidique de l'adipocyte (**Tordjman et al., 2003**) (**Figure 2**).

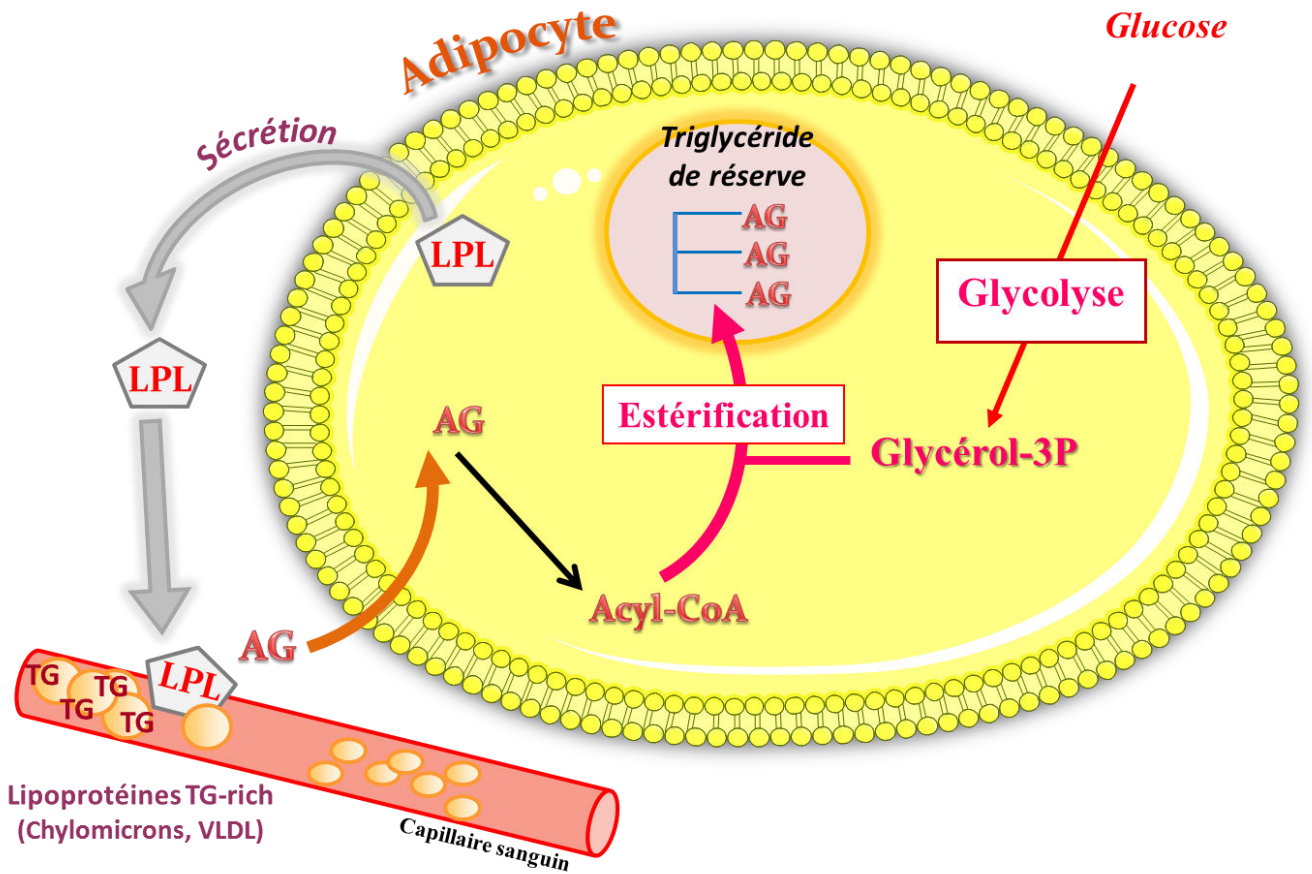


Figure 2 : Métabolisme postprandial dans l'adipocyte.

En période postprandiale, les triglycérides (TG) des lipoprotéines sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). L'adipocyte peut alors capter les acides gras (AG). Les AG pénètrent dans l'adipocyte. Dans l'adipocyte, les AG sont activés en acyl-CoA. Le glycérol-3-phosphate (G3P) nécessaire à l'estérification des AG provient du glucose alimentaire qui entre dans l'adipocyte. Le glucose suit la voie de la glycolyse pour former du glycérol-3-phosphate.

I.5.2 Métabolisme en période de jeûne

En période de jeûne, le TAB devient une source d'énergie importante de l'organisme. Ainsi le TAB mobilise ses réserves, les TG contenus dans les adipocytes sont hydrolysés en AG et glycérol lors de la lipolyse. La libération des AG est finement contrôlée par un processus de ré-estérification et de β -oxydation (**Figure 3**).

I.5.2.1 La lipolyse

La lipolyse met en jeu successivement 3 enzymes : la triglycéride lipase des adipocytes (ATGL), la lipase sensible aux hormones (HSL) et la monoglycéride lipase (MGL) (**Zimmermann et al., 2004; Zechner et al., 2009**) (**Figure 3**). Cette voie métabolique est principalement activée par les catécholamines (adrénaline, noradrénaline), les agonistes β -adrénergiques ou les inducteurs de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et inhibée par l'insuline et le glucose. Les AG sortent via les transporteurs précédemment décrits FATCD36 et FATP (**Tableau 1**) et le glycérol via l'aquaporine-7 (AQP-7). On s'attend à ce que 3 molécules d'AG soient libérées pour une seule molécule de glycérol, ce qui n'est jamais le cas. Le rapport AG/glycérol libéré est toujours inférieur à 3 (**Ballard et al., 1967; Reshef et al., 1969; Forest et al., 2003**).

I.5.2.2 Glycéronéogenèse et ré-estérification

Les AGNE provenant de la lipolyse sont en partie ré-estérifiés (30-70%) ou oxydés lors de la β -oxydation dans les adipocytes. La ré-estérification joue un rôle extrêmement important pour limiter la sortie des AGNE de la cellule, alors que le glycérol est libéré en grande partie (**Figure 3**). Ainsi, cette voie joue un rôle essentiel dans la concentration sérique des AGNE. Le processus de ré-estérification nécessite la synthèse *de novo* de G3P. La principale source de G3P en période de jeûne se fait à partir de substrats non glucidiques (pyruvate, acides aminés, lactate) via une voie physiologique appelée la glycéronéogenèse (**Beale et**

al., 2003; Nye et al., 2008). L'enzyme clé est la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C) codée par le gène *Pck1* (**Yang et al., 2009**). Son expression est sous l'influence d'un facteur de transcription le "*peroxisome proliferator activated receptor*" (PPAR) dont l'isoforme gamma est présente en grande quantité dans le TAB. Les travaux de notre équipe ont démontré le rôle important de la glycéronéogenèse et de la ré-estérification des AGNE dans la libération des AGNE par le TAB (**Beale et al., 2003, 2007; Forest et al., 2003**). Cette voie métabolique est notamment induite par les régimes riches en protéines et pauvres en sucres. Elle est la cible de plusieurs hormones et agents pharmacologiques (**Cadoudal et al., 2008**).

I.5.2.3 La β -oxydation

Les AGNE issus de la lipolyse peuvent être oxydés dans la mitochondrie (**Figure 3**). La β -oxydation des AGNE, dont les enzymes importantes sont la *carnitine palmitoyl transférase 1 b* (CPT 1-b) et la *very long chain acyl CoA dehydrogenase* (VLCAD) qui n'est pas très active dans les adipocytes car les mitochondries y sont peu abondantes. Cette oxydation contribue également à limiter la sortie des AGNE dans la circulation dans certaines conditions (voir plus avant).

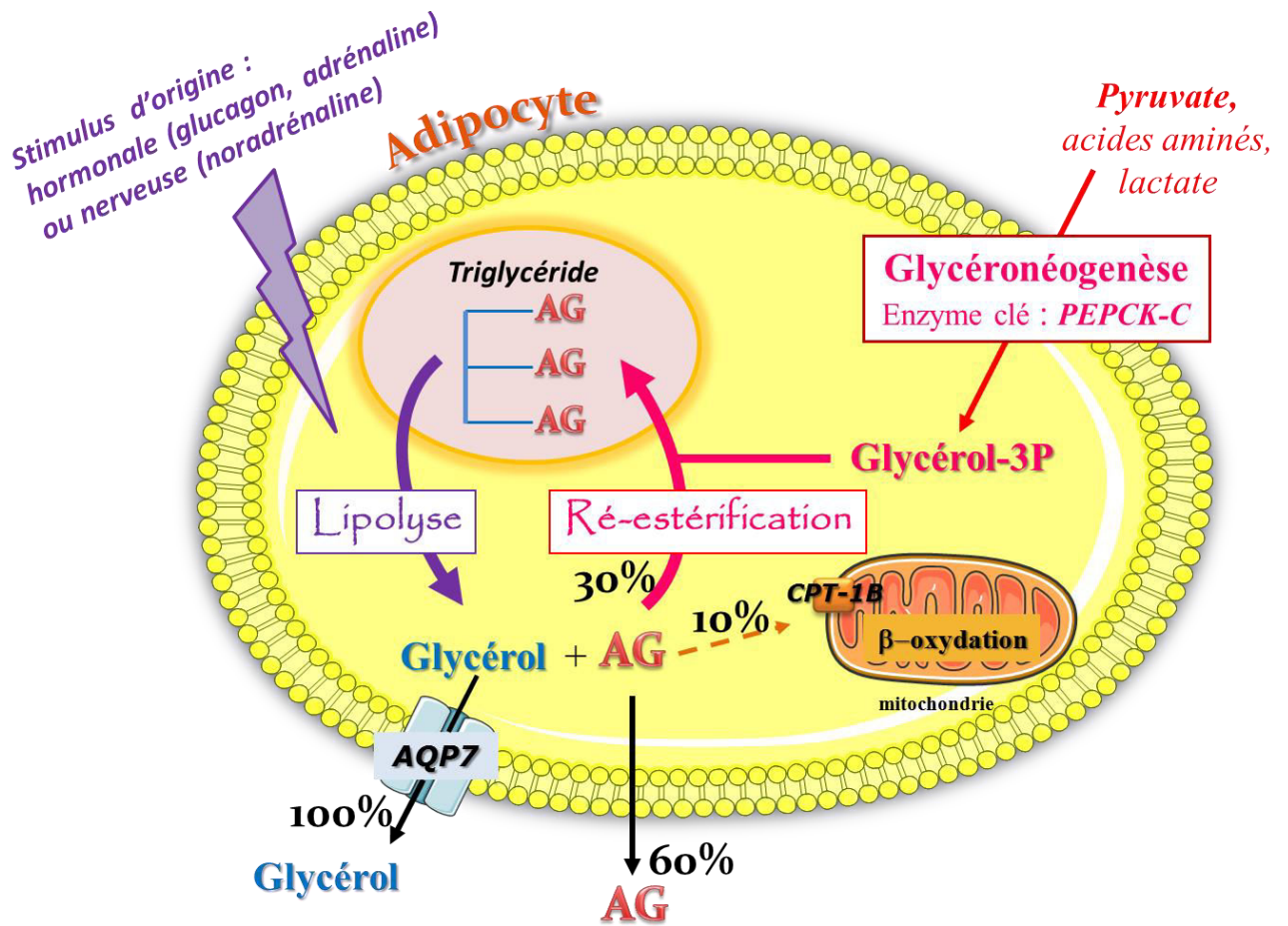


Figure 3 : Métabolisme en période de jeûne dans l'adipocyte.

La lipolyse permet l'hydrolyse des triglycérides pour former du glycérol et des acides gras (AG). Le glycérol rejoint le sang via l'aquaporine 7 (AQP7) et les AG empruntent le transporteur *fatty acid translocase* CD36 (FAT CD36). La libération des AG par la lipolyse est finement régulée par la voie de la ré-estérification et potentiellement la β-oxydation. Le processus de ré-estérification nécessite la synthèse *de novo* de G3P. La principale source de G3P en période de jeûne se fait à partir de substrats non glucidiques (pyruvate, acides aminés, lactate) via une voie physiologique appelée la glycéronéogenèse. L'enzyme clé est la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C). La β-oxydation des AGNE, dont les enzymes importantes sont la *carnitine palmitoyl transférase 1 b* (CPT-1 b) et la *very long chain acyl CoA dehydrogenase* (VLCAD) limite la sortie des AG.

I.6. Le tissu adipeux brun

Le TABr, uniquement présent chez les mammifères, est très développé chez les nouveau-nés et les mammifères hibernants. Chez les mammifères de grande taille comme l'Homme, ce tissu diminue avec l'âge. Sa fonction principale est la thermogénèse dite de non-frisson par opposition à la thermogénèse avec frisson produite par le muscle. Cette fonction thermogénique protège de l'hypothermie et pourrait jouer un rôle pour limiter l'obésité (**Cannon and Nedergaard, 2004**). Plusieurs études soulignent l'importance du TABr dans la composition corporelle et l'homéostasie glucidique (**Lowell et al., 1993; Kopecky et al., 1995; Cederberg et al., 2001; Feldmann et al., 2009**).

I.6.1 Localisation

Le TABr est présent en petite quantité, environ 60g, chez l'adulte. Il semble plus présent chez la femme que chez l'homme (**Cypess et al., 2009**).

Le TABr est organisé en plusieurs dépôts. Chez l'Homme adulte, leur localisation anatomique se situe au niveau inter-scapulaire, para-vertébral, péri-aortique, médiastinal, péri-rénal et au niveau des creux axillaires (**Bartness et al., 2010**). Plus récemment, chez l'Homme comme chez le rongeur, il a été identifié la présence d'adipocytes bruns au sein même du TAB (**Loncar, 1991; Cousin et al., 1992; Cinti, 2011**).

I.6.2 Rôle métabolique

Le TABr est richement vascularisé et innervé. Chaque adipocyte est innervé par le système nerveux sympathique qui permet la régulation de son métabolisme. La noradrénaline se fixant sur les récepteurs β_3 adrénergiques favorise la lipolyse permettant de fournir des AGNE (**Frontini et al., 2013**). Ceux-ci sont β -oxydés formant de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de KREBS et permet la formation de NADH, de FADH₂. Ainsi les AGNE sont un

substrat pour la production de chaleur, et permettent également l'augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP1 (**Cannon and Nedergaard, 2004**).

Il est indispensable pour l'adipocyte de maintenir un niveau de TG stockés adéquat pour maintenir ce métabolisme oxydatif. La ré-estérification des AG est alors indispensable.

I.6.2.1 La thermogénèse sans frisson

Contrairement au TAB, qui a une fonction de stockage, le TABr favorise la dépense énergétique par production de chaleur lors de la thermogénèse adaptative. Ce mécanisme de production de chaleur est directement lié à l'activité de respiration mitochondriale. Au sein de l'adipocyte brun, la protéine découplante UCP1, située dans la membrane interne mitochondriale est spécifique au TABr et permet de découpler la respiration cellulaire ce qui favorise le retour des protons dans la matrice mitochondriale du TABr sans s'accompagner de la synthèse d'ATP. L'énergie libérée permet de produire de la chaleur au détriment de la production d'ATP (**Kuhn et al., 2012**).

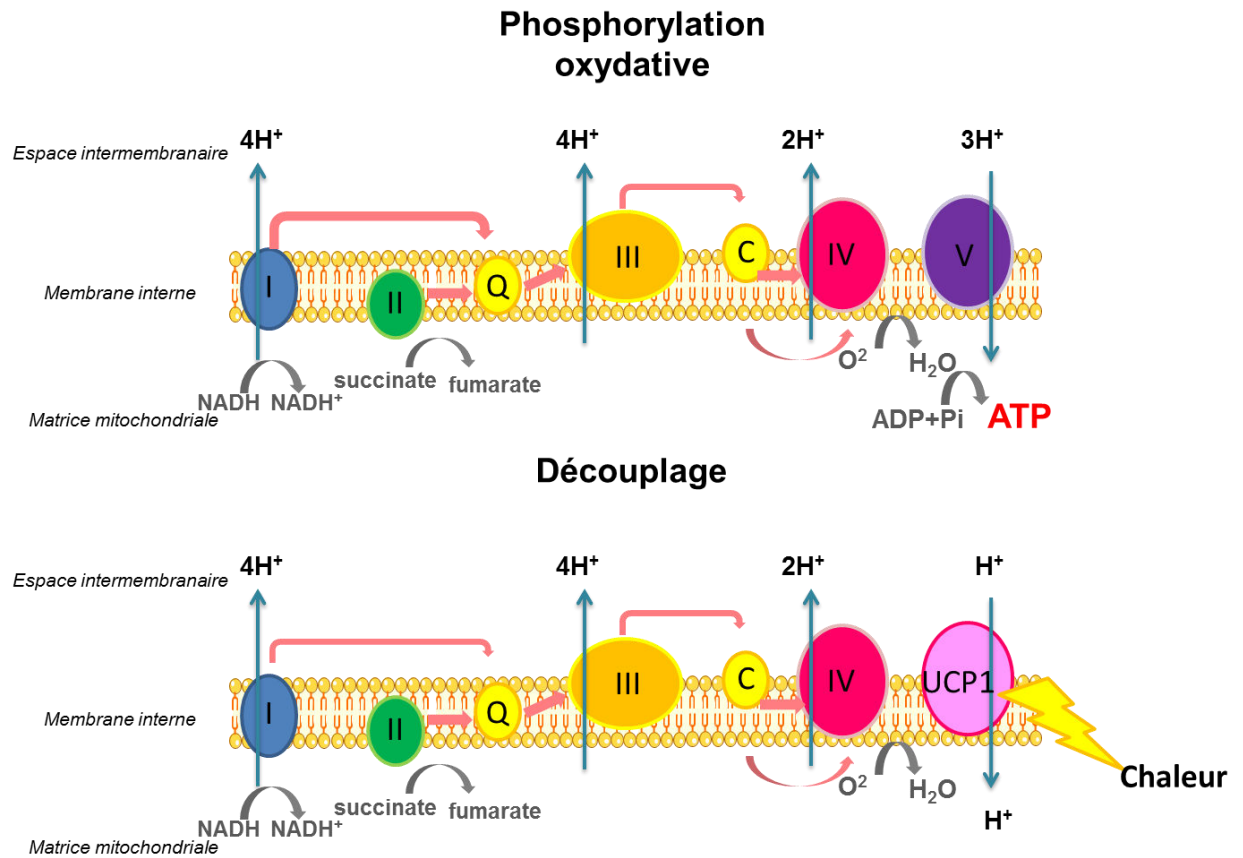


Figure 4 : La chaîne respiratoire et découplage par la protéine UCP1

UCP1 produit de l'énergie sous forme de chaleur en utilisant le gradient intra-mitochondrial de protons de la phosphorylation oxydative. I : complexe 1 de la chaîne respiratoire, NADH,H⁺-Coenzyme Q oxydoréductase ; II : complexe 2 ; succinate déshydrogénase ; III : complexe 3, Coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase ; IV : complexe 4 ; cytochrome c oxydase ; V : complexe 5 ; ATP synthase ; UCP1 : *Uncoupling protein 1* ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé ; ATP : adénosine-5'triphosphate, ADP : adénosine diphosphate ; Pi : phosphate inorganique ; H⁺ : proton. (D'après Kuhn 2012)

I.6.3 Régulations endocrines

Ce processus est sous le contrôle du système sympathique qui active la libération de noradrénaline fixant les récepteurs β -3 adrénergiques. Le système est induit notamment par une exposition au froid ce qui permet chez le nouveau-né et chez les mammifères hibernants de maintenir leur température à 37°C. Ces récepteurs adrénergiques β -3 déclenchent l'augmentation de l'AMPc dans la cellule et l'activation de la protéine kinase A (PKA) ce qui va stimuler l'expression d'UCP1 par phosphorylation du co-activateur *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α* (PGC-1 α). PGC-1 α une fois phosphorylée peut se lier dans le noyau de la cellule à des facteurs de transcription *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)* α ou γ pour permettre l'activation du gène d'UCP1 (**Gnad et al., 2014; Peirce et al., 2014**). D'autre part, les AGNE libérés lors de la lipolyse sont non seulement des substrats pour l'oxydation mais activent directement la synthèse d'UCP1. Outre le système nerveux sympathique, les hormones thyroïdiennes (T3, T4), la progestérone et l'acide rétinoïque jouent également un rôle activateur de l'oxydation mitochondriale (**Gnad et al., 2014; Peirce et al., 2014**). Des études montrent que la norépinéphrine stimule le flux sanguin au niveau du TABr. Cette vasolidation médiée par la norépinéphrine est due à une stimulation de la production de monoxyde d'azote (NO) au sein du TABr (**Nagashima et al., 1994**). Le NO est produit grâce à la *nitric oxide synthase* (NOS) dont les isoformes NOS II et NOS III s'expriment dans le TABr (**Ribiere et al., 1996; Kikuchi-Utsumi et al., 2002; Nisoli et al., 1997**).

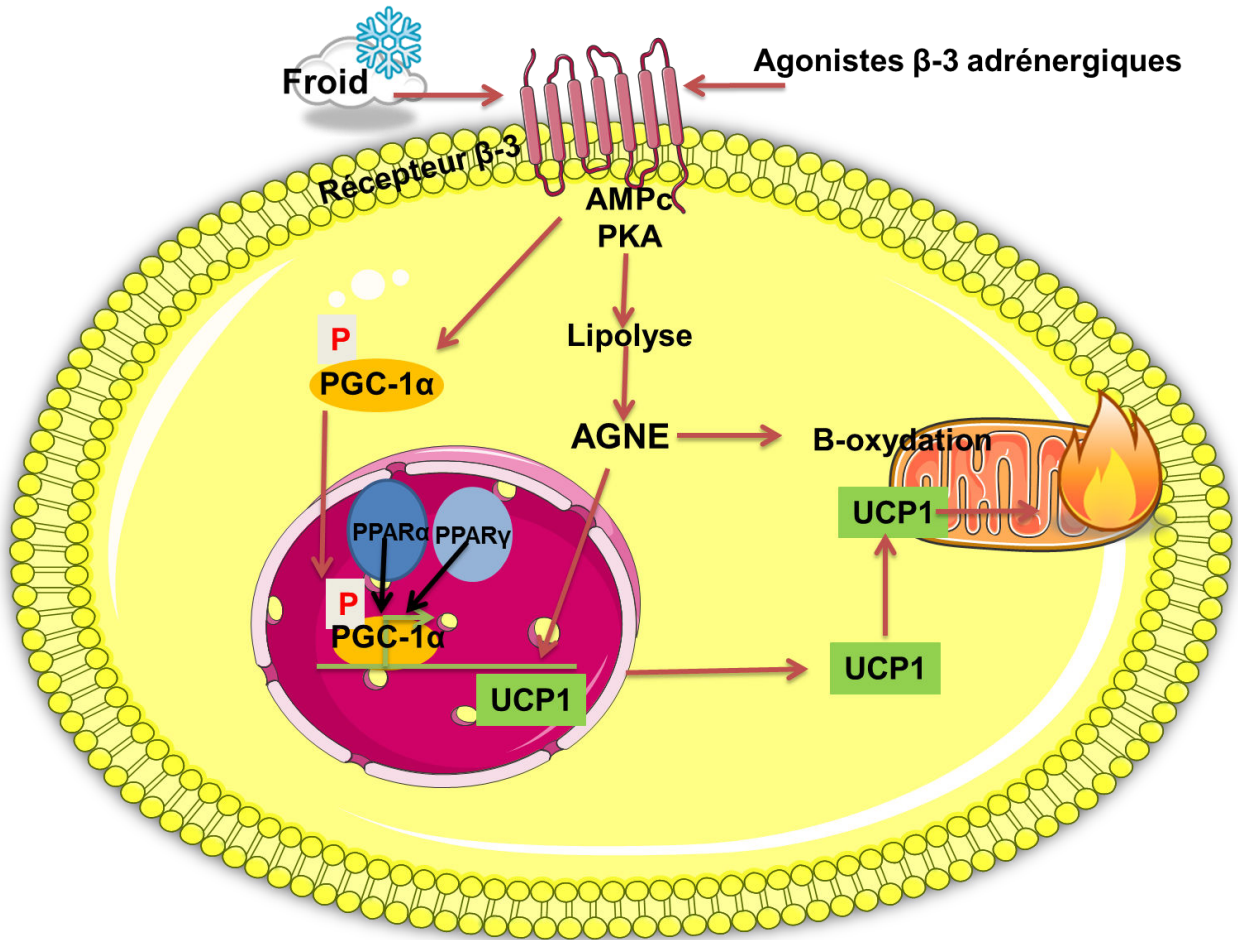


Figure 5 : Activation du gène UCP1 via les récepteurs B-3 adrénergiques dans l'adipocyte.

Le système adrénergique est activé par l'exposition au froid ou par des agonistes β -3 adrénergiques. Ceci entraîne une augmentation d'AMPc et de l'activité de la protéine kinase A (PKA). Cette dernière va activer d'une part la lipolyse donc la libération d'acides gras non estérifiés (AGNE) qui vont servir de substrat pour la β -oxydation dans la mitochondrie et seront également capables de stimuler l'expression du gène de l'uncoupling protein 1 (UCP1). D'autre part PKA phosphoryle Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α). Ce dernier se lie dans le noyau aux Peroxisome proliferator-activated receptor-(PPAR) α ou γ pour stimuler l'expression du gène UCP1. Dans la mitochondrie UCP1 permet le découplage de la phosphorylation oxydative et induit une production de chaleur.

I.7. Hétérogénéité cellulaire

Il est connu que le TABr et le TAB possèdent une hétérogénéité cellulaire. Ainsi, bien que ce tissu soit majoritairement composé d'adipocytes, il est composé également de fibroblastes, de lymphocytes, de cellules endothéliales capillaires, de pré-adipocytes et de macrophages dont l'ensemble constitue la fraction stroma-vasculaire (FSV) du tissu (**Bouloumié et al., 2005**). La fraction adipocytaire représente environ un tiers des cellules composant le TA alors que la fraction non-adipocytaire compose les deux tiers restants (**Avram et al., 2005a, 2005b**). Parmi les adipokines sécrétées, la leptine, l'adiponectine sont produites exclusivement par l'adipocyte. Cependant des facteurs comme TNF- α ou IL-6 sont sécrétés à la fois par les adipocytes et par la fraction non-adipocytaire, plus précisément par les macrophages (**Guerre-Millo, 2006**).

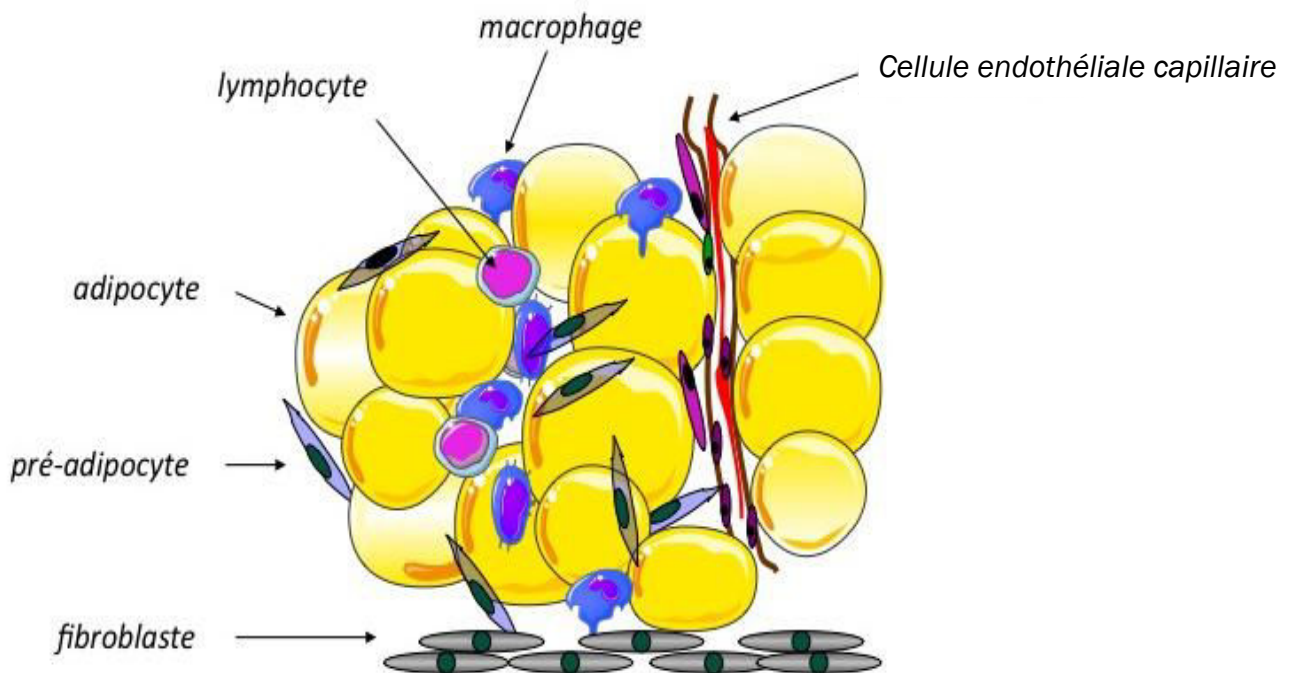


Figure 6 : Le tissu adipeux est un tissu hétérogène.

Il est composé de plusieurs types cellulaires : des fibroblastes, des pré-adipocytes, des adipocytes, des lymphocytes, des macrophages, et des cellules endothéliales capillaires

I.7.1 La fraction stroma-vasculaire

La FSV est constituée de pré-adipocytes, de lymphocytes, de mastocytes, de granulocytes, de fibroblastes, de cellules endothéliales capillaires et de monocytes/macrophages. Cette fraction est capable de produire des niveaux plus élevés de TNF- α et d'IL-6 que les adipocytes. L'intérêt se porte particulièrement sur les macrophages qui, dans les cas d'obésité, infiltrerent le TAB chez l'Homme comme chez le rongeur (**Clément et al., 2004**). Les macrophages sont plus présents au sein du TAB profond qu'au niveau sous-cutané (**Lafontan, 2006**). Cette infiltration macrophagique aurait pour conséquence des modifications au niveau métabolique engendrant une insulino-résistance.

I.7.2 La fraction adipocytaire : adipocyte blanc et adipocyte brun

Les adipocytes du TAB sont uniloculaires (**Tableau 3**). Leur unique vacuole lipidique occupant plus de 95% du volume cellulaire, le noyau et le cytoplasme sont repoussés vers la périphérie de l'adipocyte contre la membrane plasmique (**Tableau 3**). Selon le dépôt du TA, la taille de l'adipocyte varie de 30 à 70 μm mais augmente jusqu'à 200 μm dans certaines pathologies telles que l'obésité (**Tableau 3**). Les adipocytes blancs contiennent peu de mitochondries à l'inverse des adipocytes bruns (**Tableau 3**). Les mitochondries des adipocytes bruns sont indispensables à la fonction thermogénique du TABr et caractérisent une activité respiratoire importante (**Carrière et al., 2013**). Ces adipocytes multiloculaires de plus petites tailles (20 à 40 μm) que leurs homologues blancs peuvent être retrouvés au sein du TAB (**Tableau 3**). Leur rôle au sein du TAB n'est pas encore déterminé. Les deux types d'adipocytes auraient des origines développementales différentes (**Carrière et al., 2013, 2014**).



Caractéristiques	Tissu adipeux Blanc	Tissu adipeux Brun
Localisation	Sous-cutanée Viscéral	Inter-scapulaire Para-vertébrale Péri-aortique Médiastinal Péri-rénal Creux axillaires
Fonctions principales	Stockage	Thermogénèse
Morphologie	30-200 μm Grosse gouttelette unique Noyau en périphérie	15-60 μm Multiples gouttelettes Noyau central Riche en mitochondries
Marqueurs moléculaires	Leptine	UCP1

Tableau 3 : Caractéristiques des adipocytes blancs et des adipocytes bruns.

L'adipocyte blanc dériverait de précurseurs mésodermiques communs aux cellules endothéliales, alors que l'adipocyte brun dériverait de précurseurs myogéniques qui exprimeraient le facteur de transcription *myogenic factor 5* (Myf5) (**Figure 7**) (**Carrière et al., 2013**). Ainsi l'adipocyte brun a de fortes homologues avec la cellule musculaire (**Timmons et al., 2007**). Le co-activateur *PR domain containing 16* (PRDM16) permettrait l'orientation de la différenciation en adipocyte brun et limite celle en myoblaste (**Seale et al., 2008**). Il induit ainsi l'expression de PGC-1 α et de la protéine UCP1. PGC-1 α est un co-activateur transcriptionnel essentiel pour la thermogénèse adaptative (induite par le froid) (**Puigserver et al., 1998; Langin, 2010**). PGC-1 α active PRDM16 et PPAR γ et supprime l'expression de marqueurs sélectifs des cellules adipeuses blanches (**Figure 7**) (**Seale et al., 2007, 2008**). Parmi les facteurs qui déterminent le devenir des précurseurs des cellules brunes, il y a la *bone morphogenetic protein 7* (BMP7) (**Tseng et al., 2008**). Les souris déficientes en BMP7 ont un déficit de développement de leur TABr. Après un traitement chronique avec un agoniste β 3-adrénergique, on observe des adipocytes bruns au sein des dépôts de TAB

mais ceux-ci ne sont pas dérivés de cellules exprimant Myf5 (**Figure 7**) (**Seale et al., 2008**). En outre, Kozak et coll ont montré que les adipocytes bruns dans le TAB et le TABr interscapulaire ont un contrôle génétique distinct (**Xue et al., 2007**). Ces données suggèrent que dans le TAB, une population de cellules ne dérivant pas de la lignée Myf5 et potentiellement liée à la lignée blanche donne naissance à des cellules brunes fonctionnelles. Plusieurs études suggèrent l'importance du TABr pour protéger contre la prise de poids et le développement du syndrome métabolique (**Almind et al., 2007**).

I.7.3 Le *browning* et adipocyte « BRITE »

Au sein du TAB on retrouve des adipocytes multiloculaires exprimant UCP1. Certaines conditions comme l'exposition au froid conditionnent le nombre de ces adipocytes (**Cousin et al., 1992**). Ces adipocytes sont appelés adipocytes « BRITE » pour « brown-in-white » ou beige. Selon les travaux de Spiegelman et coll. en 2012, ces adipocytes BRITE sont à distinguer des adipocytes bruns (**Wu et al., 2012a**). Ces deux types d'adipocytes dériveraient des mêmes précurseurs que leurs homologues blancs. Ils expriment des marqueurs particuliers tels que CD137 et la protéine transmembranaire *transmembrane protein 26* (TMEM26) (**Wu et al., 2012a**) (**Figure 7**). Seuls 25% des adipocytes BRITE seraient issus directement des précurseurs, ceci suscite l'idée d'un mécanisme de conversion entre adipocyte blanc et adipocyte brun ou BRITE (**Figure 7**) (**Lee et al., 2012; Tran et al., 2012**). Le TAB rétro-péritonéal de rats adultes ne contient que des adipocytes blancs (**Langin, 2010**). Cependant, le traitement avec un agoniste β 3-adrénergique, pendant une semaine, augmente la présence d'adipocytes BRITE au sein du TAB rétro-péritonéal (**Langin, 2010**). Néanmoins, cette augmentation n'est pas liée à une augmentation du nombre de précurseurs. Ainsi, il y a eu une conversion du phénotype blanc vers un phénotype BRITE (**Figure 7**). Cette conversion serait la conséquence d'une augmentation de l'expression de PGC-1 α (**Larrouy et al., 1999; Tiraby and Langin, 2003; Mazzucotelli et al., 2007**). PGC-1 α active UCP1, la phosphorylation oxydative, le cycle de

KREBS ainsi que les enzymes impliquées dans l'oxydation des AGNE. De plus, PGC-1 α peut activer la GyK, enzyme qui permet la phosphorylation du glycérol en G3P. L'augmentation de cette enzyme, peu exprimée dans le TAB ou le TABr, permet de recycler le glycérol et favorise la ré-estérification des AGNE en TG (**Langin, 2010**). Ces mécanismes limitent la libération des AGNE par le TAB, et participent à la modification bénéfique du métabolisme. De plus, PPAR α est induit par PGC-1 α . Les études du laboratoire de Dominique Langin montrent que le récepteur nucléaire PPAR α est plus exprimé dans le TABr que dans le TAB. L'activation de PPAR α a la capacité d'induire l'expression de GyK et de stimuler l'oxydation des AGNE indépendamment de l'action de PGC-1 α (**Mazzucotelli et al., 2007**). Ces effets ne sont pas observés avec un agoniste PPAR γ suggérant un rôle spécifique de PPAR α dans les cellules adipeuses humaines (**Langin, 2010**). Unger et coll. ont montré que l'hyperleptinémie chez le rat entraîne la disparition quasi complète du TAB en une semaine (**Chen et al., 1996**). Ils observent une conversion du phénotype blanc en phénotype brun. Au sein de ces adipocytes, l'induction de PPAR α est un médiateur de l'action de la leptine chez ces rats (**Zhou et al., 1999; Lee et al., 2002**). De plus, chez la souris traitée avec un agoniste β 3-adrénergique, il a été montré que PPAR α stimule le brunissement ou browning du TAB (**Li et al., 2005**).

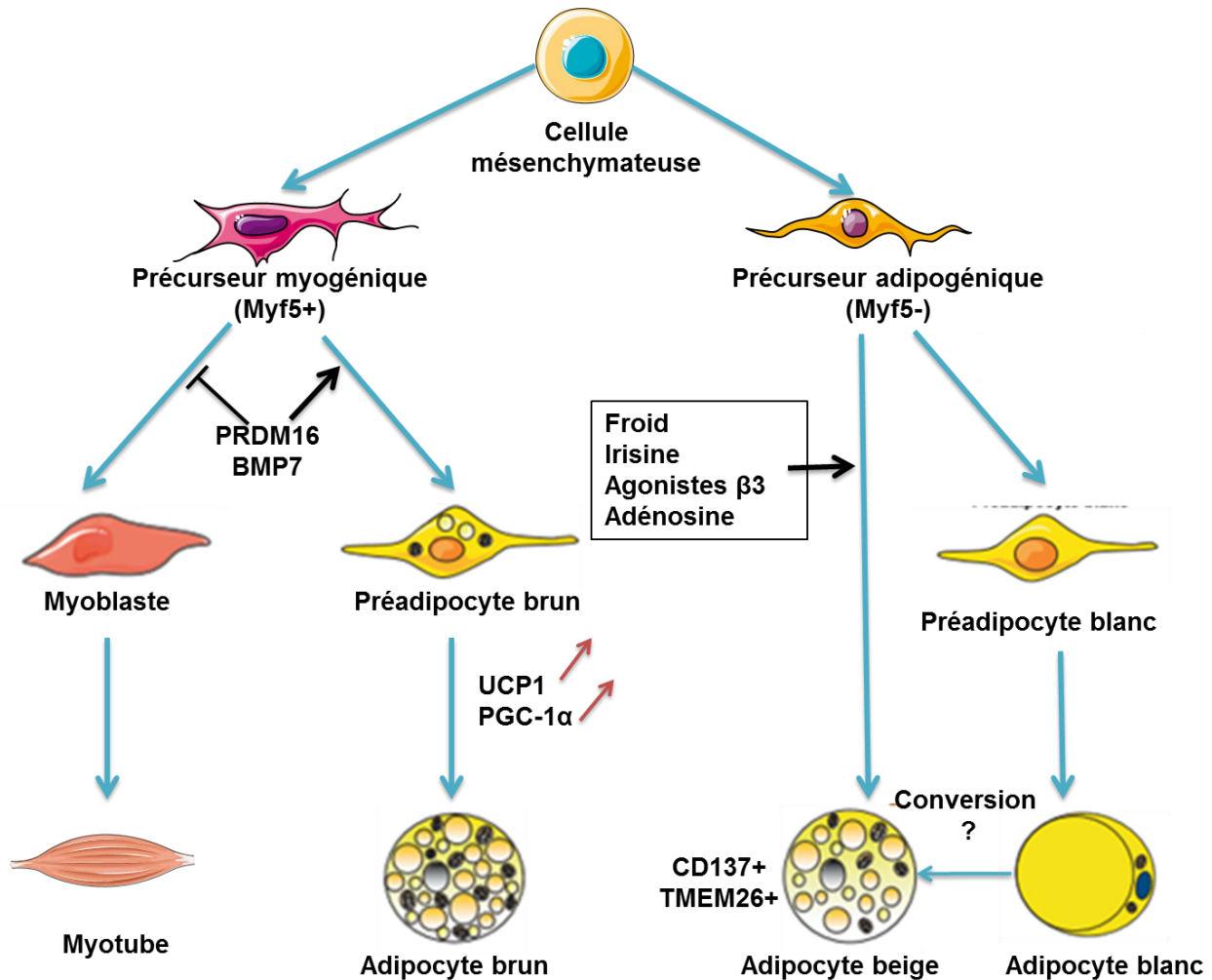


Figure 7 : Origines des adipocytes blancs et bruns.

Les cellules progénitrices des adipocytes sont issues du mésoderme et peuvent se différencier en cellule exprimant Myf5 ou non. Les progéniteurs Myf5- peuvent se différencier en adipocytes blancs et sous l'influence de certains stimuli en adipocytes beiges (cellule brune dispersée au sein des dépôts blancs). Ces derniers expriment des marqueurs particuliers tels que CD137 et la protéine transmembranaire *transmembrane protein 26* (TMEM26). Les cellules progénitrices Myf5+ peuvent se différencier en adipocytes bruns ou en myoblastes. Les régulateurs coactivateur *PR domain containing 16* (PRDM16) et la protéine morphogénétique osseuse 7 (BMP7) permettent l'orientation de la différenciation en adipocyte brun (→) et limitent celle en myoblaste (—|).

Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1α (PGC-1α) est essentiel pour la différenciation en adipocyte brun. Uncoupling protein 1 (UCP1) est spécifique des adipocytes bruns. D'après Kuhn 2012.

I.7.4 Les perspectives thérapeutiques du browning

Des souris transgéniques exprimant UCP1 dans le TAB sont protégées contre l'obésité génétique et alimentaire, et leur TAB consomme plus d'oxygène. Le brunissement pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Par analogie, les agents sympathomimétiques ciblant sélectivement le TAB pourraient être de bons candidats. Cependant, jusqu'à présent, les traitements par agonistes des récepteurs β 3-adrénrgiques ont été un échec chez l'homme (**Langin, 2006**). L'exposition au froid pourrait être efficace.... Une autre stratégie consisterait à augmenter l'expression de PRDM16 dans les pré-adipocytes blancs pour promouvoir la différenciation vers un phénotype brun. Cependant, son rôle de régulateur transcriptionnel au cours de l'embryogenèse doit être établie car son inactivation chez la souris est délétère (**Seale et al., 2008**). BMP7 peut être considéré comme un agent thérapeutique induisant la différenciation des adipocytes bruns. Cependant, il est impliqué aussi dans l'angiogenèse et la formation osseuse. Ainsi, PGC-1 α et PPAR α deviennent des candidats d'intérêt pour promouvoir le brunissement du TAB.

II. Dérégulations du tissu adipeux

II.1. Obésité, vieillissement

II.1.1 Obésité

II.1.1.1 Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le surpoids et l'obésité se définissent comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé ». L'IMC est un moyen d'évaluer l'obésité. Un individu est en surpoids si son IMC est supérieur à 25 kg.m^{-2} et obèse si cet indice dépasse 30 kg.m^{-2} . L'OMS qualifie l'obésité comme une épidémie. Le surpoids et l'obésité constituent un risque majeur dans le développement de certaines pathologies, parmi lesquelles le diabète, les maladies cardiovasculaires, le développement arthrosique et le cancer.

II.1.2 Etiologie de l'obésité

L'obésité est une pathologie dont les origines sont multifactorielles. Elle résulte à la fois d'un déséquilibre de l'homéostasie énergétique qui est en faveur du stockage de l'énergie au sein du TAB, processus aggravé par des polymorphismes génétiques. En effet, des facteurs biologiques, des prédispositions génétiques, des facteurs comportementaux et environnementaux influencent ce déséquilibre.

II.1.2.1 Bases génétiques de l'obésité

L'obésité est fortement influencée par la génétique. Les études de jumeaux entre les années 1980 et 1990 suggèrent que 40-70% de la variation du poids corporel est due à des facteurs génétiques (**Farooqi and O'Rahilly, 2000**). Il existe des mutations monogéniques comme par exemple liées au gène de la leptine. Cependant, les cas d'obésité d'origine monogénique sont rares.

A l'avenir, l'identification des gènes devrait permettre de mieux établir l'étiologie de l'obésité et des complications qui en découlent. Même si la part acquise est vraisemblablement prépondérante, des stratégies à la fois de prévention et de traitement pourraient ainsi permettre aux cliniciens de s'adapter au profil génétique de l'individu.

II.1.2.2 Environnement

II.1.2.2.1 Facteurs nutritionnels

La modification de notre mode de vie, notamment la sédentarisation de plus en plus importante et l'augmentation de la consommation d'aliments riches en sucres ou en lipides a pour conséquence une évolution croissante le développement de l'obésité. Selon l'étude Obépi 2012, le statut socio-professionnel, par ses répercussions sur la qualité des aliments et la pratique d'activités sportives, est aussi un facteur déterminant dans l'apparition de l'obésité. L'obésité peut être décrite dans ce cas comme une «maladie de société».

II.1.2.2.2 Influence de l'écosystème

Depuis les années 50, l'Homme évolue dans un écosystème pollué par des substances dites « obésogènes ». Ces dernières années, les études épidémiologiques montrent le lien entre exposition aux polluants et IMC ou d'autres perturbations du TAB. Un certain nombre de pesticides tels que les polluants organiques persistants (POP), les organophosphorés et

l'atrazine mais également le bisphénol A (BPA), les phtalates présents dans les matières plastiques des contenants alimentaires sont des perturbateurs endocriniens qui s'accumulent dans le TA au fil du temps. Les études *in vivo* et *in vitro* démontrent que ces perturbateurs endocriniens ont un impact sur le métabolisme glucido-lipidique. Ainsi, les POP stockés dans le TAB agissent sur la sécrétion d'insuline et l'adipogenèse (**Dirinck et al., 2011; Myre and Imbeault, 2014**). Les études chez l'animal montrent qu'une exposition *in utero*, ou pendant la lactation, au BPA ou aux phtalates perturbe la sécrétion d'insuline. Enfin, les métaux lourds comme le mercure, l'arsenic, le cadmium ou les particules fines (PM 2,5) augmentent le stress oxydant qui agit directement sur le métabolisme glucido-lipidique. On caractérise ces polluants d'« obésogènes » pour rendre compte de leurs effets sur le métabolisme (**Tang-Péronard et al., 2011**). En cas d'amaigrissement, ces substances peuvent être libérées dans la circulation et avoir des conséquences sur le métabolisme des différents organes notamment foie et cerveau.

II.2. Surpoids et Obésité : physiopathologie

II.2.1 Inflammation, perturbations métaboliques et endocriniennes

En 1993, Hotamisligil et coll démontrent que le TNF- α sécrété par l'adipocyte joue un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance chez le sujet obèse (**Hotamisligil et al., 1993**). En 2003, deux études montrent que l'obésité induit une infiltration de macrophages dans le TAB chez la souris comme chez l'Homme (**Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003**). Il existe deux types de macrophages, les macrophages M1 et les macrophages M2. Les M1 sont pro-inflammatoires, sécrètent des cytokines telles que TNF- α , IL-6, et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et du NO via NOS II causant l'insulino-résistance (**Gordon, 2003**). A l'inverse, les M2 produisent des cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10. L'obésité favorise la prolifération des macrophages M1 au sein du TAB (**Lumeng et al., 2007**). La diminution du nombre de macrophages M2 contribue également à

la détérioration du métabolisme adipocytaire chez le sujet obèse. En effet, les M2 sont connus pour produire des catécholamines qui favorisent à la fois la thermogenèse et la lipolyse (**Kosteli et al., 2010; Nguyen et al., 2011**). Il existe plusieurs mécanismes expliquant cette augmentation de l'infiltration macrophagique au cours de l'obésité. Lors de l'expansion du TAB, une hypoxie se développe provoquant la sécrétion de molécules angiogéniques. Ainsi, les macrophages sont recrutés au niveau du TAB pour permettre un processus de vascularisation (**Pang et al., 2008**). D'autres études sur le TAB de souris et ou de biopsie humaine suggèrent que les macrophages infiltrent le TAB en remplacement des cellules nécrotiques (**Cinti et al., 2005; Strissel et al., 2007**).

II.2.2 Diabète de type II

Près de 80% des diabétiques sont obèses (**Mokdad et al., 2000**). Les liens entre obésité et diabète sont très forts (**Fève et al., 2006**). En effet, une personne obèse a un risque 20 fois plus élevé de développer un DT2 (**Field et al., 2001**). En cas d'obésité, la libération accrue d'AGNE dans la circulation sanguine sont relayés au foie et au pancréas. Une exposition chronique des îlots de Langerhans à des concentrations élevées en AGNE, comme c'est le cas chez les diabétiques de type 2, induit une accumulation des TG dans les cellules β conduisant à une inhibition de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (**Girard, 2003**). L'accumulation des TG dans les îlots de Langerhans provoquerait un excès de palmitoyl-CoA qui en se condensant à la sérine formerait un céramide. Cette augmentation de la synthèse de céramide stimulerait la production de NO, et le déclenchement de l'apoptose par inhibition de la chaîne respiratoire (**Shulman, 2000**). Les AGNE sont impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans et servent de molécules de signalisation contrôlant l'expression de gènes (**Girard, 2000**). Ainsi, le développement excessif du TAV est responsable d'une hyperinsulinémie et d'une insulino-résistance en liaison avec une activité lipolytique plus active du TAV que du TASC. D'autre

part, les AGNE agissent localement sur les macrophages du TAV favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires (**Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003**). Les études de Hotamisligil et coll. en 1993, montrent un lien entre TNF- α et le développement de l'insulino-résistance (**Hotamisligil et al., 1993**). Il montre chez des rats obèses que la neutralisation de TNF- α par des anticorps entraîne une diminution de la glycémie et de l'insulinémie, suggérant une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez ces animaux. D'autres études, démontrent que les souris TNF- α $-/-$ sont partiellement protégées contre le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (**Uysal et al., 1997**).

II.2.3 Maladies cardiovasculaires

L'état inflammatoire systémique dû à l'augmentation de la masse adipeuse pourrait expliquer le lien entre obésité et maladie cardiovasculaire (**Janand-Delenne et al., 1998; Lemieux et al., 2001; Lafontan, 2006; Cartier et al., 2009a, 2009b; Tchernof and Després, 2013**). L'obésité viscérale a été identifiée comme un corrélat important entre perturbations métaboliques et maladies cardiovasculaires (**Kissebah et al., 1989**). À cet égard, plusieurs études ont rapporté des résultats contradictoires. Certaines études ont montré une relation linéaire entre l'IMC et le risque cardiovasculaire, tandis que d'autres n'ont pas réussi à trouver une association significative (**Lapidus et al., 1984; Larsson et al., 1992; Wannamethee et al., 1998; Wilson et al., 2002; Stevens et al., 2008**). L'obésité viscérale est augmentée chez les patients atteints de cardiopathies congénitales par rapport aux sujets asymptomatiques de maladie coronarienne (**Nakamura et al., 1994; Mahabadi et al., 2009**). Les résultats suggèrent que l'excès de TAV peut être un facteur prédictif de l'augmentation de maladies coronariennes ou cardiovasculaires (**Nakamura et al., 1994; Mahabadi et al., 2009**).

II.2.4 Problèmes ostéo-articulaires

L'obésité est un important facteur de risque pour l'arthrose dans les articulations portantes particulièrement la hanche et le genou, mais aussi dans les articulations de la main. Bien entendu des contraintes biomécaniques peuvent expliquer en partie ce risque d'arthrose pour les articulations portantes. Les perturbations métaboliques de l'obésité influencent aussi le développement de l'arthrose. Récemment, il a été montré que le fluide synovial à partir de patients atteints d'arthrose contient des concentrations de leptine qui sont similaires ou supérieures à celles mesurées dans le sérum et corrélées à l'IMC du sujet (**Dumond et al., 2003; Presle et al., 2006; Simopoulou et al., 2007**). *In vitro*, sur des chondrocytes primaires humains, la leptine, la résistine et la visfatine augmentent la synthèse d'IL-6, TNF- α . Des études plus récentes montrent que ces deux cytokines, IL-6 et TNF- α , peuvent accroître le risque l'arthrose (**Goldring and Goldring, 2004; Järvinen et al., 2008; Poonpet, 2014**). D'autre part, la production de NO par les NOS II dans les chondrocytes, augmentée en cas d'obésité, est un médiateur de la destruction du cartilage (**Otero et al., 2003, 2005; Vuolteenaho et al., 2007**). A l'inverse, des études montrent que l'augmentation du TAB pourrait avoir un effet protecteur contre le développement de l'ostéoporose (**Albala et al., 1996; Peng et al., 2014**).

II.2.5 Cancers

Il existe une association significative entre l'IMC et le risque accru de plusieurs cancers (**Pischon et al., 2008; Basen-Engquist and Chang, 2011**). Les études épidémiologiques montrent qu'il existe un risque de cancers du côlon, du sein, de l'endomètre, du rein, de l'œsophage, du foie, du pancréas ainsi que de lymphome non-hodgkinien et de myélome chez les personnes obèses (**Pischon et al., 2008; Basen-Engquist and Chang, 2011**). La perte de poids par intervention chirurgicale semble inverser cette tendance et réduire le risque de cancer (**Basen-Engquist and Chang, 2011**). L'obésité, particulièrement l'obésité

viscérale, est spécifiquement associée au risque de cancer. Un certain nombre d'études, dont une méta-analyse soutient l'idée que l'obésité viscérale augmente spécifiquement le risque de cancer colorectal indépendamment de l'adiposité totale (**Larsson and Wolk, 2007; Tsang et al., 2009; Yamamoto et al., 2010; Kang et al., 2010**). L'accumulation de TAV semble également provoquer une réponse plus faible à la chimiothérapie et augmente le risque de complications à la suite d'une intervention chirurgicale (**Nitori et al., 2009; Guiu et al., 2010**). L'obésité abdominale semble liée à un risque accru de cancer du sein à la fois pré- et post-ménopausique (**Schapira et al., 1994; Rose et al., 2007; Vona-Davis et al., 2007**), de risque de cancer de la prostate (**von Hafe et al., 2004**), et de cancer de l'œsophage (**Ryan et al., 2011**). Un grand nombre d'études sont actuellement réalisées pour expliquer le lien potentiel entre cancer et obésité / obésité viscérale (**Basen-Engquist and Chang, 2011**). Les mécanismes impliqués associent une augmentation des facteurs de croissance tels que l'insuline et l'*insulin-like growth factor* (IGF-1), l'augmentation des hormones stéroïdes sexuelles comme l'œstrogène et l'altération du niveau de certaines adipokines telles que la leptine, l'adiponectine et la visfatine. L'inflammation et le stress oxydant sont aussi des acteurs importants dans le développement du risque de cancer chez le sujet obèse (**Tchernof and Després, 2013**). Il existe également une relation mécanistique importante entre DT2 et cancer. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans l'apparition et/ou la prolifération des cellules cancéreuses dans le diabète. L'insuline semble avoir un rôle central comme IGF-1. En outre, l'hyperglycémie pourrait aussi favoriser le développement tumoral car elle va jouer un rôle dans l'activité métabolique de la cellule notamment dans le transport du glucose. L'état pro-inflammatoire, notamment l'augmentation du TNF- α , présent chez les diabétiques freine l'action des agents antioxydants intracellulaires favorisant la carcinogenèse via la stimulation de la voie NF- κ B (**Berger, 2014; Szlosarek et al., 2006**). L'obésité est associée à une augmentation anormale de l'expression de l'enzyme aromatasase dans le sein donc à une augmentation de la sécrétion locale d'œstrogènes, ainsi qu'à une prédisposition à l'hyperplasie mammaire et au cancer. A la ménopause, l'adiposité chez la femme est augmentée et relayerait des voies de

signalisation induisant l'expression de l'aromatase mammaire. L'augmentation de production de TNF- α et d'IL-6 observée lors de l'obésité au sein du TAB stimulerait le promoteur de l'aromatase (**Brown and Simpson, 2012; Bulun et al., 2012; Simpson and Brown, 2013**). D'autres études sont nécessaires pour clarifier l'étiologie du cancer lié à l'obésité viscérale.

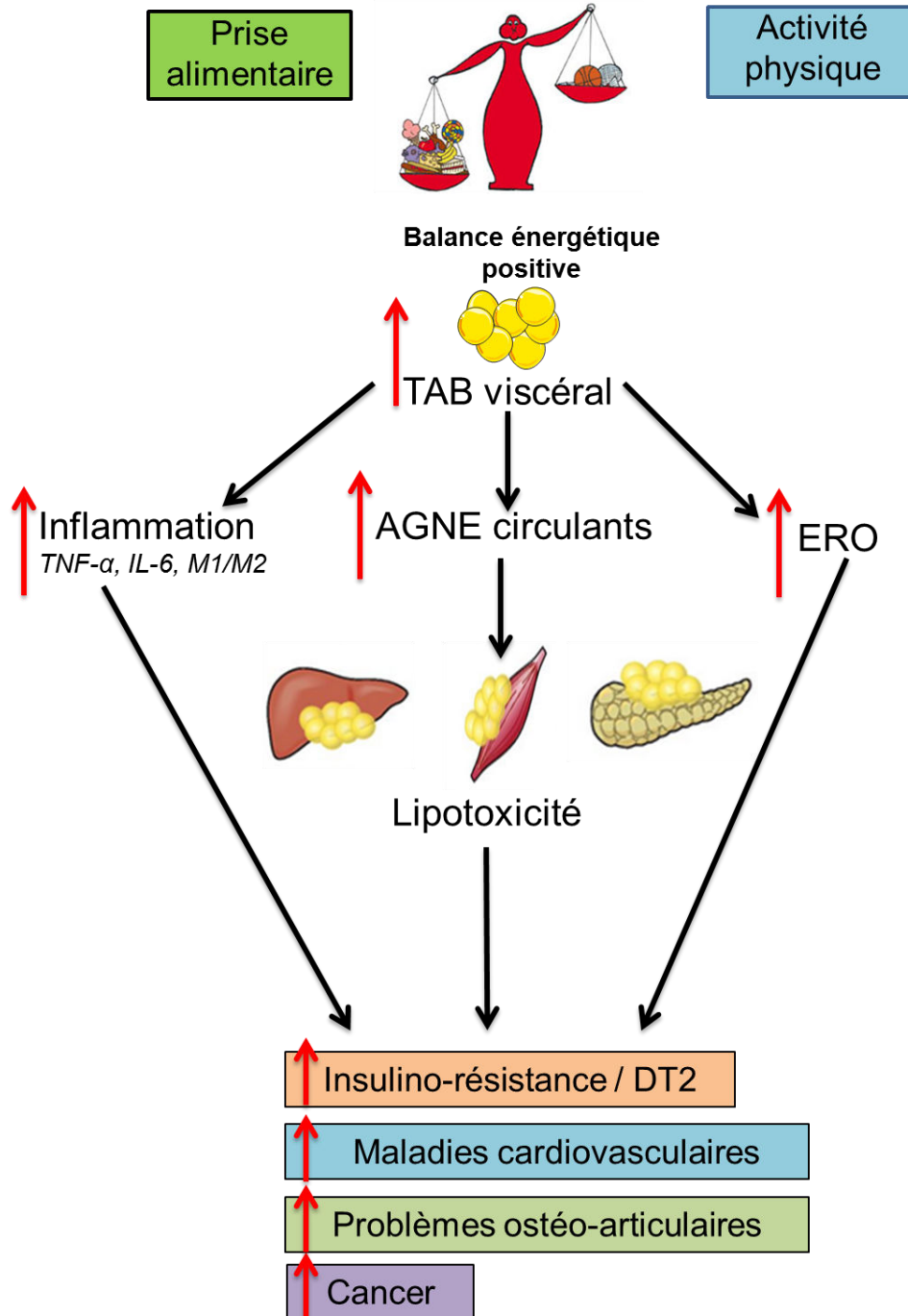


Figure 8 : Conséquences de l'obésité.

L'obésité peut être due notamment à un déséquilibre alimentaire et une diminution de l'activité physique. Ce déséquilibre amène à une balance énergétique positive. L'augmentation du tissu adipeux blanc viscéral qui en découle provoque l'installation d'une inflammation chronique (productions accrues de cytokines pro-inflammatoire : tumor necrosis factor α ($TNF-\alpha$), Interleukine-6 (IL-6) et augmentation du rapport du nombre de macrophages M1 (pro-inflammatoires) sur le nombre de macrophages M2 (anti-inflammatoires). D'autre part, l'augmentation de la masse adipeuse provoque une augmentation des acides gras non-estérifiés (AGNE) circulants provoquant une lipotoxicité pour le foie, le pancréas et le muscle notamment. De plus, au cours de l'obésité, il y a augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces trois facteurs contribuent au développement de maladies telles que l'insulino-résistance, le diabète de type 2 (DT2), les maladies cardiovasculaires, les problèmes ostéo-articulaires ou encore le cancer.

II.3. Cas particulier : le vieillissement et l'obésité sarcopénique.

Au sein des pays industrialisés, les études épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation parallèle du nombre de personnes âgées et de la prévalence de l'obésité. Au cours du vieillissement, la perte de la masse musculaire peut être associée à l'obésité et définit le concept d'obésité sarcopénique. Ceci fait le lien entre perturbation du métabolisme musculaire au cours du vieillissement et obésité. Il est important de souligner que la prévalence de l'obésité est plus importante chez le sujet âgé que dans la population générale. La proportion de personnes obèses chez les plus de 65 ans est plus importante (18,7%) que dans la population des 18-24 ans (5,4%). Elle est comparable chez les hommes (19%) et les femmes (18,4%) (**Étude Obépi Roche 2012**) Cependant le surpoids est plus fréquent chez l'homme puisque 51% en souffre contre 34% des femmes seulement (**Diouf et al., 2010**). Au niveau physiopathologique, les personnes âgées obèses cumulent les altérations dues au vieillissement et à l'obésité.

II.3.1 Définition du vieillissement

Le vieillissement est caractérisé par une perte progressive des fonctions métaboliques de l'organisme. Cette diminution d'aptitude à assurer ses fonctions biologiques peut aboutir à augmenter sa vulnérabilité et conduire à la mort. D'un point de vue général, cette altération est importante dans des situations qui font intervenir les réserves fonctionnelles de l'organisme telles que le stress, les maladies aiguës et l'effort physique. De plus, au cours du vieillissement, la composition corporelle peut être altérée. Dans ce cas, le poids de l'organisme n'est pas modifié mais la masse adipeuse augmente au détriment de la masse musculaire. La personne âgée est également sujette à une modification de la répartition du TAB. Comme détaillé plus loin, la masse adipeuse viscérale augmente alors que celle située au niveau sous-cutané diminue. Ceci a des conséquences importantes au niveau physiologique. Les facteurs biologiques intervenant dans le processus de vieillissement sont

multifactoriels et complexes. Le rôle important des facteurs génétiques et des altérations au niveau cellulaire causées par des systèmes de protections contre l'oxydation moins efficaces ou encore des dysfonctionnements métaboliques sont depuis longtemps reconnus. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux voies métaboliques qui sont modifiées à la fois par l'âge et par la prise de poids (**López-Otín et al., 2013**).

II.3.2 Vieillesse et sarcopénie

Au cours du vieillissement, une diminution de la masse et de la fonction musculaire ou sarcopénie est couramment observée (**Prentice and Jebb, 2001**). La sarcopénie vient du grec *sarco*, chair, et *pénie*, disparition. La sarcopénie est due à une diminution des apports en protéines et de la synthèse protéique intramusculaire en association avec une moindre activité physique (**Chung et al., 2013**). La perte de masse et de fonction musculaire qui a lieu au cours du vieillissement se produit même chez les individus sains de poids stables (**Delmonico et al., 2007**). De nombreuses études montrent soit sur modèle cellulaire soit sur modèle murin que des changements hormonaux (testostérone, myostatine, hormone de croissance), une augmentation de l'inflammation chronique (TNF- α et IL-6), une mauvaise nutrition ainsi qu'une inactivité physique sont autant de mécanismes sous-jacents ayant un rôle dans la perte musculaire chez la personne âgée (**Visser et al., 2002; Szulc et al., 2004; Dreyer and Volpi, 2005; Nair, 2005; Solomon and Bouloux, 2006**). La perte progressive de muscle contribue au déclin de la force et des performances musculaires. La masse adipeuse quant à elle augmente au détriment de la masse musculaire chez la personne âgée. La perte de la masse musculaire peut être associée à une augmentation de masse adipeuse de sorte que, malgré un IMC normal, il y a une augmentation du % de masse adipeuse par rapport au poids total de l'individu, condition appelée obésité sarcopénique. L'obésité et la sarcopénie peuvent se potentialiser et augmenter la morbidité et la mortalité des personnes âgées (**Zamboni et al., 2008; Lim et al., 2010**).

Les causes de la sarcopénie restent mal connues. Cependant, la limitation des apports en protéines et la moindre biodisponibilité systémique des acides aminés pourraient expliquer ce phénomène. En effet, l'utilisation des acides aminés par l'aire splanchnique (foie et tube digestif) est augmentée avec l'âge (**Jourdan et al., 2008**). A cette séquestration s'ajouterait une diminution de la réponse anabolique du muscle. Cette diminution de synthèse protéique pourrait être le fait d'une augmentation des facteurs cataboliques tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) en lien avec une diminution de facteurs anaboliques comme l'insuline ou les androgènes (**Cynober et al., 2004**). Les conséquences de la sarcopénie sont multiples et entraînent une diminution de la qualité de vie.

La sarcopénie est souvent associée à une augmentation de la masse adipeuse au cours du vieillissement. L'augmentation de l'adiposité chez les personnes âgées peut être indépendante du changement de poids corporel en raison de la perte de la masse musculaire.

II.3.3 Obésité sarcopénique

Chez la personne âgée, la consommation excessive d'énergie, l'inactivité physique, l'inflammation chronique et la résistance à l'insuline peuvent conduire au développement de l'obésité sarcopénique (**Corcoran et al., 2007; Bijlsma et al., 2013**). Les changements hormonaux ont un rôle majeur dans la prise de poids. Le métabolisme lipidique est altéré après la ménopause, un phénomène vraisemblablement lié à la baisse de sécrétion d'œstrogène et de progestérone. Une étude longitudinale de Hughes en 2004 (**Hughes et al., 2004**), confirmée par celle de Fantin et coll. en 2007 (**Fantin et al., 2007**), sur des hommes et femmes de 60 ans et plus, montre que l'adiposité des sujets augmente indépendamment du sexe.

De plus, il a été montré que le vieillissement est associé à une modification de la répartition de la masse adipeuse : une augmentation au niveau viscéral et une diminution au niveau

sous-cutané. Au niveau cellulaire, la capacité des pré-adipocytes à devenir fonctionnels et matures décroît avec l'âge (**Cartwright et al., 2007**). L'augmentation des AGNE plasmatiques pouvant être observable chez la personne âgée peut être due à une diminution de l'activité de la LPL et/ou une augmentation de la lipolyse du TAB. Ils sont captés par des organes non adipeux comme le muscle ou le foie dont le profil oxydatif important augmente le captage de ces AG et leur stockage sous forme de TG de manière ectopique. L'accumulation des TG dans les îlots de Langerhans provoquerait un excès de palmitoyl-CoA qui en se condensant à la sérine formerait un céramide. Cette augmentation de la synthèse de céramide stimulerait la production de NO, et le déclenchement de l'apoptose par inhibition de la chaîne respiratoire (**Shulman, 2000**). Ce stockage provoque une lipotoxicité affectant le fonctionnement de ces organes (**Tchkonia et al., 2006**). En particulier, sont affectés le foie qui accumule des dépôts ectopiques avec l'âge et l'obésité ainsi que le pancréas avec pour conséquence une augmentation du risque de développement du DT2 (**Lee et al., 1994; Nolan et al., 2006; Saisho et al., 2007**) et du syndrome métabolique (**Zamboni et al., 2013**). Au cours du vieillissement apparaît donc une dérégulation du métabolisme lipidique au niveau sous-cutané expliquant en partie non seulement l'augmentation de la masse adipeuse viscérale mais également les dépôts ectopiques au sein d'organes tels que le muscle, le foie, le pancréas, le muscle cardiaque (**Després and Lemieux, 2006; Rossi et al., 2011**). Une étude appelée Health ABC de 2001 chez des personnes âgées de plus de 70 ans montre qu'en plus d'une redistribution, il existe des infiltrations adipeuses au sein du muscle directement corrélées à l'âge et à l'IMC (**Goodpaster et al., 2001**).

II.3.4 Vieillessement et tissu adipeux brun

Le volume et la fonctionnalité du TABr déclinent avec l'âge. Ainsi, la capacité de l'organisme à réguler la température corporelle diminue chez l'Homme comme chez le rongeur (**McDonald et al., 1988; Norman et al., 1985**). Cette altération de la thermogénèse résulte en une moindre tolérance au froid de la part des personnes âgées. Ainsi, les personnes âgées ont un TABr atrophié associé à une diminution de l'expression d'UCP1 (**Gabaldon et al., 1995; Yamashita et al., 1999**). Le contrôle de leur poids corporel est donc altéré favorisant l'expansion du TAB. Ce déclin de TABr avec l'âge est également influencé par le sexe, les femmes étant moins fortement touchées que les hommes (**Farmer, 2009; McDonald et al., 1989**). Cette altération du TABr s'explique en partie par un dysfonctionnement du système adrénergique lié au vieillissement (**Langin et al., 1995; Scarpace et al., 1996**).

Les expériences de Ueno et coll. en 1998 montrent les effets de l'âge sur l'activité du TABr chez des souris ob/ob. Il montre que les souris obèses âgées expriment moins la protéine UCP1 (**Ueno et al., 1998**). Ces résultats suggèrent que l'activité thermogénique est diminuée chez les souris obèses âgées. Ainsi l'âge et l'obésité sont tous deux des facteurs aggravant de la diminution du TABr.

II.3.5 L'obésité : un accélérateur du vieillissement

L'obésité est un catalyseur de certaines pathologies très fréquentes chez la personne âgée. L'étude de Kaplan et coll. en 2003 montre que les personnes âgées obèses ont une perte d'autonomie plus fréquente que leurs homologues normo-pondérés (**Kaplan et al., 2003**). Deux recherches longitudinales indiquent que l'obésité chez la personne âgée limite les activités de la vie quotidienne (**Jenkins, 2004; Reynolds et al., 2005**).

II.3.6 Vieillesse et inflammation

Le vieillissement est propice au développement de l'inflammation au sein même du TAB (**Franceschi et al., 2000**). Plusieurs études montrent qu'au cours du vieillissement les cytokines pro-inflammatoires augmentent chez la personne âgée saine (**Ballou et al., 1996; Cohen et al., 1997; Ershler et al., 1993; Fagiolo et al., 1993; Ferrucci et al., 2005; Wei et al., 1992**). La balance entre molécule pro et anti-inflammatoires est donc profondément modifiée et change le microenvironnement cellulaire (**Cevenini et al., 2013**). L'inflammation chronique a des conséquences sur la composition corporelle, la balance énergétique ou l'homéostasie énergétique.

Les origines de cette augmentation de l'inflammation chez la personne âgée sont multifactorielles (**Cevenini et al., 2010; Singh and Newman, 2011; Macaulay et al., 2013**). Le mécanisme exact de l'augmentation de l'inflammation observé au cours du vieillissement reste encore mal compris. Les mécanismes proposés comprennent l'augmentation de la masse adipeuse surtout viscérale ainsi que la diminution de la synthèse d'hormones sexuelles après la ménopause et l'andropause.

L'augmentation de la masse adipeuse viscérale qui peut survenir lors du vieillissement et de l'obésité, participe à cette modification du profil d'expression des cytokines par augmentation de l'infiltration par des macrophages et des lymphocytes T qui sont capables de produire une variété de molécules inflammatoires. En effet, avec l'âge, une modification du profil d'expression des adipokines produites par les adipocytes affecte les fonctions du TAB, diminue le nombre de pré adipocytes et favorise l'infiltration des macrophages (**Adamczak et al., 2005; Adamczak and Wiecek, 2013**).

D'autre part, le vieillissement s'accompagne d'une baisse des hormones sexuelles qui contribue également à l'élévation de marqueurs pro-inflammatoires. Des études suggèrent que les œstrogènes et la testostérone inhibent la sécrétion d'IL-6 (**Pottratz et al., 1994; Ray et al., 1994**). De nombreuses études documentent une augmentation de cytokines pro-

inflammatoires telles qu'IL-6 dès la ménopause (**Jilka et al., 1992; Passeri et al., 1993; Kania et al., 1995; Pfeilschifter et al., 2002; Lee et al., 2009**), montrant l'importance des œstrogènes dans la régulation de la synthèse d'IL-6. Par ailleurs, il existe une relation inverse entre les niveaux de testostérone et du récepteur soluble de l'IL-6, suggérant le développement d'un état pro-inflammatoire en lien avec la baisse des niveaux de testostérone (**Maggio et al., 2005, 2006**).

De plus, l'augmentation des dommages oxydatifs avec l'âge peut être un autre mécanisme conduisant à une augmentation de ces cytokines (**Sakamoto et al., 2003; Sawada et al., 1992; Williams et al., 2008**). L'état inflammatoire chronique observé au cours du vieillissement, peut s'expliquer en partie par la dérégulation de la fonction mitochondriale dont le mécanisme implique la voie NF- κ B. Les dommages oxydatifs associés à l'âge provoquent l'accumulation des ERO. Cette accumulation est préjudiciable pour les cellules de l'organisme et cause leur mort par autophagie (**Kregel and Zhang, 2007**). Ainsi, les ERO participent au développement de l'inflammation. L'étude de Gill en 2010 montre que les ERO activent les *toll-like receptor* (TLR) dans les cellules immunitaires (**Gill et al., 2010**). Les TLR sont exprimés de manière ubiquitaire et permettent une réponse inflammatoire via la synthèse de différentes cytokines telles que NOS II, TNF α et IL-6. Par exemple, il est connu que les AG saturés, comme le palmitate peuvent activer TLR4 et stimuler les réponses inflammatoires via NF- κ B (**Fessler et al., 2009**). La voie de signalisation NF- κ B active la production de cytokines inflammatoires telles qu'IL-6 ou TNF- α . Le vieillissement peut activer le système NF- κ B dans de nombreux tissus et donc augmenter l'inflammation responsable de diverses pathologies (**Adler et al., 2007; Helenius et al., 1996; Salminen et al., 2008**). L'activation de la signalisation de NF- κ B peut inhiber à son tour la respiration oxydative, il semble évident que l'inflammation et la signalisation de NF- κ B peuvent influencer le métabolisme énergétique et donc aggraver la pathologie dans le TAB et avoir des conséquences dans l'apparition de maladies métaboliques.

Cette voie fait donc l'objet de recherche pour réduire l'inflammation chez le sujet âgé. Les études chez la souris montrent que l'ablation de la sous unité IKK β (sous unité régulatrice positive de la voie NF- κ B) améliore la force musculaire et permet le maintien de la masse maigre tout en favorisant la régénération tissulaire (**Tang et al., 2010**). Plusieurs études chez la souris obèse indiquent que l'inhibition pharmacologique de cette même sous-unité prévient le développement de l'insulino-résistance et améliore la tolérance au glucose (**Huang et al., 2012; Reilly et al., 2013; Tamura et al., 2007**). D'autres études chez l'Homme montrent que l'inhibition pharmacologique de la sous unité IKK β s'oppose au développement du DT2.

Différents mécanismes contribuent donc à l'augmentation de l'inflammation au cours du vieillissement. Cependant, il est difficile de savoir si l'inflammation est une cause ou une conséquence des pathologies dont on l'incrimine. Il a été montré par différentes études que l'augmentation de cet état inflammatoire augmente le risque de certaines pathologies telles que l'obésité (**Caspersen et al., 2000**), le diabète (**Cowie et al., 2006; De Martinis et al., 2005**), les maladies cardiovasculaires (**Driver et al., 2008**), la maladie d'Alzheimer (**Kalaria et al., 2008**), l'arthrite (**Dagenais et al., 2009**) le syndrome métabolique, l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives et la sarcopénie (**Cevenini 2013**) qui peuvent à leur tour alimenter l'état inflammatoire déjà présent chez la personne âgée.

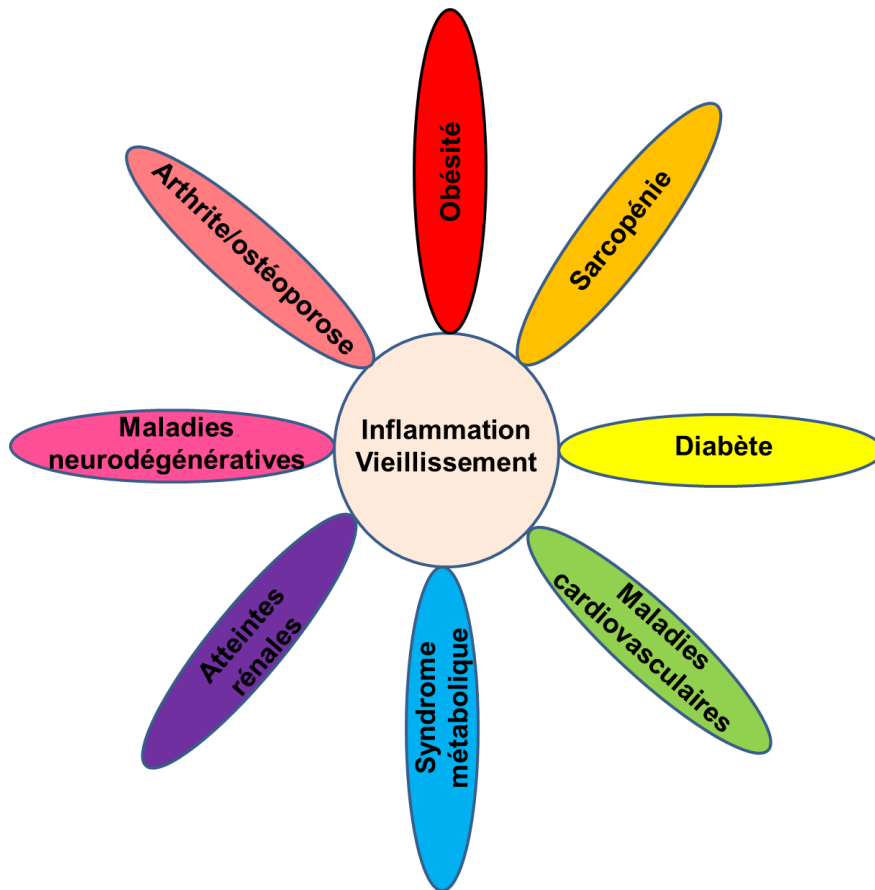


Figure 9 Conséquences physiopathologiques de l'inflammation au cours du vieillissement

Les cercles en couleur représentent chacun une pathologie associée à l'augmentation de l'inflammation au cours du vieillissement.

II.3.7 Mitochondries et vieillissement

II.3.7.1 La mitochondrie

La mitochondrie joue un rôle primordial dans le processus de vieillissement. Elle est à la fois une source importante de radicaux libres et en même temps la principale cible des dommages liés à l'oxygène.

La mitochondrie intervient dans divers processus métaboliques parmi lesquels on retrouve la dégradation des AG par la β -oxydation, l'utilisation du pyruvate issu de la glycolyse par le cycle de Krebs ainsi que la production d'énergie sous forme d'ATP lors de la phosphorylation oxydative (**Kusminski and Scherer, 2012**). La mitochondrie est un régulateur clé de l'activité métabolique de la cellule, et est également un organite important dans la production et la dégradation des radicaux libres. Les protéines mitochondriales sont produites à partir de gènes présents dans le génome nucléaire et dans le génome mitochondrial. Ce dernier code pour la plupart des protéines de la chaîne respiratoire. La biogenèse mitochondriale est le processus par lequel de nouvelles mitochondries sont formés dans la cellule (**Kusminski and Scherer, 2012**). L'augmentation de cette dernière permet de réguler à la hausse la capacité métabolique mitochondriale. La biogenèse mitochondriale est activée par le stress cellulaire ou en réponse à des stimuli hormonaux comme les catécholamines. Le principal régulateur de la biogenèse mitochondriale est le co-activateur PGC-1. Le facteur de transcription mitochondriale A (TFAM) est directement responsable de la transcription de protéines mitochondriales codée par le noyau. Au cours du vieillissement, toutes ces fonctions peuvent être perturbées et conduire à diverses maladies (**Austin and St-Pierre, 2012; Lee and Wei, 2012**).

II.3.7.2 La dysfonction mitochondriale

La dysfonction mitochondriale est un facteur contribuant au vieillissement. Ceci est basé sur le risque élevé de mutations de l'ADN mitochondrial (mtDNA). En effet, le mtDNA est

dépourvu d'histones et son système de réparation est moins efficace que celui de l'ADN nucléaire. Les études montrent que le niveau de risque de mutation du mtDNA est 15 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire (**Chistiakov et al., 2014**). En effet, l'accumulation des mutations dans le mtDNA peut atteindre un seuil critique et entraîner des effets délétères en particulier dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Des mutations dans le mtDNA peuvent modifier l'expression des enzymes de la phosphorylation oxydative conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial et une accélération de la production d'ERO (**Park and Larsson, 2011**). Ceci a pour conséquence de réduire la production d'ATP et d'altérer le transfert des électrons (**Woo et al., 2012**). La production d'ERO endommage également le mtDNA conduisant à un cercle vicieux et induit des dommages cellulaires (**Harman, 1965; Chistiakov et al., 2014**). En effet, cette complication mène à une augmentation du stress oxydatif qui provoque des dommages au sein des différents tissus de l'organisme notamment en oxydant les protéines mitochondriales ou les cardiolipines de la membrane interne de la mitochondrie ce qui augmente la fluidité membranaire de l'organite. En cas d'obésité ou de DT2, l'expression du mtDNA est diminuée ce qui réduit la quantité de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative au niveau musculaire, hépatique et du TAB (**Patti and Corvera, 2010; Vernochet and Kahn, 2012**). De plus, l'expression du principal facteur de transcription du mtDNA, TFAM impliqué dans l'initiation de la réplication du génome mitochondrial, et intervenant dans la régulation du nombre de copie du mtDNA est diminuée avec l'âge (**Ekstrand et al., 2004**). Ainsi, la biogenèse mitochondriale, diminue progressivement avec l'avancée dans l'âge (Palmer et al., 2011; Chistiakov et al., 2014) (**C. S. Palmer 2011, Dimitry A. Chistiakov 2014**). Au cours du vieillissement, Il existe une diminution de la capacité cellulaire de la biogenèse mitochondriale associée à des niveaux réduits des principaux facteurs impliqués dans cette voie tels que PGC-1 α et PPAR α notamment dans le TABr et dans le muscle squelettique (**Rogers and Smith, 2012; Rogers et al., 2012; Zhu et al., 2013**).

La dysfonction mitochondriale peut aussi participer au processus de vieillissement indépendamment de la production d'ERO. Ceci fait intervenir un grand nombre de mécanismes. Le vieillissement s'accompagne notamment d'une atrophie du TABr et d'une diminution de sa fonction entraînant une réduction de la thermorégulation associée à une intolérance au froid. Ceci est dû à une diminution de l'expression et une perte d'activité d'UCP1 (**Cannon and Nedergaard, 2004**).

II.3.8 Vieillessement et cancer

Il existe une relation étroite entre vieillissement et incidence du cancer. Il est intéressant de noter que l'obésité sarcopénique représente un risque plus important de développer un cancer (**Gonzalez et al., 2014**). En effet, bien que le cancer puisse apparaître à tous les âges, le vieillissement accroît le risque de développement du cancer. Le vieillissement est lié à des perturbations au niveau cellulaire où l'érosion des télomères et le stress oxydatif entraînent la sénescence. D'autre part, le système de réparation de l'ADN moins efficace laisse apparaître des mutations génétiques pouvant affecter des gènes suppresseurs de tumeurs tels que RB ou p53 (**Sperka et al., 2012**). Ces protéines mutées ne peuvent plus réguler les voies menant à la sénescence ou à l'apoptose. Le risque de cancérogenèse est plus élevé car au niveau physiologique la capacité à réagir face aux stress est diminuée. Tous ces changements favorisent la carcinogenèse et l'apparition du cancer (**Anisimov, 2007**).

II.3.9 Vieillessement et risques cardiovasculaires

Le risque d'athérosclérose est plus important chez la personne âgée. Cette pathologie cardiovasculaire résulte d'une modification de la structure de l'intima des artères par accumulation de lipides et de cellules spumeuses. L'accumulation des lipides au niveau de

l'endothélium active les leucocytes. Au cours du vieillissement, l'endothélium sécrète de manière accrue des cytokines mais également le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF). Ces molécules augmentent la perméabilité vasculaire permettant l'adhérence et l'infiltration des leucocytes **(Wang and Bennett, 2012)**. L'athérosclérose a des conséquences multiples telles que l'infarctus du myocarde ou des accidents vasculaires cérébraux. Elle est un processus normal du vieillissement mais peut être aggravée par certains facteurs, le principal étant l'hyperlipidémie. Chez la personne âgée, l'augmentation des ERO accroît les niveaux de *low density lipoprotein* (LDL) et de cholestérol ainsi que de TG plasmatiques qui sont tous associés à une augmentation du risque d'athérosclérose **(Griendling and Alexander, 1997; Govindarajan et al., 2005)**. L'augmentation de l'inflammation (NO, TNF- α) et la réduction des cellules musculaires lisses liée au vieillissement sont des facteurs aggravant **(Wang and Bennett, 2012)**.

III.Stratégies nutritionnelles

La mise en place de mesures hygiéno-diététiques efficaces est un préalable nécessaire à toutes stratégies de lutte contre l'obésité. Ainsi, il sera indispensable d'adopter un régime alimentaire sain et équilibré combinés à une activité physique même modérée pour une personne âgée. La perte de poids entraîne par conséquent une diminution de la masse grasse mais aussi de la masse maigre, raison pour laquelle on demeure prudent avec la réduction pondérale chez une personne âgée qui doit être encadrée. Ainsi, la stabilisation de la masse maigre durant la perte de poids chez la personne âgée va constituer un enjeu majeur dans le choix de la stratégie nutritionnelle adoptée dans ce cas.

III.1. La restriction calorique

L'effet de la restriction calorique chez la personne âgée a un effet bénéfique (**Lee and Wei, 2012; Vernochet and Kahn, 2012**). Les premières études en 1935 de McCay montrent que la restriction calorique du régime alimentaire de base de rats augmentait l'espérance de vie (**MacCay 1935**). Une étude de 20 ans sur la restriction calorique a été faite sur des singes rhésus. Les singes soumis à une restriction calorique de 30% ont une masse adipeuse diminuée, et leur pression artérielle et leur taux de TG sont également réduits (**Colman et al., 2009**). Cette étude montre également chez ces singes une amélioration de la glycémie et une incidence réduite des cancers, du diabète, ou de maladies cardio-vasculaires. En 2007, Colom et coll montrent que la restriction calorique de 40% pendant 3 mois chez des rats Wistar âgés de 15 mois, réduit la production de radicaux libres mitochondriaux (**Colom et al., 2007**). Ceci aurait un effet de prévention sur le déclin de la fonction mitochondriale chez l'animal âgé ou le sujet âgé (**Hepple et al., 2006**). Il a été également montré, *in vivo* chez des rats âgés de 24 mois, qu'une restriction calorique permettait de restaurer l'expression de la protéine UCP1 en relation avec une moindre diminution de l'expression du principal facteur de transcription mitochondrial, *Mitochondrial transcription factor A* (TFAM) (**Valle et al., 2008**).

III.2. Chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique s'applique à des sujets souffrants d'obésité sévère (>40 kg/m²). Après un bypass gastrique, une diminution de 60% du poids corporel est observée dans l'année qui suit l'intervention et de 50% après 5 ans. En parallèle de cette perte de poids, il est observé une amélioration des comorbidités et donc une réduction de la prise médicamenteuse (**World gastroenterology organisation 2011**).

Le rôle de la perte de poids dans la prévention de l'incidence du cancer et de la mortalité a été démontré par deux études majeures sur la chirurgie bariatrique.

Dans l'étude *Swedish Obese Subject* (SOS), la chirurgie bariatrique pratiquée sur plus de 2000 patients obèses (> 34 kg/m²) est associée à une diminution de 40% de l'incidence de cancer chez ces sujets (**Sjöström et al., 2007, 2009**). Dans une étude rétrospective de 7 ans sur environ 8000 patients obèses (> 35 kg/m²) ayant subi un bypass, l'incidence de cancer chez ces patients a diminué de 60% (**Adams et al., 2007, 2009**).

III.3. Les acides aminés et leurs dérivés

Parmi les stratégies nutritionnelles mises en œuvre pour lutter contre l'obésité chez les personnes âgées, la complémentation en certains acides aminés tels que l'arginine, la leucine, la glutamine et la citrulline ou en dérivés d'acides aminés tels que la carnitine et la bétaïne fait l'objet de nombreuses recherches.

Comme décrit précédemment, le vieillissement est associé à un état sarcopénique, en relation avec une réponse diminuée du muscle âgé aux stimuli de la synthèse protéique. (**Fujita and Volpi, 2006**).

En 2004, Paddon-Jones et coll. observent qu'une administration orale d'un bolus d'acides aminés essentiels (AAE) chez la personne âgée (67 ans) restaure la synthèse protéique du muscle (**Paddon-Jones et al., 2004, 2006**).

Nous verrons que d'autres études montrent l'efficacité de différents acides aminés tels que l'arginine, la leucine, la glutamine ou la citrulline. L'effet anabolique des acides aminés serait dû à l'activation de la voie de signalisation mTOR (**Kimball and Jefferson, 2006; Proud, 2007**). Des dérivés d'acides aminés sont également utilisés à des fins anaboliques et amaigrissantes.

III.3.1 Les dérivés d'acides aminés

III.4.1.1 L-carnitine

La L-carnitine n'est pas un acide aminé au sens propre du terme mais issue de deux acides aminés : la lysine et la méthionine. Souvent considérée comme un AAE, la L-carnitine joue un rôle important dans le métabolisme. Elle intervient dans le transport des AG à longue chaîne du cytosol vers la matrice mitochondriale lors du catabolisme des AG. Avec l'âge, la production de L-carnitine est réduite, ce qui affecte le métabolisme oxydatif des AG (**Noland et al., 2009**).

La L-carnitine est indispensable à la β -oxydation et régule également la concentration de coenzyme A. Müller et coll montrent en 2002 qu'une supplémentation en L-carnitine chez des sujets sains permettrait d'augmenter l'oxydation des AG (**Müller et al., 2002**). L'injection quotidienne sous-cutanée pendant 10 jours d'1 mg de L-carnitine à des souris déficientes en carnitine entraîne une augmentation significative de la température corporelle et des concentrations de L-carnitine dans le TABr des animaux. Ce traitement permet aux adipocytes bruns une reprise de leurs caractéristiques morphologiques normales et une restauration des niveaux d'expression d'UCP1. Ces résultats suggèrent fortement que la L-carnitine est essentielle pour maintenir la fonction et la morphologie du TABr (**Ozaki et al., 2011**).

III.4.1.2 La bêtaïne

La bêtaïne connue sous le nom de triméthylglycine ou glycinebêtaïne, est un dérivé de la glycine et un intermédiaire du catabolisme de la choline (**Petronini et al., 1992**). Elle agit comme un donneur de méthyl dans différentes voies de signalisation via la S-adénosyl-méthionine. Chez l'Homme l'insuffisance en bêtaïne est corrélée au syndrome métabolique et aux maladies cardiovasculaires. Ainsi 20% des patients atteints de DT2 excrètent des niveaux anormalement élevés de bêtaïne alors que la concentration plasmatique reste proche de la normale (**Dellow et al., 1999; Lever and Slow, 2010**).

Chez les bovins nourris avec une supplémentation en bêtaïne, la masse musculaire est augmentée et la masse adipeuse diminuée conférant une meilleure qualité à la viande (**Fernández-Figares et al., 2002**). Des études chez la souris montrent que la supplémentation en bêtaïne, à 1% de l'eau de boisson, limite l'accumulation de lipides au niveau hépatique. Elle améliore la sensibilité à l'insuline dans le TAB (**Wang et al., 2010**). En 2012, Olli et coll. montrent sur des cultures hypoxiques d'adipocytes traités à avec 250 µmol/l de bêtaïne une diminution des ARNm IL-6 et TNF-α (**Olli et al., 2013**).

III.3.2 Les acides aminés

III.4.2.1 La L-Arginine

La L-Arginine (ARG) est un substrat des NOS et peut être un précurseur de la formation de NO. Par cette capacité de donneur de NO, l'ARG régule de multiples voies métaboliques impliquées dans le métabolisme des AG, du glucose, des acides aminés et des protéines par le biais de voies de signalisation cellulaires telle que mTOR et de son impact sur l'expression des gènes du métabolisme.

Les études de Fu et coll en 2005 montrent que la supplémentation pendant 10 semaines en ARG, à 1.5% de l'eau de boisson chez des rats Zucker, réduit significativement la masse

adipeuse épидидymaire (-28%) et abdominale (-46%) par rapport aux animaux contrôles (**Fu et al., 2005**). Ces résultats sont à mettre en relation avec d'autres études, *in vivo*, dans lesquelles l'administration orale à long terme de l'ARG (8.3g/jour pendant 3 semaines) chez l'humain obèse diminue la masse adipeuse (**Lucotti et al., 2006**). La supplémentation en ARG chez les rats Zucker permet de réduire les concentrations sériques de glucose, de TG, d'AG et de leptine d'environ 30% et d'augmenter la lipolyse et l'oxydation des AG en lien avec l'augmentation de l'expression des gènes codant HSL, PGC-1 α et CPT-1b (**Fu et al., 2005**). Des résultats similaires sont observés dans les études *in vivo* réalisées chez le porc dont l'alimentation est supplémentée en ARG pendant 2 mois (**Tan et al., 2011**) et dans les études de cultures d'adipocytes humains traités avec 2mM d'ARG (**McKnight et al., 2010**). En agissant sur PGC-1 α , cet acide aminé augmente la croissance du TABr et ainsi la biogenèse mitochondriale (**Wu et al., 2012b**). La supplémentation alimentaire avec de l'ARG réduit efficacement le TAB chez les rats Zucker, les rats obèses, les porcs, et les patients obèses avec DT2 par son action lipolytique et d'oxydation des AG. Par ailleurs, l'ARG promouvoirait le développement du TABr. De fait, cet acide aminé devrait pouvoir être utilisé pour prévenir et traiter l'adiposité et le syndrome métabolique associé (**Wu et al., 2012b**).

III.4.2.2 La L-Leucine

La L-Leucine (LEU), un acide aminé essentiel, diminue la prise alimentaire à l'instar des régimes riches en protéines. Plusieurs études de supplémentation en LEU du régime alimentaire, chez le sujet âgé et chez le rat âgé, ont démontré que la LEU augmentait la synthèse protéique via la voie mTOR du muscle squelettique et du TAB (**Dardevet et al., 2002; Katsanos et al., 2006; Lynch et al., 2002; Rieu et al., 2007**). De plus, chez la souris sous régime hyperlipidique supplémenté en LEU la dépense énergétique est augmentée, peut-être par stimulation de la protéine découplante 3 (UCP3) dans le muscle favorisant la diminution de l'adiposité (**Zhang et al., 2007**). D'autres études chez le rat âgé montrent que la supplémentation en LEU diminue la masse adipeuse (**She et al., 2007; Vianna et al.,**

2012; Zeanandin et al., 2012). La stimulation de la voie mTOR par un régime complétement en LEU permet de réduire l'inflammation au sein du TAB via une inhibition de l'activité du facteur de transcription NF-Kb (**Macotela et al., 2011**). D'un point de vue métabolique, la LEU diminue la synthèse d'AG par diminution de l'acide gras synthase (AGS) dans les adipocytes 3T3-L1 (**Sun and Zemel, 2007**). De plus, elle est capable d'améliorer la sensibilité à l'insuline à la fois dans le TAB, le muscle et le foie de souris soumises à un régime hyperlipidique supplémenté en LEU (**Macotela et al., 2011**).

III.4.2.3 La L-Glutamine

La L-Glutamine est produite par le muscle squelettique et métabolisée dans l'intestin ou le rein (**Holecek, 2013**). La L-Glutamine est l'acide aminé le plus représenté dans l'organisme et le plus abondant au niveau plasmatique. Cependant sa production diminue avec l'âge. Différentes études montrent que cet acide aminé a des effets bénéfiques en augmentant la production de NO (**Bollhalder et al., 2013**). Les études de Prada et coll. en 2007 démontrent que des rats sous régime enrichi en lipide supplémenté en glutamine ont une masse adipeuse diminuée de moitié comparée aux rats sous régime riche en lipides seul. Cet état est associé à une augmentation de la concentration sérique d'adiponectine et une diminution de celle de la leptine. L'augmentation d'adiponectine pourrait participer à l'augmentation de l'oxydation des AG dans le muscle et le TAB. De plus, *in vivo*, la L-Glutamine prévient la résistance à l'insuline induite par un régime riche en lipides en augmentant l'activité de la voie IRS-PI3K-Akt au niveau musculaire et hépatique (**Prada et al., 2007**). L'infiltration macrophagique au sein du TAB des rats supplémentés en glutamine est moins importante et la production d'IL-6 et TNF- α est réduite par rapport aux rats contrôles (**Prada et al., 2007**).

III.4.2.4 La L-Citrulline

La Citrulline (CIT) ou acide L-2-amino-5-ureidovalérique est un acide aminé, à trois atomes d'azote. La forme active de la CIT est la forme α -amine. Classiquement considéré comme un intermédiaire du métabolisme protéique cet acide aminé est non protéique c'est-à-dire qu'il n'est pas codé par le code génétique et qu'il n'intervient pas dans la composition des protéines et des peptides.

Cet acide aminé dérive du *Citrullus vulgaris*, nom latin de la pastèque, qui est l'un des rares aliments contenant de la CIT (**Crenn et al., 2008**). Dans ce fruit, la CIT par son puissant pouvoir antioxydant intervient dans la prise en charge des radicaux (**Akashi et al., 2001**). Les recherches de Windmueller et Spaeth dans les années 1980 ont mis en évidence l'importance de la CIT au sein du métabolisme de l'intestin grêle qui libère en continu de la CIT dans la circulation systémique. Rappelons que la concentration plasmatique de la CIT chez l'homme est de l'ordre de 30-50 μ M. La CIT circule sous forme libre au sein des liquides extracellulaires et des cellules (**Crenn et al., 2008**). Dans les adipocytes, il existe 2 types de transporteurs d'acides aminés différents : Transporteurs Na^+ dépendants (ASC et y'L) et Transporteur Na^+ indépendant (L) (**Figure 10**).

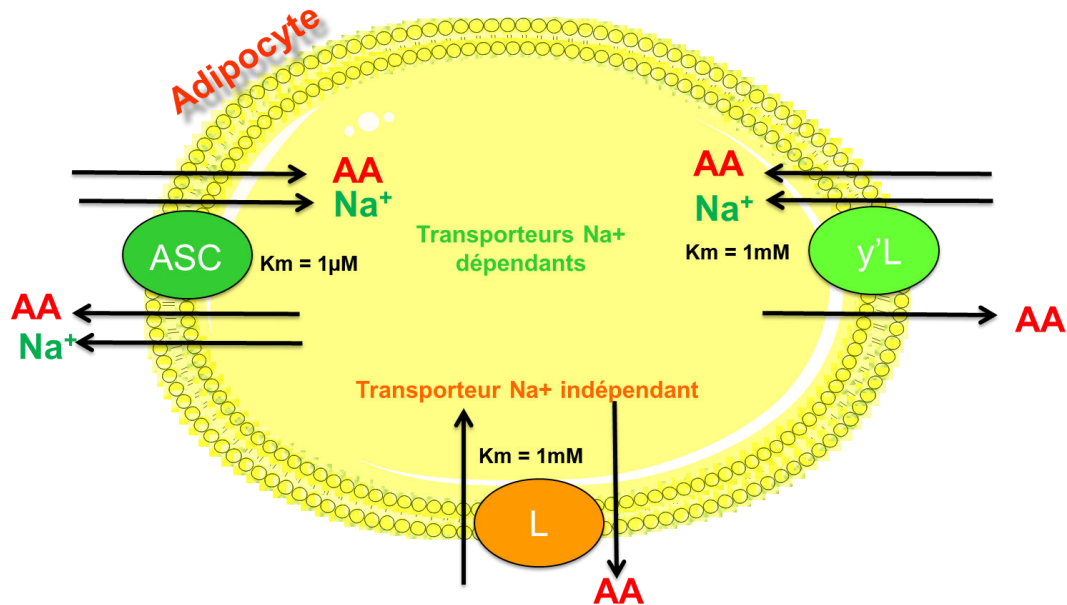


Figure 10 : Les transporteurs d'acides aminés dans l'adipocyte.

Dans les adipocytes, il existe 2 types de transporteurs d'acides aminés différents : Transporteurs Na⁺ dépendants (ASC et y'L) et Transporteur Na⁺ indépendant (L).

III.4.2.4.1 La citrullination des peptides

La présence de la CIT dans certains peptides ou protéines résulte d'une citrullination qui est une modification post-traductionnelle des protéines sur leur résidu ARG aboutissant à la formation de CIT, réaction catalysée par la Peptidyl Arginine Déiminase (PAD) en présence de calcium. Lors de cette réaction, le groupe terminal NH₂ chargé positivement est hydrolysé en un groupement oxygène, ce qui aboutit à une perte de charge positive. Cette perte provoque alors des modifications de conformation des protéines citrullinées en favorisant de nouveaux motifs de liaison ou au contraire de ruptures ayant des conséquences sur la fonction et la demi-vie de la protéine (**Baka et al., 2012**).

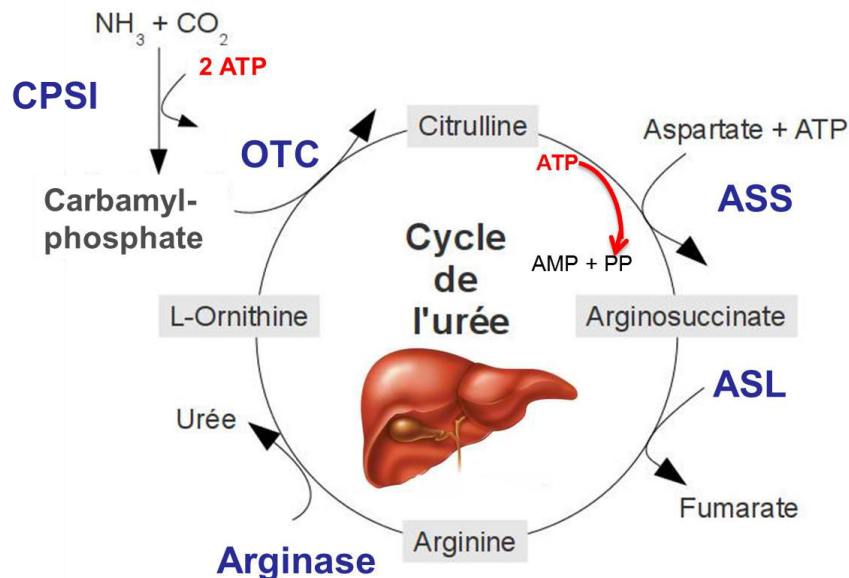
Il existe 5 isoformes de l'enzyme PAD, PAD1 est retrouvée au niveau cutané, PAD2 dans le muscle et le système nerveux central (SNC), PAD3 dans les follicules pileux et PAD4 est principalement exprimée dans la lignée hématopoïétique (**Baka et al., 2012**).

La citrullination intervient dans des processus physiologiques comme la kératinisation de la peau, la protection des neurones, la plasticité du SNC, la régulation des gènes ou les

fonctions immunitaires. Elle est également impliquée dans de nombreuses pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde et le cancer (Baka et al., 2012).

III.4.2.4.2 La citrulline et le cycle de l'urée

La CIT est un intermédiaire du cycle de l'urée. Le cycle de l'urée est un ensemble de réactions biochimiques ayant lieu dans le foie et permettant à l'organisme d'épurer l'ammoniaque qui est neurotoxique (Takiguchi and Mori, 1995; Hartman et al., 1997) (Figure 11).



ASS+ASL, argininosuccinate synthetase+lyase; CPSI : carbamylphosphate synthétase 1; OTC : ornithine transcarbamylase

Figure 11 : Le cycle de l'urée.

La synthèse de l'urée par ce cycle fait intervenir cinq enzymes. Les deux premières enzymes la carbamoyl phosphate synthase 1 (CPS-I) et l'ornithinetranscarbamoylase (OTC) sont situées dans la mitochondrie alors que les trois autres enzymes du cycle sont présentes dans le compartiment cytosolique : argininosuccinate synthase (ASS), argininosuccinate lyase (ASL) et arginase (ARG)

III.4.2.4.3 Biochimie et physiologie de la citrulline

Depuis les années 70, il a été montré chez l'Homme que la CIT est à l'état post prandial le seul acide aminé capable de contourner l'aire splanchnique, d'où une biodisponibilité de 100%. A l'inverse, les deux acides aminés les plus consommés par cette aire sont la glutamine et l'alanine.

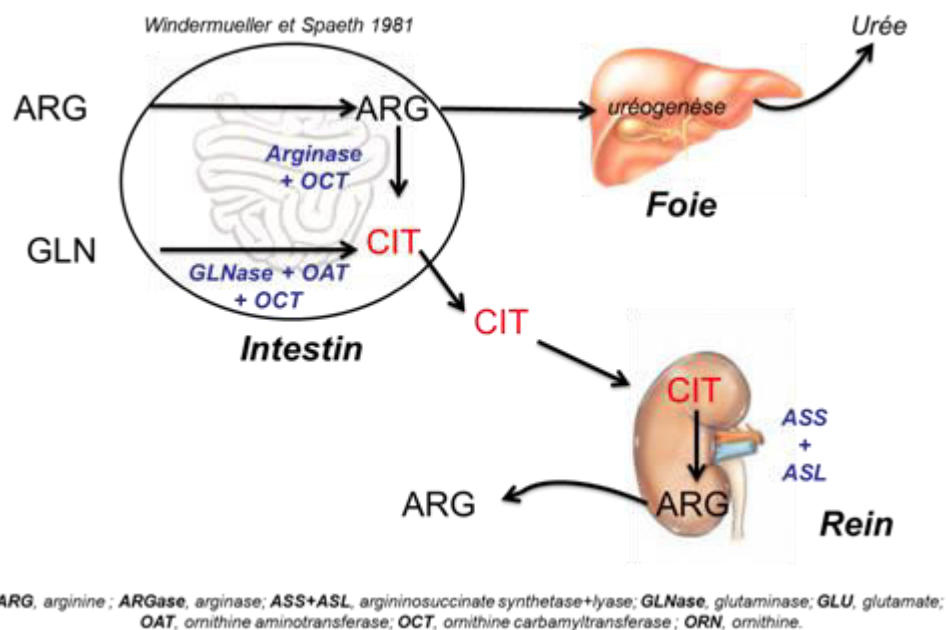


Figure 12 : Métabolisme de la citrulline.

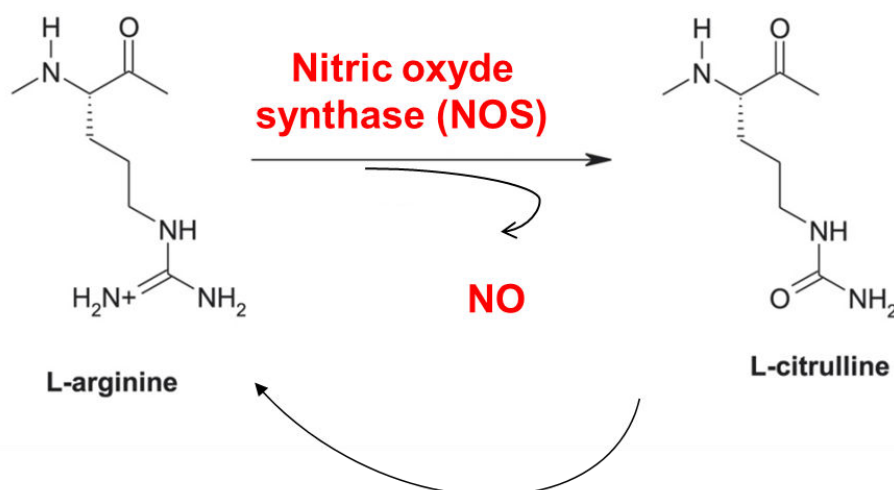
La citrulline est produite par l'intestin à partir d'arginine ou de glutamine. Elle est libérée dans la circulation sanguine sans être captée par le foie contrairement à l'arginine. La citrulline (CIT) circulante est ensuite captée par le rein où elle permet la resynthèse d'arginine (ARG). Comme elle n'est pas métabolisée par le foie, elle a une meilleure biodisponibilité que l'arginine pour l'organisme.

La CIT est synthétisée au sein des mitochondries des entérocytes majoritairement dans la partie proximale de l'intestin grêle. La CIT est à 80% un produit de la glutamine (GLN) d'origine luminale ou sanguine via l'action de la glutaminase transformant GLN en glutamate (GLU) qui est ensuite pris en charge par l'ornithine aminotransférase (OAT) pour être converti en ornithine (ORN) qui via l'ornithine carbamoyl transférase (OCT) va être modifiée en CIT. Cette dernière est ensuite exportée de la mitochondrie par le transporteur ORNT1,

un antiport ornithine/CIT (**Crenn et al., 2011**). La CIT peut également être synthétisée à partir d'ARG dans les entérocytes grâce à deux enzymes l'arginase II et l'OCT.

La CIT n'est pas utilisée par l'intestin et son catabolisme, via les enzymes argininosuccinate synthase (ASS) et argininosuccinate lyase (ASL), étant de faible activité dans cet organe, elle est majoritairement libérée dans la circulation systémique (**Figure12**). La CIT produite par l'intestin est en grande partie (85%) transformée en ARG dans le rein et plus précisément au sein du tube contourné proximal et contourne ainsi le foie contrairement à son précurseur, l'ARG (**Figure12**). Le rein possédant les enzymes ASS et ASL, est le siège de la conversion de la CIT en ARG, cette dernière est ensuite libérée dans la circulation systémique car le rein ne possède pas les enzymes du cycle de l'urée (**Figure12**). Ainsi le taux de CIT synthétisé par l'intestin est un point déterminant dans la régulation de la synthèse rénale d'ARG. Ce cycle inter-organe ARG-CIT-ARG entre l'intestin et le rein permet de maintenir une concentration basale d'ARG dans la circulation (**Figure12**).

La CIT est convertie en ARG au niveau rénal, permettant une production de NO qui est un gaz impliqué dans la vasodilatation, la neurotransmission et dans la stimulation du système immunitaire (**Figure 12**). En outre, après administration de CIT lors d'un exercice physique en phase aérobie, il a été mis en évidence une diminution de la fatigue musculaire ainsi qu'une augmentation des performances en lien avec un accroissement de la production d'ATP.



Argininosuccinate synthétase (ASS) Argininosuccinate lyase (ASL)

Figure 13 : Le cycle arginine-citrulline-NO.

La citrulline peut être convertie en arginine grâce à deux enzymes l'argininosuccinate synthase (ASS) et l'argininosuccinate lyase (ASL). L'arginine peut à son tour être reconvertie en citrulline via l'enzyme *nitric oxide synthase* (NOS) ce qui s'accompagne d'une production de NO.

III.4.2.4.4 La citrulline en physiopathologie

Dans des cas de syndrome de grêle court ou de résection intestinale massive, le site de synthèse de la CIT est fortement réduit et il apparaît une hypocitrullinémie proportionnelle à la sévérité de l'atteinte intestinale (Jianfeng et al., 2005; Rhoads et al., 2005; Santarpia et al., 2008; Crenn et al., 2008; Fitzgibbons et al., 2009; Crenn and Cynober, 2010). Cette observation a ensuite été étendue aux patients souffrant de la maladie cœliaque ou de dommages à l'intestin grêle dus à des radiations (Crenn et al., 2003). Au niveau plasmatique, la diminution de CIT engendre une diminution de l'ARG, suggérant qu'à la suite d'une résection intestinale massive l'ARG devient un acide aminé indispensable. La concentration plasmatique de CIT s'avère donc d'un intérêt majeur en tant que marqueur non invasif de la fonction intestinale et d'un certain nombre de pathologies intestinales telles que le syndrome du grêle court ou la maladie cœliaque.

Des études démontrent l'importance du taux de synthèse de CIT via l'intestin. Hoogenraad et coll ont décidé d'évaluer les conséquences d'une d'inhibition de l'activité de l'OCT. L'inhibiteur sélectif de l'OCT utilisé était la glycyglycine Δ -N-(phosphonacetyl)-L-ornithine (PALO). Cet inhibiteur administré par voie orale à des rats âgés de 6 semaines soumis à un régime appauvri en ARG a provoqué une diminution des concentrations plasmatiques de CIT et d'ARG corrélée à un retard de croissance de ces rats en association avec une augmentation de la mortalité. Ces phénomènes étaient partiellement évités par administration d'ARG à 1% et abolis par une complémentation à 1% de CIT (**Hoogenraad et al., 1985**). Bien que l'enrichissement de l'alimentation en ARG apparaisse comme une stratégie thérapeutique intéressante, elle présente un inconvénient majeur sachant que l'ARG est métabolisé par le foie pour le cycle de l'urée dont elle est un activateur. En conséquence, un enrichissement de l'alimentation en ARG pourrait avoir des effets négatifs par une augmentation de l'uréogénèse. Une supplémentation en CIT pourrait s'avérer plus intéressante. La CIT non métabolisée par le foie et précurseur de l'ARG, pourrait être un bon candidat pour compenser les conséquences de la résection intestinale.

Des recherches de Osowska et coll., ont démontré que la supplémentation en CIT augmente la concentration d'ARG et restaure l'homéostasie du NO chez des rats ayant subi une résection intestinale à 80 %. La CIT a également un effet positif sur le poids de la muqueuse intestinale et son contenu en protéines. Un régime enrichi en CIT a permis de limiter la perte de poids chez les patients souffrant du syndrome du grêle court (**Osowska et al., 2004**).

L'objectif des recherches décrites dans ce paragraphe était de trouver une nouvelle stratégie thérapeutique nutritionnelle permettant de contourner la séquestration des acides aminés dans l'aire splanchnique qui est un obstacle à la renutrition des personnes âgées. Connue pour être augmentée chez les personnes âgées dénutries, cette séquestration limite l'accès des acides aminés à la circulation systémique lors de la période postprandiale. Ceci provoque une diminution de la synthèse protéique, entretenant la perte de masse musculaire

observée au cours du vieillissement. Par ses propriétés déjà décrites, la CIT est apparue comme une bonne stratégie thérapeutique pour améliorer le statut nutritionnel des patients âgés en stimulant la synthèse protéique au niveau du tissu musculaire. Chez des rats comme chez les personnes âgées dénutries, la fonction intestinale est intacte cependant il existe une atrophie de l'intestin. La CIT, capable de contourner l'aire splanchnique, serait alors une bonne alternative thérapeutique pour restaurer l'homéostasie du NO au sein des tissus et ainsi améliorer le statut nutritionnel de ces patients en stimulant la synthèse protéique au niveau du tissu musculaire. Des études préliminaires chez la personne âgée (88-91 ans) soumise à un régime standard ou enrichi en protéines avec ou sans complémentation en CIT indiquent que l'enrichissement avec ou sans CIT permet de diminuer significativement la masse adipeuse (-13%) mais seule la supplémentation en CIT permet de maintenir la masse maigre (+0.58%) (**Frédéric Behar DIU 2013**)

Osowska et coll. ont réalisé une étude chez des rats âgés dénutris pendant 12 semaines puis re-nourris après cette période, par un régime supplémenté en CIT (5g.kg⁻¹.jour⁻¹) ou par un régime supplémenté en acides aminés non-essentiels AANE (alanine, glycine, proline, histidine, aspartate et sérine en concentration équimolaire). Chez le rat âgé dénutri, en comparaison avec un apport contrôlé isoazoté, la CIT module le métabolisme protéique musculaire. Ainsi, on observe une augmentation de 20% du contenu protéique et de 90% du débit de synthèse protéique sans modification de la protéolyse (**Osowska et al., 2006; Moinard et al., 2009**). Des recherches ont ensuite été entreprises pour déterminer le mode d'action de la CIT et notamment préciser si elle agit de manières directes ou indirectes sur la synthèse protéique. Moinard et coll. ont démontré que la CIT a une action directe sur la synthèse protéique au niveau musculaire chez le rat âgé dénutri sans faire intervenir de métabolites ou d'autres acides aminés (**Moinard et al., 2009**).

IV. Monoxyde d'azote (NO) et métabolisme

Le NO est un gaz aux multiples fonctions découvert comme messager au niveau du système vasculaire par l'équipe de Furchgott et Zawadzki en 1980 (**Furchgott and Zawadzki, 1980**). Ce messager agit sur les cellules musculaires lisses au sein de l'endothélium vasculaire favorisant sa relaxation (**Palmer et al., 1987**). Le NO peut diffuser librement d'une cellule à l'autre, son effet est donc très rapide. La courte demi-vie du NO (quelques secondes) limite son temps de réaction. Au niveau du vaisseau, le NO active la guanylate cyclase permettant la formation de GMPc à partir du GMP favorisant la vasorelaxation (**Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987**).

IV.1. La synthèse du NO dans les cellules animales

La biosynthèse du NO se fait à partir de l'ARG, réaction catalysée par une enzyme la NO synthase (NOS), en présence d'oxygène et de NADPH qui sont des co-substrats, et de nombreux co-facteurs.

La NOS peut être présente dans différentes structures cellulaires comme la membrane plasmique, le cytoplasme, le noyau, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Il existe différentes isoformes de la NOS produites par différents gènes et qui font partie de la famille des hémoprotéines.

La NOS I et la NOS III dites constitutives sont dépendantes du calcium et de la calmoduline. En réponse à un stimulus physiologique, elles provoquent une libération rapide de NO limitée dans le temps (quelques secondes à quelques minutes). A l'inverse la NOS II dite inductible est indépendante du calcium et de la calmoduline. En réponse à des stimuli immunologiques, faisant intervenir les cytokines inflammatoires et les endotoxines bactériennes, la NOS II permet une libération tardive et importante de NO pendant de longues périodes (heures voire jours). La NOS II et la NOS III sont exprimées dans

l'adipocyte (**Ribiere et al., 1996**). L'adipocyte brun exprime la NOS III dans le cytoplasme, le noyau et la membrane plasmique et la NOS II dans le cytoplasme et le noyau (**Giordano et al., 2002**). A l'inverse, l'adipocyte blanc exprime NOS II et NOS III au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique (**Elizalde et al., 2000; Ribiere et al., 1996**). NOS I est faiblement exprimée au sein de ces tissus (**Elizalde et al., 2000; Giordano et al., 2002**).

Isoformes	Nom descriptif	poids moléculaire	organe/tissu/cellules	localisation cellulaire	expression
NOS-I	n-NOS (neuronal)	160kDa	Cerveau	Cytosolique	Constitutive
NOS-II	iNOS (inductible)	130kDa	Macrophage Adipocytes	Cytosolique	Inductible
NOS-III	e-NOS (endothéliale)	135kDa	Vaisseaux sanguins Adipocytes	Membrane Cytosolique	Constitutive

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes isoformes des NOS.

Bien que ces trois isoformes aient entre elles 51-57% de similarité chez l'Homme, elles ont des propriétés catalytiques, une régulation physiologique, et une inhibition pharmacologique spécifiques à chacune (**Alderton et al., 2001**).

IV.2. La réactivité du NO

Dans l'organisme, selon les conditions physiologiques et physiopathologiques, le NO se comporte comme oxydant ou antioxydant. Lorsque dans des conditions d'obésité, d'inflammation ou d'insulino-résistance, la concentration de nitrites plasmatiques augmente (micromolaire), le NO a des effets oxydants et cytotoxiques (**Stamler et al., 1992; Furukawa et al., 2004**). A ces concentrations élevées, le NO peut inactiver des protéines cellulaires conduisant à leur dégradation puis à la mort cellulaire (**Souza et al., 2000; Stamler et al., 1992**). La nitrosylation de cystéine et la nitration de tyrosine des protéines ont été observées dans plusieurs études (**Radi, 2004; White et al., 2010**). Nous avons démontré dans notre laboratoire qu'après induction des NOS II adipocytaires, NO induit la nitration des tyrosines de la PEPCK-C (**Jaubert et al., 2012; Joffin et al., 2012**). A l'inverse, à faible concentration (nanomolaire), le NO exerce des effets anti-oxydants en prévenant la formation des ERO à

la suite d'un stress oxydant (**Kanner et al., 1991; Patel et al., 2000; Radi et al., 1991; Stamler et al., 1992**).

IV.3. NO et métabolisme

Le NO régule le métabolisme du glucose et des AG chez les mammifères (**Jobgen et al., 2006**). Cette molécule stimule, à l'état physiologique, l'absorption du glucose ainsi que l'oxydation du glucose et des AG au niveau du muscle squelettique, du cœur, du foie et du TAB par réduction de la disponibilité en malonyl-CoA via l'inhibition de l'acétyl CoA carboxylase et l'activation de la malonyl-CoA décarboxylase (**Jobgen et al., 2006**). Le NO inhibe la synthèse des TG, du glucose, du glycogène et des AG dans les tissus cibles tels que le foie ou le TAB et favorise à l'inverse la lipolyse au niveau adipocytaire (**Gaudiot et al., 2000; Frühbeck and Gómez-Ambrosi, 2001**). Des études chez le rat montrent qu'un régime supplémenté en ARG augmente la synthèse de NO qui stimule la lipolyse et l'oxydation des AG dans le TAB. Il en résulte une diminution importante de la masse du TAB, particulièrement du TAB RET (-46%), alors que le TABr est augmenté chez ces animaux (**Fu et al., 2005; Tan et al., 2012; Wu et al., 2012b**). Comme attendu, l'inhibition de la synthèse de NO cause une hyperlipidémie et une accumulation de TG (**Wu et al., 2012b**). Le mécanisme sous-jacent pourrait impliquer la voie de signalisation dépendante du guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Au sein du laboratoire, il a clairement été démontré que l'insuline, les œstrogènes et la leptine exercent des effets dépendants du NO sur le métabolisme des adipocytes (**Rivière et al., 2002; Meheik et al., 2005; Jaubert et al., 2007; Niang et al., 2011; Joffin et al., 2012**). En outre, le NO active l'expression de PGC-1 α qui est impliqué dans la biogenèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative (**Karamitri et al., 2009**). Ainsi la modulation de la voie ARG-NO par supplémentation du régime alimentaire en ARG ou en CIT permettrait une prévention et un traitement du syndrome métabolique chez les personnes souffrant d'obésité.

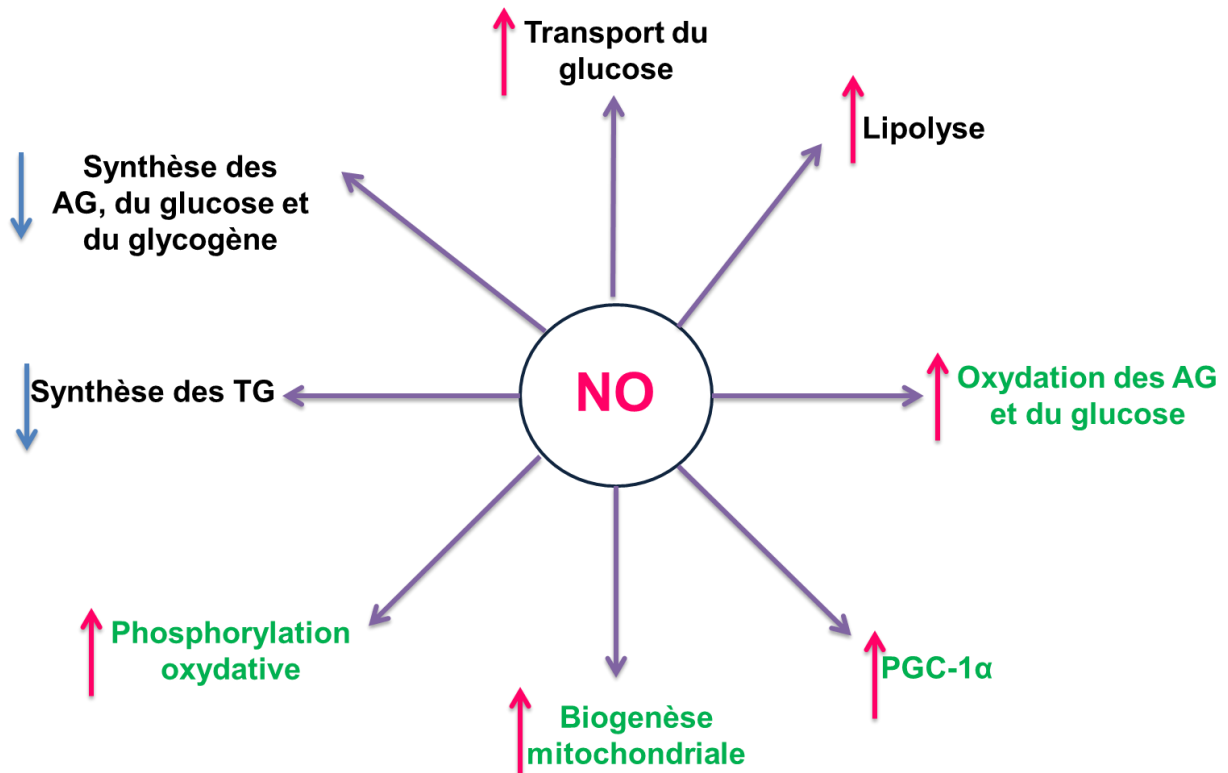


Figure 14 : Effets du NO à des concentrations physiologiques sur le métabolisme énergétique.

L'augmentation du monoxyde d'azote (NO) augmente l'oxydation des acides gras (AG) en réduisant la production de malonyl-CoA et en diminuant la synthèse des triglycérides (TG). Le NO augmente la lipolyse et stimule le transport du glucose dans le muscle et le tissu adipeux blanc (TAB) et augmente l'oxydation du glucose tout en diminuant la synthèse de ce dernier dans le foie. NO augmente la biogenèse mitochondriale via le peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) et augmente la phosphorylation oxydative. En vert, sont regroupées les voies métaboliques et les enzymes liées à l'oxydation et la biogenèse mitochondriale.

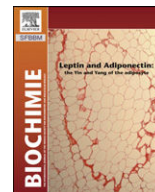
IV.4. NO et métabolisme du TAB : exemple de la leptine: Article 1

Article de revue: Is there NO help for leptin?

[Joffin N](#), [Niang F](#), [Forest C](#), [Jaubert AM](#).

Publication dans le journal *Biochimie*, [Volume 94, Issue 10](#), Octobre 2012, Pages 2104–2110, DOI: 10.1016/j.biochi.2012.06.017

Depuis l'identification initiale de la leptine comme le produit du gène ob, en 1994, les voies de signalisation par lesquelles cette hormone altère la physiologie cellulaire ont fait l'objet de recherches approfondies. Le fait que la leptine puisse induire la production de NO a été démontré dans des études sur la glande pituitaire et les îlots pancréatiques. Un grand nombre d'études supplémentaires a également montré que cette adipokine stimule la synthèse de NO dans de nombreux tissus. Cet article de revue examine le rôle de la leptine dans la production de NO et ses conséquences physiopathologiques. Le rôle de ce messenger gazeux dans la physiologie dépend du type de cellules, de sa concentration et de la durée de l'exposition. Il peut être un oxydant puissant ou un protecteur de l'intégrité des cellules contre la formation des ERO. La leptine joue deux rôles opposés sur la pression artérielle. Elle exerce un effet hypertenseur en raison de l'activation sympathique et un effet vasorelaxant dû à la production de NO. Cette adipokine agit via le NO pour produire des facteurs pro-inflammatoires dans les pathologies du cartilage, contribuant potentiellement à un risque accru de développer une arthrose. Un autre rôle bien documenté du NO, agissant soit directement soit par l'intermédiaire de l'hypothalamus, concerne le métabolisme des lipides dans le muscle et le TAB par induction de la leptine. Dans les adipocytes, l'action directe et rapide de la leptine est d'activer la NOS III, ce qui favorise la lipolyse. En revanche, à long terme, la leptine réduit la lipolyse. Cependant, à la fois à court terme et à long terme, la glycéronéogenèse et son enzyme clé, PEPCK-C, sont diminuées par l'adipokine, favorisant ainsi la libération d'AGNE. De ce fait, la leptine induit la production de NO et joue un rôle essentiel dans le métabolisme des AG dans le TA. Les effets qui en résultent sont d'éviter le stockage des lipides et d'améliorer les dépenses d'énergie, avec un intérêt dans la prise en charge de l'obésité et ses maladies associées.



Review

Is there NO help for leptin?

Nolwenn Joffin^{a,1}, Fatoumata Niang^{a,1}, Claude Forest^{a,*}, Anne-Marie Jaubert^{a,b}^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 747, Université Paris Descartes, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France^b Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine Paris-Ile de France-Ouest, Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines, F-78000 Versailles, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2012

Accepted 15 June 2012

Available online 29 June 2012

Keywords:

Leptin
Nitric oxide
Fatty acids
Glyceroneogenesis
PEPCK-C

ABSTRACT

Since the initial identification of leptin as the product of the *ob* gene in 1994, the signaling pathways by which this hormone alters cell physiology have been the subject of extensive investigations. The fact that leptin can induce nitric oxide (NO) production was first demonstrated in studies of the pituitary gland and pancreatic islets. A large number of additional studies further showed that this adipokine stimulates NO synthesis in multiple tissues. This review article discusses the role of leptin in NO production and its pathophysiological consequences. The role of this gaseous messenger in cell physiology depends on the cell type, the concentration of NO and the duration of exposure. It can be either a potent oxidant or a protector of cell integrity against the formation of reactive oxygen species. Leptin plays two opposing roles on arterial pressure. It exerts a hypertensive effect due to sympathetic activation and a vasorelaxant effect due to NO production. This adipokine acts via NO to produce pro-inflammatory factors in cartilage pathology, potentially contributing to an increased risk for osteoarthritis. Another well-documented role of leptin-induced NO, acting either directly or via the hypothalamus, concerns lipid metabolism in muscle and adipose tissue. In adipocytes, the direct and rapid action of leptin is to activate the nitric oxide synthase III, which favors lipolysis. In contrast, in the long-term, leptin reduces lipolysis. However, both in the short-term and in the long-term, glyceroneogenesis and its key enzyme, the cytosolic phosphoenolpyruvatecarboxykinase (PEPCK-C), are down-regulated by the adipokine, thus favoring fatty acid release. Hence, leptin-induced NO production plays a crucial role in fatty acid metabolism in adipose tissue. The resulting effects are to prevent lipid storage and to improve energy expenditure, with possible improvements of the obese state and its associated diseases.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Leptin plays an important role in the central regulation of body weight and its synthesis is positively correlated with the amount of white adipose tissue (WAT) and body mass index (BMI) [1,2]. This 16 kDa adipokine is found in many tissues other than WAT such as the stomach, placenta, bone, mammary gland, liver and muscle but in much lower amount [3]. Leptin acts via the Ob-R receptors that belong to the class I cytokine receptor superfamily [4]. There are six different isoforms with identical extracellular binding domains but with cytoplasmic domains of different lengths. These isoforms include one soluble form (Ob-Re), four short forms (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd and Ob-Rf) and a long form (Ob-Rb). Ob-Rb is strongly expressed in the hypothalamus, kidney, liver, lung, pancreas,

muscle and WAT and is the most important isoform for signal transduction [3,5,6].

Leptin activates Ob-Rb phosphorylation, thereby inducing the Janus kinase (JaK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) transduction pathway [5]. Through its action on the central nervous system, leptin inhibits food intake and stimulates energy expenditure [1,6,7]. Furthermore, it participates in reproductive functions by increasing follicle stimulating hormone-releasing factor (FSHRF), luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) [6–9]. Additional studies have revealed that leptin also is involved in the regulation of a variety of several other biological functions [3,7,10–13]. The activation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) by leptin results in an increase in the expression of cytokines and chemokines in immune cells [3,5]. Hyperleptinemia, which is characteristic of the obese state, is linked to the overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) to limit Ob-Rb signaling in WAT and induces leptin resistance [5,6]. This hormone also activates both phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) leading to

* Corresponding author. Tel.: +33(0)142863867; fax: +33(0)142863868.

E-mail address: claudе.forest@parisdescartes.fr (C. Forest).¹ Nolwenn Joffin and Fatoumata Niang contributed equally to this work.

osteoblast proliferation [14] and AMP kinase (AMPK) to prevent fatty acid (FA) synthesis and to alter FA oxidation in the liver [15,16].

The first demonstration that leptin can induce nitric oxide (NO) production arose from the pioneer work of Yu et al. in studies of the pituitary gland, and from Wang et al. investigations of pancreatic islets [17,18]. A large number of additional studies further showed that this adipokine stimulates NO synthesis in various tissues.

2. Nitric oxide synthesis and action

NO was discovered to have a biological function as a gaseous messenger acting on the relaxation of vascular endothelial cells. Because of this effect it was named endothelium-derived relaxing factor [19]. NO synthesis is the result of the expression of NO synthases (NOS). NO synthesis from L-arginine is mediated by three isoforms of NOS belonging to the hemoprotein family [20]. These three isoforms were initially named in relation to their tissue localization: neuronal NOS (n-NOS or NOS I), inducible NOS (iNOS or NOS II) and endothelial NOS (eNOS or NOS III). NOS I and NOS III are also found in skeletal and cardiac muscles. NOS II is mainly located in macrophages [20]. NOS I and NOS III are constitutive, calcium-calmodulin-dependent, regulated in a post-translational manner by phosphorylation, palmitoylation and myristoylation and produce a rapid and transient NO flux [21]. NOS II is inducible by cytokines, is calcium-calmodulin-independent and produces much higher amounts of NO as compared to NOS I or III [20]. However, the appearance of NO from the action of NOS II requires several hours because it necessitates the induction of the gene [20]. NO is produced in vascular endothelial cells and acts in smooth muscle cells where it activates the soluble guanylyl-cyclase and forms cGMP leading to vasodilatation [22]. Its short half-life (3–5 s) suggests a rapid and local role.

In cell models, NO effects can be mimicked by NO donors like S-Nitroso-N-Acetyl-DL Penicillamine (SNAP) or Diethylenetriamine NONOate. In contrast, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or L-N^G-monomethyl Arginine are commonly used to inhibit NOS, whatever the isoform. Due to the quick lability of NO, its production is difficult to evaluate. To alleviate these difficulties, the concentration of nitrite in plasma and incubation media has been used as a reflection of NO production.

The role of NO in cell physiology is complex and frequently unclear because it depends on the cell type, the NO concentration and the length of action [23]. In pathological conditions like obesity, inflammation and insulin resistance, the concentrations of nitrites in the plasma are in the micromolar range and oxidant and cytotoxic effects of NO are observed [24,25]. It is believed that, when present in high amounts, NO reacts with O₂^{•-}, a potent oxidant, to form ONOO⁻, thus overriding natural antioxidants and scavengers [25]. Large amounts of NO released in cells inactivate proteins, leading to their degradation and to cell death [26,27]. High and sustained levels of NO result from the induction of NOS II. Tyrosine nitration has been suggested as the mechanism leading to the altered protein stability and function which is associated with acute and chronic disease pathologies [28–30]. In contrast, it seems that at nanomolar concentrations, NO exerts anti-oxidant effects [25,28,31,32]. For instance, in endothelial cells, activation of NOS III rapidly provides low amounts of NO. Under these conditions, NO protects cell integrity against the formation of reactive oxygen species (ROS) following an oxidative stress and it inhibits peroxide-mediated toxicity [33,34]. The action of NO depends also on the length of exposure to the gas. A short-term exposure (<12 h) of endothelial cells with NO donors down-regulates the expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC-1 α) [35]. In contrast, a long-term exposure (4 days) induces PGC-1 α in human thyroid cell line, or in cultured brown

adipocytes or L6 myotubes [36–38]. Under such conditions, NO increases mitochondrial biogenesis and the oxidative phosphorylation status.

3. NO-mediated vascular effects of leptin and hypertension

NO production plays an important role in the regulation of arterial pressure. Frühbeck originally showed that leptin exerts a biphasic effect on blood pressure regulation [39]. The pressor effect of sympathoexcitation induced by leptin was opposed by the simultaneous leptin-mediated release of NO that contributed to vasorelaxation and decrease of blood pressure. Other studies then suggested that leptin-induced arterial relaxation was mediated by NO released from the endothelium, and that Akt played an important role in this process [11,40,41]. Therefore, leptin can stimulate NO formation by directly activating NOS III, which may account for its vasodilatation and hypotensive effects. More recently, it was shown that leptin increases NOS II protein expression in vascular smooth muscle cells and that the resulting rise of NO prevents the vasoconstrictor effects of angiotensin II [42].

In contrast, NOS II is involved in insulin-resistance, but not in hypertension and oxidative stress, in relation with obesity [43]. In muscle, AMPK prevents NOS II induction and reduces NO production leading to a reduced effect of insulin. AMPK activation also suppresses the expression of the NOS II protein in cytokine-treated adipocytes suggesting a counterbalancing role for the pathogenic induction in atherosclerosis and obesity-linked diabetes for example [44].

Other studies have reported the occurrence of both NO-dependent and NO-independent mechanisms [45,46]. Obesity is often associated with hypertension, and it has been shown that leptin affects blood pressure by activating the sympathetic nervous system [11,19,20,22]. When acting on the kidney, leptin exerts opposite effects on blood pressure, either acute, due to NO synthesis, or chronic, by affecting renal sympathetic activation [11,45]. In the short-term, leptin increases NO production, which inhibits renal sodium reabsorption leading to excretion of sodium in urine. This effect is mediated, at least partially, by decreased Na⁺, K⁺-ATPase activity in the renal medulla, and is impaired in obese rats [47]. These effects are attenuated in spontaneously hypertensive rats (SHR) and in Sprague Dawley rats fed with a cafeteria diet [11,48]. Additionally, human leptin administered intraperitoneally stimulates natriuresis and reduces renal medullary Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat and is impaired in dietary-induced obese rats [47]. Since obesity is associated with leptin-resistance, the occurrence of such a resistant state in the kidney can be postulated reasonably in the obese and, thus, could contribute at least partly to the hypertension observed in this pathological state. In contrast, in the long-term, leptin acts on the renal sympathetic nervous system and increases blood pressure. It reduces natriuresis favoring the retention of sodium which is associated with the inhibition of NO synthesis [11]. This alteration in natriuresis could partly explain the high blood pressure observed in the obese with chronic hyperleptinemia [11,49]. Melanocortin of the central nervous system (CNS), by which leptin chronically regulates blood pressure may exert an important role. Acute studies indicate that activation of CNS melanocortin receptors (MC3/4R), using pharmacological agonists, raises blood pressure. Chronic blockade of these receptors reduces blood pressure. Furthermore, studies also suggest that in the obese, a reduced NO formation in the brain is observed, a change that could amplify the chronic blood pressure effects of melanocortin activation [50].

In addition, this adipokine causes the release of FA from WAT [45,51]. This increase in FA could contribute to the development of obesity-associated hypertension.

Therefore, leptin plays two opposing compensatory roles on arterial pressure with a hypertensive effect linked to sympathetic activation and a vasorelaxant effect resulting from NO production.

4. Leptin, NO and inflammation

Leptin has a dual effect on the immune system. On the one hand, this hormone has a protective role against infections because it regulates T-cell proliferation and activation [52,53]. To our knowledge there is still no evidence that leptin action on T-cells results in intracellular NO production. On the other hand, this adipokine functions as a pro-inflammatory cytokine [12,54]. There is increasing evidence that leptin is involved in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases like rheumatoid arthritis [3]. NOS II is expressed in osteoarthritic cartilage and in macrophages in the course of obesity. Leptin alone or in combination with other pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 – IL-1, tumor necrosis factor alpha – TNF α) enhance NOS II expression in chondrocytes via NF- κ b [55,56]. From a large standpoint, due to NOS II expression in activated macrophages, the production of this protein is increased in case of macrophage proliferation and infiltration in WAT such as in obesity, diabetes and aging [12,49,53,54]. Furthermore, in chondrocytes, leptin has been shown to enhance the inductive action of IL-1 and IL-8 on NOS II, and thus on NO production, whereas estrogens inhibited IL-1 effects [12,53,56,57]. Therefore, leptin, acting via NO as an agent to produce pro-inflammatory factors in cartilage pathology, could contribute to an increased risk for osteoarthritis in obesity.

5. Leptin, NO and glucose metabolism

Leptin acts via the central nervous system to modulate glucose metabolism in muscle and liver [58,59]. Intra-cerebro-ventricular (ICV) or intra-venous (IV) injection of this hormone increases glucose uptake and gluconeogenesis in the liver along with an increase in glucose-6-phosphatase activity [60–62]. Both central and direct effects of leptin on muscle glucose uptake have been demonstrated [60,62]. However, conflicting results have been observed for the action of leptin on glucose uptake and glycogen synthesis depending upon the biological model and the presence or not of insulin [63–66]. In the Caco2 intestinal model system leptin rapidly inhibits glucose uptake and reduces the number of amino acid transporters [13]. A recent report shows that leptin relieves intestinal ischemia/reperfusion injury by promoting ERK1/2 phosphorylation and the NO signaling pathway [67]. It would be worth investigating whether a similar signaling pathway is involved in leptin action on intestinal glucose uptake and metabolism.

The potential dependence on NO for the action of leptin on gluconeogenesis in the liver has not been evaluated yet. In contrast, in skeletal muscle, it has been shown that following ICV injection of leptin, L-NAME inhibits the hormone-induced glucose uptake and synthesis of glycogen [68]. When applied directly to L6 myotubes in culture, NO donors increase the expression of glucose transporter 4 (Glut4) via cGMP- and AMPK-dependent mechanisms [69]. Other results have demonstrated that the genetic deletion of NOS II in mice protects against high fat diet (HFD)-induced insulin resistance, suggesting that NOS II may cause insulin resistance through NO-mediated tyrosine nitration of key proteins intervening in insulin signaling such as insulin receptor beta (IR β), insulin receptor substrate (IRS) and Akt in liver and skeletal muscle [43,70]. However, the link between leptin action, NO production and glucose transport and oxidation remains unexplored.

Of utmost interest is the very recent discovery that a subset of hypothalamic neurons specifically expressing both Ob-Rb and NOS I are key players in leptin action for the control of energy balance

and glucose homeostasis [71]. Selective genetic ablation of Ob-Rb in this subset of neurons in mice produces hyperphagic obesity, decreased energy expenditure and hyperglycemia. Therefore, leptin acts through NOS-I-expressing neurons to control energy balance. This discovery opens up a new avenue in obesity research.

6. Leptin, NO and fatty acid metabolism

A large number of studies point to leptin, acting either directly or via the hypothalamus, as important regulator of lipid metabolism. For instance in muscle, leptin stimulates FA oxidation by activating AMPK [15]. In the liver, this adipokine decreases long chain FA production and increases hepatic lipid export [72]. In pancreatic beta cells, leptin blocks FA-induced apoptosis [73]. In WAT it stimulates lipolysis and AMPK phosphorylation which leads to a reduced expression of the acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS) genes whereas carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) gene expression is stimulated [15,51,74,75]. All these studies suggest that leptin prevents lipid storage and improves energy expenditure in WAT.

The evidence that NO and FA metabolism are tightly connected originally came from the Unger group and from our group [76–78]. On the one hand, it was shown that NO is required for FA-induced attenuation of insulin secretion in prediabetic rat islets, at least *in vitro* [77]. On the other hand, Ribière et al. demonstrated that rat adipocytes express NOS II and NOS III and that NO donors induce lipolysis [76,78]. Other studies highlighted the fact that NO could also restrain lipolysis in cytokine/LPS-activated adipocytes, possibly via oxidative modifications of key lipolytic proteins [79]. Furthermore, a diet supplemented with arginine decreases retroperitoneal fat mass and enhances the expression of genes involved in FA oxidation in adipocytes from obese diabetic Zucker rats [80,81]. Finally, NOS III knockout mice present increased abdominal fat mass, dyslipidemia and are insulin-resistant [37].

The link between leptin action, NO and FA metabolism was provided by the pioneering work of the Fr uhbeck group who showed that both *in vivo* and in cultured adipocytes from rats, L-NAME prevents the leptin-induced release of glycerol as a marker of lipolysis [82]. During fasting, glycerol released from adipocytes is taken up by the liver where it is the major substrate for gluconeogenesis. Aquaporin 7 is synthesized by fat cells and is reported to act as a channel for the output of glycerol and water and to facilitate the movement of small solutes across the adipocyte membrane [83]. While gaseous molecules have traditionally been thought to travel from cell to cell by free diffusion through the bilayer portion of the membrane, this does not explain their rapid physiological actions. The recent observations that: (1) water channels can transport other molecules besides water, and (2) aquaporins are often expressed in tissues where gas (but not water) transport is essential suggest that these channels conduct physiologically important gases in addition to water. NO must traverse two lipid bilayers to exit the cells where it is produced as well as when entering other cells. It has been shown that aquaporins, which are integral membrane proteins that operate as water channels, also transport NO [84]. Hence, NO could thus be a paracrine messenger between cells. On a pathological viewpoint, the deficiency of aquaporin 7 in adipocytes is associated with the accumulation of glycerol-3P (G3P) in these cells, contributing to the adult-onset obesity in mice [83].

Other studies have demonstrated that leptin enhances NO production and lipid catabolism in the human placenta, which provides supportive evidence for its role in placental functions [85]. In addition, leptin stimulates fatty acid oxidation in the intact heart by a STAT-3–NO–p38 MAPK-dependent mechanism [86]. There is now clear evidence that leptin acts via NO production in multiple tissues.

In 2005 Mehebi et al. partly deciphered the mechanism by which leptin modulates NO production in adipocytes [87]. The adipokine activates NOS III phosphorylation through MAP kinase and PKA signal transduction which results in the production of NO. This proposed mechanism could explain the positive correlation between plasma nitrite levels and fat mass (see above). Insulin also induces NOS III phosphorylation, although via a different pathway (PI3K) [88]. These observations prompted us to analyze the combined effects of leptin and insulin. We showed that there is a mutual resistance following activation of NOS III [89]. Leptin phosphorylates IRS-1, thereby inducing insulin resistance. Simultaneously, insulin dephosphorylates Jak-2, hence provoking leptin resistance. The interference of signaling between these two hormones could play a crucial role in insulin- and leptin-resistance observed in obesity.

7. Leptin, NO and glyceroneogenesis

During fasting, circulating FAs arise from WAT as a consequence of lipolysis of stored triglycerides. However, a significant portion of these FAs (30–70%) is re-esterified within the adipocyte, so that a recycling occurs and the net FA output of FA is much less than would occur for a « true » lipolysis [90]. A balance between antagonistic processes, lipolysis, beta-oxidation and FA re-esterification, control the rate of net FA release from WAT. The process of re-esterification requires G3P, the synthesis of which involves glyceroneogenesis. The latter was defined 45 years ago by Hanson, Reshef and colleagues as the *de novo* synthesis of G3P from pyruvate, lactate or amino acids and its key enzyme was demonstrated to be the cytosolic isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) [91]. Our results indicate that glyceroneogenesis is indeed important for lipid homeostasis and that deregulation of this pathway has profound pathophysiological effects [92]. Several nutrients, hormones and pharmacological agents like thiazolidinediones modulate glyceroneogenesis by altering PEPCK-C gene (*Pck1*) regulation and PEPCK-C synthesis [93–96].

Our work shows that leptin at physiological concentrations (10 ng/ml) and depending on the duration of treatment can cause either an increase or a decrease in adipocyte lipolysis, and that NO is likely involved [97]. When WAT explants were incubated with leptin for 2 h, lipolysis was induced leading to the release of glycerol and FA. However, incubation for 18 h resulted in the opposite effect. With long-term treatment, glycerol release was indeed reduced but FA output remained constant. This was because FA re-esterification was also diminished as shown by a decrease in the incorporation of radiolabeled [1-¹⁴C]-pyruvate into neutral lipids (glyceroneogenesis). This effect was due to a coordinated down-regulation of the hormone sensitive lipase (HSL) and PEPCK-C proteins. Leptin effects on lipid metabolism were mimicked by SNAP and abolished by L-NAME, thus showing that they depend on NO production. Hence, depending on the duration of treatment, this adipokine can cause both an increase or a decrease in lipid breakdown, and NO is involved in the process.

We then wondered whether PEPCK-C was an acute leptin target. We exposed rat WAT explants to 10 ng/ml leptin for 2 h and showed that glyceroneogenesis and PEPCK-C protein were down-regulated, in the absence of any effect on *Pck1* expression [98]. We also found that NO was involved in this down-regulation. The rapid decrease in the level of PEPCK-C is intriguing. Until recently, no allosteric modifier of this enzyme was described and no factor that regulated its rate of degradation was known. However, recent data has shown that the acetylation of hepatic PEPCK-C results in a rapid decrease in the level of the enzyme and supports the hypothesis that a post-translational modification is an adequate mechanism for glucose to rapidly repress gluconeogenesis [99,100]. Since NO exerts nitrate

and nitrosylative activities, we postulated that NO-mediated modifications of PEPCK-C affect its stability, explaining the reduced levels. We recently observed that the rapid leptin-induced decrease in PEPCK-C level was correlated with an increase in PEPCK-C nitration [98]. These observations shed important light on the complexity of the physiological mechanisms by which body weight is regulated in both the short- and long-term.

Previous data from our laboratory also have revealed that another cytokine, interferon gamma (IFN- γ), reduces glyceroneogenesis and *Pck1* expression [101]. IFN- γ , like leptin, is able to induce NO production [102]. We thus tested the hypothesis that IFN- γ affects PEPCK-C expression via NO and that leptin and IFN-g exert similar mechanisms. To this end we treated WAT explants with leptin (10 ng/ml) or/and IFN- γ (50 ng/ml) for 6 h. As shown in Fig. 1A, IFN- γ up-regulated NOS II mRNA whereas leptin had no effect. Both cytokines significantly decreased PEPCK-C mRNA (Fig. 1B). Surprisingly, treatment with IFN- γ and leptin simultaneously, reduced IFN- γ accumulation of NOS II mRNA and abolished the inhibitory effect of each cytokine on PEPCK-C mRNA (Fig. 1A and B). There is no explanation yet for this interference of action, which could arise, however, from the difference in the origins of NO induced by these

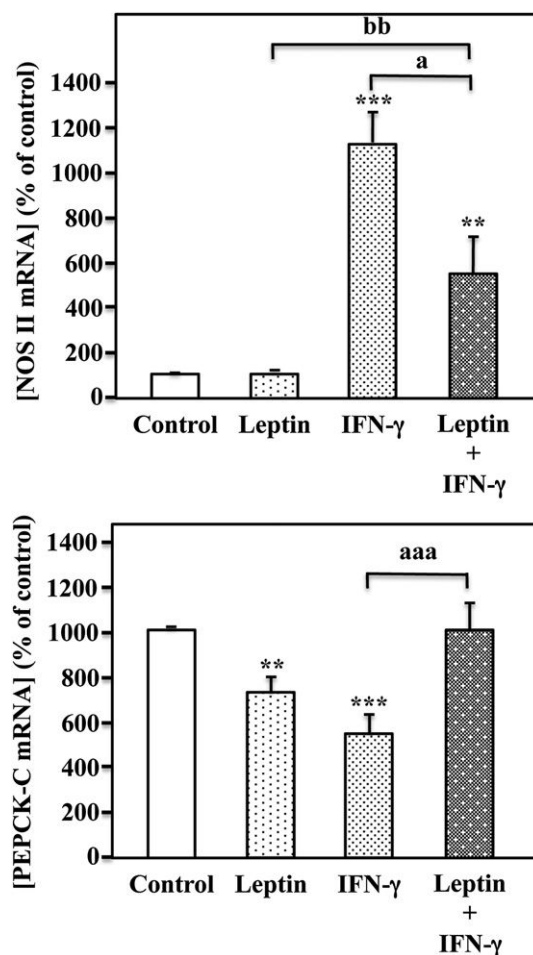


Fig. 1. Effects of leptin and IFN- γ on NOS II and PEPCK-C mRNA in rat WAT explants. Explants were treated or not with leptin (10 μ g/L) or IFN- γ (50 μ g/L) for 6 h in Krebs–Ringer bicarbonate medium containing 2% bovine serum albumin. PEPCK-C and NOS II mRNA levels were analyzed by real time RT-PCR as described [89]. Results are normalized using 18S rRNA. The nonparametric Mann–Whitney *U* test for pairwise comparisons was applied due to the small number of experiments. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Each value represents the mean \pm SEM, ($n = 5$). ** $P < 0.01$ vs. control; *** $P < 0.001$; ^a $P < 0.05$ vs. IFN- γ -treated explants; ^{aaa} $P < 0.001$ vs. IFN- γ -treated explants; ^{bb} $P < 0.01$ vs. leptin-treated explants.

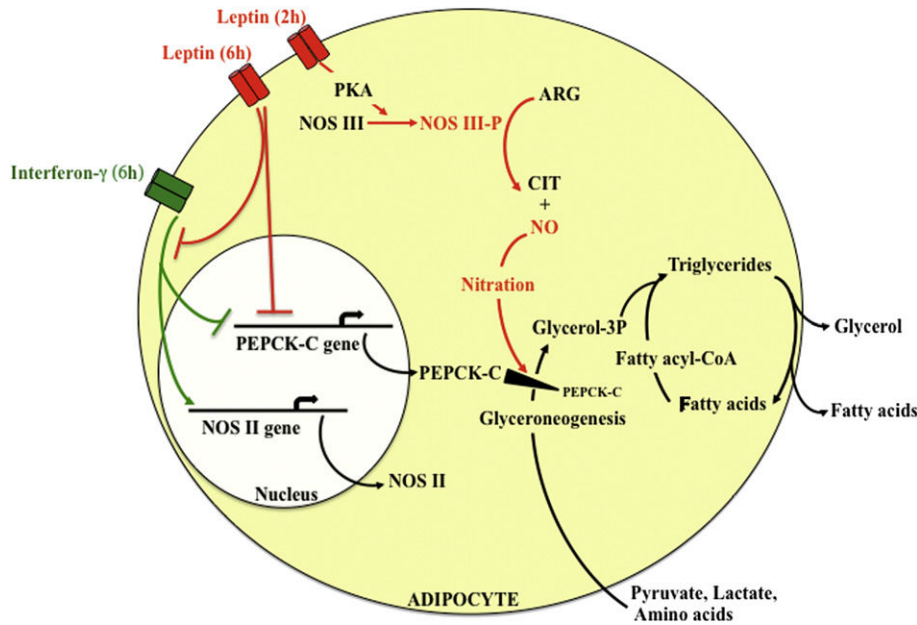


Fig. 2. Schematic representation of the effects of leptin and IFN-γ on glyceroneogenesis and PEPCK-C in adipocytes. A 2 h treatment of adipocytes with leptin leads to NOS III phosphorylation, activating it, and to NO production that reduces PEPCK-C levels probably via nitration of the protein. The resulting alteration of glyceroneogenesis induces a decrease in fatty acid re-esterification. A 6 h treatment of adipocytes with leptin provokes a decrease in PEPCK-C gene expression without affecting the NOS II gene, whereas IFN-γ reduces PEPCK-C gene expression but stimulates the expression of the NOS II gene. Leptin attenuates the effect of IFN-γ on the expression of PEPCK-C and NOS II genes.

cytokines. Leptin phosphorylates NOS III, activating it which results in a very rapid rise in NO [87]. IFN-γ induces NOS II, which thus leads to the delayed release of a large amount of NO [102,103]. Leptin could nitrosylate or nitrate transcription factors that counteract the action of IFN-γ on the NOS II gene. A similar explanation could be advanced in the case of *Pck1*. A summary of the effects of leptin and IFN-γ on glyceroneogenesis and PEPCK-C in adipocytes is illustrated in Fig. 2.

The negative crosstalk between leptin and IFN-γ described above resemble that observed previously between insulin and leptin signaling [89]. In any case, the treatment of WAT with leptin, whether on a long-term or short-term basis, negatively affects glyceroneogenesis and PEPCK-C levels, thereby limiting FA storage.

8. Conclusion

NO is an essential signal for the action of leptin on various tissues, including the pituitary, beta-cells of the pancreas, immune cells, cartilage, muscle and WAT. The NO-mediated role of leptin in cell physiology is complex. First, this adipokine has either a central action or a direct effect on responsive cells of the periphery. For instance, leptin plays two opposing compensatory roles on arterial pressure with a hypertensive effect linked to sympathetic activation and a vasorelaxant effect associated with NO production. Second, the NO-mediated leptin effect depends on the cell type, NOS isoforms, NO concentration and the length of leptin action (Fig. 3). Furthermore, leptin via NO could counteract the effect of other hormones and cytokines, such as insulin or IFN-γ, in relation with pathophysiological conditions. For instance, a NO-mediated decrease in fatty acid re-esterification is a pertinent mechanism by which leptin could reduce energy storage in the obese.

Acknowledgments

The Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche has awarded a fellowship to FN. This work was financed by the Institut National de la Recherche Médicale and the Université Paris Descartes. We also thank Dr L. Aggerbeck (INSERM UMR-S 747, Université Paris Descartes) for useful comments on the article and NO help with its title.

References

- [1] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372 (1994) 425–432.
- [2] J.M. Friedman, Leptin, leptin receptors, and the control of body weight, *Nutr. Rev.* 56 (1998) s38–46, discussion s54–75.
- [3] Q.L.K. Lam, L. Lu, Role of leptin in immunity, *Cell. Mol. Immunol.* 4 (2007) 1–13.
- [4] L.A. Tartaglia, M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, et al., Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R, *Cell* 83 (1995) 1263–1271.

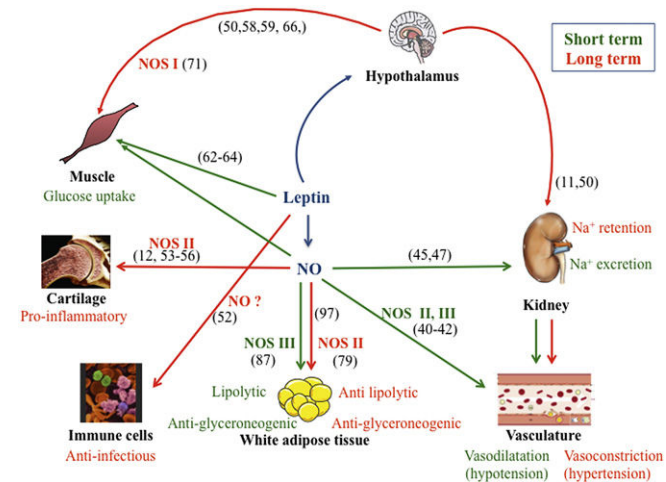


Fig. 3. Schematic representation of the short-term and long-term effects of leptin: role of NO. Short-term effects are represented in green arrows and long-term effects are in red arrows. NOS isoforms that have been clearly shown as those involved in the effects are indicated on the corresponding arrow. The numbers in parentheses report the references of the manuscripts that describe the corresponding mechanisms.

- [5] G. Sweeney, Leptin signalling, *Cell. Signal.* 14 (2002) 655–663.
- [6] M.G. Myers, M.A. Cowley, H. Münzberg, Mechanisms of leptin action and leptin resistance, *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008) 537–556.
- [7] R.S. Ahima, Central actions of adipocyte hormones, *Trends Endocrinol. Metab.* 16 (2005) 307–313.
- [8] D.S. Jessop, Review: central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, *J. Endocrinol.* 160 (1999) 169–180.
- [9] S.M. McCann, S. Karanth, C.A. Mastronardi, W.L. Dees, G. Childs, B. Miller, et al., Control of gonadotropin secretion by follicle-stimulating hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone, and leptin, *Arch. Med. Res.* 32 (2001) 476–485.
- [10] M. Guerre-Millo, Adipose tissue and adipokines: for better or worse, *Diabetes Metab.* 30 (2004) 13–19.
- [11] P.E. Bravo, S. Morse, D.M. Borne, E.A. Aguilar, E. Reisin, Leptin and hypertension in obesity, *Vasc. Health Risk Manag.* 2 (2006) 163–169.
- [12] K. Vuolteenaho, A. Koskinen, M. Kukkonen, R. Nieminen, U. Pääväranta, T. Moilanen, et al., Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-mediator role of NO in leptin-induced PGE₂, IL-6, and IL-8 production, *Mediators Inflamm.* (2009) 345838.
- [13] C. Fanjul, J. Barrenetxe, C. Iñigo, Y. Sakar, R. Ducroc, A. Barber, et al., Leptin regulates sugar and amino acids transport in the human intestinal cell line Caco-2, *Acta Physiol.* (2012).
- [14] B. Burguera, A. Brunetto, A. Garcia-Ocana, R. Teijeiro, J. Esplen, T. Thomas, et al., Leptin increases proliferation of human osteosarcoma cells through activation of PI(3)-K and MAPK pathways, *Med. Sci. Monit.* 12 (2006) BR341–349.
- [15] Y. Minokoshi, Y.-B. Kim, O.D. Peroni, L.G.D. Fryer, C. Müller, D. Carling, et al., Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nature* 415 (2002) 339–343.
- [16] G. Frühbeck, Intracellular signalling pathways activated by leptin, *Biochem. J.* 393 (2006) 7.
- [17] W.H. Yu, A. Walczewska, S. Karanth, S.M. McCann, Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland, *Endocrinology* 138 (1997) 5055–5058.
- [18] M.-Y. Wang, K. Koyama, M. Shimabukuro, C.B. Newgard, R.H. Unger, OB-Rb gene transfer to leptin-resistant islets reverses diabetogenic phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 714.
- [19] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980) 373–376.
- [20] U. Förstermann, H. Kleinert, Nitric oxide synthase: expression and expression control of the three isoforms, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352 (1995) 351–364.
- [21] W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem. J.* 357 (2001) 593–615.
- [22] W.P. Arnold, C.K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (1977) 3203–3207.
- [23] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 109–142.
- [24] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1752–1761.
- [25] J.S. Stamler, D.J. Singel, J. Loscalzo, Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science* 258 (1992) 1898–1902.
- [26] J.S. Stamler, D.I. Simon, J.A. Osborne, M.E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, et al., S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 444–448.
- [27] J.M. Souza, I. Choi, Q. Chen, M. Weisse, E. Daikhin, M. Yudkoff, et al., Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 380 (2000) 360–366.
- [28] R.P. Patel, A. LeVonen, J.H. Crawford, V.M. Darley-Usmar, Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis, *Cardiovasc. Res.* 47 (2000) 465–474.
- [29] R. Radi, Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 4003–4008.
- [30] P.J. White, A. Charbonneau, G.J. Cooney, A. Marette, Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299 (2010) E868–E878.
- [31] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman, Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4244–4250.
- [32] J. Kanner, S. Harel, R. Granit, Nitric oxide as an antioxidant, *Arch. Biochem. Biophys.* 289 (1991) 130–136.
- [33] S.L. Linas, J.E. Repine, Endothelial cells protect vascular smooth muscle cells from H₂O₂ attack, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) F767–F773.
- [34] A.C. Degnim, S.E. Morrow, J. Ku, H.A. Zar, D.K. Nakayama, Nitric oxide inhibits peroxide-mediated endothelial toxicity, *J. Surg. Res.* 75 (1998) 127–134.
- [35] S. Borniquel, I. Valle, S. Cadenas, S. Lamas, M. Monsalve, Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α , *FASEB J.* 20 (2006) 1889–1891.
- [36] M. Raharjaona, S. Le Pennec, J. Poirier, D. Mirebeau-Prunier, C. Rouxel, C. Jacques, et al., PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocyctic thyroid tumours, *PLoS ONE* 4 (2009) e7964.
- [37] E. Nisoli, E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, et al., Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide, *Science* 299 (2003) 896–899.
- [38] V.A. Lira, D.L. Brown, A.K. Lira, A.N. Kavazis, Q.A. Soltow, E.H. Zeanah, et al., Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells, *J. Physiol.* 588 (2010) 3551–3566.
- [39] G. Frühbeck, Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration, *Diabetes* 48 (1999) 903–908.
- [40] K. Kimura, K. Tsuda, A. Baba, T. Kawabe, S. Boh-oka, M. Ibata, et al., Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (2000) 745–749.
- [41] C. Vecchione, A. Maffei, S. Colella, A. Aretini, R. Poulet, G. Frati, et al., Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway, *Diabetes* 51 (2002) 168–173.
- [42] A. Rodríguez, A. Fortuño, J. Gómez-Ambrosi, G. Zalba, J. Díez, G. Frühbeck, The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism, *Endocrinology* 148 (2007) 324–331.
- [43] M. Perreault, A. Marette, Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle, *Nat. Med.* 7 (2001) 1138–1143.
- [44] G. Pilon, P. Dallaire, A. Marette, Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20767–20774.
- [45] S. Engeli, A.M. Sharma, Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease, *Horm. Metab. Res.* 32 (2000) 485–499.
- [46] Y.-M. Leung, C.-Y. Kwan, Dual vascular effects of leptin via endothelium: hypothesis and perspective, *Chin. J. Physiol.* 51 (2008) 1–6.
- [47] J. Beitowski, Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension, *J. Hypertens.* 24 (2006) 789–801.
- [48] G. Coatmellec-Tagliioni, J.-P. Dausse, Y. Giudicelli, C. Ribière, Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 362–367.
- [49] M. Lafontan, [Kidney, adipose tissue, adipocytes – what's new?], *Nephrol. Ther.* 7 (2011) 69–79.
- [50] J.M. do Carmo, M. Bassi, A.A. da Silva, J.E. Hall, Systemic but not central nervous system nitric oxide synthase inhibition exacerbates the hypertensive effects of chronic melanocortin-3/4 receptor activation, *Hypertension* 57 (2011) 428–434.
- [51] G. Frühbeck, M. Aguado, J.A. Martínez, In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 (1997) 590–594.
- [52] A. La Cava, G. Matarese, The weight of leptin in immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 371–379.
- [53] G. Fantuzzi, Adipose tissue, adipokines, and inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 911–919, quiz 920.
- [54] T.J. Guzik, D. Mangalat, R. Korbut, Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (2006) 505–528.
- [55] S.K. Fried, D.A. Bunkin, A.S. Greenberg, Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 847–850.
- [56] M. Otero, R. Lago, F. Lago, J.J.G. Reino, O. Gualillo, Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) R581–R591.
- [57] P. Rchette, M.-F. Dumontier, K. Tahiri, M. Widerak, A. Torre, M. Benallaoua, et al., Oestrogens inhibit interleukin 1 β -mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor-kappa B impairment, *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 345–350.
- [58] S.H. Bates, J.V. Gardiner, R.B. Jones, S.R. Bloom, C.J. Bailey, Acute stimulation of glucose uptake by leptin in l6 muscle cells, *Horm. Metab. Res.* 34 (2002) 111–115.
- [59] E.D. Berglund, C.R. Vianna, J. Donato Jr., M.H. Kim, J.-C. Chuang, C.E. Lee, et al., Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice, *J. Clin. Invest.* (2012).
- [60] S. Kamohara, R. Burcelin, J.L. Halaas, J.M. Friedman, M.J. Charron, Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment, *Nature* 389 (1997) 374–377.
- [61] L. Rossetti, D. Massillon, N. Barzilay, P. Vuguin, W. Chen, M. Hawkins, et al., Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27758–27763.
- [62] R. Burcelin, S. Kamohara, J. Li, G.S. Tannenbaum, M.J. Charron, J.M. Friedman, Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in ob/ob mice, *Diabetes* 48 (1999) 1264–1269.
- [63] L. Berti, M. Kellerer, E. Capp, H.U. Häring, Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect, *Diabetologia* 40 (1997) 606–609.
- [64] R.B. Ceddia, W.N. William Jr., R. Curi, Leptin increases glucose transport and utilization in skeletal muscle in vitro, *Gen. Pharmacol.* 31 (1998) 799–801.

- [65] G. Sweeney, J. Keen, R. Somwar, D. Konrad, R. Garg, A. Klip, High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in I6 rat skeletal muscle cells, *Endocrinology* 142 (2001) 4806–4812.
- [66] G. Frühbeck, J. Salvador, Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism, *Diabetologia* 43 (2000) 3–12.
- [67] Z.-H. Deng Jr., G.-T. Yan, L.-H. Wang, J.-Y. Zhang, H. Xue, K. Zhang, Leptin relieves intestinal ischemia/reperfusion injury by promoting ERK1/2 phosphorylation and the NO signaling pathway, *J. Trauma Acute Care Surg.* 72 (2012) 143–149.
- [68] T. Shiuchi, H. Nakagami, M. Iwai, Y. Takeda, T.-X. Cui, R. Chen, et al., Involvement of bradykinin and nitric oxide in leptin-mediated glucose uptake in skeletal muscle, *Endocrinology* 142 (2001) 608–612.
- [69] V.A. Lira, Q.A. Soltow, J.H.D. Long, J.L. Betters, J.E. Sellman, D.S. Criswell, Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E1062–E1068.
- [70] G. Pilon, A. Charbonneau, P.J. White, P. Dallaire, M. Perreault, S. Kapur, et al., Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO⁻ induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle, *PLoS ONE* 5 (2010) e15912.
- [71] R.L. Leshan, M. Greenwald-Yarnell, C.M. Patterson, I.E. Gonzalez, M.G. Myers Jr., Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance, *Nat. Med.* (2012).
- [72] A. Singh, M. Wirtz, N. Parker, M. Hogan, J. Strahler, G. Michailidis, et al., Leptin-mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 13100–13105.
- [73] M. Shimabukuro, Y.T. Zhou, M. Levi, R.H. Unger, Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2498–2502.
- [74] C.A. Siegrist-Kaiser, V. Pauli, C.E. Juge-Aubry, O. Boss, A. Pernin, W.W. Chin, et al., Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 2858–2864.
- [75] M.Y. Wang, Y. Lee, R.H. Unger, Novel form of lipolysis induced by leptin, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17541–17544.
- [76] C. Ribiere, A.M. Jaubert, N. Gaudiot, D. Sabourault, M.L. Marcus, J.L. Boucher, et al., White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222 (1996) 706–712.
- [77] M. Shimabukuro, M. Ohneda, Y. Lee, R.H. Unger, Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 290–295.
- [78] N. Gaudiot, A.M. Jaubert, E. Charbonnier, D. Sabourault, D. Lacasa, Y. Giudicelli, et al., Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13475–13481.
- [79] P. Penforis, A. Marette, Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 135–142.
- [80] W.J. Fu, T.E. Haynes, R. Kohli, J. Hu, W. Shi, T.E. Spencer, et al., Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats, *J. Nutr.* 135 (2005) 714–721.
- [81] W. Jobgen, C.J. Meininger, S.C. Jobgen, P. Li, M.-J. Lee, S.B. Smith, et al., Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats, *J. Nutr.* 139 (2009) 230–237.
- [82] G. Frühbeck, J. Gómez-Ambrosi, Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide, *Cell. Signal.* 13 (2001) 827–833.
- [83] G. Frühbeck, Obesity: aquaporin enters the picture, *Nature* 438 (2005) 436–437.
- [84] M. Herrera, J.L. Garvin, Aquaporins as gas channels, *Pflugers Arch.* 462 (2011) 623–630.
- [85] V. White, E. González, E. Capobianco, C. Pustovrh, N. Martínez, R. Higa, et al., Leptin modulates nitric oxide production and lipid metabolism in human placenta, *Reprod. Fertil. Dev.* 18 (2006) 425–432.
- [86] V. Sharma, S. Mustafa, N. Patel, R. Wambolt, M.F. Allard, J.H. McNeill, Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism, *Eur. J. Pharmacol.* 617 (2009) 113–117.
- [87] N. Mehebig, A.-M. Jaubert, D. Sabourault, Y. Giudicelli, C. Ribière, Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289 (2005) C379–C387.
- [88] C. Ribière, A.-M. Jaubert, D. Sabourault, D. Lacasa, Y. Giudicelli, Insulin stimulates nitric oxide production in rat adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291 (2002) 394–399.
- [89] N. Mehebig-Mojaat, C. Ribière, F. Niang, C. Forest, A.-M. Jaubert, Leptin and insulin induce mutual resistance for nitric oxide synthase III activation in adipocytes, *J. Cell. Biochem.* 108 (2009) 982–988.
- [90] J. Tordjman, W. Khazen, B. Antoine, G. Chauvet, J. Quette, F. Fouque, et al., Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes, *Biochimie* 85 (2003) 1213–1218.
- [91] J. Yang, S.C. Kalhan, R.W. Hanson, What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 27025–27029.
- [92] E.G. Beale, B.J. Harvey, C. Forest, PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes, *Cell Biochem. Biophys.* 48 (2007) 89–95.
- [93] J. Antras-Ferry, S. Franckhauser, D. Robin, P. Robin, D.K. Granner, C. Forest, Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: effects of retinoic acid and differentiation, *Biochem. J.* 302 (Pt 3) (1994) 943–948.
- [94] C. Forest, S. Franckhauser, M. Glorian, J. Antras-Ferry, D. Robin, P. Robin, Regulation of gene transcription by fatty acids, fibrates and prostaglandins: the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene as a model, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57 (1997) 47–56.
- [95] S.N. Leroyer, J. Tordjman, G. Chauvet, J. Quette, C. Chapron, C. Forest, et al., Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 13141–13149.
- [96] J. Yang, L. Reshef, H. Cassuto, G. Aleman, R.W. Hanson, Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 27031–27035.
- [97] F. Niang, C. Benelli, C. Ribière, M. Collinet, N. Mehebig-Mojaat, G. Penot, et al., Leptin induces nitric oxide-mediated inhibition of lipolysis and glyceroneogenesis in rat white adipose tissue, *J. Nutr.* 141 (2011) 4–9.
- [98] A.M. Jaubert, G. Penot, F. Niang, S. Durant, C. Forest, Rapid nitration of adipocyte phosphoenolpyruvate carboxykinase by leptin reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release. *PLoS ONE* (in press).
- [99] W. Jiang, S. Wang, M. Xiao, Y. Lin, L. Zhou, Q. Lei, et al., Acetylation regulates glyceroneogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase, *Mol. Cell.* 43 (2011) 33–44.
- [100] S. Zhao, W. Xu, W. Jiang, W. Yu, Y. Lin, T. Zhang, et al., Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation, *Science* 327 (2010) 1000–1004.
- [101] W. Khazen, E. Distel, M. Collinet, V.E. Chaves, J.-P. M'Bika, C. Chany, et al., Acute and selective inhibition of adipocyte glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase by interferon gamma, *Endocrinology* 148 (2007) 4007–4014.
- [102] P. Dighiero, F. Behar-Cohen, Y. Courtois, O. Goureau, Expression of inducible nitric oxide synthase in bovine corneal endothelial cells and keratocytes in vitro after lipopolysaccharide and cytokines stimulation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 2045–2052.
- [103] R.N. Mitchell, A.H. Lichtman, The link between IFN-gamma and allograft arteriopathy: is the answer NO? *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 762–764.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Effet direct de la CIT sur le métabolisme du tissu adipeux de rats âgés ?

Dans une société où l'espérance de vie s'allonge de plus en plus, il est important d'améliorer la qualité de vie liée à la santé des personnes âgées. Le vieillissement s'accompagne le plus souvent d'une perte de masse musculaire et d'un excès de masse adipeuse associés au développement de nombreuses pathologies chroniques et notamment le DT2. La CIT, par son action sur les métabolismes protéique et énergétique apparaît comme un candidat intéressant dans la prise en charge des personnes âgées.

En plus de son action sur le métabolisme protéique, la CIT agit sur le métabolisme énergétique. Une analyse protéomique dans un muscle à prédominance glycolytique a montré que la CIT modifie de manière significative l'expression de différentes enzymes du métabolisme du glucose (**Faure et al., 2013**). Au cours de travaux chez des rats âgés, il a été observé qu'un apport de CIT pendant 3 mois induit significativement une augmentation de la masse maigre (+8 %) et une réduction significative de la masse adipeuse sous-cutanée (-14 %) mais aussi viscérale (- 42 %) (**Moinard et al., 2009**). Ce résultat présente un grand intérêt compte tenu du rôle délétère de la masse adipeuse viscérale dans la pathogénie du syndrome métabolique.

Les mécanismes d'action de cet acide aminé demandent à être précisés.

Dans l'article 1, nous avons étudié l'action de la CIT sur le métabolisme du TAB afin de confirmer son intérêt dans la prévention nutritionnelle des maladies liées à l'âge. Cette étude a eu pour objectif d'évaluer si la CIT affecte directement ou non le métabolisme du TAB dans des explants de rats jeunes ou âgés. Nous avons concentré nos études sur 3 voies métaboliques, lipolyse, glycéronéogenèse, et β -oxydation ainsi que sur les principaux gènes impliqués dans ces différentes voies métaboliques.

Effet direct de la CIT lié à l'âge ou la masse du TAB ?

En 2012, Wu observe dans un modèle de rats diabétiques obèses ZDF alimentés par un régime supplémenté avec du jus de pastèque qui est naturellement riche en CIT, des modifications de la composition corporelle similaires à celles observées chez le rat âgé en 2009 par Moinard et coll.

Dans l'article 2, nous nous sommes donc demandé quels étaient les rôles respectifs de l'excès de masse adipeuse et du vieillissement dans les effets directs de la CIT sur le TA. Le but de cette étude a été d'évaluer si la CIT exerce également un effet lipolytique dans des explants de jeunes rats sous régime riche en lipides (*High-fat-diet*, HFD) qui développent un excès de masse adipeuse. En tenant compte de l'évolution parallèle des processus inflammatoires dans le TA des rats en surpoids, nous avons étudié l'implication du NO dans les effets de la CIT sur le métabolisme des AG.

Effet de la CIT sur la protéine découplante UCP1 ?

Les articles 1 et 2 ont permis de démontrer que la CIT stimule la β -oxydation dans des explants TA de rats jeunes mais non dans ceux de rats âgés. Dans l'article 3, nous avons cherché à savoir si la CIT exerçait un effet de brunissement du TAB de rats âgés sous régime contrôle ou de rats jeunes sous régime contrôle ou sous HFD. Dans ce but, nous avons analysé les variations de l'expression de la protéine découplante UCP 1 et de ses principaux régulateurs transcriptionnels.

RESULTATS

I. Résultats complémentaires *in vivo*

Effet *in vivo* de la citrulline sur la masse des tissus adipeux épидидymaire et rétropéritonéal de rats âgés sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois.

Des rats âgés de 22 mois sont nourris pendant 12 semaines soit avec un régime contenant de la CIT à 1g.kg⁻¹.jour⁻¹, soit avec un régime contrôle supplémenté en acides aminés non-essentiels (AANE). Nous montrons que le régime CIT entraîne une diminution de la masse du TA rétropéritonéal (RET) de 45% mais ne modifie pas la masse du TA épидидymaire (EPI) (Figure15). Ces résultats nous ont conduits à focaliser nos études sur le TA RET.

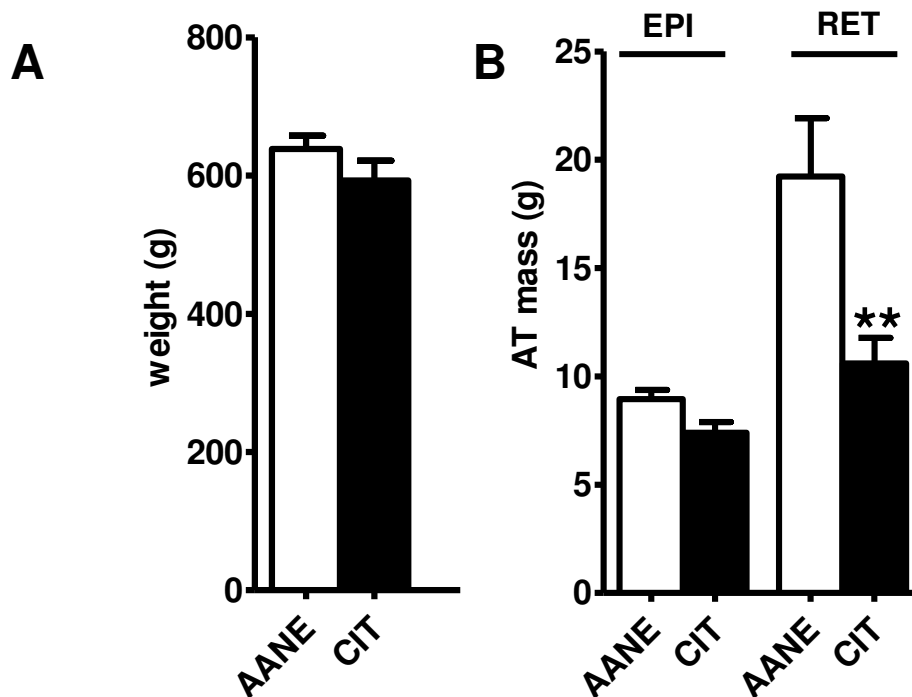


Figure 15 : Effet *in vivo* de la CIT sur le poids corporel et la masse des tissu adipeux épидидymaire et rétropéritonéal de rats âgés sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois.

Les rats âgés de 22 mois sont nourris pendant 12 semaines soit avec un régime complété par de la CIT à 1g.kg⁻¹.jour⁻¹, soit avec un régime contrôle supplémenté en acides aminés non-essentiels (AANE.)

Effet *in vivo* de la citrulline sur la lipolyse du tissu adipeux rétropéritonéal de rats âgés sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois.

Aucune modification n'est observée dans la libération du glycérol et des AGNE du TA RET.

In vivo, la CIT n'a pas d'effet sur l'expression des gènes codant ATGL, HSL et GyK (Figure 16).

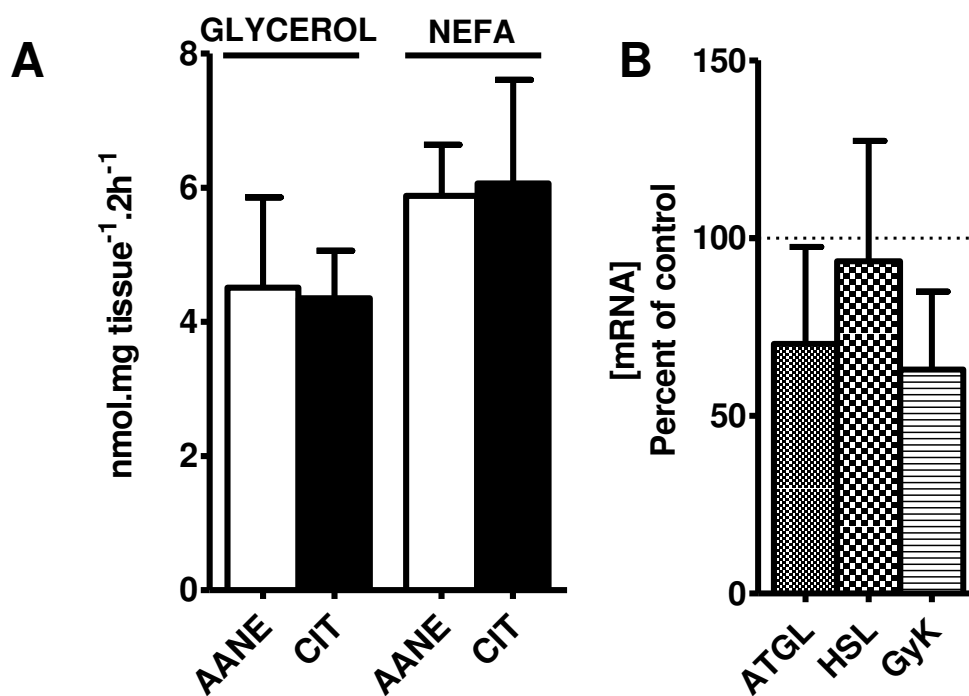


Figure 16 : Effet *in vivo* de la CIT sur la libération de glycérol et de NEFA ainsi que sur l'expression des gènes codant ATGL, HSL et GyK du TA EPI et du TA RET de rats âgés.

Les explants de TA EPI et RET des rats âgés de 22 mois nourris pendant 12 semaines soit avec un régime contenant de la CIT à 1g.kg⁻¹.jour⁻¹, soit avec un régime contrôle ont été incubés pendant 2h dans un milieu KREBS sans glucose avant analyse A) Effets *in vivo* de la CIT sur la libération de glycérol et de NEFA dans le milieu d'incubation. Les résultats sont exprimés en nmol.mg⁻¹.tissue.2h⁻¹ B) Effet *in vivo* de la CIT sur l'expression des gènes codant les enzymes clés de la lipolyse. Les niveaux d'ARNm d'ATGL, HSL et GyK ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant l'ARNm RPL13. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent le rapport entre les valeurs obtenues chez les rats âgés sous régime CIT et les valeurs obtenues chez les rats sous régime AANE, prises comme contrôle. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 8 expériences indépendantes, chacune réalisée en triple.

Effet *in vivo* de la citrulline sur la glycéronéogenèse et sur l'expression des gènes codants PEPCK-C et PPAR γ 2 du tissu adipeux rétro-péritonéal de rats âgés sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois.

Nous avons étudié les effets chez le rat âgé du régime contenant de la CIT pendant 3 mois sur la glycéronéogenèse et sur l'expression des gènes codant PEPCK-C et PPAR γ 2. Aucune modification de l'incorporation du pyruvate radiomarqué dans les lipides ni de l'expression des gènes PEPCK-C et PPAR γ 2 du TA RET n'est observée (**Figure 17**).

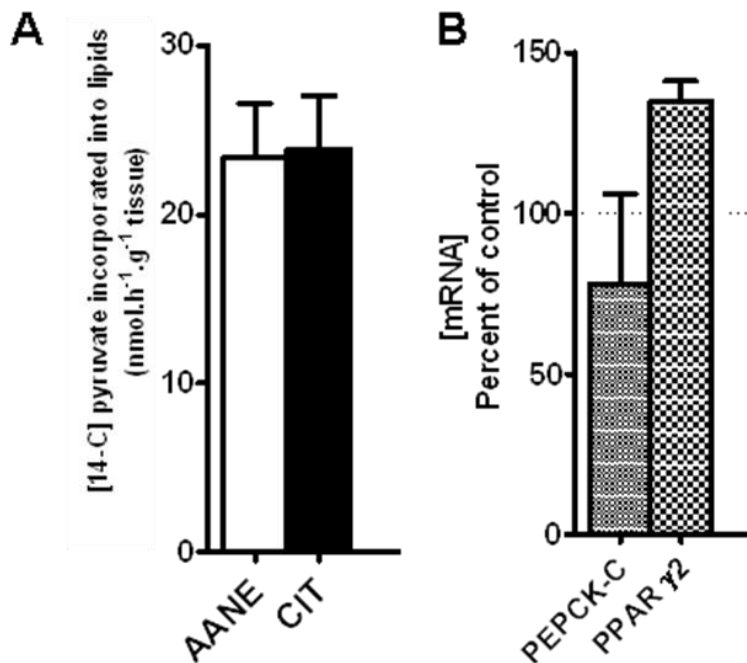


Figure 17 : Effet *in vivo* de la CIT sur la glycéronéogenèse et sur l'expression des gènes codant PEPCK-C et PPAR γ 2 du TA RET de rats âgés.

Les explants de TA RET de rats âgés ont été incubés pendant 2h dans du milieu KREBS sans glucose avant analyse. A) Effet *in vivo* de la CIT sur la glycéronéogenèse mesurée par l'incorporation du [1-¹⁴C]-pyruvate dans les lipides. Les résultats sont exprimés en mmol.h⁻¹.g⁻¹tissue (B): Effet *in vivo* de la CIT sur l'expression des gènes codant PEPCK-C et PPAR γ 2 du TA RET de rats âgés. Les niveaux d'ARNm de PEPCK-C et PPAR γ 2 ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent le rapport entre les valeurs obtenues chez les rats âgés dont le régime a été supplémenté en CIT et les valeurs obtenues chez les rats âgés sous régime AANE prises comme contrôle. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 8 expériences indépendantes, chacune réalisée en triple.

Effet *in vivo* de la citrulline sur l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation et des marqueurs de macrophages sur le tissu adipeux rétropéritonéal de rats âgés sous régime enrichi en citrulline pendant 3 mois.

La CIT diminue l'expression des ARNm des marqueurs de macrophages F4/80 (64%) et CD68 (66%) au sein du TA RET. De plus, le régime permet de diminuer l'expression des marqueurs de l'inflammation IL-6 (33%) et TNF- α (97%). Bien qu'*in vivo* la CIT n'affecte pas l'expression des gènes codant ASS et ASL, elle permet de diminuer l'expression de l'ARNm NOS II (78%) dans le TA RET (**Figure 18**).

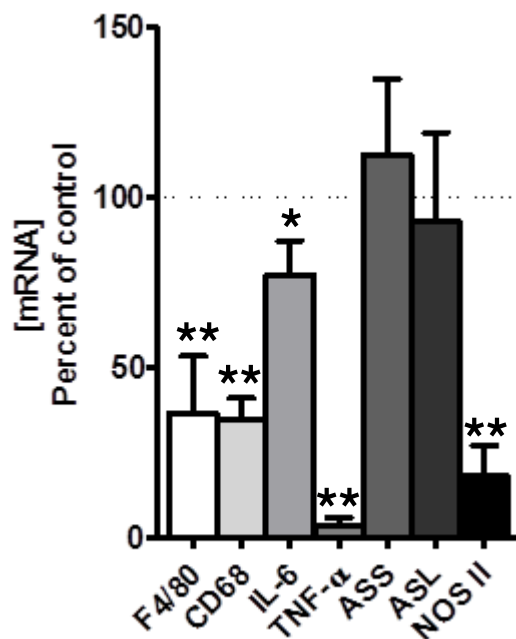


Figure 18 : Effet *in vivo* d'un régime enrichi en CIT sur l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation et des marqueurs de macrophages sur le TA RET.

Les explants de TA RET de rats âgés sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois ont été incubés pendant 24 heures dans un milieu KREBS contenant 5mmol/L glucose avant analyse. Les niveaux d'ARNm de F4/80, CD68, IL-6, TNF- α , de NOS II ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant l'ARNm RPL13. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent le rapport entre les valeurs obtenues chez les rats âgés dont le régime a été supplémenté en CIT et les valeurs obtenues chez les rats âgés sous régime AANE prises comme contrôle. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 8 expériences indépendantes réalisées en triple. * P <0,05 vs Ctrl, ** P <0,01 vs Ctrl

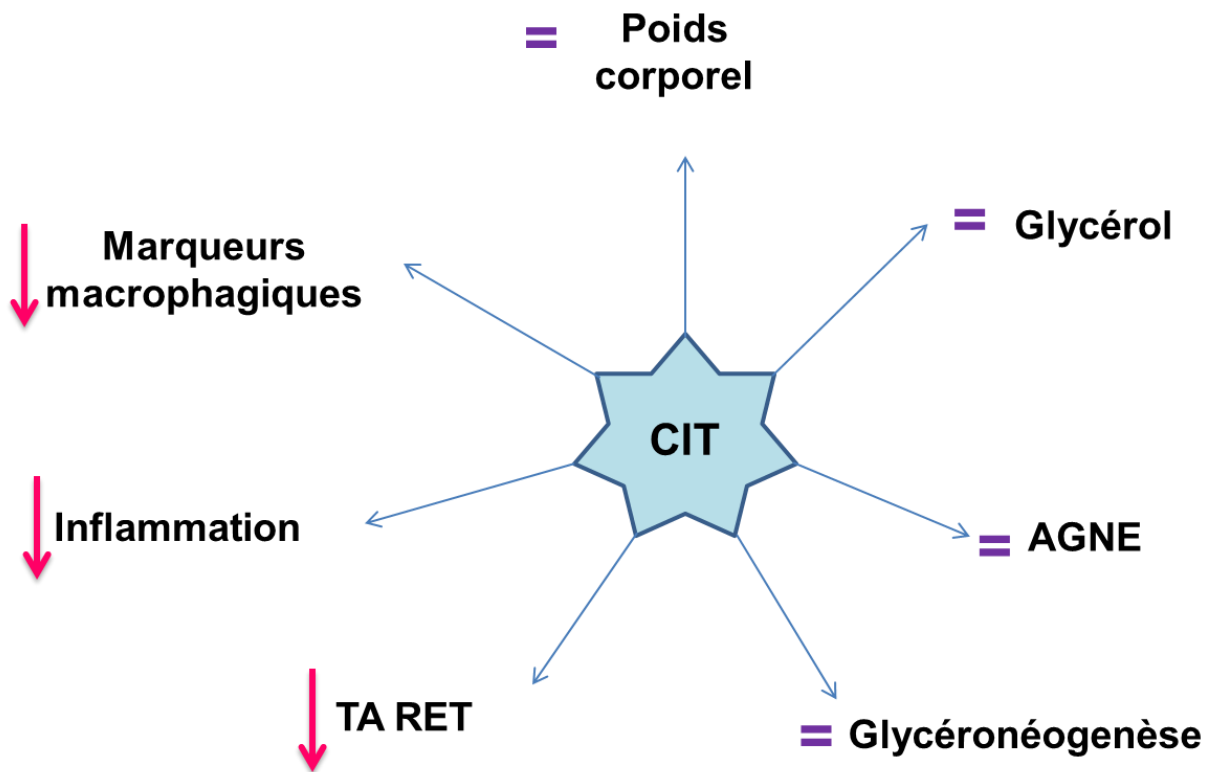


Figure 19 : Effets *in vivo* de la citrulline sur le tissu adipeux rétro-péritonéal de rats âgés de 22 mois alimentés pendant 3 mois avec un régime supplémenté en citrulline.

In vivo, la CIT n'a pas d'effet sur le métabolisme mais nous observons cependant une diminution de la masse adipeuse (**Figure 19**). L'enrichissement en CIT du régime alimentaire de ces rats se fait sur un temps long et peut engendrer un état stationnaire. Nous nous sommes donc demandé si cet acide aminé pouvait avoir des effets directs sur le TA RET à plus court terme.

II. ARTICLE 2

La citrulline induit la libération des acides gras sélectivement dans le tissu adipeux viscéral de rats âgés.

[Joffin N](#), [Jaubert AM](#), [Durant S](#), [Bastin J](#), [De Bandt JP](#), [Cynober L](#), [Moinard C](#), [Forest C](#), [Noirez P](#).

Publication dans le journal *Molecular Nutrition and Food Research* [Volume 58, Issue 9](#), pages 1765–1775, September 2014 DOI: 10.1002/mnfr.201400053

Contexte : Au cours du vieillissement, l'augmentation de la masse du TAV peut entraîner des altérations métaboliques. Une alimentation enrichie en CIT réduit la masse du TA chez les rats âgés. Nous avons émis l'hypothèse que la CIT pourrait agir directement sur le métabolisme des AG dans le TA RET.

Méthodes et résultats : Un traitement avec 2,5mM CIT pendant 24 h d'explants de TA RET de rats jeunes (2 mois) ou âgés (25 mois) induit une augmentation de 50% de la libération du glycérol et des AGNE chez les rats âgés, non observée dans des explants de jeunes rats. La forme phosphorylée de la lipase sensible aux hormones, une enzyme lipolytique clé, est induite 1,5 fois dans les explants des rats jeunes et vieux traités à la CIT, alors que la glycéronéogenèse, qui fournit du G3P nécessaire pour la ré-estérification des AG, et son enzyme clé, PEPCCK-C ont été diminués de 40-70%. En particulier chez le jeune rat, la capacité de β -oxydation et l'expression des gènes CPT-1b et VLCAD ont été fortement induites par la CIT. En revanche, chez les rats âgés, tandis que la glycéronéogenèse est diminuée, la bêta-oxydation n'est pas affectée, ce qui permet une libération accrue d'AGNE.

Conclusion : Ainsi, dans le TA RET, la CIT exerce une induction spécifique de la capacité β -oxydative chez les jeunes rats et une stimulation sélective de libération d'AG chez les rats âgés, offrant ainsi un mécanisme d'action directe de CIT pour réduire la masse du TA.

RESEARCH ARTICLE

Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats

Nolwenn Joffin^{1,2}, Anne-Marie Jaubert^{2,3}, Sylvie Durant^{1,2}, Jean Bastin^{1,2}, Jean-Pascal De Bandt^{1,4,5}, Luc Cynober^{1,4,5}, Christophe Moinard^{1,4}, Claude Forest^{1,2} and Philippe Noirez^{1,6,7}

¹ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1124, Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation Cellulaire, Paris, France

³ Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine Paris-Ile de France-Ouest, Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Versailles, France

⁴ Laboratoire de Biologie de la Nutrition, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

⁵ Service de Biochimie, Hôpital Cochin, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁶ Institut de Recherche Biomédicale et d'Epidémiologie du Sport, Paris, France

⁷ UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, Paris, France

Scope: During aging, increased visceral adipose tissue (AT) mass may result in impaired metabolic status. A citrulline (CIT)-supplemented diet reduces AT mass in old rats. We hypothesized that CIT could directly affect fatty acid (FA) metabolism in retroperitoneal AT.

Methods and results: A 24-h exposure of AT explants from old (25 months) rats to 2.5 mM CIT induced a 50% rise in glycerol and FA release, which was not observed in explants from young (2 months) animals. The phosphorylated form of hormone-sensitive lipase, a key lipolytic enzyme, was 1.5-fold higher in CIT-treated explants from old and young rats, whereas glycerooneogenesis, that provides glycerol-3P requested for FA re-esterification, and its key enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase, were down-regulated 40–70%. Specifically in young rats, beta-oxidation capacity and gene expressions of carnitine palmitoyl transferase 1-b and very long chain acyl-CoA dehydrogenase were strongly up-regulated by CIT. In contrast, in old rats, while glycerooneogenesis was lower, beta-oxidation was not affected, enabling increased FA release.

Conclusion: Hence, in visceral AT, CIT exerts a specific induction of the beta-oxidation capacity in young rats and a selective stimulation of FA release in old rats, therefore providing a direct mechanism of CIT action to reduce AT mass.

Keywords:

Adipose tissue / Aging / Citrulline / Fatty acids / Glycerooneogenesis

Received: January 23, 2014

Revised: April 11, 2014

Accepted: April 14, 2014

Correspondence: Dr. Claude Forest, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1124, Université Paris Descartes, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France
E-mail: claudie.forest@parisdescartes.fr

Abbreviations: ARG, arginine; ASL, argininosuccinate lyase; ASS, argininosuccinate synthase; AT, adipose tissue; ATGL, adipocyte triglyceride lipase; BSA, bovine serum albumin; CIT, citrulline; CPT1-b, carnitine palmitoyl transferase 1-b; 8CPT-cAMP, 8-(4-chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt; FA, fatty acid; Gyk, glycerol kinase; HSL, hormone-sensitive lipase; KREBS, Krebs Ringer buffer saline; NEFA, nonesterified fatty acids; NO, nitric oxide; NOS, NO syn-

1 Introduction

It is of common knowledge that the distribution of adipose tissue (AT) mass is altered during aging. After middle age, subcutaneous fat mass declines whereas intraabdominal fat tends to be either preserved or enlarged [1–4]. This situation leads to an augmented ratio of visceral to subcutaneous AT which is associated with an increased risk of

thases; PEPCK-C, cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase; P-HSL, phosphorylated-HSL; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor-alpha; PPAR γ 2, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2; RET AT, retroperitoneal AT; VLCAD, very long chain acyl dehydrogenase

atherosclerosis and diabetes [5, 6]. Among the intraabdominal depots, epididymal and retroperitoneal AT (RET AT) are considered as visceral depots and have been largely used for metabolic regulation studies [3, 7–10].

The AT is heterogeneous, encompassing several cell types in addition to adipocytes [11]. Specifically, the amount of resident macrophages increases with AT mass, causing a chronic low-grade inflammatory state [12]. The expansion of AT mass can be the result of either cell proliferation followed by differentiation into adipocytes or size enlargement of preexisting adipocytes because of an increased cell capacity to store triglycerides. The latter situation is reversed when lipolysis, i.e. triglyceride hydrolysis, is stimulated. Adipocyte triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) are the two main lipolytic enzymes [13, 14]. ATGL has no known posttranslational modification affecting its activity whereas, following phosphorylation, phosphorylated-HSL (P-HSL) is translocated at the surface of lipid droplets to hydrolyze triglycerides and diglycerides. Upon lipolysis induction, nonesterified fatty acids (NEFA) and glycerol can be released in the blood. However, under such a situation, plasma NEFA concentration depends also on other metabolic processes in addition to lipolysis. NEFA disposal is finely regulated by re-esterification, a pathway linked to glyceroneogenesis, for which the cytosolic isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) is the key enzyme, and by mitochondrial beta-oxidation [15–17]. Glycerol output is also balanced by its direct phosphorylation when glycerol kinase (Gyk) is induced. Any treatment to fight visceral obesity would be efficient if it reduces re-esterification and increases beta-oxidation, in addition to stimulating lipolysis. Such a treatment would favor adipocyte emptying.

Citrulline (CIT) is an amino acid that plays important roles although it is not incorporated in proteins. CIT is involved in urea production in the liver and is coupled to nitric oxide (NO) production [18]. CIT recycling into arginine (ARG) is well described in macrophages that express argininosuccinate synthase (ASS), argininosuccinate lyase (ASL), and NO synthases (NOS) [19]. This CIT-derived process could participate in the cellular response to inflammation [20]. CIT is poorly present in natural foods, except watermelon, hence dietary supplementation with ARG or CIT was used to treat and prevent human metabolic disorders [21]. However, when administered to humans, ARG is metabolized in the liver whereas CIT is not and therefore becomes all available [20]. CIT was also shown to modulate protein metabolism in muscles of malnourished aged rats [22]. Some of us recently described that a 3-month treatment of old rats with a CIT-supplemented diet resulted in an increased lean mass and a decreased AT mass, particularly the visceral depot and was able to modify lipid raft structure in the brain [23, 24]. Furthermore, a similar effect on body composition was observed by Wu and colleagues in a model of obese ZDF diabetic rats fed with a diet supplemented with watermelon juice which is naturally enriched in CIT [25].

The purpose of the present study was to evaluate whether CIT could directly affect adipocyte metabolism in AT explants from young and old rats. We focused our studies on lipolysis, glyceroneogenesis, and beta-oxidation.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Dulbecco's PBS, DMEM, penicillin, streptomycin, SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix kit were from Invitrogen Life Technologies (Saint Aubin, France). RNeasy lipid tissue mini kit, Qiazol Reagent, and DNase set were purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). [1-¹⁴C]-Pyruvate acid, sodium salt (9.5 mCi/mmol), and (9,10-³H) palmitic acid (60 Ci/mmol) were from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Rat insulin enzyme immunoassay kit was from Bertinpharma (SPI-BIO) (Montigny le Bretonneux, France). Glucose Assay Kit was from Abcam (Cambridge, UK). Triacylglycerol assay kit was from Biomérieux (Craponne, France). Hybond-N⁺ membranes and Amersham Hyperfilm enhanced chemiluminescent (ECL) were from GE Healthcare Life Sciences (Velizy-Villacoublay, France). Free Fatty Acids Half Micro test and SYBR Green were from Roche (Meylan, France). Glycerol test (glycerol UV-method) was from R-Biopharm (Saint Didier au Mont d'Or, France). For Western blot analyses, SDS-PAGE was carried out using an SDS-MOPS running buffer and a Novex 4–12% Bis-Tris gel from Invitrogen (Villebon sur Yvette, France). Rabbit antiHSL and anti-P-HSL antisera were purchased from Ozyme (Saint Quentin en Yvelines, France). Sheep anti-PEPCK-C antibody was a gift from Professor E. Beale (Lubbock, TX, USA). Goat anti- β -actin antibody was from Santa-Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Nylon mesh was from Sefar (Switzerland). Fatty acid (FA)-free albumin, sodium pyruvate and Tween 20 and all other products were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). CIT was a gift from Citrage company (<http://www.citrage.com>).

2.2 Animals

For in vivo experiments, 22-month-old male Sprague–Dawley rats from Charles River (L'Arbresle, France) were randomized into two groups after 2 weeks of acclimatization. In the CIT group ($n = 5$) rats were fed ad libitum with standard diet supplemented with CIT at 1 g·kg⁻¹·d⁻¹ during 12 weeks [24]. Rats of the control group ($n = 5$) were fed ad libitum with standard diet.

For in vitro experiments, 25-month-old male Sprague–Dawley rats were a gift from Sainte Anne Hospital (Paris, France). Two-month-old male Sprague–Dawley rats were obtained from Centre d'Élevage de Rats Janvier (Berthevin, France).

All rats were maintained at constant room temperature (24°C) on a 12-h-light/-dark cycle. Rats were fed a standard balanced diet (60% carbohydrates, 16% proteins, 3% lipids, 5% vitamins and minerals, including retinol (1.98 mg/kg), cholecalciferol (506 µg/kg), d-α-tocopherol (20 mg/kg), and micronutrients such as calcium pantothenate, nicotinic acid, calcium iodate, ferrous carbonate, and copper sulfate) from Safe (Augy, France) and tap water ad libitum. Rats were anaesthetized and killed by decapitation.

Blood was taken from the jugular vein. Aliquots were centrifuged and the supernatants were stored at –20°C for further glucose, insulin, and triacylglycerol determination. Samples of epididymal and RET AT were removed and weighted.

The protocol for the animal studies was conducted according to the French Guidelines for the care and use of experimental animals.

2.3 Histology

For *in vivo* experiments, 5–8 g of RET AT was analyzed to measure adipocyte sizes. RET AT was removed and immediately fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 48 h at 4°C. After fixation, tissues were dehydrated in ethanol, cleared, and finally embedded in paraffin blocks. Paraffin sections (5-µm thick) were stained by hematoxylin and eosin and observed under a microscope (Zeiss, Germany). Adipocyte size was analyzed by using an image processing software (ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) with the determination for all adipocytes on a tissue section of minimal Feret diameter (corresponding to the lowest length of two parallel lines that just touch each side of the cell).

2.4 Rat AT explants

For *in vitro* experiments, RET AT from rats was removed for analyses. About 200 mg of tissue were cut in about 20 mg fragments and cultured in Krebs Ringer buffer saline (KREBS) medium (0.63% NaCl, 0.32% KCl, 0.014% CaCl₂, 0.015% KH₂PO₄, 0.025% MgSO₄, 0.2% NaHCO₃) containing 5 mM glucose at 37°C in 10% CO₂. At 6 h, KREBS medium was renewed with 5 mM glucose. At 24 h of incubation, KREBS medium was renewed with 5 mM glucose with or without 2.5 mM CIT (this dose was chosen because it corresponds to the plasma CIT concentration observed after CIT supplementation [22]). Explants were treated by CIT for 8 or 24 h then frozen before further studies [26].

2.5 Isolation of adipocytes from AT

Isolated RET adipocytes were prepared as previously described [27]. Once digestion was complete, samples were passed through a sterile 250 µm nylon mesh. Then the floating adipocytes-enriched fraction was washed three times

with KREBS medium containing 3% bovine serum albumin (BSA). The supernatant (adipocytes) was placed in Qiazol lysis reagent and kept at –80°C for later RNA extraction.

2.6 Culture and differentiation of 3T3-F442A adipocytes

3T3-F442A preadipocytes were grown to confluence in DMEM containing 25 mM glucose, 200 IU/mL penicillin, 50 mg/L streptomycin, 2 mg/mL biotin, and 4 mg/L pantothenate supplemented with 10% newborn calf serum. Cells were cultured at 37°C in a 10% CO₂ incubator. At confluence, newborn calf serum was changed to fetal bovine serum and 20 mM insulin was added to the medium named differentiation medium as described previously [28]. Culture medium was changed every 2–3 days. For experiments, medium was replaced by insulin-deprived regular medium 24 h ahead of the treatment with CIT. After 8 or 24 h of treatment with CIT, RNA and protein were frozen for further analyses.

2.7 Glycerol and FA release

2.7.1 Culture of explants from *in vivo* CIT-supplemented rats

Two hundred milligrams of tissues from CIT-supplemented or control rats were cut into fragments of about 20 mg and cultured in KREBS medium, glucose 5 mM, as described previously [9]. The medium was changed at 6 h. To study lipolysis, medium was changed with KREBS glucose-free medium containing 2% FA-free BSA and 5 mM pyruvate. Two hours later, the incubation medium was recovered for the estimation of lipolytic NEFA and glycerol.

2.7.2 Culture of explants from nonsupplemented rats

Two hundred milligrams of tissue were cut into fragments of about 20 mg and cultured in KREBS medium glucose 5 mM. The medium was changed at 6 h. Two hours later, the medium was replaced with KREBS medium, 5 mM glucose, containing or not 2.5 mM CIT. At 24 h of incubation, the medium was replaced with KREBS, glucose-free medium, containing 2% FA-free BSA and 5 mM pyruvate. Two hours later, the incubation medium was recovered for the estimation of lipolytic NEFA and glycerol.

2.7.3 3T3 F442A adipocytes

One million 3T3 F442A adipocytes was treated or not with 2.5 mM CIT for 24 h. Then, the medium was replaced with KREBS glucose-free medium containing 2% FA-free BSA and

5 mM pyruvate. Two hours later, the incubation medium was recovered for the estimation of lipolytic NEFA and glycerol.

2.8 Glyceroneogenic flux

To investigate the proportion of re-esterification of NEFA, glyceroneogenic flux was followed by the incorporation of ^{14}C from $[1-^{14}\text{C}]$ -pyruvate into neutral lipids, followed by lipid extraction as described previously [9, 26]. AT explants (200 mg) were incubated in KREBS medium 5 mM glucose with or without 2.5 mM CIT for 24 h, then media were changed and explants were incubated at 37°C under 10% CO_2 for 2 h with KREBS glucose-free medium containing 2% FA-free BSA and 5 mM pyruvate. $[1-^{14}\text{C}]$ -Pyruvate (9.5 mCi/mmol) was used at an isotopic dilution of 1/250. At 2 h of incubation, each sample was rinsed and frozen in liquid nitrogen before lipid extraction, according to the simplified method of Bligh and Dyer [29]. The subsequent $[1-^{14}\text{C}]$ -pyruvate incorporation was estimated by counting the radioactivity associated with the fragments [9, 26].

2.9 Beta-oxidation

Palmitate oxidation rates from RET AT (100 mg) were assessed after 24-h incubation in the presence or absence of CIT. Tritiated water release experiments were carried out in triplicate as previously described [30]. Cultured explants layers were washed three times with PBS and 200 μL of (9,10- ^3H) palmitic acid (60 Ci/mmol) bound to FA-free albumin (final concentration: 125 μM , palmitate:albumin 2:1) were added per well. Incubation was carried out for 2 h at 37°C. After incubation, the mixture was removed and added to a tube containing 200 μL of cold 10% trichloroacetic acid. The tubes were centrifuged 10 min at 3300 $\times g$ at 4°C and aliquots of supernatants (350 μL) were removed, mixed with 55 μL of 6 N NaOH, and applied to ion-exchange resin. The columns were washed with 1.7 mL of water and the eluates were counted.

2.10 RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time RT-qPCR

Total RNA was extracted from RET AT and isolated adipocytes. RNA was quantified by spectrophotometric Nanodrop (ND-1000; Nyxor Biotech). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed using SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix kit. Samples of cDNA were diluted 1:40, amplified, and used for RT-qPCR measurements using SYBR Green. RT-qPCR was performed in the LightCycler1536 instrument (Roche) as follows: 75°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of denaturation (95°C for 15 s to the denaturation, 60°C for 30 s to the annealing, 72°C for 30 s to the extension). Results were analyzed with the LightCycler1536 software from Roche. Ribosomal RPL13 RNA was

Table 1. Primer sequences of RNA

RNA	Forward (5' 3')	Reverse (5' 3')
(A) Rat primer sequences of RNA tested in RT-qPCR.		
<i>Cd68</i>	Agagcagggtcaaggtgaacag	Aggggtggaagaaaggtgaagc
<i>Cpt1b</i>	Acaatgggacattccaggag	Aaagactggcgctgctca
<i>Emr1</i>	Gtggaggatggggatggac	Acaacaggaaggtgctatgg
<i>IL6</i>	Ttggatggtcttggtcctagcc	Tcctacccaactccaatgctc
<i>Nos2</i>	Cccagagcctctagacctcaa	Catggtgaacacgttcttgg
<i>Ppara</i>	Aagccatctcagatgctg	Tcagaggccctgaacagtg
<i>Pparg</i>	Ttatgctgttatgggtgaaa	Caaaggaatgggagtgctc
<i>Rpl13</i>	Tggcaggggctcag	Tgggcatcacaggtcc
<i>Tnf</i>	Gcttggtggttgctacgac	Actgaactcggggatggtg
<i>Acadvl</i>	Tgaatgacctgccaag	Ccaaatctctgccaagc
(B) Murin primer sequences of RNA tested in RT-qPCR.		
<i>Cpt1b</i>	Ttccgacaaacctgaagct	Taagatctgggctatctgtgtcc
<i>Ppara</i>	Aagccatctcagatgctg	Tcagaggccctgaacagtg
<i>Pparg</i>	Ttatgctgttatgggtgaaa	Caaaggaatgagtggtc
<i>Rpl13</i>	Ggatccctccacctatgaca	Ctggtactccaccgacctc
<i>Acadvl</i>	Tgaatgacctgccaag	Ccaaatctctgccaagc

The abbreviations of the genes, their 5'–3' nucleotide sequences of the forward and reverse primers are presented.

used to normalize cDNA. Quantification of mRNA was carried out by comparing the number of cycles required to reach reference and target threshold values ($2^{-(\delta - \delta_{\text{Ct}})}$ method) as described previously [31]. Sequences of the rat sense and anti-sense nucleotides corresponding to the different tested genes are presented in Table 1.

2.11 Western blot

Protein fractions were prepared from AT explants in a buffer containing 10 mM HEPES pH 7.9, then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, and blocked with 3% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20. Blots were incubated with 1:1000, 1:1000, 1:2500, and 1:500 dilutions for the HSL, P-HSL, PEPCK-C, and β -actin antisera, respectively. For PEPCK-C detection, bound antibodies were visualized using ECL according to the manufacturer's instruction. Blots were exposed to Hyperfilm and signals were quantified by scanning densitometry. For β -actin, HSL, and P-HSL, the Odyssey method was used for detection, following the procedure described by the manufacturer (Li-COR). Quantitative results of Western blotting were obtained by densitometry using ImageJ software.

2.12 Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Each independent experiment was carried out in triplicate. Statistical analyses were carried out using the nonparametric Mann–Whitney *U*-test for pairwise comparisons which was applied due to the small number of experiments ($n < 10$). $*p < 0.05$ versus Ctrl;

Table 2. Anthropometric and biological parameters of young and old rats

	Young N = 5	Old N = 5
Body weight (g)	256 ± 5	651 ± 15**
Epididymal AT weight (g)	4.40 ± 0.45	9.00 ± 0.43**
Retroperitoneal AT weight (g)	4.5 ± 0.80	19.08 ± 2.70**
Glycemia (mM)	5.42 ± 0.10	5.73 ± 0.28
Insulinemia (ng/mL)	0.249 ± 0.022	0.286 ± 0.023
Triacylglycerol (g/L)	1.52 ± 0.09	1.55 ± 0.21

Two-month-old male young rats ($n = 5$) and 25-month-old male rats ($n = 7$) were under a standard balanced diet. Blood samples and adipose tissue were collected for analyses. Data are means ± SEM.

** $p < 0.01$ versus young.

** $p < 0.01$ versus Ctrl; *** $p < 0.001$ versus Ctrl. A value of $p < 0.05$ was considered as significant.

3 Results

3.1 Body and metabolic parameters

Old rats presented a significant higher body weight than young animals (Table 2). The weight of both epididymal and RET AT increased in old rats in comparison with young animals. Furthermore, the ratio of RET AT to body weight increased with age from 1.8 to 2.9% whereas that of epididymal AT remained similar (1.7 versus 1.4%). Thus, we decided to focus our studies on RET AT. Interestingly, young and old rats used in this study had similar blood glucose, insulin, and triglyceride levels (Table 2).

3.2 In vivo effect of CIT in AT from old rats

We studied the lipolytic effects of CIT in RET AT explants from old rats maintained for a long-term (3 months) under the CIT-supplemented diet or the control diet.

As described in Fig. 1, the release in the incubation medium of glycerol and NEFA from explants of CIT-treated rats remained unchanged. However, adipocyte size was significantly lower in CIT-supplemented rats than in controls.

3.3 In vitro effect of CIT in AT from young and old rats

We investigated the effect of CIT on RET AT explants from young (2 months) and old rats (25 months). A concentration of 2.5 mM CIT was chosen to mimic the plasma concentration of this amino acid in rats supplemented with CIT [22]. We determined the glycerol and NEFA concentrations in the culture medium of explants maintained for 24 h in the presence of CIT. As shown in Fig. 2A, a significant increase in glycerol

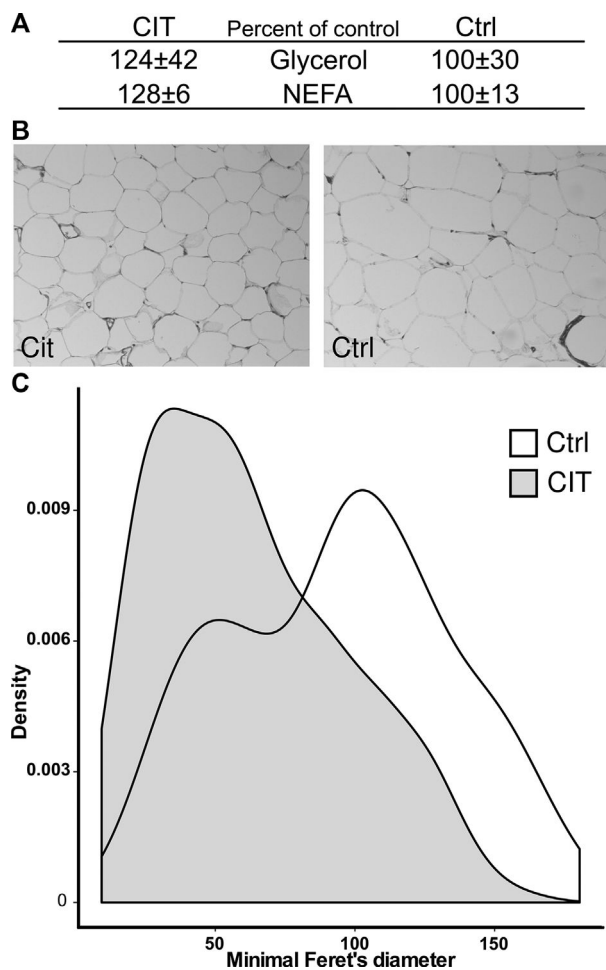


Figure 1. Effect of CIT in RET AT explants from old rats maintained for 3 months under the CIT-supplemented diet. (A) Glycerol and NEFA release from RET AT explants of old rats. Twenty-two-month-old rats were fed either a chow supplemented with CIT, 1 g·kg⁻¹·day⁻¹, or a control diet for 12 weeks. Explants of RET AT were prepared and incubated for 24 h as described in Materials and Methods for the determination of glycerol and NEFA concentrations. Results are expressed in percent of control and each value represents the mean ± SEM from five independent experiments, each carried out in triplicate. In control rats, absolute values were 4.51 ± 1.35 nmol·2 h⁻¹·mg⁻¹ tissue for glycerol, and 2.94 ± 0.38 nmol·2 h⁻¹·mg⁻¹ tissue for NEFA. (B) Histological hematoxylin staining of RET AT from 25-month-old rats fed either a chow supplemented with CIT, 1 g·kg⁻¹·day⁻¹ or a control diet for 12 weeks. (C) Frequency distribution of adipocyte size (minimal Feret's diameter) from RET AT of the same rats as in B. CIT treatment induced a significant (***) shift toward smaller size in adipocyte distribution.

(48%) and NEFA (45%) release in the incubation medium occurred selectively in old rats. The protein concentrations per gram of tissue were identical whether explants were treated or not with CIT (data not shown).

In addition to the total ATGL and HSL amounts, we determined the proportion of P-HSL. We observed that a 24-h

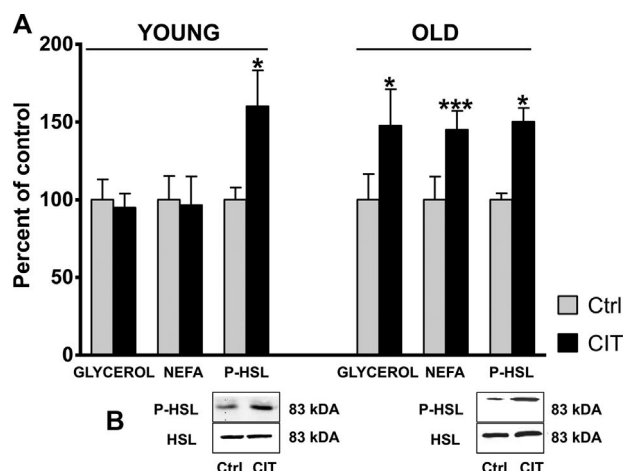


Figure 2. Effect of CIT on glycerol and NEFA release and on phosphorylated-HSL (P-HSL) of RET AT explants from young and old rats. (A) Glycerol and NEFA concentrations in culture medium of RET AT explants, from young (2-month-old) and old (25-month-old) rats, treated or not for 24 h with CIT 2.5 mM. In young rats, absolute values were $4.54 \pm 0.60 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ tissue for glycerol and $3.13 \pm 0.48 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ tissue for NEFA. In old rats, absolute values were $4.61 \pm 0.44 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ tissue for glycerol and $2.90 \pm 0.89 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ tissue for NEFA. Results were expressed in percent of control (Ctrl) and each value represents the mean \pm SEM from five to seven independent experiments, each carried out in triplicate. Histograms of P-HSL represent the mean \pm SEM of the quantification of four Western blots carried out from different explants. (B) Representative autoradiogram of four Western blots of total HSL and P-HSL in explants from young and old rats, at 24 h of exposure or not (Ctrl) to CIT. * $p < 0.05$ versus Ctrl; *** $p < 0.001$ versus Ctrl.

exposure to CIT did not modify ATGL (data not shown), while this treatment induced P-HSL in explants from both young (58%) and old (50%) rats (Fig. 2B).

The fact that neither glycerol nor NEFA output was modified by CIT in AT from young rats, while P-HSL was increased, suggesting that lipolysis occurred, was puzzling. Glycerol could be reused if Gylk was induced. Using RT-qPCR, we monitored Gylk mRNA in CIT-treated explants versus controls. *GK* gene expression presented a twofold induction in CIT-treated explants from young rats whereas it remained unchanged when old rats were used (data not shown).

The release of NEFA from AT strongly depends on their intracellular utilization which is modulated by re-esterification and beta-oxidation. Accordingly, we first monitored glyceroneogenesis as the first step in FA re-esterification, evaluated by the incorporation of $[1-^{14}\text{C}]$ -pyruvate into neutral lipids. In the presence of CIT, glyceroneogenesis was found significantly attenuated (46 and 34%) in AT from young and old animals, respectively, when compared with untreated explants (Fig. 3A). Since PEPCK-C is the key enzyme of glyceroneogenesis, the amount of this protein was determined by Western blot analysis. As expected, a 24-h exposure to CIT reduced PEPCK-C amount in explants from both young

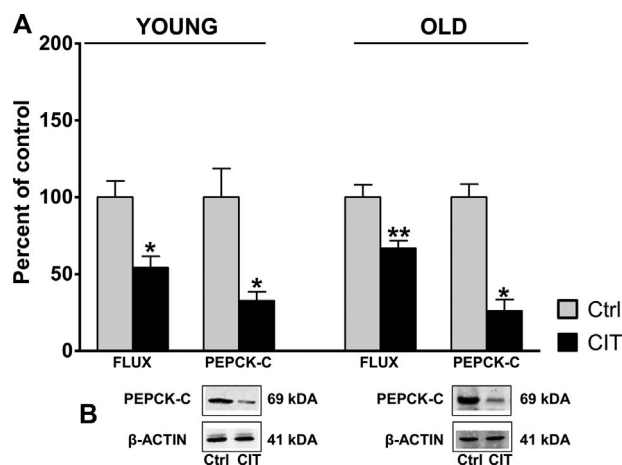


Figure 3. Effect of CIT on glyceroneogenesis and on PEPCK-C amount in RET AT explants from young and old rats. (A) Explants from young (2-month-old) and old (25-month-old) rats were incubated or not (Ctrl) with CIT 2.5 mM for 24 h before measuring the incorporation of $[1-^{14}\text{C}]$ -pyruvate into neutral lipids, as described in Materials and Methods. Control (Ctrl) values were $14.47 \pm 1.53 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ for young rats and $17.05 \pm 1.4 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ for old rats. Results were expressed in percent of control (Ctrl), and each value represents the mean \pm SEM from five to seven independent experiments, each carried out in triplicate. Histograms of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) represent the mean \pm SEM of the quantification of four Western blots carried out from different explants. (B) Representative autoradiogram of four Western blots of PEPCK-C in explants from young and old rats, at 24 h of exposure or not (Ctrl) to CIT. * $p < 0.05$ versus Ctrl; ** $p < 0.01$ versus Ctrl.

(68%) and old (74%) rats (Fig. 3B). Thus, CIT reduced NEFA re-esterification in RET AT from both ages.

The above results can explain the increased NEFA release in the medium of explants from old rats but cannot account for the absence of NEFA output in young rats. Thus, we investigated the beta-oxidation capacity of the explants under the same conditions of exposure to CIT. Results show that CIT induced palmitate oxidation rates about threefold in AT from young rats (Fig. 4, insert). In contrast, beta-oxidation did not change in response to CIT in AT from old rats.

Therefore, in young rats, the glyceroneogenic flux is reduced and the beta-oxidation capacity is augmented, opening an explanation for the apparent absence of CIT effect on net NEFA output. In contrast, in old rats, while glyceroneogenesis is reduced, beta-oxidation is not affected, thus resulting in an increased NEFA release in the medium (Fig. 2A).

3.4 Effects of CIT on metabolic protein-encoded genes

We first evaluated the stability of the expression of the series of genes involved in the metabolic processes under study. Although large variations occurred in some of these genes

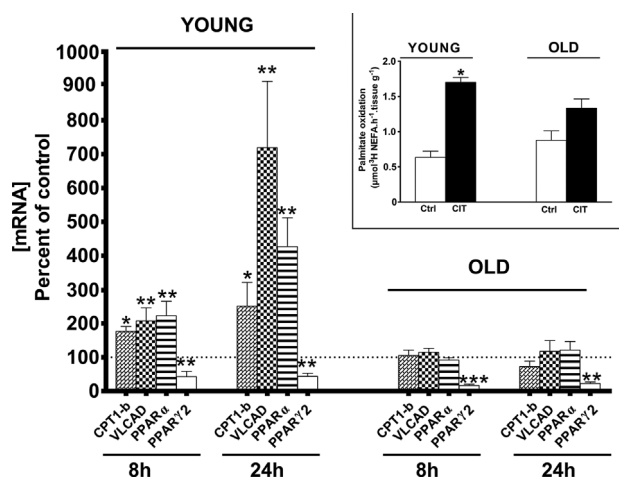


Figure 4. Effect of CIT on beta-oxidation and on the expression of genes coding for proteins involved in beta-oxidation and in mitochondrial biogenesis. Explants from young (2-month-old) and old (25-month-old) rats were incubated or not (Ctrl) with CIT 2.5 mM for 8 or 24 h. Carnitine palmitoyl transferase 1-b (CPT1-b), very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD), peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 (PPAR γ ₂) transcript levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using RPL13 mRNA. Results are expressed in percent of control (Ctrl) and each value represents the mean \pm SEM of five to seven independent experiments carried out in triplicate. Insert: Explants were incubated or not (Ctrl) with CIT for 24 h before following the incorporation of ³H₂O from (9,10-³H)-palmitate as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm SEM of four independent experiments carried out in triplicate. * p < 0.05 versus Ctrl; ** p < 0.01 versus Ctrl; *** p < 0.001 versus Ctrl.

between their expression in freshly isolated tissues and at 24 h of incubation, no significant modifications were detected later on (data not shown). Hence, the expression of these genes remains satisfactorily stable in control explants whether obtained from young or old rats.

Then, we monitored the expression levels of genes coding for proteins involved in beta-oxidation in AT explants from young and old rats treated for 8 or 24 h with 2.5 mM CIT. Selectively in young rats, CIT induced the expression of carnitine palmitoyl transferase 1-b and very long chain acyl dehydrogenase mRNA to reach, respectively, 177 and 251% at 8 h and 208 and 719% at 24 h (Fig. 4).

We then wondered whether the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 (PPAR γ ₂) were affected by CIT. These two transcription factors play important roles on metabolic and oxidative genes in adipocytes. We observed a large CIT-induced increase in PPAR α mRNA selectively in explants from young rats (Fig. 4). In contrast, the *Pparg* gene was down-regulated by CIT whatever the age of the animals and the time of treatment, with a stronger effect in old rats (Fig. 4).

3.5 Effects of aging and CIT on inflammatory protein-encoded genes

The impact of aging and of CIT on the expression of genes involved in inflammation was analyzed in RET AT explants from young and old rats. The expression of the genes coding for two macrophage markers—F4/80 and CD68—was both raised about eightfold (Fig. 5A) in explants from old rats compared to young rats. The mRNAs encoding the inflammatory markers—interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha—were also increased, respectively, about fourfold and threefold with aging. In addition, *Nos2* gene expression was stimulated about twofold in old versus young rats (Fig. 5A). A 24-h treatment of explants with CIT affected neither the expression of macrophage markers nor that of inflammatory markers whatever the age of the rats (Fig. 5B). In contrast, CIT up-regulated NOS II mRNA (270%) selectively in AT explants from old rats (Fig. 5B).

3.6 Effects of CIT in cultured adipocytes

AT is heterogeneous, comprising fibroblasts, endothelial cells of capillaries, resident macrophages, and lymphocytes, in addition to adipocytes. To evaluate the effect of CIT on adipocytes, we used the adipocyte cell line 3T3-F442A. Twelve days after confluence, cells were differentiated into adipose-like cells. When treated with 2.5 mM CIT for 8 and 24 h, these cells did not release additional glycerol and NEFA in the culture medium, when compared to controls (Fig. 6A). In contrast, 8-(4-chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, a well-known lipolytic agent, induced glycerol and NEFA output about twofold, as expected [32]. However, as in RET AT (Fig. 2), CIT increased HSL phosphorylation and down-regulated PEPCK-C amount (Fig. 6A).

3T3-F442A adipocytes, such as RET AT from young rats, responded to CIT by a large induction of CPT-1b mRNA both at 8 and 24 h (Fig. 6B). *Acadvl*, gene expression was up-regulated about twofold only at 24 h whereas PPAR α increased already at 8 h. In contrast, PPAR γ ₂ transcript was strongly down-regulated both at 8 and 24 h (Fig. 6B).

4 Discussion

Our data show that a CIT-enriched diet administered to old rats for 3 months induces a decrease in adipocyte diameter of RET AT, in line with the original demonstration that the CIT-rich watermelon juice reduces RET AT mass in ZDF rat [25]. However, watermelon juice contains other nutrients (e.g. lycopene) with pharmacological properties. Thus, our study clearly shows the specific effect of CIT. The action of CIT in old (25-month-old) and young (2-month-old) rats is somewhat different. Selectively in AT explants from old rats, CIT induces FA and glycerol release in the culture medium. FA and glycerol output are considered as the hallmarks of

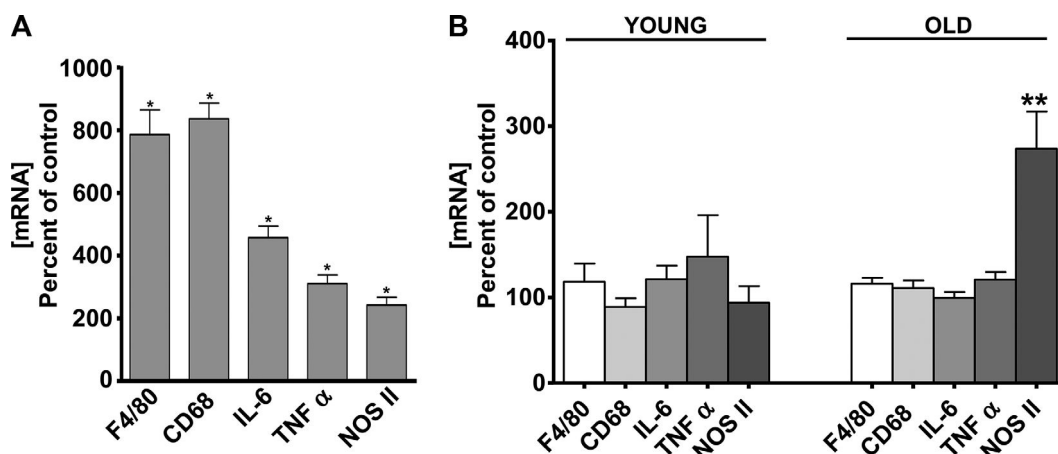


Figure 5. Effect of aging and of CIT on the expression of genes coding for proteins involved in macrophage markers and in inflammation F4/80, CD68, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), nitric oxide synthase 2 (NOS II) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using RPL13 mRNA. (A) Effect of aging. Explants from young (2-month-old) and old (25-month-old) rats were incubated in the absence of CIT for 24 h. Results represent the ratio of the values obtained in old rats versus the values obtained in young rats, taken as controls. (B) Explants from young (2-month-old, $n = 5$) and old (25-month-old, $n = 7$) rats were incubated or not (Ctrl) with CIT 2.5 mM for 24 h. Results are expressed as percent of control and represent the mean \pm SEM of five to seven independent experiments carried out in triplicate. * $p < 0.05$ versus Ctrl; ** $p < 0.01$ versus Ctrl; *** $p < 0.001$ versus Ctrl.

lipolysis. However, FA and glycerol that originate from triglyceride breakdown can be immediately metabolized in intracellular pathways, therefore preventing their release. Such a situation appears to occur here. Whatever the age of the rat, CIT is lipolytic since it significantly increases the amount of P-HSL, the active form of this key lipolytic enzyme. The total ATGL amount did not vary in response to CIT but the

proportion of lipid droplet-linked ATGL could be increased, although such a hypothesis requires further work. In addition, Gyk mRNA is also up-regulated by CIT specifically in explants from young rats (unpublished results), thus giving a clue for the lack of increase in glycerol output in CIT-treated explants. The demonstration that glyceroneogenesis is decreased together with the CIT-induced down-regulation of

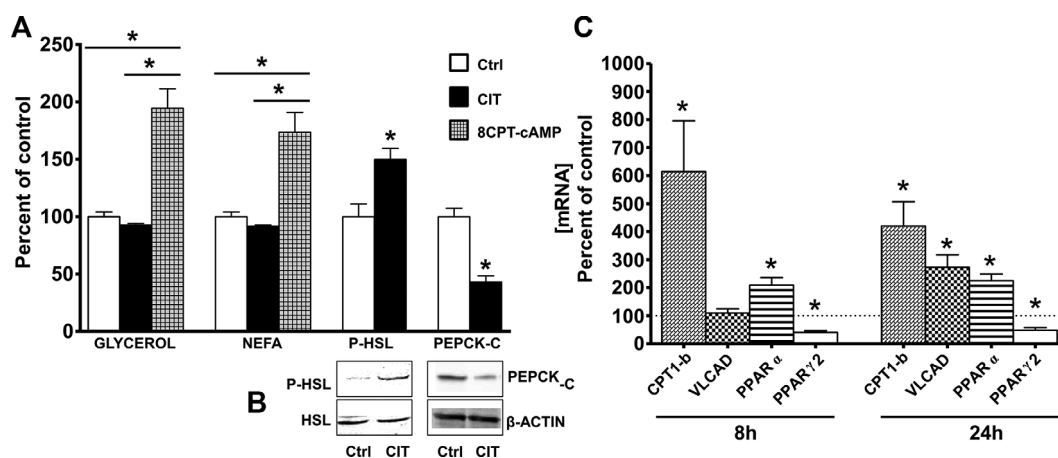


Figure 6. Effect of CIT on differentiated 3T3-F442A adipocytes. (A) Glycerol and NEFA concentrations in the culture medium of 3T3-F442A cells, incubated or not (Ctrl) with CIT 2.5 mM for 24 h. Values are expressed in percent of control (Ctrl). In Ctrl, absolute values were 4.42 ± 0.19 nmol/2 h/ μ g protein for glycerol, and 3.02 ± 0.12 nmol/2 h/ μ g protein for NEFA. (B) Representative autoradiogram of four Western blots of total hormone-sensitive lipase (HSL) and phosphorylated-HSL (P-HSL) expression and of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK-C) protein levels in 3T3-F442A adipocytes, at 24 h of exposure or not (Ctrl) to CIT. (C) Effects of CIT on the expression of metabolic genes coding for proteins involved in beta-oxidation and mitochondrial biogenesis in 3T3-F442A adipocytes, treated or not (Ctrl) for 8 or 24 h with 2.5 mM CIT. Carnitine palmitoyl transferase 1-b (CPT1-b), very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD), peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 (PPAR γ 2) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using RPL13 mRNA. Results are expressed as percent of control (Ctrl) and represent the mean \pm SEM of four independent experiments carried out in triplicate. * $p < 0.05$ versus Ctrl.

its key enzyme, PEPCK-C, strongly suggests that this amino acid reduces re-esterification of lipolytic FA into triglycerides [26]. CIT-induced reduction of PEPCK-C level is concomitant with a decrease in the expression of its mRNA (data not shown). This is consistent with the fact that the expression of PPAR γ_2 , a key transcription factor controlling *Pck1* expression, was found to be strongly down-regulated in response to CIT in both young and old rats.

While an increased FA output occurs in AT from old rats, this effect was not observed in young animals. Although the basal beta-oxidation capacity in RET AT is not statistically different between young and old rats, its induction by CIT occurs selectively in AT from young rats. This process probably compensates the observed reduction in FA re-esterification, thus potentially explaining the absence of induction of FA release in young rats. Altogether, these results suggest that CIT augments FA beta-oxidation, in line with the up-regulation of *Cpt1b*, *Acadvl*, and *Ppara* expressions in AT from young rats. Increased levels of acylcarnitine and carnitine were reported to follow elevations in CIT in neonates with intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency [33]. Since a carnitine-supplemented diet increases beta-oxidation in muscle, due to acetylcarnitine efflux from mitochondria to cytosol, such a mechanism could be one of the causes of CIT effect in AT [34]. If it were so, the combined supplementation with CIT and carnitine could be an original approach to treat metabolic disorders. Further works are required to clarify this point.

We made the hypothesis that the age-dependent CIT effect on beta-oxidation could be the result of a differential CIT-induced NO production. For NO production with CIT as a substrate, ASS and ASL are required [19]. Although *Ass* and *Asl* are expressed in RET AT, these mRNAs are below the level of detection by RT-qPCR in isolated adipocytes from this AT (unpublished results from our group). Hence, adipocytes are not NO producers from CIT as a substrate. However, AT is made of several cell types in addition to adipocytes, including endothelial cells of vessels and resident macrophages in which ASS and ASL are present in large amount [19,20]. Therefore, both cell types can synthesize ARG from CIT, which in turn can produce NO from NOS III and NOS II, respectively [27]. It is well known that the number of macrophages increases in AT with aging and gain of fat mass [12, 35]. We show here that macrophage markers are strongly up-regulated with age in RET AT. Therefore, NO production from AT-resident macrophages could indeed be increased with aging. Another observation is that CIT induces *Nos2* expression selectively in AT from old rats. This effect is in line with studies pointing out the ability of CIT to favor NO production. Hence, in vitro, CIT enhanced NOS III expression in endothelial cells [36]. Furthermore, in endotoxemic rats, CIT administration increased phosphorylation of NOS III in enterocytes [37]. Such a synergy could favor a large increase in NO production in this AT, compared with a weaker NO synthesis from NOS III in explants from young animals. NO could then easily diffuse toward adipocytes and affect FA metabolism, with a noteworthy effect on beta-oxidation. Such

a hypothesis would mean that high NO production would be deleterious for beta-oxidation whereas low amounts of NO favor beta-oxidation in agreement with previously published observations [38,39]. A similar opposite effect of low and high productions of NO on leptin action was also demonstrated [9, 40, 41].

Altogether our results provide a metabolic explanation for the reduction in adipocyte size observed in RET AT from in vivo CIT-supplemented old rats for 3 months. Previously published observations demonstrated that dietary L-ARG supplementation reduced AT mass by down-regulating the expression of genes that encode lipogenic enzymes [25,42]. This down-regulation is concomitant with an increase in skeletal muscle and brown fat mass in obese rats [42,43]. Other data showed that, in old malnourished rats, a CIT-supplemented diet induced a rise in protein content in muscle [22]. Although ARG and CIT were shown to significantly affect AT mass in vivo, no data of a direct CIT effect on AT was available. Our results demonstrate that CIT is able to act directly on adipose cells.

The increase in NEFA output triggered by CIT appears in line with the study of Faure et al. that demonstrated that CIT supplementation to malnourished old rats stimulated muscle energy metabolism [44]. Accordingly, it can be thought that potential deleterious effects of the rise in circulating glycerol and NEFA could be counteracted by the lipo-oxidative action of CIT in nonadipose cells, particularly in muscle cells. Of particular interest is the observation that in AT from young rats and in 3T3-F442A cells, CIT directly induces the mitochondrial beta-oxidation, and therefore exerts a direct protector role. Altogether, this metabolic action of CIT in the young rat sounds as a favorable mechanism to limit lipid storage and to facilitate fat burning. In advanced age, fat depots are redistributed, leading to an increased ratio of visceral to subcutaneous fat mass [1, 2, 6]. The CIT-induced reduction of fat deposit in RET AT could prevent this increase in ratio of visceral to subcutaneous fat, and hence could limit the associated pathological risks (e.g. diabetes, cardiovascular diseases) related to aging. In obesity, the rise in AT mass also affects predominantly visceral fat, and CIT effects in this pathophysiological situation remain an opened question.

We thank Dr. Brigitte Potier for providing us with a series of old rats and Irène Balmay for performing histology. We acknowledge the Institut National de la Recherche Scientifique and the Université Paris Descartes for their financial support.

Potential conflict of interest statement: LC, JPDB, and CM are shareholders of Citrage company. NJ, AMJ, JB, SD, CF, and PN have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Hughes, V. A., Roubenoff, R., Wood, M., Frontera, W. R. et al., Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 475–482.

- [2] Cartwright, M. J., Tchkonina, T., Kirkland, J. L., Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp. Gerontol.* 2007, *42*, 463–471.
- [3] Escrivá, F., Gavete, M. L., Fermín, Y., Pérez, C. et al., Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J. Endocrinol.* 2007, *194*, 131–141.
- [4] Catalano, K. J., Stefanovski, D., Bergman, R. N., Critical role of the mesenteric depot versus other intra-abdominal adipose depots in the development of insulin resistance in young rats. *Diabetes* 2010, *59*, 1416–1423.
- [5] Bamshad, M., Aoki, V. T., Adkison, M. G., Warren, W. S. et al., Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 1998, *275*, R291–R299.
- [6] Kirkland, J. L., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Han, J. et al., Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp. Gerontol.* 2002, *37*, 757–767.
- [7] Cinti, S., The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005, *73*, 9–15.
- [8] Anghel, S. I., Wahli, W., Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res.* 2007, *17*, 486–511.
- [9] Niang, F., Benelli, C., Ribière, C., Collinet, M. et al., Leptin induces nitric oxide-mediated inhibition of lipolysis and glyceroneogenesis in rat white adipose tissue. *J. Nutr.* 2011, *141*, 4–9.
- [10] De Queiroz, K. B., Guimarães, J. B., Coimbra, C. C., Rodovalho, G. V. et al., Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids* 2014, *49*, 85–96.
- [11] Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Frühbeck, G., Adipose tissue immunity and cancer. *Front Physiol.* 2013, *4*, 275(1–13).
- [12] Tchkonina, T., Morbeck, D. E., von Zglinicki, T., van Deursen, J. et al., Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 2010, *9*, 667–684.
- [13] Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., Zechner, R., Lipolysis—a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 2011, *50*, 14–27.
- [14] Young, S. G., Zechner, R., Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 2013, *27*, 459–484.
- [15] Cadoudal, T., Leroyer, S., Reis, A. F., Tordjman, J. et al., Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome. *Biochimie* 2005, *87*, 27–32.
- [16] Flachs, P., Rossmeisl, M., Kuda, O., Kopecky, J., Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1831*, 986–1003.
- [17] Nye, C., Kim, J., Kalhan, S. C., Hanson, R. W., Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab.* 2008, *19*, 356–361.
- [18] Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S. et al., Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur. J. Biochem. FEBS* 2003, *270*, 1887–1899.
- [19] Haines, R. J., Pendleton, L. C., Eichler, D. C., Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2011, *2*, 8–23.
- [20] Cynober, L., Moinard, C., De Bandt, J.-P., The 2009 ESPEN Sir David Cuthbertson. Citrulline: a new major signaling molecule or just another player in the pharmaconutrition game? *Clin. Nutr.* 2010, *29*, 545–551.
- [21] Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S. et al., Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005, *29*, 177–205.
- [22] Osowska, S., Duchemann, T., Walrand, S., Paillard, A. et al., Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 2006, *291*, E582–E586.
- [23] Marquet-de Rougé, P., Clamagirand, C., Facchinetti, P., Rose, C. et al., Citrulline diet supplementation improves specific age-related raft changes in wild-type rodent hippocampus. *Age. Dordr. Neth.* 2013, *35*, 1589–1606.
- [24] Moinard, C., Le Plénier, S., Cynober, L., Raynaud-Simon, A., Long-term effect of citrulline supplementation in healthy aged rats: effect on body composition. *Clin. Nutr.* 2009, *4*, O025.
- [25] Wu, G., Collins, J. K., Perkins-Veazie, P., Siddiq, M. et al., Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* 2007, *137*, 2680–2685.
- [26] Cadoudal, T., Blouin, J. M., Collinet, M., Fouque, F. et al., Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007, *50*, 666–675.
- [27] Ribiere, C., Jaubert, A. M., Gaudiot, N., Sabourault, D. et al., White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, *222*, 706–712.
- [28] Antras-Ferry, J., Franckhauser, S., Robin, D., Robin, P. et al., Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: effects of retinoic acid and differentiation. *Biochem. J.* 1994, *302*(Pt 3), 943–948.
- [29] Bligh, E. G., Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, *37*, 911–917.
- [30] Djouadi, F., Bonnefont, J.-P., Thuillier, L., Droin, V. et al., Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate. *Pediatr. Res.* 2003, *54*, 446–451.
- [31] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[Delta][Delta]CT method. *Methods* 2001, *25*, 402–408.
- [32] Franckhauser, S., Antras-Ferry, J., Robin, P., Robin, D. et al., Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: opposite effects of dexamethasone and isoprenaline on transcription. *Biochem. J.* 1995, *305*(Pt 1), 65–71.

- [33] Lee, N.-C., Chien, Y.-H., Kobayashi, K., Saheki, T. et al., Time course of acylcarnitine elevation in neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006, 29, 551–555.
- [34] Muoio, D. M., Noland, R. C., Kovalik, J.-P., Seiler, S. E. et al., Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab.* 2012, 15, 764–777.
- [35] Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G. et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1821–1830.
- [36] Berthe, M.-C., Bernard, M., Rasmussen, C., Darquy, S. et al., Arginine or citrulline associated with a statin stimulates nitric oxide production in bovine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 670, 566–570.
- [37] Wijnands, K. A. P., Vink, H., Briedé, J. J., van Faassen, E. E. et al., Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLoS ONE* 2012, 7, e37439.
- [38] Jeon, M. J., Leem, J., Ko, M. S., Jang, J. E. et al., Mitochondrial dysfunction and activation of iNOS are responsible for the palmitate-induced decrease in adiponectin synthesis in 3T3L1 adipocytes. *Exp. Mol. Med.* 2012, 44, 562–570.
- [39] Doulias, P.-T., Tenopoulou, M., Greene, J. L., Raju, K. et al., Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation. *Sci. Signal.* 2014, 6, 256(1–12).
- [40] Mehebig, N., Jaubert, A.-M., Sabourault, D., Giudicelli, Y. et al., Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005, 289, C379–C387.
- [41] Joffin, N., Niang, F., Forest, C., Jaubert, A.-M., Is there NO help for leptin? *Biochimie* 2012, 94, 2104–2110.
- [42] Jobgen, W., Meininger, C. J., Jobgen, S. C., Li, P. et al., Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J. Nutr.* 2009, 139, 230–237.
- [43] Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A. et al., Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 7153–7164.
- [44] Faure, C., Morio, B., Chafey, P., Le Plénier, S. et al., Citrulline enhances myofibrillar constituents expression of skeletal muscle and induces a switch in muscle energy metabolism in malnourished aged rats. *Proteomics* 2013, 13, 2191–2201.

III. Résultats complémentaire *in vitro* chez le rat âgé

Effet *in vitro* de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme par le tissu adipeux rétropéritonéal de rats jeunes et de rats âgés.

La figure 20 montre les effets de la CIT à 8h et 24h de traitement. Alors que la CIT diminue l'expression de l'ARNm de la leptine chez le rat âgé dès 8h (71%), elle augmente en parallèle l'expression du gène codant l'adiponectine (274%). Aucun effet n'est observé sur l'expression des autres gènes par le traitement CIT (Figure 20).

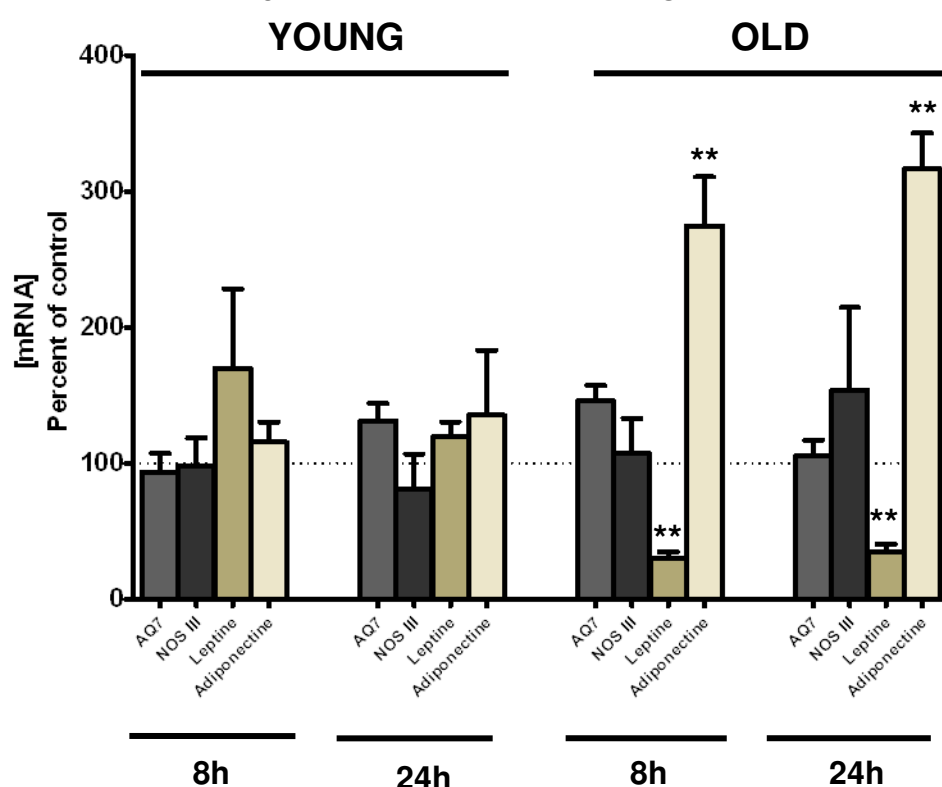


Figure 20 : Effet de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme du tissu adipeux rétropéritonéal de rats jeunes et de rats âgés.

Les explants de TA RET de rats jeunes et âgés sont traités ou non avec la CIT à 2,5mM pendant 8h ou 24h. Etude des effets de la CIT sur les gènes codant pour l'aquaporine 7 (AQ7), la *nitric oxide synthase 3* (NOS III), la leptine, l'adiponectine du TA RET de rats jeunes et âgés. Les ARNm ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant l'ARNm RPL13. Les résultats représentent le rapport entre les valeurs obtenues pour les explants de TA RET de rats jeunes ou âgés traités par la CIT et les valeurs obtenues pour les explants de TA RET de rats jeunes ou âgés non traités prises comme contrôle. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent la moyenne \pm SEM de 7 expériences indépendantes réalisées en triple. ** P < 0,01 vs Ctrl.

Effets *in vitro* de la CIT sur les explants de tissu adipeux rétro-péritonéal de rats âgés dans des conditions de culture riche en acides aminés.

Nous avons voulu savoir si dans des conditions de culture en DMEM, un milieu contenant d'autres acides aminés, la CIT pouvait agir de la même manière sur le métabolisme du TAB. Nous avons utilisé soit un milieu DMEM 10 % CO₂ soit un milieu KREBS 5% de CO₂. Nous montrons que la CIT augmente la concentration de glycérol et de NEFA dans les deux conditions d'incubation. La CIT diminue la glycéronéogenèse quel que soit le milieu d'incubation des explants de TA RET (**Figure 21**).

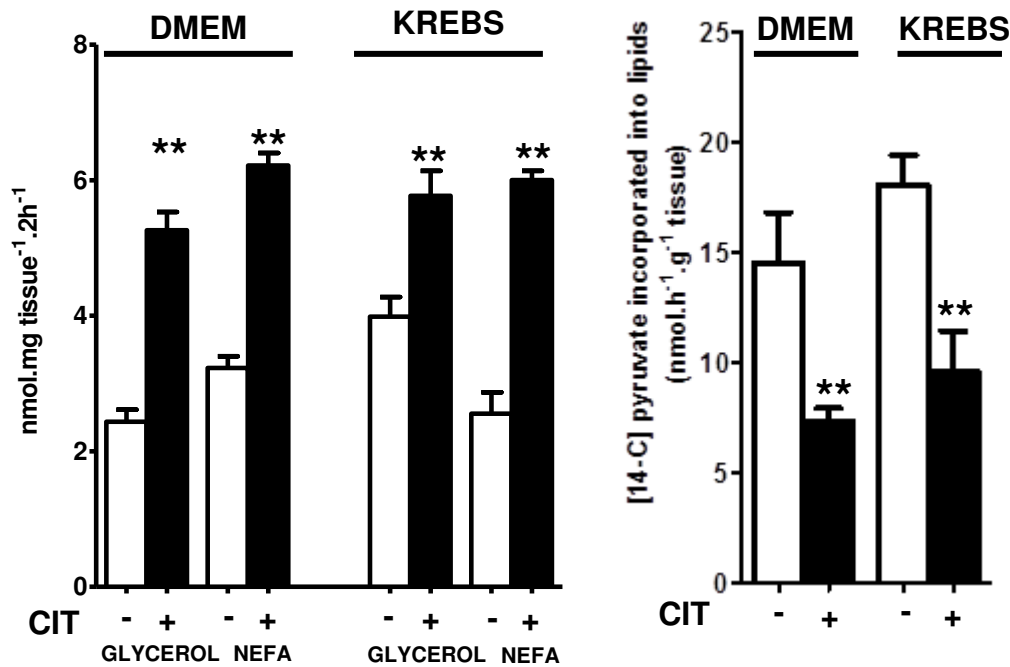


Figure 21 : Effets *in vitro* de la CIT sur le métabolisme des explants de TA RET de rats âgés dans d'autres conditions de cultures.

Les explants de TA RET de rats âgés sont incubés pendant 24h dans un milieu DMEM 10% de CO₂ ou dans un milieu KREBS 5% CO₂. Puis les explants sont traités avec ou sans CIT à 2,5mM pendant 24h. A) Effets de la CIT sur la libération de glycérol et de NEFA. Les résultats sont exprimés en nmol.mg⁻¹tissue.2h⁻¹ B) Effets de la CIT sur la glycéronéogenèse. Les résultats sont exprimés en nmol.h⁻¹.g⁻¹tissue. Chaque résultat représente la moyenne ± SEM de 5 expériences indépendantes réalisées en triple. ** P < 0.01 vs CIT

IV. ARTICLE 3

La citrulline réduit la glycéronéogenèse et induit la libération des acides gras dans le tissu adipeux viscéral chez des rats en surpoids.

[Joffin N](#), [Jaubert AM](#), [Durant S](#), [Bastin J](#), [De Bandt JP](#), [Cynober L](#), [Moinard C](#), [Coumoul X](#), [Forest C](#), [Noirez P](#)

Publication dans le journal *Molecular Nutrition and Food Research*
DOI: 10.1002/mnfr.201400507

Contexte : Une alimentation riche en lipides (HFD) augmente le TAV. Notre objectif était d'évaluer si la CIT affectait le métabolisme des AG du TA RET de rats sous régime riche en lipide (HFD).

Méthodes et résultats : Les rats ont été nourris pendant 8 semaines soit avec un régime contrôle (CD) ou HFD. Les explants de TA RET ont été exposés pendant 24h à 2,5 mM CIT. La CIT double la libération des AGNE sélectivement dans le TA RET des rats HFD. La phosphorylation de la lipase sensible aux hormones a été augmentée de 50 et 100% par la CIT respectivement dans les explants de TA RET de rats CD et HFD. Sous CIT, la β -oxydation est augmentée de façon similaire quel que soit le régime alimentaire, tandis que la glycéronéogenèse, qui permet la ré-estérification des AGNE, a été diminuée de 50 à 80% respectivement chez les rats CD et HFD. Chez ces derniers, la diminution importante de la ré-estérification explique probablement l'augmentation de la libération des AGNE. Un prétraitement avec le L-NAME abolit les effets de la CIT.

Conclusion: Ces résultats démontrent l'effet direct lipolytique et anti-glycéronéogénique de la CIT sur les explants de TA RET de rats CD et HFD. La CIT stimule la libération d'AGNE sélectivement chez les rats HFD, probablement en conséquence de la diminution drastique de la glycéronéogenèse. Le NO est un médiateur des effets de la CIT. Ces résultats fournissent la preuve d'une action directe de la CIT sur le TA RET permettant potentiellement de réduire le surpoids lié un régime riche en lipides.

RESEARCH ARTICLE

Citrulline reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release in visceral adipose tissue from overweight rats

Nolwenn Joffin^{1,2}, Anne-Marie Jaubert^{2,3}, Sylvie Durant^{1,2}, Jean Bastin^{1,2}, Jean-Pascal De Bandt^{1,4,5}, Luc Cynober^{1,4,5}, Christophe Moinard^{1,4}, Xavier Coumou^{1,2}, Claude Forest^{1,2} and Philippe Noirez^{1,6,7}

¹ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1124, Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation Cellulaire, Paris, France

³ Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine Paris-Ile de France-Ouest, Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Versailles, France

⁴ Laboratoire de Biologie de la Nutrition, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

⁵ Service de Biochimie, Hôpital Cochin, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁶ Institut de Recherche Biomédicale et d'Epidémiologie du Sport, EA 7329, Paris, France

⁷ Faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, Paris, France

Scope: High-fat diet (HFD) increases visceral adipose tissue (AT). Our aim was to evaluate whether citrulline (CIT) affected nonesterified fatty acid (NEFA) metabolism in AT from HFD-fed rats.

Methods and results: Rats were fed for 8 weeks with either a control diet (CD) or HFD. Retroperitoneal AT explants were exposed to 2.5 mmol/L CIT for 24 h. We analyzed lipolysis, beta-oxidation, glyceroneogenesis, and the expression of the key associated enzymes. CIT doubled NEFA release selectively in HFD AT. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase was upregulated 50 and 100% by CIT in CD and HFD AT, respectively. Under CIT, beta-oxidation increased similarly whatever the diet, whereas glyceroneogenesis, which permits NEFA re-esterification, was downregulated 50 and 80% in CD and HFD AT, respectively. In the latter, the important decrease in re-esterification probably explains the rise of NEFA release. A pretreatment with the nitric oxide synthase inhibitor N ω-nitro-L-arginine methyl ester abolished CIT effects.

Conclusion: These results demonstrate direct lipolytic and antiglyceroneogenic effects of CIT on CD and HFD AT. The selective CIT-mediated NEFA release from HFD AT was probably the consequence of the drastic decrease in glyceroneogenesis and nitric oxide was a mediator of CIT effects. These results provide evidence for a direct action of CIT on AT to reduce overweight.

Keywords:

Adipose tissue / Citrulline / Fatty acids / Glyceroneogenesis / Overweight

Received: July 25, 2014
Revised: September 15, 2014
Accepted: September 21, 2014

Correspondence: Dr. Claude Forest, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1124, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation Cellulaire, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

E-mail: claude.forest@parisdescartes.fr

Abbreviations: ARG, arginine; ASL, argininosuccinate lyase; ASS, argininosuccinate synthase; AT, adipose tissue; ATGL, adipose triglyceride lipase; CD, control diet; CIT, citrulline; CPT 1-b, carnitine palmitoyl transferase 1-b; EPI, epididymal; GyK, glycerol kinase; HFD, high-fat diet; HSL, hormone-sensitive

1 Introduction

Excess fat mass and insulin resistance are largely the consequence of a disequilibrium between food consumption and

lipase; P-HSL, phosphorylated HSL; KREBS, Krebs Ringer buffer saline; L-NAME, Nω-nitro-L-arginine methyl ester; NEFA, nonesterified fatty acid; NO, nitric oxide; NOS, NO synthase; PEPCK-C, cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPAR_γ2, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2; RET, retroperitoneal; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; VLCAD, very long chain acyl CoA dehydrogenase; ZDF, Zucker Diabetic Fatty

energy needs, particularly under high-fat diet (HFD) [1, 2]. Altered glucose tolerance is one of the severe outcomes of excess fat mass [3–5]. The excessive development of visceral white adipose tissue (AT) is an important determinant of metabolic syndrome, a complication that frequently occurs in obese subjects [6]. Among the intra-abdominal depots, epididymal (EPI) and retroperitoneal (RET) AT are considered as visceral depots and have been largely used for metabolic regulation studies [7–11].

AT is heterogeneous, containing several cell types other than adipocytes [12]. Specifically, a rise in chronic low-grade inflammation develops when AT mass expands, because of the increase in the amount of resident macrophages and lymphocytes in AT [1, 13–15]. The dynamic of AT mass is the result of either hyperplasia or hypertrophy. The latter is due to an increased storage of triglycerides in adipocytes. Lipolysis, i.e., triglyceride hydrolysis, reverses this situation during fasting. Upon lipolysis induction, nonesterified fatty acids (NEFAs) and glycerol can be released to the blood. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) are involved in the first and second step of triglyceride breakdown [16, 17]. Whereas HSL activity can be induced via phosphorylation, no posttranslational modification of ATGL is known. Both enzymes are translocated at the surface of lipid droplets upon activation [16, 17]. NEFA stemming from lipolysis can be released into the blood or undergo re-esterification and mitochondrial beta-oxidation [18, 19]. During lipolytic situations, NEFA re-esterification is the consequence of glyceroneogenesis, for which the cytosolic isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) is the key enzyme [20, 21]. Glycerol output is also hampered by its phosphorylation mediated by glycerol kinase (GyK) [22]. Hence, any treatment favoring adipocyte emptying would be efficient to fight overweight and/or obesity.

Citrulline (CIT) is an amino acid that is not used for protein synthesis. Like arginine (ARG), it is proposed as a food supplement in aging and sports to improve muscle mass and function [23, 24]. CIT is an intermediate of the urea cycle in the liver and is also released from ARG during nitric oxide (NO) production [25, 26]. CIT can be recycled into ARG in macrophages because of the expression of argininosuccinate synthase (ASS), argininosuccinate lyase (ASL), and NO synthases (NOSs) in these cells [27]. Therefore, CIT can be used by specific cell populations for NO production [25, 26]. In isolated adipocytes both NOS II and NOS III proteins are expressed but neither ASS nor ASL are detected [19, 28]. Dietary supplementation with ARG or CIT was used to treat and prevent inherited human metabolic disorders [29]. However, when administered to humans, ARG is largely metabolized in the liver, in contrast to CIT. Therefore ARG bioavailability is much weaker than that of CIT [30]. Furthermore, Wu et al. observed that a diet supplemented with watermelon juice, the most important natural source of CIT, in a model of obese Zucker Diabetic Fatty (ZDF) diabetic rats decreased plasma glucose and NEFA concentrations [31]. Recently, we demonstrated that CIT exerted a direct lipolytic action in RET AT

explants from rats, although NEFA release occurred selectively in explants from aged rats that can be considered as overweight [19]. We thus wondered what were the respective roles of excess fat mass and of aging in these observations. Since old rats are overweight, the aim of the present study was to evaluate whether CIT exerted also a lipolytic effect in AT explants from HFD-fed young rats, which develop excess fat mass. Taking into account the parallel development of inflammatory processes in the expanding AT, we also investigated the implication of NO in CIT effects on NEFA metabolism [13, 32].

2 Materials and methods

2.1 Materials

SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix kit was from Invitrogen Life Technologies (Saint Aubin, France). Rneasy lipid tissue mini kit, Qiazol Reagent and DNase set were purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). [1-¹⁴C]-Pyruvic acid, sodium salt (9.5 mCi/mmol) and (9,10-³H) palmitic acid (60 Ci/mmol) were from PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA). Rat insulin enzyme immunoassay kit was from Bertinpharma (SPI-BIO) (Montigny le Bretonneux, France). Glucose Assay Kit and mouse very long chain acyl dehydrogenase (VLCAD) antibody were from Abcam (Cambridge, UK). Triacylglycerol assay kit was from Biomérieux (Craponne, France). Hybond-N⁺ membranes and Amersham Hyperfilm ECL were from GE Healthcare Life Sciences (Velizy-Villacoublay, France). Free Fatty Acids Half Micro test and SYBR Green were from Roche (Meylan, France). Glycerol test (glycerol UV-method) was from R-Biopharm (Saint Didier au Mont d'Or, France). For Western-blot analyses, SDS-PAGE was carried out using a SDS-MOPS running buffer and a Novex 4–12% Bis-Tris gel from Invitrogen (Villebon sur Yvette, France). Rabbit anti-HSL and anti-phosphorylated HSL (P-HSL) antisera were purchased from Ozyme (Saint Quentin en Yvelines, France). Sheep anti-PEPCK-C antibody was a gift from Professor E. Beale (Lubbock, TX, USA). Goat anti-β-actin antibody was from Santa-Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Nylon mesh was from Sefar (Switzerland). Fatty acid free albumin, sodium pyruvate, Tween 20, and all other products were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). CIT was a gift from Citrage company (<http://www.citrage.com>).

2.2 Animals: Housing and feeding

Two-month-old male Sprague–Dawley rats from Centre d'Elevage de Rats Janvier (Berthevin, France) were randomized into two groups. After two weeks of acclimatization, rats were fed ad libitum during 8 weeks as follow: the control diet (CD) group rats ($n = 7$) were fed with standard diet and the

HFD group rats ($n = 7$) were fed with HFD. All rats had free access to water and food ad libitum.

All rats were maintained at constant room temperature (24°C) on a 12-h light/dark cycle. CD rats were fed with a standard balanced diet (11.7 MJ/kg) (64% carbohydrates, 20% proteins, 3% lipids, 5% vitamins and minerals) from Safe (Augy, France). HFD rats were fed with a HFD (19.5 MJ/kg) (44.5% carbohydrates, 20% proteins, 27.5% lipids, 5% vitamins and minerals) from Safe.

Rats were anaesthetized and after blood sampling from the jugular vein, killed by decapitation. Blood aliquots were centrifuged and supernatants were stored at -20°C for further glucose (Glucose Assay Kit was from Abcam), insulin (Rat insulin enzyme immunoassay kit was from Bertinpharma (SPI-BIO)) and triacylglycerol (Triacylglycerol assay kit was from Biomérieux) determinations. Samples of AT were removed and weighted.

The protocol for the animal studies was conducted according to the French Guidelines for the care and use of experimental animals.

2.3 Rat adipose tissue explants

RET AT from rats was sampled for analyses. About 200 mg of tissue were cut in about 20 mg fragments and cultured in Krebs Ringer buffer saline (KREBS) medium (0.63% NaCl, 0.032% KCl, 0.014% CaCl_2 , 0.015% KH_2PO_4 , 0.025% MgSO_4 , 0.2% NaHCO_3) containing 5 mmol/L glucose at 37°C under 10% CO_2 . At 6 h, KREBS medium was renewed with 5 mM glucose. At 24 h of incubation, KREBS medium was renewed with 5 mM glucose with or without 2.5 mmol/L CIT (this concentration was chosen because it corresponds to the plasma CIT concentration observed after CIT supplementation) [23]. Explants were treated by CIT for 24 h, then frozen before further studies [33].

2.4 Glycerol and NEFA release

Two hundred milligrams of tissue were cut into fragments of about 20 mg and cultured in KREBS medium glucose 5 mmol/L. The medium was changed at 6 h. Two hours later the medium was replaced with KREBS 5 mM glucose medium in presence or in absence of 2.5 mmol/L CIT. After 24 h incubation, the medium was replaced with KREBS glucose-free medium containing 2% of fatty acid free BSA and 5 mmol/L pyruvate. Two hours later, the incubation medium was recovered for the estimation of lipolytic NEFA with Free Fatty Acids Half Micro test from Roche and glycerol with glycerol test (glycerol UV-method) from R-Biopharm.

2.5 Beta-oxidation

Palmitate oxidation was evaluated on 100 mg RET AT at 24 h of incubation with or without 2.5 mmol/L CIT. The

release of tritiated water was assessed in triplicate as previously described [34]. Layers of explants were washed three times with PBS before the addition of 200 μL ($9,10\text{-}^3\text{H}$) palmitic acid (60 Ci/mmol) bound to fatty acid free albumin (final concentration: 125 μM , palmitate:albumin 2:1) per well. After 2 h at 37°C, the mixture was removed and added to a tube containing 200 μL of cold 10% trichloroacetic acid. After centrifugation for 10 min at $3300 \times g$ at 4°C, aliquots of supernatants (350 μL) were taken, mixed with 55 μL of 6N NaOH, and applied to the ion-exchange resin. Columns were washed with 1.7 mL of water and eluates were counted.

2.6 Glyceroneogenic flux

Glyceroneogenic flux was followed by the incorporation of ^{14}C from [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-pyruvic acid, sodium salt (9.5 mCi/mmol), into lipids, followed by lipid extraction as described previously to investigate the proportion of NEFA re-esterification [9, 33]. AT explants (200 mg) were incubated in KREBS medium containing 5 mmol/L glucose in the presence or absence of 2.5 mmol/L CIT. At 24 h, media were changed and explants were incubated at 37°C under 10% CO_2 for 2 h with KREBS glucose free medium containing 2% fatty acid free BSA and 5 mmol/L pyruvic acid. [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Pyruvic acid was used at an isotopic dilution of 1/250. At 2 h of incubation, each sample was rinsed and frozen in liquid nitrogen before lipid extraction, according to the simplified method of Bligh and Dyer [35]. The subsequent [$1\text{-}^{14}\text{C}$] pyruvic acid incorporation was estimated by counting the radioactivity associated with the fragments [9, 33].

2.7 RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time RT-qPCR

Total RNA was extracted from RET AT with Rneasy lipid tissue mini kit from Qiagen. RNA was quantified by spectrophotometric Nanodrop. Total RNA (500 ng) was reverse transcribed using SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix kit from Life Technologies. Samples of cDNA were diluted 1:40, amplified, and used for RT-qPCR measurements using SYBR Green from Roche as previously described [19]. RT-qPCR was performed in the LightCycler1536 instrument from Roche as follows: 75°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of denaturation (95°C for 15 s to the denaturation, 60°C for 30 s to the annealing, 72°C for 30 s to the extension). Results were analyzed with the LightCycler1536 software from Roche. Ribosomal RPL13 RNA was used to normalize cDNA. Quantification of mRNA was carried out by comparing the number of cycles required to reach reference and target threshold values ($2^{-(\delta-\delta\text{Ct})}$ method) as described previously [36]. Sequences of the rat sense and antisense nucleotides corresponding to the different genes assayed are presented in Table 1.

Table 1. Rat primer sequences of RNA tested by RT-qPCR

RNA	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>As1</i>	gctcccgactgctgagat	ttttctggtccggatgg
<i>Ass</i>	ccaccggcttcatcaatc	tgctctgaaggcgatggta
<i>Acadv1</i>	tgaatgaccctgccaag	ccacaatctctgccaagc
<i>Cpt 1-b</i>	acaatgggacattccaggag	aaagactggcgctgctca
<i>Pnpla2</i>	gtgtcctcaccatccggtt	tggcctcatcaccagatac
<i>Cd68</i>	agagcaggtcaaggtgaacag	agggtggaagaaaggtgtaagc
<i>Emr1</i>	gtggaggatggggatggac	acaacaggaaggtggctatgg
<i>Lipe</i>	agccacaacctagcagaact	ctgggcgtagtaggctagag
<i>IL6</i>	ttggatggtcttggctctagcc	tctaccaccaactccaatgctc
<i>Gk</i>	cgggaaataataatttgcgaagtc	ccaacgaagtctcactgcac
<i>Nos2</i>	cccagagcctctagacctcaa	catggtgaacacgcttctgg
<i>Rpl13</i>	tggcaggggcttcag	tggcatcacaggctc
<i>TNF-α</i>	gcttggtggttctgctacgac	actgaactcgggggtgattg

The abbreviations of the genes, their 5' to 3' nucleotide sequences of the forward and reverse primers are presented.

2.8 Western blot

Protein fractions were prepared from AT explants in a buffer containing 10 mmol/L HEPES pH 7.9, then separated by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose filters. Blots were blocked with 3% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20 and incubated with 1:500, 1:1000, 1:1000, 1:2500, 1:1000, and 1:500 dilutions for the ATGL, HSL, P-HSL, PEPCK-C, VLCAD, and β -actin antisera, respectively. Rabbit anti-ATGL, anti-HSL, and anti-P-HSL antibodies were purchased from Ozyme. Rabbit VLCAD antibody was from Abcam. Sheep anti-PEPCK-C antibody was a gift from Professor

E. Beale. Goat anti- β -actin antibody was from Santa-Cruz Biotechnology.

For PEPCK-C detection, bound antibodies were visualized using enhanced chemiluminescent according to the manufacturer's instructions. Blots were exposed to hyperfilm and signals were quantified by scanning densitometry. For ATGL, β -actin, HSL, P-HSL, and VLCAD, the Odyssey method was used for detection, following the procedure described by the manufacturer (Li-COR). Quantitative results of Western blotting were obtained by densitometry in ImageJ software.

2.9 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Each independent experiment was carried out in triplicate. Statistical analysis was carried out using the nonparametric Mann–Whitney *U* test for pairwise comparisons, which was applied due to the small number of experiments ($n < 10$). A value of $p < 0.05$ was considered as significant—* $p < 0.05$ versus CD; ** $p < 0.01$ versus CD; *** $p < 0.001$ versus CD; ^a $p < 0.05$ versus CIT; ^{aa} $p < 0.01$ versus CIT.

3 Results

3.1 Body and metabolic parameters

HFD rats ($n = 7$) presented a significant higher body weight than animals fed a CD ($n = 7$) (Table 2). The weights of RET

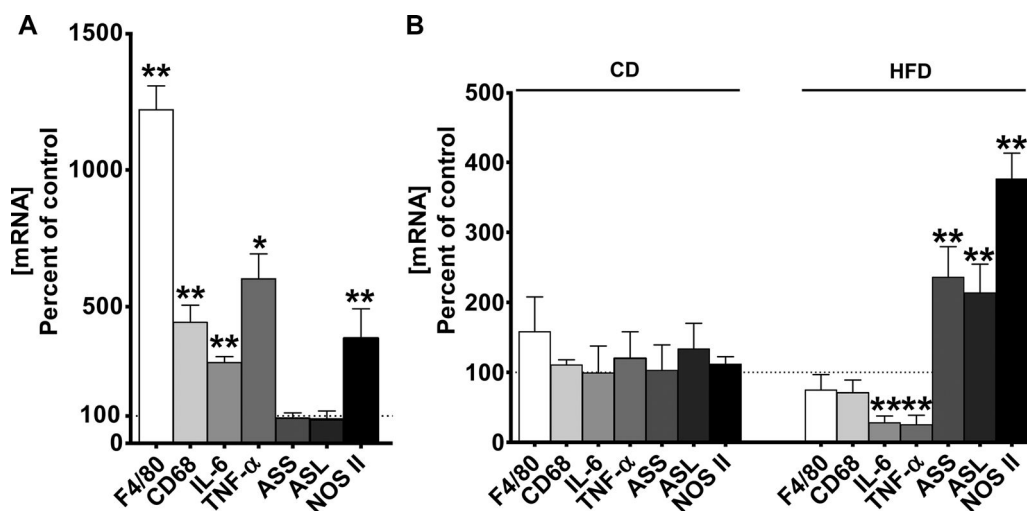


Figure 1. Effects of HFD and CIT on the expression of inflammatory protein-encoded genes. F4/80, CD68, IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), argininosuccinate synthase (ASS), argininosuccinate lyase (ASL), and nitric oxide synthase 2 (NOS II) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using RPL13 mRNA. (A) Effect of HFD. Explants from CD and HFD rats were incubated in the absence of CIT for 24 h. Results represent the ratio of the values obtained in HFD rats versus the values obtained in CD rats—taken as controls. (B) Effect of CIT. Explants from CD and HFD rats were incubated or not incubated (control) with CIT 2.5 mM for 24 h. Results represent the ratio of the values obtained in CIT-treated AT explants from CD and HFD rats versus the values obtained in control AT explants from CD and HFD rats—taken as controls. Results are expressed as percent of control and represent the mean \pm SEM of seven independent experiments, each carried out in triplicate. * $p < 0.05$ versus control; ** $p < 0.01$ versus control.

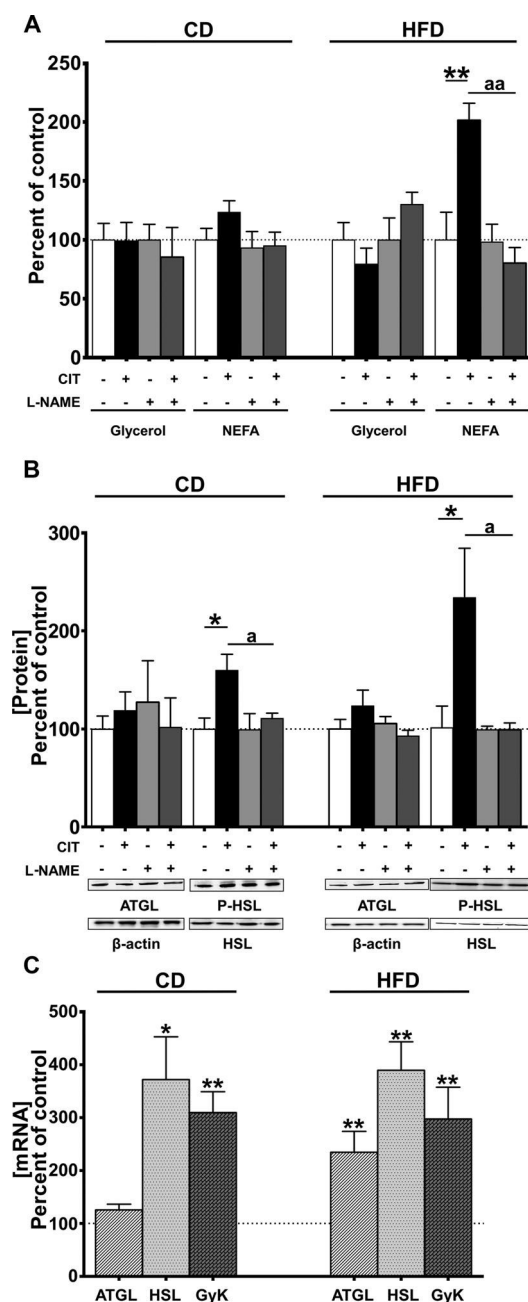


Figure 2. Effect of CIT on lipolysis and the expression of ATGL, HSL, and GyK. Explants were treated or not treated by CIT and/or L-NAME as described in Section 2. (A) Glycerol and NEFA concentrations in culture medium of RET AT explants from CD and HFD rats. For CD rats, absolute values were $1.96 \pm 0.37 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{tissue} \cdot \text{mg}^{-1}$ for glycerol and $2.74 \pm 0.26 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{tissue} \cdot \text{mg}^{-1}$ for NEFA. For HFD rats, absolute values were $1.68 \pm 0.65 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{tissue} \cdot \text{mg}^{-1}$ for glycerol and $1.85 \pm 0.43 \text{ nmol} \cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{tissue} \cdot \text{mg}^{-1}$ for NEFA. Results are expressed in percent of control and each value represents the mean \pm SEM from seven independent experiments, each carried out in triplicate. (B) Histograms of adipose triglyceride lipase (ATGL) and phosphorylated hormone-sensitive lipase (P-HSL) represent the mean \pm SEM of the quantification of seven Western blots carried out from

AT and EPI AT were augmented, respectively, by 108 and 62% in HFD rats compared with CD animals. Furthermore, the ratio of RET AT weight to body weight presented a larger increase with HFD (3.8 vs. 2.0%) than that of EPI AT (2.8 vs. 1.9%). Thus, we decided to focus our studies on RET AT, because in addition this tissue plays a crucial role in the occurrence of metabolic syndrome. HFD and CD rats had similar blood levels of glucose, insulin, and triglycerides (Table 2).

3.2 Effects of HFD and CIT on the expression of inflammatory protein-encoded genes

It is well known that overweight and obesity induce a low-grade inflammation status. We first analyzed the effect of HFD on inflammation compared to CD under our experimental conditions.

HFD had no effect on the expression of ASL and ASS genes (Fig. 1A). However, this diet dramatically increased the expression of the genes coding for F4/80 (1219%) and CD68 (442%), two macrophage markers, and for three inflammatory proteins, IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and NOS II (Fig. 1A).

We then investigated the impact of a 24 h treatment with CIT on the expression of the above-mentioned genes in RET AT explants from CD and HFD rats. None of these mRNAs was affected by the 24 h treatment with 2.5 mmol/L CIT in explants from CD rats (Fig. 1B). In explants from HFD rats, CIT did not change F4/80 and CD68 expressions but decreased by 60% that of IL-6 and TNF- α mRNA levels and increased

Table 2. Anthropometric and biological parameters of young CD and HFD rats

	CD N = 7	HFD N = 7
Body weight (g)	598 \pm 22	649 \pm 13*
Epididymal AT weight (g)	11.5 \pm 0.6	18.6 \pm 1.1***
Retroperitoneal AT weight (g)	12 \pm 1.1	25 \pm 1.6***
Glycemia (mmol/L)	5.60 \pm 0.03	6.21 \pm 0.36
Insulinemia (ng/mL)	0.25 \pm 0.02	0.29 \pm 0.03
Triacylglycerol (g/L)	1.6 \pm 0.06	2.22 \pm 0.21

Young CD ($n = 7$) and HFD rats ($n = 7$) were under a standard balanced diet. Blood samples and adipose tissue were collected for analyses. Data are means \pm SEM.

* $p < 0.05$ versus CD; *** $p < 0.001$ versus CD.

different explants. Results are expressed as percent of control, relative to β -actin or HSL and represent the mean \pm SEM of seven independent experiments carried out in triplicate. A representative autoradiogram of Western blots of ATGL, HSL, P-HSL, and β -actin is shown. (C) ATGL, HSL, and glycerol kinase (GyK) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using RPL13 mRNA. Results are expressed as percent of control and represent the mean \pm SEM of seven independent experiments, each carried out in triplicate. * $p < 0.05$ versus control; ** $p < 0.01$ versus control; ^a $p < 0.05$ versus CIT; ^{aa} $p < 0.01$ versus CIT.

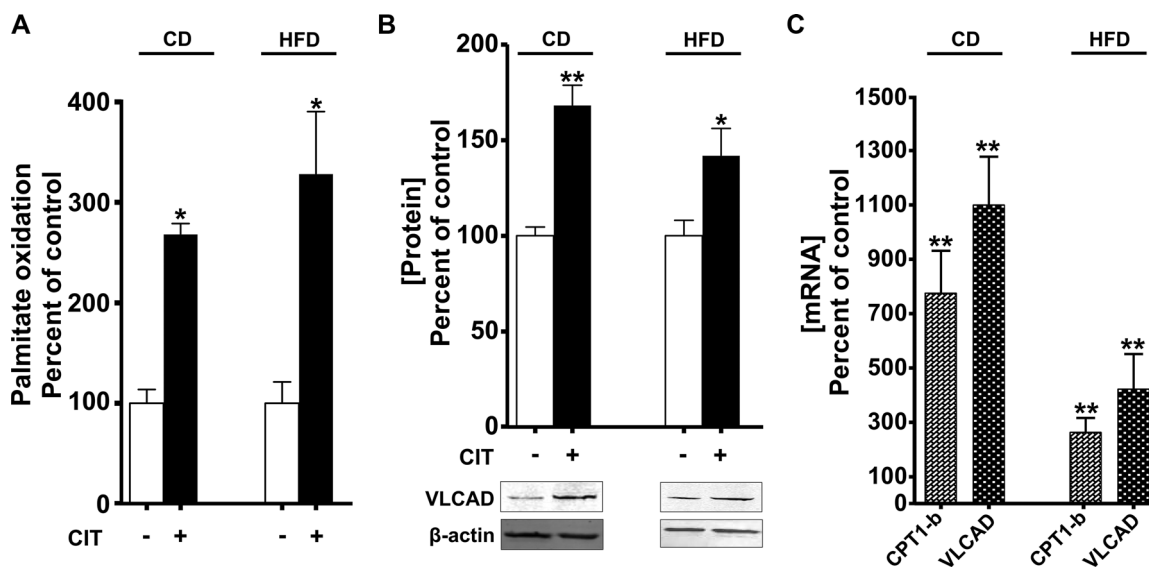


Figure 3. Effect of CIT on beta-oxidation and very long chain acyl dehydrogenase (VLCAD) expression. Explants were incubated or not incubated with CIT for 24 h before analysis. (A) Incorporation of $^3\text{H}_2\text{O}$ from (9,10- ^3H)-palmitate is described in Section 2. Each value represents the mean \pm SEM of four independent experiments, each carried out in triplicate. In CD rats, absolute values were 1.4 ± 0.14 nmol ^3H NEFA $\cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{tissue} \cdot \text{mg}^{-1}$. In HFD rats, absolute values were 1.9 ± 0.14 nmol ^3H NEFA $\cdot 2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{tissue} \cdot \text{mg}^{-1}$. Results are expressed in percentage of control and each value represents the mean \pm SEM from four independent experiments, each carried out in triplicate. (B) Histograms of VLCAD represent the mean \pm SEM of the quantification of five Western blots carried out from different explants. Results are expressed as percent of control and represent the mean \pm SEM of five independent experiments carried out in triplicate. A representative autoradiogram of Western blots of VLCAD and β -actin is shown. (C) VLCAD and carnitine palmitoyl transferase 1-b (CPT 1-b) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using RPL13 mRNA. Results are expressed as percent of control and represent the mean \pm SEM of five independent experiments carried out in triplicate. * $p < 0.05$ versus control; ** $p < 0.01$ versus control.

significantly that of *Ass*, *Asl* and *Nos2* in explants from HFD rats (Fig. 1B). Furthermore, NOS II mRNA expression was increased by HFD and CIT treatment.

3.3 Effect of CIT on lipolysis and beta-oxidation

We studied the effect of a 24 h CIT treatment on glycerol and NEFA release in the culture medium of AT explants. As shown in Fig. 2A, CIT did not affect glycerol release in AT explants from CD and HFD rats, whereas NEFA output was significantly and selectively increased about twofold in the culture medium of explants from HFD rats.

Since HFD and CIT are able to stimulate *Nos2* gene expression (Fig. 1), we postulated that NO might be implicated in CIT effect on NEFA output. When explants were pretreated for 30 min with 1 mmol/L N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nonselective NOS inhibitor, CIT-induced NEFA release in explants from HFD rats was abolished (Fig. 2A).

We then assessed ATGL and HSL mRNA and protein expressions. Protein concentrations were similar whether explants were treated or not with CIT (data not shown). CIT did not affect ATGL protein level in explants from CD and HFD rats (Fig. 2B), although it slightly increased ATGL mRNA about twofold selectively in HFD explants (Fig. 2C). CIT up-

regulated the amount of the phosphorylated fraction of HSL (P-HSL) in explants from CD (60%) and HFD (133%) rats (Fig. 2B) in line with the induction of HSL mRNA (370 and 400%) in both CD and HFD (Fig. 2C).

When explants were pretreated with L-NAME, then with CIT for 24 h, the increase in HSL phosphorylation was abolished whatever their origin (Fig. 2B). This result suggests that NO is involved in CIT effect.

Using RT-qPCR, we monitored GyK mRNA expression in CIT-treated versus controls explants. GyK expression presented a threefold induction in CIT-treated explants from both CD and HFD rats (Fig. 2C). Such a result could reflect the absence of CIT effect on glycerol release in the culture medium of AT explants from both CD and HFD rats.

We then investigated the oxidative capacity of the explants in response to CIT. Results showed that palmitate oxidation was similar in AT explants from CD and HFD rats and was similarly increased about threefold by CIT in explants from both groups (Fig. 3A). CIT upregulated the amount of VLCAD, an enzyme involved in beta-oxidation of palmitate, in explants from CD (168%) and HFD (142%) rats (Fig. 3B) in line with the induction of its mRNA (Fig. 3C). Carnitine palmitoyl transferase 1-b (CPT 1-b) gene expression was also significantly increased by CIT in explants from both groups (Fig. 3C).

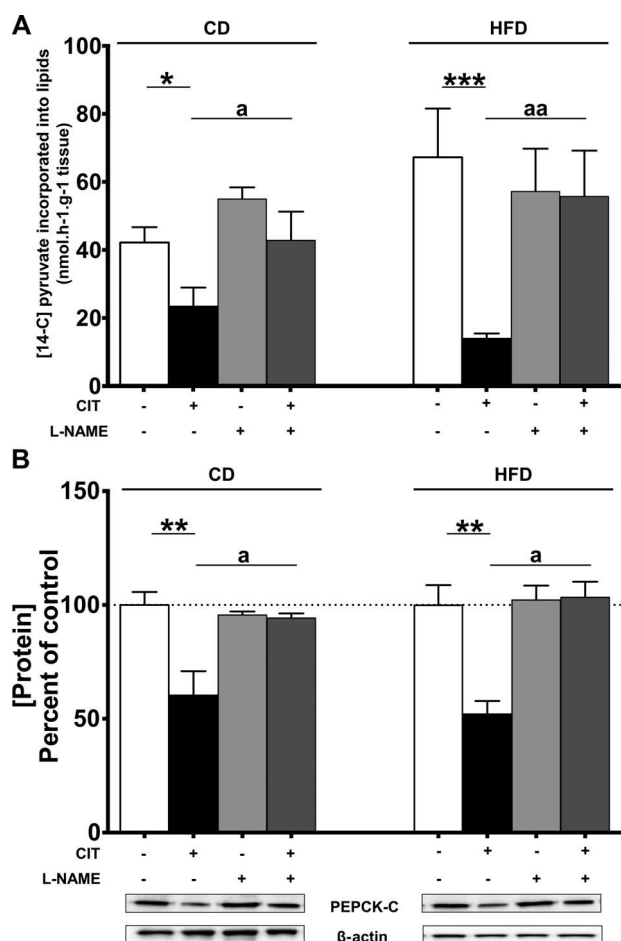


Figure 4. Effect of CIT on glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) expression. Explants were treated or not treated by CIT and/or L-NAME as described in Section 2. (A) Glyceroneogenic flux in AT explants from CD and HFD rats. Each value represents the mean \pm SEM from seven independent experiments, each carried out in triplicate. (B) Histograms of PEPCK-C represent the mean \pm SEM of the quantification of seven Western blots, each carried out from different explants. A representative autoradiogram of Western blots of PEPCK-C and β -actin in explants from CD and HFD rats is shown. * $p < 0.05$ versus control; ** $p < 0.01$ versus control; *** $p < 0.001$ versus control; ^a $p < 0.05$ versus CIT; ^{aa} $p < 0.01$ versus CIT.

3.4 Effect of CIT on glyceroneogenesis

CIT stimulates NEFA output in AT explants from HFD rats. This release largely depends on their intracellular re-esterification. We then monitored glyceroneogenesis, as the first step of NEFA re-esterification, by the incorporation of [1-¹⁴C]-pyruvate into lipids. HFD slightly augmented glyceroneogenesis in basal conditions (Fig. 4A). CIT attenuated glyceroneogenesis in AT explants from CD rats (50%), but drastically decreased (80%) this pathway in AT explants from HFD animals (Fig. 4A). When explants were pretreated with L-NAME, then with CIT for 24 h, CIT effect on glyceroneoge-

nesis was completely abolished in both AT explants (Fig. 4A). As a consequence, as seen for lipolysis and NEFA output (Fig. 2A and B), NO is involved in CIT effect on glyceroneogenesis. This suggested that CIT stimulates NEFA release (Fig. 2A) through an NO-dependent inhibition of glyceroneogenesis (Fig. 4A).

Then, we estimated by Western blot the amount of PEPCK-C protein, the key enzyme for glyceroneogenesis. A 24 h exposure to CIT reduced PEPCK-C amount in explants from both CD (40%) and HFD (48%) rats (Fig. 4B). As seen for the glyceroneogenesis flux, L-NAME abolished this CIT effect, suggesting that CIT stimulated NEFA release through an NO-dependent inhibition of PEPCK-C.

4 Discussion

CIT has been shown to reduce fat mass and augment lean mass in various pathophysiological conditions [37]. The underlying mechanism was unknown until we recently demonstrated that CIT induced NEFA output in RET AT explants from old rats [19]. Excess fat mass, like in aging, is accompanied by an increase in inflammation markers [19, 38, 39]. This led us to propose that similar processes might occur in AT from both aging and overweight status. We evaluated whether CIT exerted an effect on NEFA output in AT explants from HFD-fed rats that, like aged rats, present excess fat mass.

Our data show that CIT acts directly on RET AT explants from HFD and CD rats (Fig. 5). However, depending on the type of diet, this amino acid exerts different effects. In overweight, CIT stimulates NEFA output from AT in a manner similar to that observed in old rats, although the mechanism appears to be different. NEFA and glycerol release are considered as the hallmarks of lipolysis. Selectively in AT explants from HFD rats, CIT induced NEFA release in the incubation medium, while glycerol output was not affected whatever the diet. Under CIT action, HSL phosphorylation was augmented, suggesting that lipolysis increased. The fact that glycerol output was not modified by CIT in AT from CD and HFD rats, while P-HSL was increased, is related to the CIT-induced upregulation of GyK expression, an effect that suggests that glycerol phosphorylation was augmented. The magnitude of NEFA release can also be modulated by other processes, such as beta-oxidation or re-esterification. Therefore, the simultaneous occurrence of triglyceride hydrolysis and of these processes can limit the release of these lipolysis-derived products [18, 20]. The differential CIT effect on NEFA output in HFD and CD explants cannot be explained by beta-oxidation since this process is similarly activated by CIT in explants from both diets. This situation is different from that occurring in old rats, in which the beta-oxidation capacity is CIT-resistant [19]. An important observation is the difference in the robustness of CIT effect on glyceroneogenesis between CD and HFD. The observed augmentation of NEFA output in the medium of AT from HFD rats is most likely related to the massive CIT-induced drop in

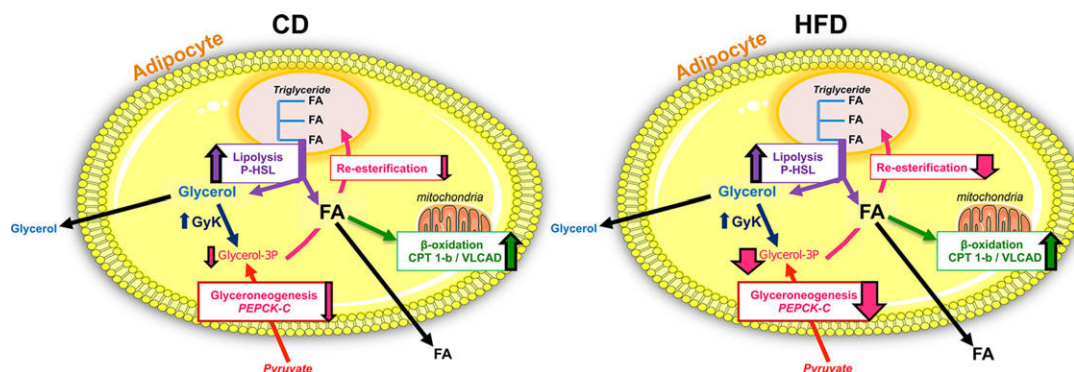


Figure 5. Schematic representation of CIT effects on FA metabolism in AT from CD and HFD rats. CIT effects are represented by arrows. The width of arrows is proportional to the intensity of CIT effects on the selected metabolic pathways, illustrated in different colors. In both CD and HFD, CIT stimulates lipolysis estimated by the amount of phosphorylated hormone-sensitive lipase (P-HSL). Glycerol output remains stable because of the increase in glycerol kinase (GyK) expression. CIT induces oxidative capacity (β -oxidation). In line with this, carnitine palmitoyl-transferase 1-b (CPT 1-b) and very long chain acyl dehydrogenase (VLCAD) expressions are increased. CIT reduces glyceroneogenesis, marker of FA re-esterification, and alters the expression of its key enzyme, cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C). In CD rats, re-esterification is balanced by the induction of beta-oxidation, explaining that FA release is unaffected. In HFD rats, the drastic decrease in FA re-esterification is not fully compensated by the induction of beta-oxidation and, as a consequence, FA release augments.

glyceroneogenesis, as in NEFA re-esterification (Fig. 5). Hence, under CIT treatment, NEFA and glycerol that originate from triglyceride breakdown are metabolized in intracellular pathways, therefore preventing their release in explants from CD rats. In contrast, in HFD rats, the CIT-induced massive drop in NEFA re-esterification reflects their higher release. This situation is at variance from that occurring in old rats in which the beta-oxidation capacity is not modified by CIT, while this amino acid downregulates glyceroneogenesis with a magnitude similar to that in AT from young animals [19]. Thus, although CIT stimulates NEFA release in both HFD and old rats, the underlying mechanisms appear to be quite different.

We showed that CIT increased *Ass* and *Asl* expression in RET AT explants from HFD rats. CIT can thus be converted to ARG and participate in the ARG-CIT cycle that produces NO [27]. However, we could not detect ASS and ASL mRNAs in isolated adipocytes from AT (unpublished results from our group). Thus, adipocytes are unable to produce NO from CIT as a substrate. In addition to adipocytes, AT includes endothelial cells of vessels and resident macrophages in which ASS and ASL are abundant [12, 27]. Such cell types can synthesize ARG from CIT, which in turn can produce NO from NOS III, then NOS II later on [28]. In overweight or aging rodents, macrophage infiltration rises in AT [14, 40]. We previously demonstrated that macrophage markers are strongly upregulated with age in RET AT [19]. The same situation occurs in HFD rats as shown by the increased expression of F4/80 and CD68 mRNA levels of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α) and NOS II.

Of interest is the observation that CIT reduced IL-6 and TNF- α mRNA expressions in explants from HFD rats, a situation at variance with that in old rats. This observation is

in accordance with several studies previously demonstrating that amino acids and derivatives decrease proinflammatory markers in mouse or human adipocytes or monocytes [1, 41, 42]. As expected from previous work, HFD induces *Nos2* expression [43]. An original observation here is that CIT upregulates *Nos2* expression selectively in AT from HFD rats, pointing out the ability of CIT to favor NO production. This study could be related to previous results showing the NO implication in the effects of ARG on inflammatory status in macrophages [44].

We show here that the NOS inhibitor L-NAME prevents CIT effects, thus assessing the implication of NO as the mediator of CIT action. In fact, using L-NAME and the NO donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillamine, we demonstrated previously that NO induced lipolysis and reduced glyceroneogenesis [9, 45, 46]. Such results are in agreement with other studies carried out on 3T3-L1 adipocytes or with *Nos2* KO mice that concluded that NO drastically reduced peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 (PPAR γ_2) expression in adipocytes [47, 48]. PPAR γ_2 is the main characterized transcriptional regulator of *Pck1* in adipocytes [49]. The decrease in PPAR γ_2 alters PEPCK-C expression and, consequently, glyceroneogenesis. Another hypothesis is that the CIT-directed NO production directly nitrates PEPCK-C, resulting in a rapid drop in the enzyme expression and glyceroneogenesis. A similar mechanism was previously demonstrated in our group for leptin action in AT [50]. Other studies showed that the effect of ARG on AT could be mediated by NO production or an inflammatory process in peritoneal macrophages [26, 44]. Interestingly, more recent studies established that ARG-supplemented diet activated the mTOR pathway and NO production via NOS II leading to improved uterin implantation in rats [51]. Furthermore, the

signaling pathway mTOR/NOS II/NO was clearly demonstrated to stimulate NO production in different human and rodent cell models [52].

The lipolytic effect of CIT associated with the drop in glyceroneogenic flux and NEFA re-esterification in RET AT explants from HFD rats results in NEFA output. This effect is probably beneficial because it favors adipocyte emptying. Alternatively, the CIT-induced elevation of plasma NEFA in HFD rats might be detrimental because of the known potential action of NEFA on the occurrence of an insulin-resistant state. In line with this hypothesis, Sailer et al. described a positive correlation between plasma CIT and obesity development [53]. However, such a detrimental action of NEFA would not occur if they are used as energy substrates for other tissues. Some of us established that a long-term CIT-supplemented diet increased muscle mass and decreased AT mass in aging rats [37]. We show here that the oxidative capacity of mitochondria was increased by CIT in CD and HFD AT. As basal metabolism is linked to body weight [54], HFD rats could have higher energy expenditure than CD rats. Therefore, for a similar level of physical activity, a more important energy consumption is expected in HFD rats compared with CD, thus leading to a lowering of AT mass in overweight animals. Indeed, physical activity in addition to CIT-supplemented diet could be more effective to favor a significant decrease in visceral AT. The amplified NEFA release induced by CIT in AT explants from overweight rats could act as an energy source in physical activity or for the resulting increase in skeletal muscle mass. Such a process would favor muscle metabolism in these HFD animals. Our observations suggest that CIT administration to overweight or obese subjects could be beneficial. As demonstrated in the present study, CIT decreased the production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in AT explants from HFD rats. Besides, the absence of glycerol release counteracts its potential use by the liver for the synthesis of VLDLs and such a mechanism limits the usual hypertriglyceridemia that can be observed after AT lipolysis. Altogether, our data point to CIT as a natural food supplement with the potency to decrease AT mass in overweight subjects.

We acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Université Paris Descartes for their financial support.

Potential conflict of interest statement: J.P.D.B., L.C., and C.M. are shareholders of Citrage company. N.J., A.M.J., S.D., J.B., X.C., C.F., and P.N. have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Macotela, Y., Emanuelli, B., Bång, A. M., Espinoza, D. O. et al., Dietary leucine—an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS One* 2011, *6*, e21187.
- [2] Benoit, B., Plaisancié, P., Awada, M., Géloën, A. et al., High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. *Nutr. Res.* 2013, *33*, 952–960.
- [3] Large, V., Arner, P., Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.* 1998, *24*, 409–418.
- [4] Tordjman, J., Guerre-Millo, M., Clément, K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab.* 2008, *34*, 658–663.
- [5] Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E., Orci, L., Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, *1801*, 209–214.
- [6] Després, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P. et al., Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008, *28*, 1039–1049.
- [7] Cinti, S., The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2005, *73*, 9–15.
- [8] Anghel, S. I., Wahli, W., Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res.* 2007, *17*, 486–511.
- [9] Niang, F., Benelli, C., Ribière, C., Collinet, M. et al., Leptin induces nitric oxide-mediated inhibition of lipolysis and glyceroneogenesis in rat white adipose tissue. *J. Nutr.* 2011, *141*, 4–9.
- [10] De Queiroz, K. B., Guimarães, J. B., Coimbra, C. C., Rodvalho, G. V. et al., Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids* 2014, *49*, 85–96.
- [11] Chau, Y.-Y., Bandiera, R., Serrels, A., Martínez-Estrada, O. M. et al., Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat. Cell Biol.* 2014, *16*, 367–375.
- [12] Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Frühbeck, G., Adipose tissue immunity and cancer. *Front. Physiol.* 2013, *4*, 275.
- [13] Ortega Martínez de Victoria, E., Xu, X., Koska, J., Francisco, A. M. et al., Macrophage content in subcutaneous adipose tissue: associations with adiposity, age, inflammatory markers, and whole-body insulin action in healthy Pima Indians. *Diabetes* 2009, *58*, 385–393.
- [14] Tchkonja, T., Morbeck, D. E., von Zglinicki, T., van Deursen, J. et al., Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 2010, *9*, 667–684.
- [15] Sakuma, K., Yamaguchi, A., Sarcopenic obesity and endocrinal adaptation with age. *Int. J. Endocrinol.* 2013, *2013*, 204164.
- [16] Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., Zechner, R., Lipolysis—a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 2011, *50*, 14–27.
- [17] Young, S. G., Zechner, R., Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 2013, *27*, 459–484.
- [18] Flachs, P., Rossmeisl, M., Kuda, O., Kopecky, J., Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent

- of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1831*, 986–1003.
- [19] Joffin, N., Jaubert, A.-M., Durant, S., Bastin, J. et al., Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, *58*, 1765–1775.
- [20] Cadoudal, T., Leroyer, S., Reis, A. F., Tordjman, J. et al., Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome. *Biochimie* 2005, *87*, 27–32.
- [21] Nye, C., Kim, J., Kalhan, S. C., Hanson, R. W., Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab.* 2008, *19*, 356–361.
- [22] Guan, H.-P., Li, Y., Jensen, M. V., Newgard, C. B. et al., A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat. Med.* 2002, *8*, 1122–1128.
- [23] Osowska, S., Duchemann, T., Walrand, S., Paillard, A. et al., Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006, *291*, E582–E586.
- [24] Sureda, A., Pons, A., Arginine and citrulline supplementation in sports and exercise: ergogenic nutrients? *Med. Sport Sci.* 2012, *59*, 18–28.
- [25] Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S. et al., Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur. J. Biochem.* 2003, *270*, 1887–1899.
- [26] Jobgen, W. S., Fried, S. K., Fu, W. J., Meininger, C. J. et al., Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 2006, *17*, 571–588.
- [27] Haines, R. J., Pendleton, L. C., Eichler, D. C., Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2011, *2*, 8–23.
- [28] Ribiere, C., Jaubert, A. M., Gaudiot, N., Sabourault, D. et al., White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, *222*, 706–712.
- [29] Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S. et al., Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005, *29*, 177–205.
- [30] Cynober, L., Moinard, C., De Bandt, J.-P., The 2009 ESPEN Sir David Cuthbertson. Citrulline: a new major signaling molecule or just another player in the pharmaconutrition game? *Clin. Nutr.* 2010, *29*, 545–551.
- [31] Wu, G., Collins, J. K., Perkins-Veazie, P., Siddiq, M. et al., Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* 2007, *137*, 2680–2685.
- [32] Zamboni, M., Rossi, A. P., Fantin, F., Zamboni, G. et al., Adipose tissue, diet and aging. *Mech. Ageing Dev.* 2013, *136–137*, 129–137.
- [33] Cadoudal, T., Blouin, J. M., Collinet, M., Fouque, F. et al., Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007, *50*, 666–675.
- [34] Djouadi, F., Bonnefont, J.-P., Thuillier, L., Droin, V. et al., Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate. *Pediatr. Res.* 2003, *54*, 446–451.
- [35] Bligh, E. G., Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, *37*, 911–917.
- [36] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-[Delta][Delta]CT method. *Methods* 2001, *25*, 402–408.
- [37] Moinard, C., Le Plénier, S., Cynober, L., Raynaud-Simon, A., Long-term effect of citrulline supplementation in healthy aged rats: effect on body composition. *Clin. Nutr.* 2009, *4*, 12.
- [38] Kuk, J. L., Saunders, T. J., Davidson, L. E., Ross, R. Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing Res. Rev.* 2009, *8*, 339–348.
- [39] Fuentes, E., Fuentes, F., Vilahur, G., Badimon, L. et al., Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013, *2013*, 136584.
- [40] Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G. et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2003, *112*, 1821–1830.
- [41] Olli, K., Lahtinen, S., Rautonen, N., Tiihonen, K., Betaine reduces the expression of inflammatory adipokines caused by hypoxia in human adipocytes. *Br. J. Nutr.* 2013, *109*, 43–49.
- [42] Raspé, C., Czeslick, E., Weimann, A., Schinke, C. et al., Glutamine and alanine-induced differential expression of intracellular IL-6, IL-8, and TNF- α in LPS-stimulated monocytes in human whole-blood. *Cytokine* 2013, *62*, 52–57.
- [43] Tsuchiya, K., Sakai, H., Suzuki, N., Iwashima, F. et al., Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology* 2007, *148*, 4548–4556.
- [44] Breuillard, C., Belabed, L., Bonhomme, S., Blanc-Quintin, M.-C. et al., Arginine availability modulates arginine metabolism and TNF α production in peritoneal macrophages from Zucker diabetic fatty rats. *Clin. Nutr.* 2012, *31*, 415–421.
- [45] Gaudiot, N., Jaubert, A. M., Charbonnier, E., Sabourault, D. et al., Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 13475–13481.
- [46] Joffin, N., Niang, F., Forest, C., Jaubert, A.-M., Is there NO help for leptin? *Biochimie* 2012, *94*, 2104–2110.
- [47] Nozaki, M., Fukuhara, A., Segawa, K., Okuno, Y. et al., Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, *364*, 33–39.
- [48] Dallaire, P., Bellmann, K., Laplante, M., Gélinas, S. et al., Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes* 2008, *57*, 1999–2011.

- [49] Glorian, M., Duplus, E., Beale, E. G., Scott, D. K. et al., A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie* 2001, 83, 933–943.
- [50] Jaubert, A.-M., Penot, G., Niang, F., Durant, S. et al., Rapid nitration of adipocyte phosphoenolpyruvate carboxykinase by leptin reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release. *PLoS One* 2012, 7, e40650.
- [51] Zeng, X., Mao, X., Huang, Z., Wang, F. et al., Arginine enhances embryo implantation in rats through PI3K/PKB/mTOR/NO signaling pathway during early pregnancy. *Reproduction* 2013, 145, 1–7.
- [52] Lee, M., Choy, J. C., Positive feedback regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by Ras protein S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 15677–15686.
- [53] Sailer, M., Dahlhoff, C., Giesbertz, P., Eidens, M. K. et al., Increased plasma citrulline in mice marks diet-induced obesity and may predict the development of the metabolic syndrome. *PLoS One* 2013, 8, e63950.
- [54] Morio, B., Ritz, P., Verdier, E., Montaurier, C. et al., Critical evaluation of the factorial and heart-rate recording methods for the determination of energy expenditure of free-living elderly people. *Br. J. Nutr.* 1997, 78, 709–722.

V. Résultats complémentaires *in vitro* chez le rat jeune HFD

Effet *in vitro* de la CIT sur l'expression des gènes codant les protéines du métabolisme du tissu adipeux rétropéritonéal de rats CD ou HFD à 8h et 24h.

Nous avons étudié les effets de la CIT sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du TA RET de rats CD ou HFD. La CIT augmente l'expression des ARNm de l'adiponectine (251%) à 24h de traitement chez le rat CD. Chez le rat HFD, l'expression du gène codant NOS III est augmentée à 8h (389%) et 24h (419%). A 24h de traitement, la CIT augmente aussi l'expression de l'ARNm de l'AQ7 (167%), et de l'adiponectine (462%) dans les explants de TA RET de rats HFD (Figure 22).

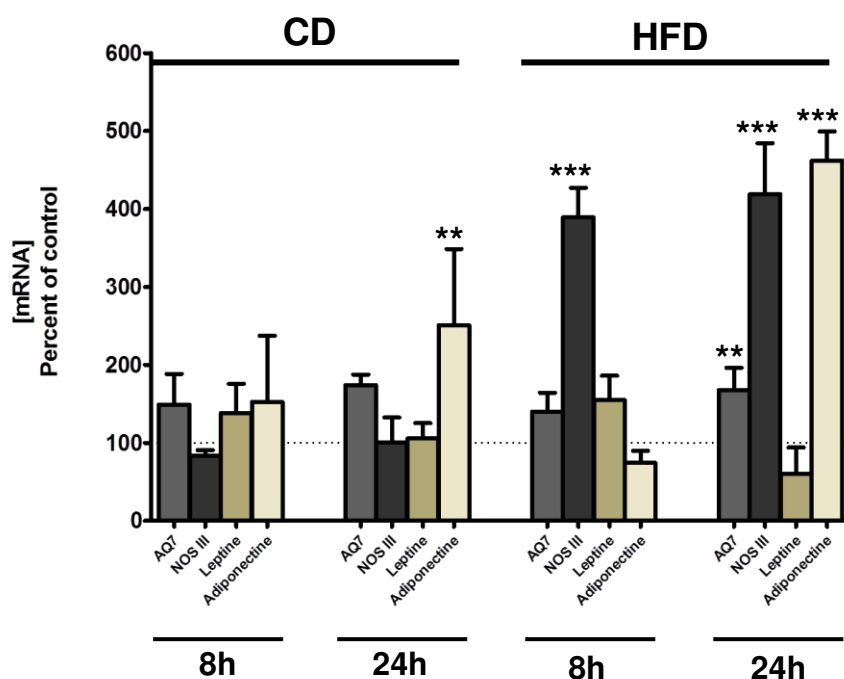


Figure 22 : Effet *in vitro* de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme du tissu adipeux rétropéritonéal de rats CD ou de rats HFD.

Les explants de TA RET de rats CD et HFD traités ou non pendant 8h ou 24h avec 2,5 mmol/L de CIT. Etude des effets de la CIT sur les gènes codant l'aquaporine 7 (AQ7), la NOS III, la leptine, l'adiponectine de TA RET de rats CD et HFD. Les quantités relatives d'ARNm ont été évaluées par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant l'ARNm RPL13. Les résultats représentent le rapport entre les valeurs obtenues pour les explants de TA RET de rats CD ou HFD traités par la CIT et les valeurs obtenues pour les explants de TA RET de rats CD ou HFD non traités prises comme contrôle. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent la moyenne \pm SEM de 7 expériences indépendantes réalisées en triple. ** P < 0,01 vs Ctrl ; *** P < 0.001 vs CIT

Effet du HFD et de la CIT sur l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'inflammation et des marqueurs de macrophages du tissu adipeux épидidymaire de rats CD ou HFD.

Les effets du HFD sur l'expression des gènes codant les protéines de l'inflammation et des marqueurs de macrophages ont montré que ce régime exerce un effet inflammatoire chronique sur le TA RET. Nous avons voulu faire les mêmes études sur une autre localisation profonde du TA : le TA EPI. L'effet du HFD sur les marqueurs de l'inflammation après 8h ou 24h de culture a été analysé chez des rats âgés de 4 mois en comparaison avec des rats sous régime contrôle (CD) âgés de 2 mois et de 4 mois. Dans nos conditions expérimentales, le HFD n'a eu aucun effet sur l'expression des gènes codant ASL et ASS (**Figure 23**). Cependant, ce régime a considérablement augmenté l'expression des gènes codant deux marqueurs de macrophages F4/80 (687%, 683%) et CD68 (473%, 566%) et des gènes codant les protéines de l'inflammation, IL-6 (324%, 337%), TNF- α (416%, 507%) et NOS II (298%, 656%) (**Figure 23**).

Nous avons ensuite étudié l'impact sur l'expression des gènes mentionnés ci-dessus, d'un traitement de 8h avec de la CIT des explants de TA EPI de rats CD âgés de 2 mois et de 4 mois et de rats HFD âgés de 4 mois. Chez le rat CD âgé de 2 mois, la CIT n'influence pas l'expression des gènes de l'inflammation et des marqueurs de macrophages. Nous constatons une diminution de l'expression de l'ARNm de IL-6 (33%) à 8h de traitement et de TNF- α (30%) à 24h dans les explants de TA EPI de rats CD 4 mois. Chez le rat HFD, la CIT augmente l'expression de l'ARNm de NOS II à 8h (431%) et à 24h (396%) et diminue l'expression du gène codant pour TNF- α (76%-87%) et IL-6 (71-78%) à 8h et 24h (**Figure 23**).

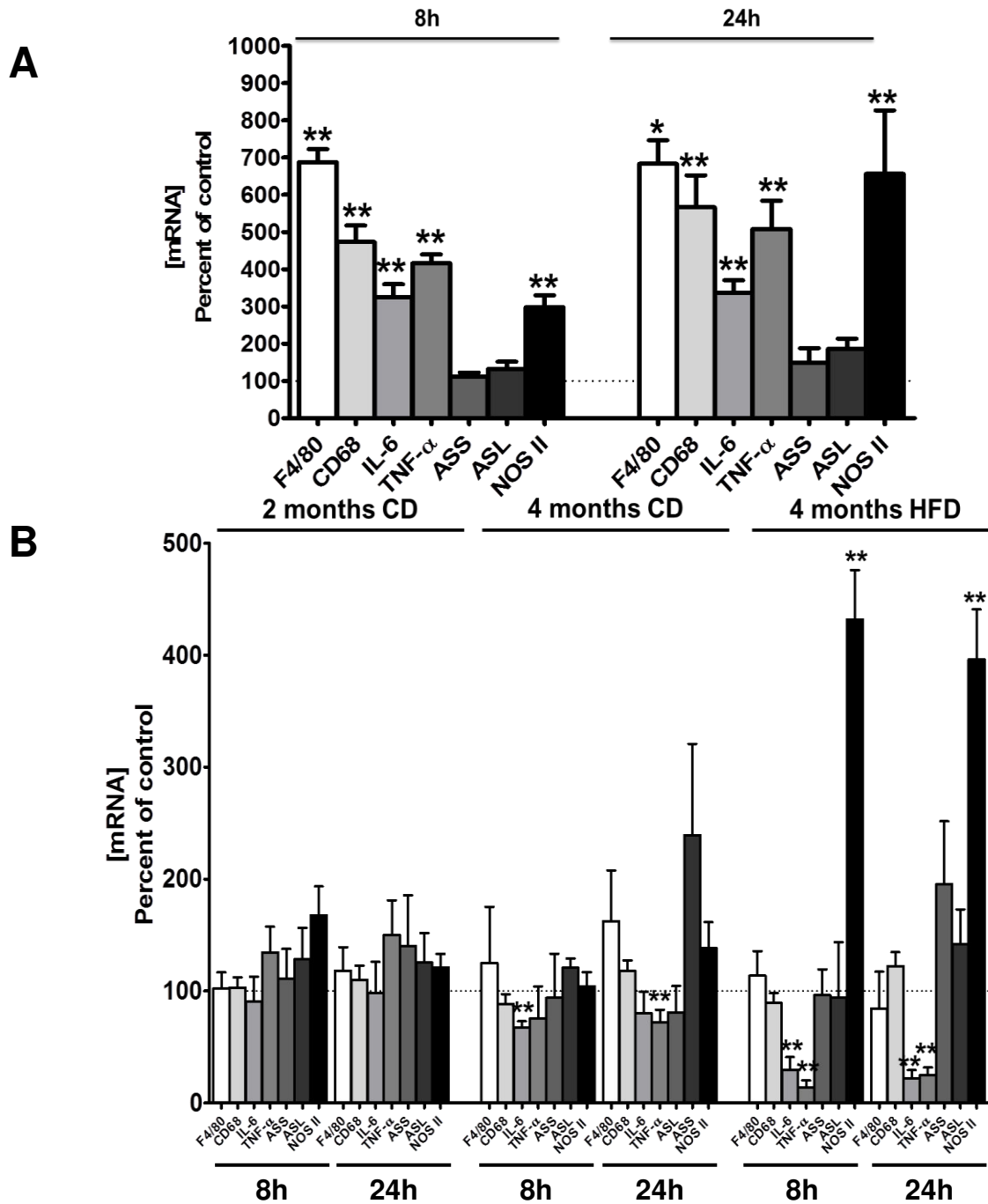


Figure 23 : Effets du HFD et de CIT sur l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation et des marqueurs de macrophages du tissu adipeux épидидymaire de rats CD ou HFD.

Les niveaux d'ARNm de F4/80, CD68, IL-6, TNF- α , NOS II ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant RPL13. Les explants de TA EPI de rats CD 2 mois et 4 mois et de rats HFD 4 mois ont été incubés sans CIT pendant 8h ou 24h. A) Effet du HFD. Les résultats représentent le rapport entre les valeurs obtenues chez les rats HFD 4 mois vs les valeurs obtenues chez les rats CD 2 mois et 4 mois, prises comme contrôle. B) Les explants de TA EPI de rats 2 mois et 4 mois CD et HFD 4 mois ont été incubés ou non avec CIT 2,5 mM pendant 8h ou 24h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes réalisées en triple. * P<0,05 vs Ctrl** P <0,01 vs Ctrl

Effet de la CIT et implication du NO sur le tissu adipeux épидидymaire de rats âgés de 2 mois ou 4 mois CD ou 4 mois HFD.

Comme le montre la **figure 24**, la CIT n'a pas d'effet sur la libération du glycérol et de NEFA chez les rats CD de 2 mois ou de 4 mois alors que celle-ci est augmentée significativement d'environ 56% dans le milieu d'incubation des explants de rats HFD. Comme nous avons vu précédemment que d'une part le surpoids et d'autre part la CIT sont capables de stimuler l'expression du gène codant pour la NOS II (**Figure 24**), nous avons postulé que le NO pourrait être impliqué dans l'effet de la CIT sur la lipolyse. Lorsque des explants de TA EPI de rats CD et de rats HFD ont été pré-traités pendant 30 minutes avec 1 mmol / L-N ω -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de NOS non-sélectif, les effets lipolytiques de la CIT chez les rats HFD sont abolis (**Figure 24**). Nous avons ensuite évalué par RT-qPCR les niveaux d'expression des ARNm des enzymes ATGL et HSL ainsi que leur expression protéique. La CIT n'a pas d'incidence sur le niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine ATGL dans des explants de rats CD 2 mois et 4 mois et de rats HFD (**Figure 24**). La CIT stimule la forme phosphorylée de HSL (P-HSL) dans les explants de TA EPI de rats 2 mois CD (360%) (**Figure 24**) en lien avec l'induction de l'ARNm HSL à 24h (647%) (**Figure 24**). La CIT stimule la forme phosphorylée de HSL (P-HSL) dans des explants de TA EPI de rats CD 4 mois (146%) et de rats HFD (130%) (**Figure 24**) en lien avec l'induction de l'ARNm HSL dès 8h (332% et 456%) chez le rat HFD (**Figure 24**). Lorsque les explants ont été pré-traités avec L-NAME, puis avec la CIT pendant 24h, l'augmentation de la phosphorylation de HSL a été abolie quels que soient les rats (**Figure 24**). Ce résultat suggère que le NO est impliqué dans l'effet de la CIT. Par RT-qPCR, nous avons suivi l'expression de l'ARNm GyK. Son expression est augmentée dans les explants de TA EPI de rats CD 2 mois (396%) et HFD (335%) à 24h et dès 8 h chez les rats CD 4 mois (363%) (**Figure 24**). L'augmentation de la GyK pourrait permettre une augmentation de la phosphorylation du glycérol et expliquerait l'absence de libération de glycérol.

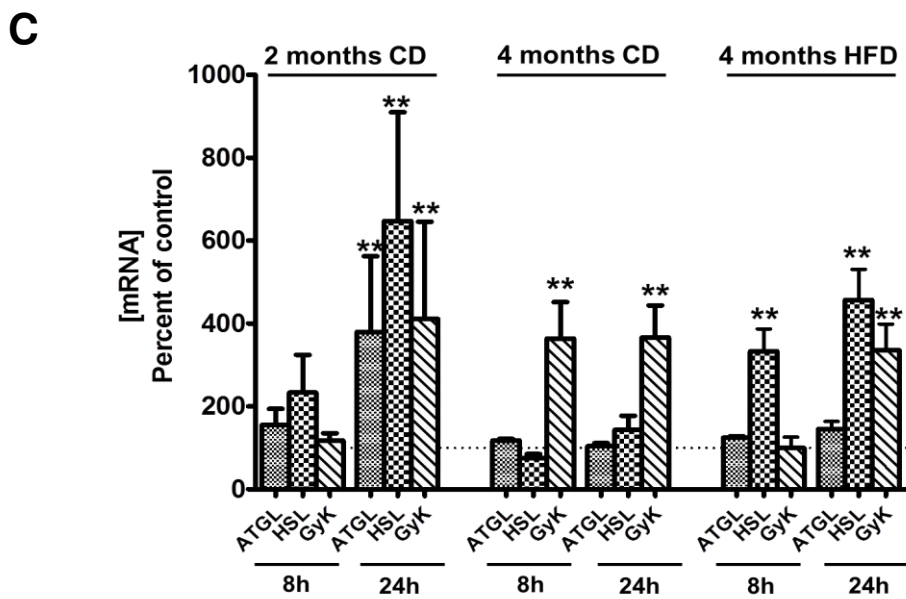
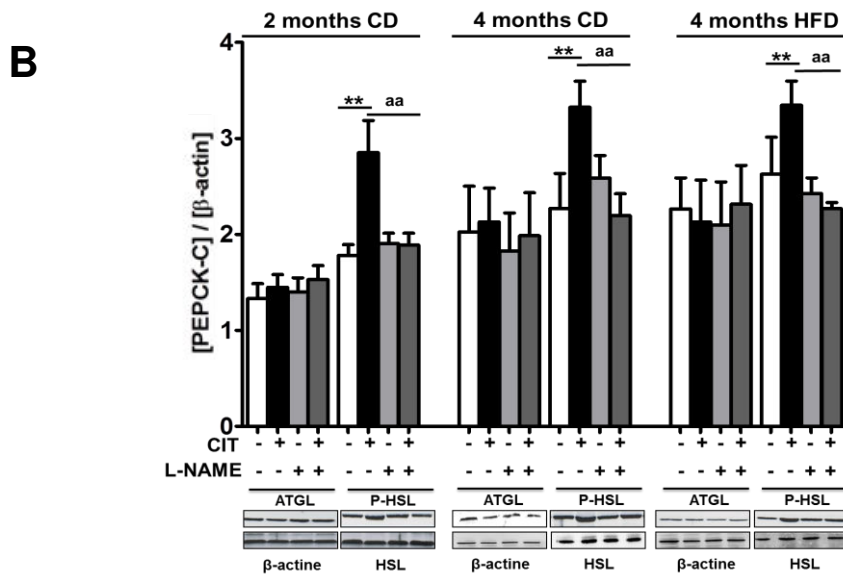
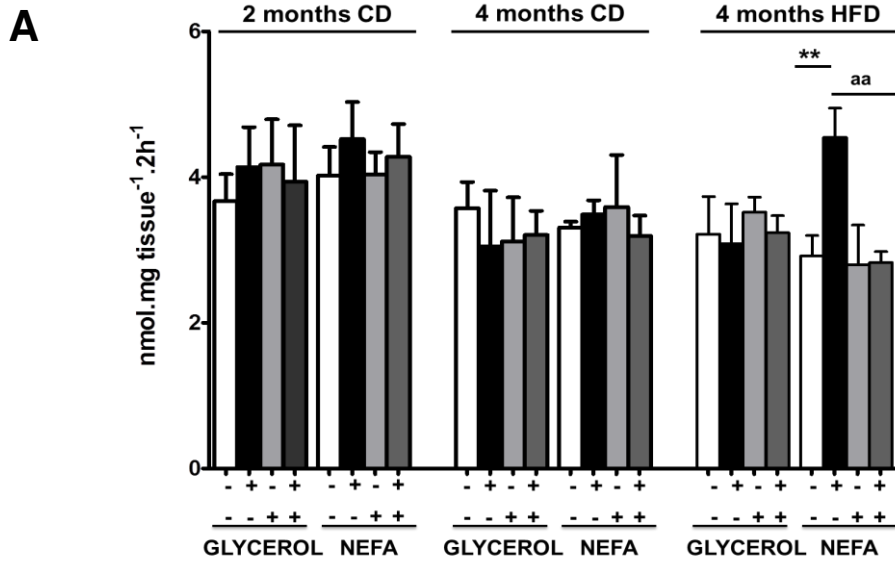


Figure 24 : Effet de la CIT et implication du NO dans la libération de glycérol et des NEFA du tissu adipeux épидидymaire de rats CD et HFD

Les explants de TA EPI de rats CD ou HFD sont pré-traités ou non avec du L-NAME et traités ou non pendant 24h avec 2,5 mM de CIT avant analyse. A) Effet *in vitro* de la CIT sur la libération de glycérol et de NEFA. Les résultats sont exprimés en nmol.mg tissue⁻¹ 2h⁻¹ B) Effet de la CIT sur l'expression des protéines ATGL et HSL sur les explants de TA RET de rats CD et HFD à 24h. Autoradiogramme représentatif de 5 Western blot d'ATGL, HSL, P-HSL et de la β-actine dans des explants de TA EPI de rats CD et de rats HFD, à 24h de traitement ou non avec de la CIT. C) Effet de la CIT sur l'expression des ARNm d'ATGL, HSL et GyK. Les niveaux d'ARNm ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant l'ARNm RPL13. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent la moyenne ± SEM de 5 expériences indépendantes réalisées en triple. * P < 0,05 vs Ctrl; ** P < 0,01 vs Ctrl. a P < 0,05 vs CIT ; aa P < 0,01 vs CIT.

Effet de la CIT et implication du NO sur la glycéronéogenèse et PEPCK-C d'explants de tissu adipeux épидидymaire de rats CD et de rats HFD.

La CIT stimule la libération des NEFA dans les explants de TA EPI de rats HFD. La quantité de NEFA libérée dépend largement de leur niveau de ré-estérification intracellulaire. Nous avons donc étudié la glycéronéogenèse par l'incorporation de [1-¹⁴C] -pyruvate dans les lipides. Le niveau basal de glycéronéogenèse est semblable entre CD 2 mois, 4 mois et HFD (**Figure 25 A**). A 24h de traitement, la CIT diminue la glycéronéogenèse dans les explants de TA EPI de rats 2 mois CD (67%), 4 mois CD (52%) et de rats HFD (41%) (**Figure 25 A**). Lorsque les explants ont été pré-traités par le L-NAME, puis par la CIT pendant 24h, l'effet de CIT sur la glycéronéogenèse a été complètement aboli dans les explants de TA EPI de rats 2 ou 4 mois CD et HFD (**Figure 25 A**). En conséquence, comme décrit pour la lipolyse et la sortie des NEFA (**Figure 24 A et 24 B**), le NO est impliqué dans l'effet de la CIT sur la glycéronéogenèse. Cela suggère que la CIT stimule la libération des NEFA (**Figure 24**) par une inhibition de la glycéronéogenèse dépendante du NO (**Figure 25**).

Ensuite, nous avons estimé par western blot la quantité de protéines PEPCK-C, l'enzyme clé de la glycéronéogenèse. Une exposition de 24h à la CIT réduit l'expression de la protéine PEPCK-C dans des explants de rats 2 mois CD (40%), de rats 4 mois CD (60%) et de rats HFD (46%) (**Figure 25**). Comme pour la glycéronéogenèse, le pré-traitement avec le L-NAME a aboli cet effet de la CIT chez le rat CD comme chez le rat HFD, ce qui suggère que la CIT stimule la libération des NEFA par une inhibition NO-dépendante de la PEPCK-C.

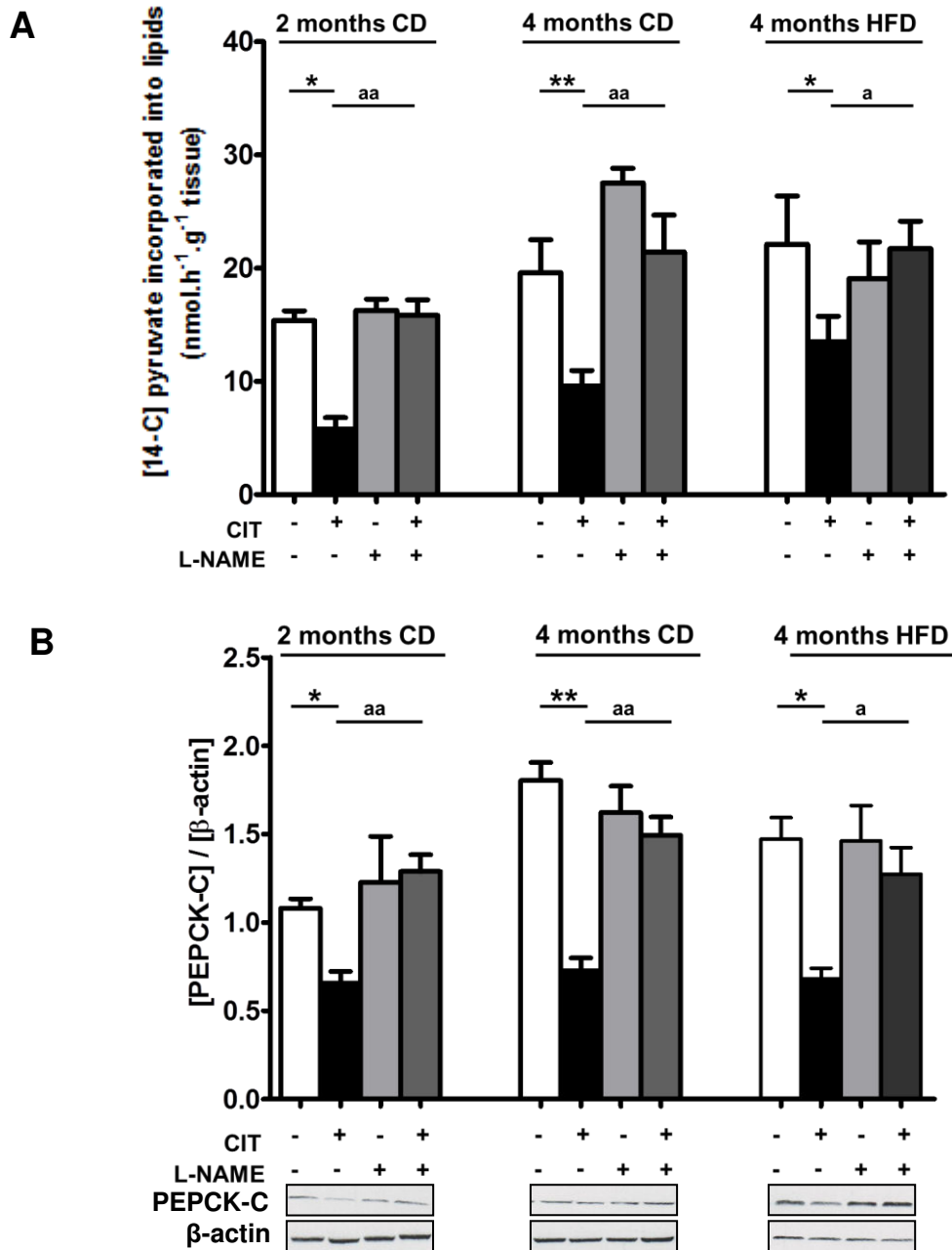


Figure 25 : Effet de la CIT et implication du NO sur la glycéronéogenèse et PEPCK-C d'explants de tissu adipeux épидидymaire de rats CD et de rats HFD.

Les explants de TA EPI de rats sont pré-traités ou non avec du L-NAME et traités ou non pendant 24h avec 2,5 mM de CIT avant analyse. A) Effet de la CIT sur la glycéronéogenèse. Les résultats sont exprimés en nmol.h⁻¹.g⁻¹ tissu, B) Effet de la CIT sur l'expression de la protéine PEPCK-C. Les histogrammes de la PEPCK-C représentent la moyenne ± SEM de la quantification de 5 western blots réalisés à partir de différents explants.

Un autoradiogramme représentatif de 5 Western blot de PEPCK-C est illustré. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 5 expériences indépendantes, chacune effectuée en triple. * P < 0,05 vs Ctrl; ** P < 0,01 vs Ctrl a P < 0,05 vs CIT ; aa P < 0,01 vs CIT.

Effet *in vitro* de la CIT sur l'expression des gènes codant les protéines du métabolisme du tissu adipeux épидидymaire de rats CD ou HFD à 8h et 24h.

Nous avons étudié les effets de la CIT sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du TA EPI de rats CD ou HFD. La CIT augmente l'expression des ARNm de l'adiponectine à 24h de traitement chez le rat CD 2 mois (239%), 4 mois (435%) et 4 mois HFD (2365%). Chez le rat HFD, l'expression de l'ARNm de la leptine est diminuée (58%) à 24h par la CIT (**Figure 26**).

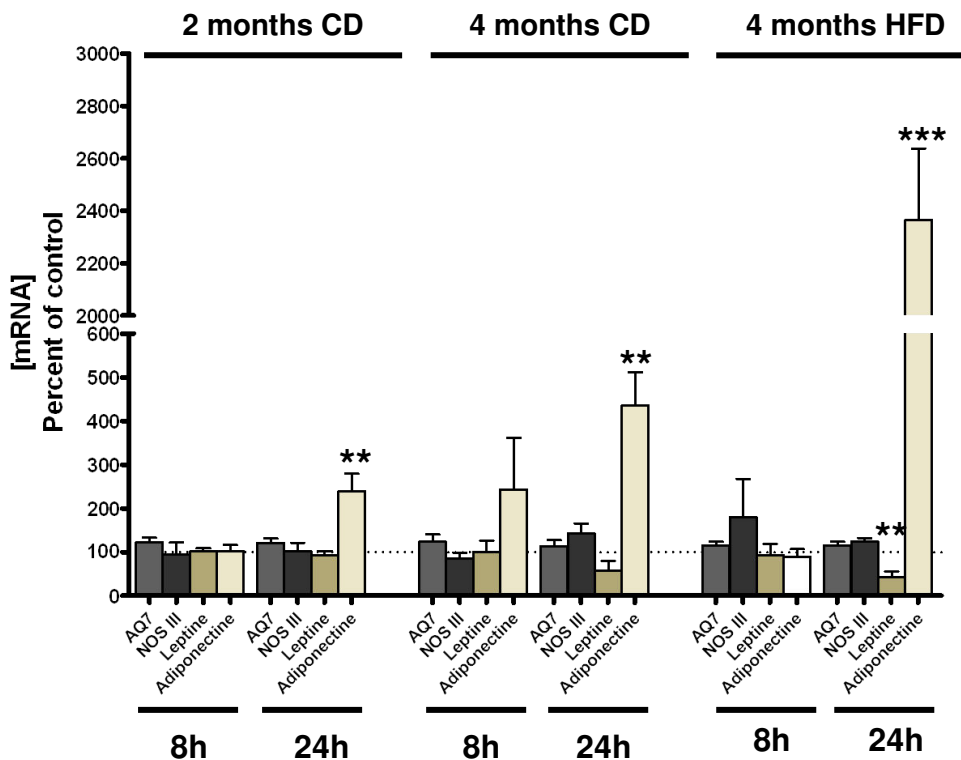


Figure 26 : Effet *in vitro* de la CIT sur l'expression des gènes du métabolisme du tissu adipeux épидидymaire de rats CD ou de rats HFD.

Les explants de TA EPI de rats CD et HFD traités ou non avec 2,5 mmol/L de CIT ont été incubés pendant 8h ou 24h. Etude des effets de la CIT sur les gènes codant l'aquaporine 7 (AQ7), la NOS III, la leptine, l'adiponectine de TA EPI de rats CD et HFD. Les ARNm ont été évalués par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés en utilisant l'ARNm RPL13. Les résultats représentent le rapport entre les valeurs obtenues pour les explants de TA EPI de rats CD ou HFD traités par la CIT et les valeurs obtenues pour les explants de TA EPI de rats CD ou HFD non traités prises comme contrôle. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes réalisées en triple. ** P < 0,01 vs Ctrl ; *** P < 0.001 vs CIT

VI. Article 4

Induction de la protéine découplante 1 par la citrulline dans des explants de tissu adipeux blanc de rats minces ou en surpoids.

Nolwenn Joffin, Anne-Marie Jaubert, Jessica Bamba, Robert Barouki, Philippe Noirez, Claude Forest.

Publication (sous presse) dans le journal *Adipocyte*, Novembre 2014

Contexte : Un régime enrichi en citrulline (CIT) réduit la masse du tissu adipeux (TA). Nous avons récemment montré que la CIT stimule la β -oxydation dans des explants de TA rétropéritonéal (RET) chez les rats jeunes sous régime contrôle (CD) ou sous régime enrichi en lipide (HFD) (2-4 mois). Celle-ci n'est pas affectée dans les explants de TA RET de rats âgés sous régime CD (25 mois).

Méthodes et résultats : Les explants de TA RET et de TA épидидymaire (EPI) des rats jeunes (2-4 mois) sous régime CD ou HFD et de rats âgés (25 mois) ont été exposés pendant 24h à 2,5 mmol/L de CIT. Nous avons ensuite procédé à une analyse des gènes par RT-qPCR, et des protéines par western blot. Ici, nous montrons que le TA des rats jeunes HFD ou des rats âgés CD présente une diminution de l'expression basale (ARNm et protéine) de la protéine découplante (UCP1) par rapport au TA RET de rats jeunes CD. Sélectivement dans le TA RET ou EPI de rats jeunes, la CIT augmente l'expression d'UCP1 ainsi que celle de ses principaux régulateurs, *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) α ou γ 2, *PPAR γ -coactivator-1- α* (PGC-1 α) et *mitochondrial-transcription-factor-A* (TFAM). Cependant l'expression du gène d'un autre régulateur, PPAR γ 2, est diminuée quel que soit l'âge et le régime.

Conclusions : Ces résultats suggèrent que la CIT induit un nouveau statut métabolique dans le TA, avec une augmentation de la β -oxydation et du découplage de la chaîne respiratoire, entraînant ainsi une dépense énergétique qui favorise la réduction de la masse adipeuse.

**Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of
white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats**

Nolwenn Joffin ^{1,2}, Anne-Marie Jaubert ^{2,3}, Jessica Bamba ^{1,2}, Robert Barouki ^{1,2},
Philippe Noirez ^{1,4,5}, Claude Forest ^{1,2}

¹Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1124, Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.

³Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine Paris-Ile de France-Ouest; Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Versailles, France

⁴Institut de Recherche Biomédicale et d'Epidémiologie du Sport, EA 7329, 11 avenue du Tremblay, 75012 Paris, France

⁵Faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, 1 rue Lacretelle, 75015 Paris, France

Corresponding author:

Dr Claude Forest. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S
1124; Université Paris Descartes, Pharmacologie Toxicologie et Signalisation
Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

E-mail: claudе.forest@parisdescartes.fr

Keywords: adipose tissue, citrulline, fatty acids, UCP1, browning, obesity

Running title: Citrulline induces WAT browning

Abbreviations:

ARG arginine

ASL argininosuccinate lyase

ASS argininosuccinate synthase

BSA bovine serum albumin

CD control diet

CIT citrulline

CPT1-b carnitine palmitoyl transferase 1-b

EPI epididymal

HFD high-fat-diet

KREBS Krebs Ringer Buffer Saline

NEFA non-esterified fatty acids

NO nitric oxide

NOS nitric oxide synthase

PEPCK-C cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase

PGC-1 α peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α

PKA protein kinase A

PPAR peroxisome proliferator-activated receptor

RET retroperitoneal

TFAM mitochondrial transcription factor A

VLCAD very long chain acyl-CoA dehydrogenase

WAT white adipose tissue

Abstract

A diet enriched with citrulline (CIT) reduces white adipose tissue (WAT) mass. We recently showed that CIT stimulated beta-oxidation in rat WAT explants from young (2-4 months) but not old (25 months) rats. Here we show that both in old rats and high-fat-diet-fed young rats, uncoupling protein one (UCP1) mRNA and protein expressions were weaker than those in young control rats. Selectively in WAT from young rats, a 24h CIT treatment up-regulated expressions of UCP1, peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α), PPAR γ -coactivator-1- α and mitochondrial-transcription-factor-A whereas it down-regulated PPAR γ 2 gene expression, whatever the diet. These results suggest that CIT induces a new metabolic status in WAT, with increased beta-oxidation and uncoupling of respiratory chain, resulting in energy expenditure that favors fat mass reduction.

Introduction

Excess energy storage in white adipose tissue (WAT) favors an increase in fat mass with pathophysiological consequences like insulin resistance and altered glucose tolerance leading to type-2 diabetes (T2DM). Aging and high-fat diet (HFD) often result in enlarged WAT mass, particularly intra-abdominal depots like the retroperitoneal (RET). One of the strategies to oppose fat mass gain would be to activate energy dissipation in brown adipose tissue (BAT). Brown adipocytes have the unique feature to express the uncoupling protein 1 (UCP1), responsible for the uncoupling between oxidative phosphorylation and ATP production, therefore dissipating energy as heat ^{1,2}. In 1992, Cousin et al. demonstrated the presence of UCP1-expressing adipocytes in well-defined WAT depots ³. Such cells, resembling brown adipocytes in WAT, were further described and named BRITE for "brown-in-white" or beige adipocytes, then shown as having an intermediate signature between brown and white adipocytes ^{4,5}. Although the distinct origins of these cells remain a matter of debate, they both express UCP1 ^{6,7}. Activators of UCP1 in BAT and inducers of WAT browning, i.e. the acquisition of a brown phenotype, have been determined. Among these agents, cold exposure, beta-adrenergic agonists, retinoids, triiodothyronine, irisin, atrial natriuretic factor, prostaglandins, adenosine or lipolytic NEFA themselves have been shown to up-regulate UCP1 ⁸⁻¹¹.

An interesting observation of decreased WAT mass together with increased BAT mass and UCP1 arose from high-fat-diet-induced (HFD) overweight rats to which L-arginine (L-ARG) was given in drinking water ¹². L-ARG induced lipolysis and beta-oxidation in WAT ¹³. These studies were carried out either *in vivo* or in cultured cells. Studies on cultured explants from WAT are scarce. Using RET explants, we showed recently that citrulline (CIT) induced lipolysis and beta-oxidation while it reduced glyceroneogenesis and NEFA re-esterification in control and HFD-fed young rats ^{14,15}.

Similar data were obtained on RET explants from old rats, except that beta-oxidation remained unaffected by CIT^{14,15}. CIT is an amino acid that is not used for protein synthesis. Like L-ARG, CIT is an intermediary product in nitric oxide (NO) synthesis, provided that argininosuccinate synthase (ASS) and argininosuccinate lyase (ASL) are present, which is the case in macrophages but not in isolated adipocytes¹⁴⁻¹⁶. Unlike what occurs with L-ARG, CIT, administered as a food supplement, is not metabolized in the liver, therefore its bioavailability is higher than that of L-ARG. CIT is thus proposed as a food supplement during aging and in sports to improve muscle mass and function^{17,18}.

In the present study we investigated whether CIT exerted a browning effect on epididymal (EPI) and RET WAT explants from control and HFD-fed young rats together with old rats. To this aim we analyzed variations in UCP1 expression and in its main transcriptional regulators.

Results

Effect of age, diet and CIT on the expression of UCP1 gene and protein. We first evaluated the effect of age or HFD on the relative UCP1 gene and protein expressions in RET and EPI WAT explants maintained in culture for either 8h or 24h. For CD in both depots, UCP1 mRNA level was similar in explants from two-month-old and four-month-old rats while for HFD, it presented a 45-55% decrease (Figure 1A). In both depots from twenty-five-month-old rats, UCP1 mRNA was reduced to 50-60 % when compared to two-month-old rats (Figure 1A). A similar pattern of reduction of UCP1 protein occurred with 40-50 % decrease at 24h of treatment (Figure 1B). We then assessed the effect of CIT treatment for 8h and 24h on UCP1 expression in RET and EPI WAT explants. At 24h CIT treatment, UCP1 mRNA was increased 3.5 to 6-fold, for both depots, in two-month-old and four-month-old rats, whether the latter were maintained or not on a HFD diet for eight weeks, while it remained unaffected by CIT in twenty-five-month-old rats (Figure 1C). A weaker (2.3-fold) increase in UCP1 mRNA was observed at 8h CIT treatment in EPI WAT from two month-old rats, although no other change occurred at this time (Figure 1C). At 24h CIT exposure, UCP1 protein was up-regulated 1.5 to 2-fold in WAT from young rats for both depots, whatever the diet, while it remained unaffected in WAT from twenty-five-month-old rats (Figure 1D).

Effect of CIT on the expression of genes encoding transcription factors and regulators involved in mitochondria metabolism. In agreement with our previously published results, peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) gene expression was stimulated by CIT in RET explants from 2-month-old young rats whereas it remained unaffected in RET explants from 25-month-old rats

(Figure 2A-B)¹⁴. In contrast, PPAR γ 2 gene expression was down-regulated (58-86%) by CIT in RET explants whatever the age of the animals (Figure 2A-B)¹⁴. This reduced level was observed at 8h of exposure to CIT and remained stable at 24h. These previously described observations were extended to RET explants from CD-fed and HFD-fed 4-month-old rats that responded in a manner similar to those from 2-month-old rats (Figure 2A-B). In addition, the response of EPI explants to either 8h or 24h of CIT exposure was similar to that of RET, except for 25-month-old rats in which the PPAR γ 2 gene remained unaffected (Figure 2C-D). CIT treatment augmented PPAR γ co-activator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) mRNA in both depots from young rats whatever the diet (Figure 2A-D). These increases were more pronounced at 24h than at 8h of treatment. In explants from 25-month-old rats, PGC-1 α and TFAM genes remained unresponsive to CIT whatever the WAT depot and the time of treatment (Figure 2A-D).

Discussion

We show that UCP1 mRNA and protein are expressed in RET and EPI WAT from rats, in accordance with previously published studies³. This expression is reduced with either aging or HFD. Our previous results established that CIT induced direct, rapid and deep modifications of NEFA metabolism in WAT explants from rats^{14,15}. Notably, CIT increased beta-oxidation capacity, together with the expression of the PPAR α gene, in RET explants from young rats whether they were fed a CD or a HFD. Here, we observe that CIT was also able to induce UCP1 in WAT from young animals. However, no change in beta-oxidation^{14,15}, UCP1 expression and its transcriptional regulators (the present study) occurred in explants from old animals in response to this amino acid. The mechanism that underlines this young *versus* old difference in beta-oxidation and UCP1 expression remains an open issue.

Therefore, in old animals, part of lipolytic NEFA are released from WAT and can be used as energetic substrates for demanding tissues like muscle¹⁴. Such observations are in line with the increase in muscle mass from old rats fed with either a L-ARG- or a CIT-supplemented diet^{19,20}. We observed previously that in young animals, whether HFD-fed or not, NEFA output remained unaffected by CIT but NEFA oxidation was stimulated¹⁵. In the present study, we show that CIT up-regulates UCP1 expression in WAT explant from young rats. This effect is rapid since a 3-fold to 6-fold increase in UCP1 mRNA occurred at 24h of treatment, together with a 1.5- to 2-fold rise in the protein. Such a new metabolic feature is the sign of a situation of energetic expenditure in WAT.

What could be the mechanism of CIT action? Since cAMP, through protein kinase A (PKA) activation, is one of the major inducers of UCP1 gene expression in brown adipocytes, it could be the mediator of CIT action, although there is no report of the effect of this amino acid on PKA²¹. Such a mechanism is likely not occurring here.

One of the best-known cAMP-responsive gene in adipocytes is *pck1* (the cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene) ^{22,23}. Therefore, any stimulation by CIT of cAMP production should induce *pck1* and the inverse occurs here. However, CIT stimulates HSL phosphorylation in RET WAT and induces NEFA release when explants are isolated from HFD-fed young rats or from old rats ^{14,15}. Among the other agents that were demonstrated as capable of inducing HSL phosphorylation and lipolysis, the mitogen-activated protein kinase pathway and extracellular signal-regulated kinase (ERK) could play a role ²⁴. Alternatively, lipolysis could be activated because of the reduction of an inhibitory pathway, like those mediated by the AMP-activated protein kinase (AMPK), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II or glycogen synthase kinase IV ²⁵. Interestingly, L-ARG was reported as being both lipolytic and capable of inducing AMPK, two potentially opposite phenomena in adipocytes, without clear explanations for this apparent contradiction ¹³.

One of the best candidate for mediating CIT action could be NO. As mentioned above, ASS and ASL are not expressed in WAT adipocytes. Hence, any NO production from CIT would primarily occur in macrophages present in WAT and would diffuse from macrophages to adipocytes where it would act on UCP1 expression. Previous reports showed the lipolytic and anti-glyceroneogenic nature of NO in WAT ^{15,26-28}. Besides, NO induces mitochondrial biogenesis via guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) and PGC-1 α , the central transcriptional activator in thermogenic adipocytes ^{29,30}. Both PPAR α and PPAR γ are transcription factors that interact with PGC-1 α ³¹. CIT strongly induced PGC1 α and PPAR α gene expressions in both RET and EPI WAT from young rats, whereas PPAR γ 2 mRNA was down-regulated in the same animals, in agreement with our previous results ¹⁴. The reduction in PPAR γ 2 reflects the previously observed strong decrease in PEPCK-C

expression and in glyceroneogenesis^{14,15}. *Pck1* is indeed the major PPAR γ 2 target gene in adipocytes³²⁻³⁴.

The simultaneous induction by CIT of PGC1 α and PPAR α is in line with the observed concomitant up-regulation of UCP1 in WAT, probably leading to a rise in the thermogenic status of the cells. CIT effect on UCP1 gene expression is supposedly transcriptional through a PPAR α /PGC1 α -process, since this couple was clearly demonstrated as acting as an inducer of the UCP1 gene in rodents and in humans^{35,36}. PPAR α and PGC1 α were also shown to stimulate FA oxidation, notably in brown adipocytes, *via* the induction of expression of CPT 1b and VLCAD³⁷⁻³⁹. These observations are in agreement with our previous results showing that selectively in WAT explants from young rats, CIT induced an increase in beta-oxidation capacity, together with an up-regulation of CPT 1b and VLCAD^{14,15}.

Another interesting observation of the present study is the CIT effect on TFAM expression because TFAM is a PGC1- α target and a major transcription factor for mitochondrial DNA replication^{31,40,41}. The possible CIT action as a factor favoring mitochondriogenesis during WAT browning remains an open issue with potential physiological consequences. Such a question also occurs with L-ARG-fed rats for which PGC 1 α and mitochondrial biogenesis are enhanced, together with BAT and whole-body energy metabolism^{13,42}.

Altogether, our data identify a novel mechanism of CIT health effects and highlight the induction of UCP1 as a mediator of decreased WAT mass, browning of WAT and increased energy expenditure. The data open new and simple avenues of therapeutic intervention in overweight and obesity.

Materials and Methods

Animals: housing and feeding. Two-month-old male Sprague Dawley rats were from Centre d'Élevage de Rats Janvier (Berthevin, France), fed *ad libitum* with a standard (control) diet (CD) (n=21). They were acclimatized for 2 weeks then randomized into 3 groups. The two-month-old CD rats (n=7) were immediately used for the culture of AT explants. The two other groups were maintained for an additional 8 weeks under either a CD (four-month-old CD; n=7) or a high-fat diet (four-month-old HFD; n=7). Twenty-five-month-old male Sprague Dawley rats, fed *ad libitum* with CD, were a gift from Sainte Anne Hospital (Paris, France) (n=7). All rats have free access to water and food *ad libitum* and were housed at constant room temperature (24°C) on a 12-h-light/dark cycle. CD rats were fed with a standard balanced diet (11.7 MJ/kg) (64% carbohydrates, 20% proteins, 3% lipids, 8% vitamins and minerals) from Safe (Augy, France). HFD rats were fed with a HFD (19.5 MJ/kg) (44.5% carbohydrates, 20% proteins, 27.5% lipids, 8% vitamins and minerals) from Safe (Augy, France). Rats were anaesthetized and after blood sampling from the jugular vein, they were killed by decapitation. Samples of WAT were removed and weighted. The protocol for the animal studies was conducted according to the French Guidelines for the care and use of experimental animals.

Rat adipose tissue explants. EPI and RET WAT from rats were sampled for analyses. About 200mg of tissue were cut in about 20mg fragments and cultured in Krebs Ringer buffer saline (KREBS) medium as previously described^{14,15}. Explants were exposed to 2.5 mmol/L CIT for 8h or 24h then frozen before further studies.

RNA Extraction, cDNA Synthesis and Real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from RET WAT with Rneasy lipid tissue mini kit from Qiagen. RNA was quantified by spectrophotometric Nanodrop. Total RNA (500ng) was reverse transcribed using SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix kit from Life Technologies. Samples of cDNA were diluted 1:40, amplified and used for RT-qPCR measurements using SYBR Green from Roche as previously described ¹⁴. RT-qPCR was performed in the LightCycler1536 instrument from Roche as follows: 75°C for 2min, 95°C for 10min, 40 cycles of denaturation (95°C for 15s to the denaturation, 60°C for 30s to the annealing, 72°C for 30s to the extension). Results were analyzed with the LightCycler1536 software from Roche. Ribosomal RPL13 RNA was used to normalize cDNA. Quantification of mRNA was carried out by comparing the number of cycles required to reach reference and target threshold values ($2^{-(\delta-\delta Ct)}$ method) as described previously ⁴³. Sequences of the rat sense and antisense nucleotides were: PGC1- α : 5'-tgcccctgccagtcacagga-3' 5'-gctcagccgaggacacgagg-3'; PPAR α : 5'-aagccatcttcacgatgctg-3' 5'-tcagaggtcctgaacagtg-3' ; PPAR γ 2 : 5'-ttatgctgttatgggtgaaa-3' 5'- caaaggaatgggagtgtc-3' ; TFAM : 5'-gttccggggaatgtggggcg-3' 5'-gacaggcgagggtatgcggc-3' ; UCP1 : 5'-tacagagttatagccaccaca-3' 5'-tggaacgtcatcatgtttgtg-3' ; RPL13 : 5'-tggcaggggcttcag-3' 5'-tgggcatcacagggtcc-3'

Western blot. Protein fractions were prepared from WAT explants in a buffer containing 10mmol/L HEPES pH 7.9, then separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose filters. Blots were blocked with 3% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20 and incubated with 1:1000 and 1:500 dilutions for the UCP1 and β -actin antisera, respectively. Rabbit UCP1 and mouse β -actin antisera were purchased from thermofisher and Abcam respectively.

The Odyssey method was used for detection, following the procedure described by the manufacturer (Li-COR). Quantitative results of Western blotting were obtained by densitometry in ImageJ software.

Statistical analysis. Data are presented as means \pm SEM. Each independent experiment was carried out in triplicate. Statistical analysis was carried out using the nonparametric Mann & Whitney U test for pairwise comparisons, which was applied due to the small number of experiments ($n < 10$). A value of $P < 0.05$ was considered as significant.

* $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. control

Acknowledgements

We thank Dr. Brigitte Potier for providing us with a series of old rats. We acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Université Paris Descartes for their financial support.

Conflict of interests

No conflict of interest

References

1. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84:277–359.
2. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 2000; 529: 3–10.
3. Cousin B, Cinti S, Morrioni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, Casteilla L. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992; 103:931–42.
4. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 2010; 285:7153–64.
5. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150:366–76.
6. Tran K-V, Gealekman O, Frontini A, Zingaretti MC, Morrioni M, Giordano A, Smorlesi A, Perugini J, De Matteis R, Sbarbati A, et al. The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* 2012; 15:222–9.
7. Lee Y-H, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 2012; 15:480–91.
8. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19:1252–63.
9. Carrière A, Jeanson Y, Cousin B, Arnaud E, Casteilla L. Le recrutement et l'activation d'adipocytes bruns et/ou BRITE: Une perspective réelle pour le traitement des maladies métaboliques ? *médecine/sciences* 2013; 29:729–35.
10. Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, André M, Chenouard V, Arnaud E, Barreau C, Walther R, Galinier A, Wdziekonski B, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* 2014; 63:3253–65.
11. Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A, Hoffmann LS, Reverte-Salisa L, Horn P, Mutlu S, et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 2014; in press.
12. Jobgen W, Fu WJ, Gao H, Li P, Meininger CJ, Smith SB, Spencer TE, Wu G. High fat feeding and dietary L-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue. *Amino Acids* 2009; 37:187–98.

13. Tan B, Li X, Yin Y, Wu Z, Liu C, Tekwe CD, Wu G. Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Front Biosci J Virtual Libr* 2012; 17:2237–46.
14. Joffin N, Jaubert A-M, Durant S, Bastin J, De Bandt J-P, Cynober L, Moinard C, Forest C, Noirez P. Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 1765-75
15. Joffin N, Jaubert A-M, Durant S, Bastin J, De Bandt J-P, Cynober L, Moinard C, Coumoul X, Forest C, Noirez P. Citrulline reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release in visceral adipose tissue from overweight rats. *Mol Nutr Food Res* 2014; in press.
16. Haines RJ, Pendleton LC, Eichler DC. Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *Int J Biochem Mol Biol* 2011; 2:8–23.
17. Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L, Moinard C. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 29:582–6.
18. Sureda A, Pons A. Arginine and citrulline supplementation in sports and exercise: ergogenic nutrients? *Med Sport Sci* 2012; 59:18–28.
19. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee M-J, Smith SB, Spencer TE, Fried SK, Wu G. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr* 2009; 139:230–7.
20. Moinard, C., Le Plénier, S., Cynober, L., Raynaud-Simon, A., Long-term effect of citrulline supplementation in healthy aged rats: effect on body composition. *Clin. Nutr.* 2009, 4, O025. *Clin Nutr Suppl* 4:12.
21. Forest C, Doglio A, Casteilla L, Ricquier D, Ailhaud G. Expression of the mitochondrial uncoupling protein in brown adipocytes. Absence in brown preadipocytes and BFC-1 cells. Modulation by isoproterenol in adipocytes. *Exp Cell Res* 1987; 168:233–46.
22. Reshef L, Hanson RW. The interaction of catecholamines and adrenal corticosteroids in the induction of phosphopyruvate carboxylase in rat liver and adipose tissue. *Biochem J* 1972; 127:809–18.
23. Franckhauser S, Antras-Ferry J, Robin P, Robin D, Granner DK, Forest C. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: opposite effects of dexamethasone and isoprenaline on transcription. *Biochem J* 1995; 305:65–71.
24. Greenberg AS. Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *J Biol Chem* 2001; 276:45456–61.
25. Watt MJ, Steinberg GR. Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J* 2008; 414:313–25.

26. Gaudiot N, Ribière C, Jaubert AM, Giudicelli Y. Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C1603–10.
27. Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 2006; 17:571–88.
28. Niang F, Benelli C, Ribière C, Collinet M, Mehebik-Mojaat N, Penot G, Forest C, Jaubert A-M. Leptin induces nitric oxide-mediated inhibition of lipolysis and glyceroneogenesis in rat white adipose tissue. *J Nutr* 2011; 141:4–9.
29. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998; 92:829–39.
30. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; 299:896–9.
31. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000; 106:847–56.
32. Glorian M, Duplus E, Beale EG, Scott DK, Granner DK, Forest C. A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie* 2001; 83:933–43.
33. Forest C, Tordjman J, Glorian M, Duplus E, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Antoine B. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1125–9.
34. Cadoudal T, Blouin JM, Collinet M, Fouque F, Tan GD, Loizon E, Beale EG, Frayn KN, Karpe F, Vidal H, et al. Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50:666–75.
35. Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 2001; 276:1486–93.
36. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 2003; 278:33370–6.
37. Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2004; 61:393–416.

38. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J-C, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116:571–80.
39. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease. *Circulation* 2007; 115:2540–8.
40. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98:115–24.
41. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004; 18:357–68.
42. Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, Hu J, Shi W, Spencer TE, Carroll RJ, Meininger CJ, Wu G. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* 2005; 135:714–21.
43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; 25:402–8.

Figure legends

Figure 1: Effect of age, diet and CIT on the expression of UCP1 gene and protein

RET or EPI WAT explants from 2 months old CD (white histogram), 4 months old CD (light grey histogram), 4 months old HFD (dark grey histogram) and 25 months old CD (black histogram) rats were incubated either in the absence of CIT (panel A, B) or with or without CIT (panels C, D) for 8h or 24h as described in materials and methods. Uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized to RPL13 mRNA and expressed in % of control (panels A, C). UCP1 protein levels were estimated by western blots and results were normalized to β -actin (panels B, D). Results represent the mean \pm SEM of independent experiments (n=7) carried out in triplicate from different explants.

* $P < 0.05$ vs. Control; ** $P < 0.01$ vs. Control

(A) Effects of diet or age on UCP1 gene expression. Histograms represent the ratio of the values obtained from 4 months old CD rats, 4 months old HFD rats or 25 months old rats to the values obtained from 2 months old CD rats, taken as controls.

(B) Effects of diet or age on the expression of UCP1 protein. Histograms represent the relative UCP1 levels to β -actin. A representative autoradiogram of western blots of UCP1 and β -actin, is shown.

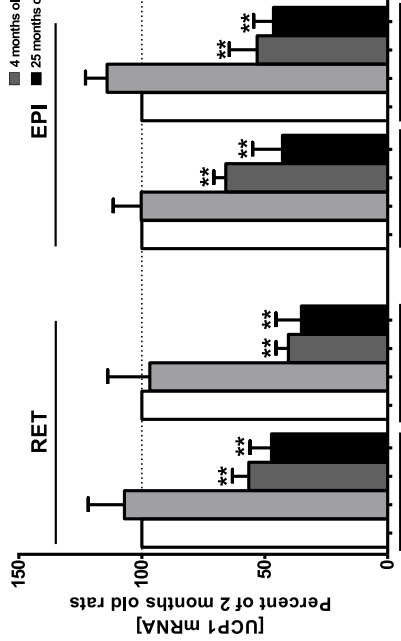
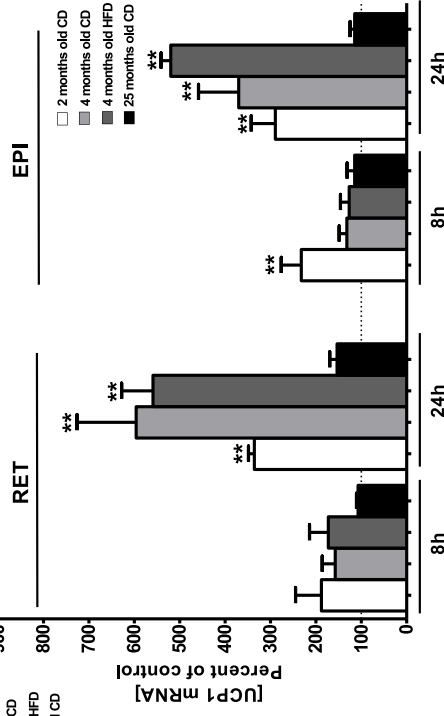
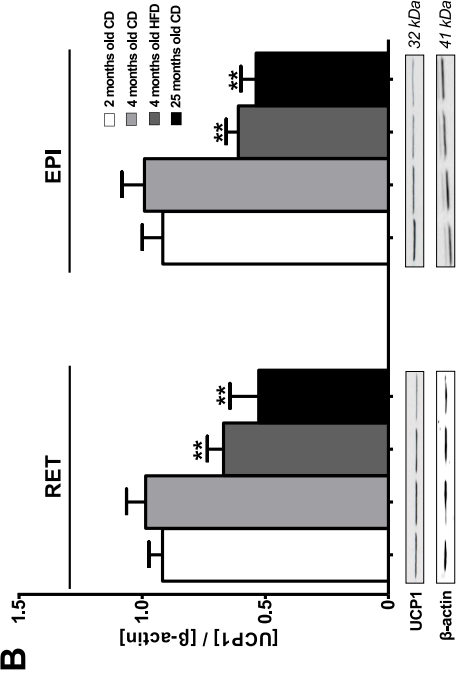
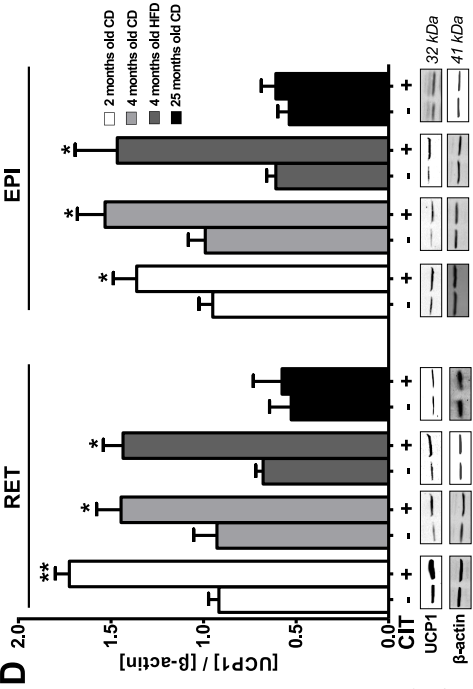
(C) Effects of CIT on UCP1 mRNA levels. Histograms represent the ratio of the values obtained from CIT-treated explants from 2 months old CD rats, 4 months old CD rats, 4 months old HFD rats or 25 months old rats to the values obtained in untreated explants from rats of the corresponding age, taken as controls.

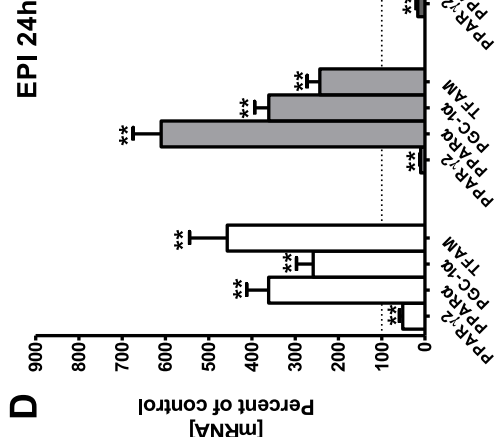
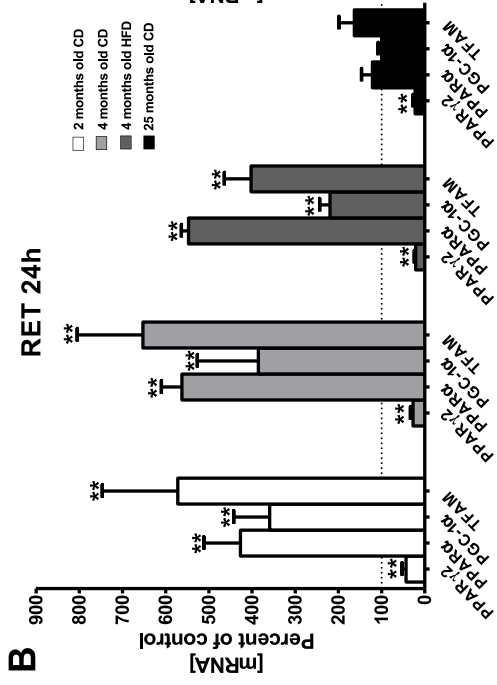
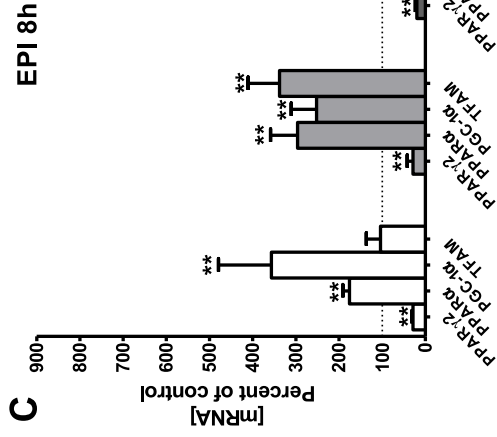
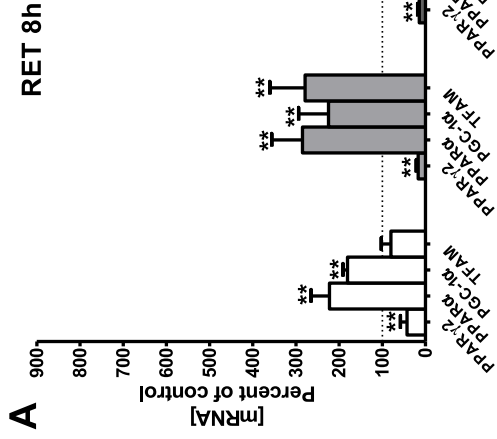
(D) Effects of CIT on the expression of UCP1 protein. Histograms represent the relative UCP1 levels to β -actin. A representative autoradiogram of western blots of UCP1 and β -actin, is shown.

Figure 2: Effect of CIT on the expression of genes coding for transcription factors and regulators involved in mitochondria metabolism

RET (panel A, B) or EPI (panel C, D) WAT explants from 2 months old CD (white histogram), 4 months old CD (light grey histogram), 4 months old HFD (dark grey histogram) and 25 months old CD (black histogram) rats were incubated with or without CIT for 8h (panels A, C) or 24h (panels B, D), as described in materials and methods. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPAR γ 2), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. Histograms represent the ratio of the values obtained from CIT-treated explants from 2 months old CD rats, 4 months old CD rats, 4 months old HFD rats or 25 months old rats to the values obtained in untreated explants from rats of the corresponding age, taken as controls. Results were normalized to RPL13 mRNA and expressed in % of control.

* $P < 0.05$ vs. Control; ** $P < 0.01$ vs. Control

A**C****B****D**



CONCLUSION-DISCUSSION

I. Rappel des résultats

La complémentation en CIT pendant 3 mois chez le rat âgé réduit significativement la masse du TAV. Nos données montrent que cette complémentation en CIT induit une diminution du diamètre des adipocytes du TA RET. Ces résultats sont à mettre en lien avec la première démonstration des travaux de Moinard et coll. en 2009 montrant une diminution drastique de la masse du TA intra-abdominale et des études de Wu en 2012 montrant que le jus de pastèque riche en CIT réduit la masse adipeuse RET de rat ZDF. Aucune modification du métabolisme des AG dans le TA des rats âgés n'est observée lorsque ceux-ci ont été sous régime enrichi en CIT pendant 3 mois. Cependant, les facteurs de l'inflammation tels qu'IL-6 et TNF- α , ainsi que les marqueurs de macrophages, F4/80 et CD68, sont fortement réduits chez ces rats, suggérant une activité anti-inflammatoire de la CIT à long terme chez les rats âgés.

Notre hypothèse de travail était que la CIT pourrait augmenter la lipolyse et affecter le métabolisme des AG du TA. Nous démontrons *in vitro* de manière originale un effet direct de la CIT sur le métabolisme du TA chez le rat.

Dans l'article intitulé « **Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats** » publié dans le journal *Molecular Nutrition and Food Research*, nous démontrons que la CIT agit de manière différentielle sur le métabolisme du TA RET des rats jeunes ou âgés. La concentration des AG libérés est augmentée sélectivement dans le TA RET de rats âgés. Le traitement par la CIT induit une augmentation de la phosphorylation de la HSL, une des enzymes clés de la lipolyse, chez les rats jeunes (58%) ou âgés (50%). En revanche, le flux glycéronéogénique, marqueur de la ré-estérification des AG, est diminué environ de moitié en présence de CIT quel que soit l'âge. Uniquement chez le rat jeune, l'augmentation de la capacité oxydative (200%) du TA

RET permet de compenser la moindre prise en charge des AGNE consécutive à cette diminution de ré-estérification.

Le vieillissement étant lié à une augmentation du TA, nous avons fait l'hypothèse que la CIT exerce aussi une action lipolytique dans le TA de rat jeunes en surpoids.

Dans le deuxième article intitulé « **Citrulline reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release in visceral adipose tissue from overweight rats** » publié dans le journal *Molecular Nutrition and Food Research*, nous avons étudié les effets d'un traitement de 24h par la CIT sur des explants de TA RET issus de rats de 4 mois, maintenus pendant 2 mois sous régime standard (CD) ou enrichi en lipides (HFD). La libération des AG est stimulée par la CIT sélectivement dans les explants de rats HFD (100%). Cependant, la forme phosphorylée de la HSL est augmentée dans le TA de rats CD (60%) ou HFD (133%). La capacité oxydative est augmentée d'environ 200% dans le TA quel que soit le régime. En accord avec ces résultats, l'expression de la CPT 1-b et de la VLCAD, enzymes marqueurs de la β -oxydation, est stimulée quel que soit le régime. La CIT diminue drastiquement la glycéronéogenèse chez les rats HFD (80%) et plus faiblement chez les CD (50%) ceci en corrélation avec une réduction de moitié de la quantité de PEPCK-C, enzyme clé de cette voie.

Dans l'article 3 intitulé « **Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats** », nous montrons que la CIT induit une augmentation de l'expression de la protéine UCP1 sélectivement dans le TA de rats jeunes quel que soit le régime alimentaire. Le traitement par la CIT augmente les facteurs de transcription d'UCP1, PPAR α et PGC1- α ainsi que l'expression du gène codant TFAM suggérant un phénomène de brunissement. Ces résultats suggèrent que la CIT induit un nouvel état métabolique dans le TA, avec augmentation de la β -oxydation et du découplage de la chaîne respiratoire, ce qui entraîne une dépense d'énergie qui favorise la réduction de la masse adipeuse blanche chez le rat jeune.

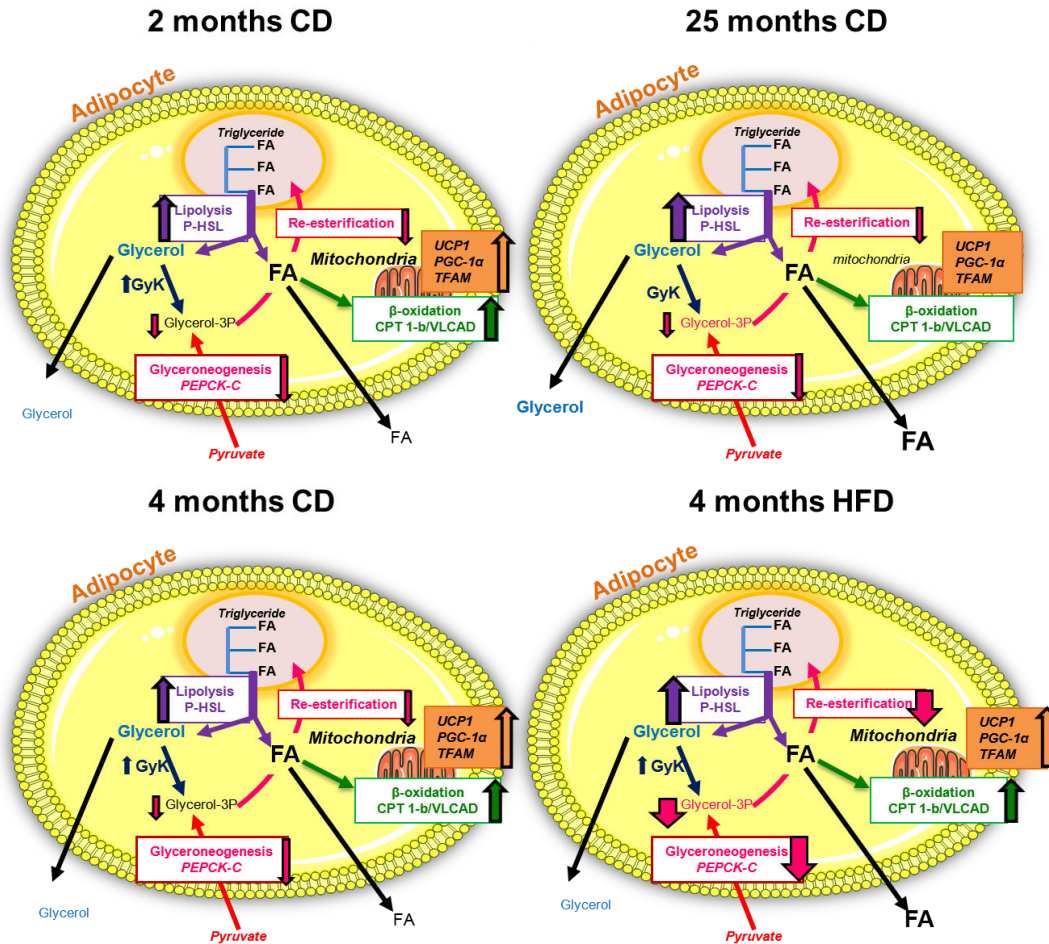


Figure 27 : Représentation schématique des effets de la CIT sur le métabolisme du tissu adipeux.

Les voies de la lipolyse, de la glycéronéogenèse et de la ré-estérification et l'expression de la protéine découplante UCP1 sont spécifiques de l'adipocyte. La β -oxydation, l'expression de la glycérol kinase (GyK), du facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) et de *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α* (PGC-1 α) peuvent être présentes dans les autres types cellulaires composant le tissu adipeux. Pour une question de clarté et de visibilité, nous extrapolons les effets de la CIT dans l'adipocyte. Les effets de la CIT sont représentés par des flèches. La largeur des flèches est proportionnelle à l'intensité des effets de la CIT sur les voies métaboliques étudiées, illustrées dans des couleurs différentes. Dans le tissu adipeux (TA) de rats jeunes ou âgés et de rats CD ou de rats HFD, la CIT induit la lipolyse estimée par l'augmentation de la forme phosphorylée de la lipase hormono-sensible (P-HSL) et diminue la glycéronéogenèse, marqueur de la ré-estérification des acides gras (FA), et modifie l'expression de son enzyme clé, la phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C). La libération du glycérol est augmentée sélectivement dans le TA de rats âgés. Dans le TA de rats jeunes CD ou HFD, la sortie de glycérol reste stable car la CIT stimule l'expression de GyK. La CIT augmente la capacité oxydative (β -oxydation) en lien avec l'augmentation de l'expression de la carnitine palmitoyl-transférase 1-b (CPT-1b) et *very long chain acyl CoA dehydrogenase* (VLCAD). Chez les jeunes rats CD, la diminution de la ré-estérification des FA est équilibrée par l'augmentation de la β -oxydation, expliquant que la libération des FA ne soit pas affectée. Chez les rats HFD, la diminution drastique de la ré-estérification des FA n'est pas entièrement compensée par l'augmentation de la β -oxydation et, a pour conséquence une augmentation de la libération des FA. TFAM, UCP1 ainsi que de son régulateur clé PGC-1 α sont augmentés sélectivement chez les rats jeunes CD ou HFD. De même, TFAM est sélectivement augmenté chez les rats jeunes indépendamment du régime alimentaire.

II. Discussion et perspectives

II.1. Différence rats âgés / rats jeunes HFD

La CIT modifie profondément le métabolisme des AG dans le TA de rats. Quel que soit l'âge ou le régime, elle augmente la lipolyse et diminue la glycéronéogenèse. Cependant, indépendamment du régime, la capacité oxydative du TA n'est augmentée que chez les rats jeunes prévenant ainsi la libération des AG.

Chez les rats jeunes soumis à un régime HFD comme chez les rats âgés, la CIT induit la libération d'une partie des AG issus de la lipolyse. Replacé dans le contexte d'un organisme entier, ces AGNE libérés peuvent être lipotoxiques et engendrer le développement du DT2 mais ils peuvent aussi être utilisés comme substrat énergétique par des tissus périphériques tels que le muscle. Nos résultats sont en accord avec les conclusions de Faure et coll. dont les études montrent qu'un régime enrichi en CIT n'affecte peu ou pas les enzymes mitochondriales dans le tissu musculaire de rats âgés dénutris mais augmente le nombre de fibres musculaires en corrélation avec un nombre plus important de mitochondries donc à une demande énergétique plus importante du muscle (**Faure et al., 2012, 2013; Moinard et al., 2014**). Dans cette dernière étude, Moinard et coll. ont observé qu'un régime enrichi en CIT chez le rat âgé accroît la masse musculaire (+14% à 48%) par augmentation de la taille des fibres et de l'expression des protéines musculaires (**Moinard et al., 2009, 2014**). De plus, cette étude a mis en évidence que le métabolisme énergétique musculaire est augmenté via une hausse de l'activité des mitochondries et de leur biogenèse (**Moinard et al., 2014**). Des études préliminaires chez la personne âgée (88-91 ans) semble indiquer que l'enrichissement du régime alimentaire en protéines avec ou sans complémentation en CIT permettrait de diminuer significativement la masse adipeuse (-13%) mais que seule la supplémentation en CIT permettrait de maintenir la masse maigre (+0,58%) (**Frédéric Behar DIU 2013**).

Nos études in vitro sur le TAB RET de rats âgés suggèrent que les AG libérés sous l'action de la CIT seraient un moyen de répondre à la demande en énergie augmentée du muscle. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'impact de la CIT dans les relations entre muscle et TAB. Des études in vitro de co-cultures d'adipocytes et de cellules musculaires traités par la CIT pourraient être une stratégie pour définir les voies de communication entre les deux types cellulaires. Nous pourrions également envisager de nouvelles études in vivo de complémentarité en CIT chez le rat obèse et le rat âgé permettant d'évaluer à la fois le métabolisme du muscle et du TAB tout en analysant les concentrations circulantes d'AGNE.

Nos expériences ne mettent pas en évidence de différence d'expression d'UCP1 dans le TAB RET des rats âgés traités ou non par la CIT pendant 8h ou 24h. Plusieurs études récentes montrent qu'il existe chez l'Homme âgé un polymorphisme du gène codant pour UCP1 qui expliquerait la faible expression et la faible activité de la protéine ainsi que la résistance à la stimulation du développement du TABr au cours du vieillissement (**Rose et al., 2011a, 2011b; Yoneshiro et al., 2013**). De plus, la résistance au brunissement du TAB chez l'animal âgé, notamment la souris, pourrait être due, d'une part à la diminution de l'expression de gènes importants pour la régulation de l'activité de ce tissu tels que *PPAR α* , et, d'autre part à la diminution du nombre de récepteurs β 3 présents à la membrane des adipocytes (**Rogers and Smith, 2012; Rogers et al., 2012**). Les régions promotrices du gène UCP1 (**Barbera et al., 2001**) contiennent des éléments de réponse aux PPAR, à la fois *PPAR α* et *PPAR γ* (**Nedergaard et al., 2005**), ces deux facteurs étant connus pour favoriser l'adipogenèse des pré-adipocytes bruns (**Villarroya et al., 2007**). Cependant, Rogers et coll constatent qu'au cours du vieillissement seule l'expression de *PPAR α* décline dans le TAB, suggérant un rôle prépondérant de ce facteur dans le passage d'un phénotype blanc à un phénotype brun chez le sujet âgé (**Rogers and Smith, 2012; Rogers et al., 2012**).

Chez le rat en surpoids, le traitement par la CIT du TA RET induit une augmentation de la libération des AGNE, mais à la différence du rat âgé, la CIT induit à la fois une augmentation

de la capacité oxydative du TA RET et de l'expression d'UCP1, suggérant un changement de phénotype du TA du blanc vers le brun. D'autres études de Fu et coll. en 2005 montrent que la supplémentation en ARG, chez le rat obèse diabétique Zucker, peut également augmenter la capacité oxydative du TAB tout en stimulant l'expression de PGC-1 α , principal régulateur d'UCP1 et de la biogenèse mitochondriale (**Fu et al., 2005**). Les études de Jobgen et coll. en 2009 montrent que la supplémentation en ARG pendant 3 mois chez le rat HFD augmente la masse musculaire (*soleus* et *extensor digitorum longus*) tout en augmentant la masse du TABr au détriment de la masse du TAB (**Jobgen et al., 2009**). De plus, la supplémentation soit en acides aminés à chaînes ramifiées pendant 2 semaines, soit en isoleucine, chez la souris HFD, augmente l'expression de PPAR α et d'UCP2 dans le foie ainsi que d'UCP3 dans le muscle. Ces résultats sont corrélés à une diminution du contenu en TG de ces mêmes organes (**Nishimura et al., 2010; Arakawa et al., 2011**). L'ensemble de ces données indique que les régimes enrichis en acides aminés (ARG ou Isoleucine) augmentent l'expression des différentes isoformes de la protéine découplante dans le TAB, le muscle et le foie, tout en augmentant la masse musculaire des animaux HFD. Ainsi, nous pouvons suggérer que la CIT, tout en favorisant la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur grâce à l'augmentation de la protéine UCP1 du TAB, favoriserait le développement de la masse musculaire, comme c'est le cas pour ARG et Isoleucine. Cette augmentation de masse musculaire s'accompagnerait alors d'un accroissement de la demande en énergie de ce tissu chez le rat HFD. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la libération des AGNE en réponse à cette demande. Ainsi, nos résultats obtenus *in vitro* sur des explants de TAB de rats HFD devraient être complétés par des études *in vivo* de supplémentation d'un régime en CIT chez le rat en surpoids pour comprendre à la fois les effets de la CIT sur le muscle et sa fonction ainsi que la relation muscle-TAB. L'augmentation de l'expression d'UCP1 dans le TAB est associée à une meilleure tolérance au glucose chez les personnes obèses (**Timmons and Pedersen, 2009**). UCP1 serait donc une cible thérapeutique attrayante, particulièrement prometteuse pour le traitement du DT2.

En perspective de ce travail, nous pourrions étudier le mécanisme d'action de la CIT impliqué dans l'augmentation de la protéine UCP1 dans le TA de rats jeunes. D'autre part, il serait intéressant d'envisager des cinétiques plus longues sur le TA de rats HFD ou de rats âgés et étudier par immunohistochimie si la CIT établit une véritable conversion du phénotype blanc vers un phénotype brun. Enfin une étude sur le TA humain des effets de la CIT sur le brunissement du TAB permettrait d'envisager une nouvelle stratégie anti-obésité.

II.2. Mécanisme d'action de la citrulline

Le TABr est spécialisé dans la dissipation de l'énergie. Ainsi, le développement de ce tissu serait une cible potentielle pour de nouvelles stratégies nutritionnelles dans les thérapies anti-obésité. L'expression du gène UCP1 peut être induite par différents facteurs qualifiés de brunisseurs tels que l'exposition au froid, les agonistes β -adrénergiques, les agonistes rétinoïdes, l'irisine et l'adénosine. En effet, ces différents agents ainsi que les AGNE issus de la lipolyse eux-mêmes, peuvent induire l'expression d'UCP1 (**Jobgen et al., 2009; Carrière et al., 2013, 2014; Harms and Seale, 2013; Gnad et al., 2014**). Le TABr est activé par le système nerveux sympathique avec libération concomitante de catécholamines et activation des récepteurs β -adrénergiques. Chez le rongeur et chez l'Homme, le récepteur β_3 adrénergique est exprimé en abondance dans le TAB et TABr (**Lönnqvist et al., 1993, 1995; De Matteis et al., 2002; Lafontan and Berlan, 2003; Yehuda-Shnaidman et al., 2010**). Dans l'adipocyte brun, les AGNE issus de la lipolyse induite par les récepteurs β_3 adrénergiques sont utilisés par la thermogénèse et permettent la production de chaleur via UCP1 (**Ricquier et al., 1986**). Les récepteurs β_3 adrénergiques augmentent la concentration intracellulaire de l'AMPc qui active la PKA. L'AMPc est l'un des principaux régulateurs de l'expression du gène UCP1 (**Forest et al., 1987**). La PKA pourrait être le médiateur de l'action de CIT, bien qu'il n'y ait pas d'études relatives à l'effet de cet acide aminé sur cette enzyme. Cependant, ce mécanisme n'est probablement pas impliqué dans les effets de la CIT dans nos conditions expérimentales. En effet, dans les adipocytes, le gène codant la

PEPCK-C (*pck1*) est stimulé notamment par augmentation de l'AMPc (**Reshef and Hanson, 1972; Franckhauser et al., 1995**). La CIT stimule la phosphorylation de HSL induisant une augmentation de la libération des AGNE dans les explants de TA RET de rats HFD ou de rats âgés, alors qu'il est généralement admis que cette phosphorylation est sous la dépendance de l'AMPc et de la PKA. Or le traitement par la CIT dans nos conditions diminue l'expression de ce gène. Mais la lipolyse peut être activée par d'autres mécanismes, notamment en raison de la réduction d'une voie inhibitrice, comme la voie de l'AMPK (**Watt and Steinberg, 2008**). De façon étonnante, l'ARG joue à la fois un rôle lipolytique et inducteur de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), deux phénomènes potentiellement opposés dans les adipocytes, sans qu'il y ait dans la littérature d'explications claires de cette contradiction apparente (**Tan et al., 2012**).

Afin d'exclure le rôle de PKA dans les effets de la CIT, nous devrions envisager in vitro sur des explants de TA de rats de bloquer préalablement la voie de la PKA grâce à un inhibiteur tel que PKI avant d'évaluer les effets de la CIT sur le métabolisme du TA.

II.2.1 Implication du NO dans les effets de la citrulline

L'un des meilleurs candidats pouvant être impliqué dans l'action de la CIT pourrait être le NO. Comme mentionné dans l'article 1, ASL et ASS ne sont pas exprimés dans les adipocytes isolés à partir du TAB. Par conséquent, la production de NO via la CIT est vraisemblablement issue des macrophages présents dans le TAB qui contiennent tout l'équipement enzymatique pour le cycle ARG-CIT-NO comme les cellules endothéliales capillaires (**Figure 28**). Le NO diffuserait des macrophages vers les adipocytes où il pourrait agir sur l'expression d'UCP1. Au niveau physiologique, le NO a un rôle complexe qui dépend de sa concentration, de sa durée d'action et de l'organe étudié.

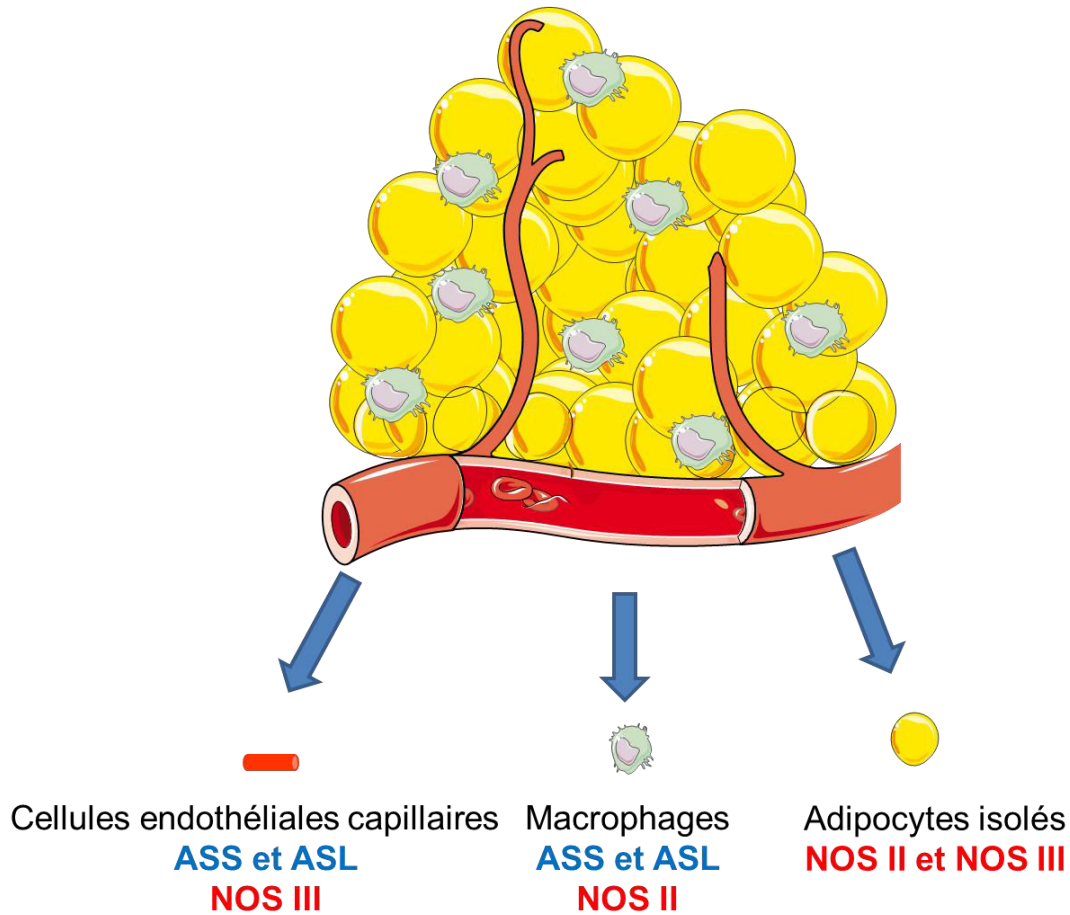


Figure 28 : Répartition des enzymes impliquées dans le cycle ARG-CIT-NO dans le tissu adipeux.

Le tissu adipeux est hétérogène et contient notamment des cellules endothéliales capillaires, des macrophages et des adipocytes. Les deux premiers types cellulaires expriment les 3 enzymes requises pour le cycle arginine-citrulline-NO : ASS : Argininosuccinate synthase ; ASL : Argininosuccinate lyase ; NOS : *nitric oxide synthase*. Alors que l'adipocyte lui ne possède que les NOS II et III.

II.2.1.1 CIT, NO et lipolyse

Les études de notre laboratoire ont permis d'établir un lien clair entre NO et métabolisme des AG. En 1998, Gaudiot et coll. montrent que le NO est un inducteur de la lipolyse des adipocytes isolés (**Gaudiot et al., 1998**). En 2011, Niang et coll. observent que les effets lipolytiques de la leptine sur des explants de TA EPI de rats sont dépendants du NO (**Niang et al., 2011**). Dans l'article 2, nous mettons en évidence que les effets lipolytiques de la CIT sont abolis par un prétraitement avec le L-NAME. Ces résultats sont à mettre en parallèle des données précédentes de Fu et coll. en 2005 montrant que la supplémentation pendant 3 mois en ARG chez le rat jeune augmente la lipolyse et la phosphorylation de HSL en lien avec une augmentation de la production de NO par les TA RET et EPI (**Fu et al., 2005**). Des études plus récentes démontrent que la supplémentation en ARG chez le porc augmente l'expression de l'ARNm HSL du TASC (**Tang et al., 2010**).

II.2.1.2 CIT, NO et glycéronéogenèse

Dans ce travail, la CIT a un effet anti-glycéronéogénique sur le TA RET et EPI de rats jeunes quel que soit le régime. Nous mettons en évidence que cet effet est lié d'une part à une régulation négative de l'expression de son principal facteur de transcription PPAR γ 2 et d'autre part à une implication du NO dans les effets anti-glycéronéogéniques de la CIT. A des concentrations élevées de l'ordre du micromolaire, le NO peut induire la nitration des tyrosines menant à l'altération de la stabilité et de la fonction de protéines (**Patel et al., 2000; Radi, 2004; White et al., 2010**). Dans notre laboratoire, il a été mis en évidence que la nitration de la PEPCK-C dans les adipocytes par action de la leptine permettait de diminuer la glycéronéogenèse (**Jaubert et al., 2012**). Nous pourrions envisager ce mécanisme pour expliquer la diminution de l'expression de la protéine PEPCK-C dans les explants de TA RET de rats âgés et de rats jeunes quel que soit le régime. En effet, notre étude a montré que la CIT induit l'expression de l'ARNm de la NOS II, enzyme capable de produire des concentrations brèves mais importantes de NO.

Il serait donc intéressant d'étudier en présence de CIT, la possible nitration par le NO de la protéine PEPCK-C dans des explants de TAB de rats jeunes, obèses ou âgés (immunoprécipitation et western blot).

II.2.1.3 CIT, NO et fonction mitochondriale

A des concentrations de l'ordre du nanomolaire, produites par la NOS III, le NO a un pouvoir anti-oxydant et protège les cellules des dommages liés aux ERO. Cette protection est intéressante dans nos conditions, car nous montrons que la CIT augmente la β -oxydation du TAB chez le rat jeune quel que soit le régime. Or l'augmentation du métabolisme oxydatif est un risque d'augmenter les ERO et donc les dommages cellulaires. Dans notre étude, l'expression de l'ARNm NOS III est augmentée sous l'action de la CIT dans les explants de TA RET et EPI de rats jeunes sous régime HFD ou non, sans préjuger d'éventuelles modifications post-traductionnelles par phosphorylation de la NOS III. L'augmentation du NO par la NOS III dans nos conditions serait alors un moyen de protéger le TA de la possible augmentation de la production des ERO via la β -oxydation.

Le temps d'exposition au NO est aussi un critère important. L'exposition à court terme (<12h) de cellules endothéliales au NO diminue l'expression de PGC-1 α alors qu'à l'inverse une exposition plus longue (>24h) permet une augmentation de l'expression de ce principal régulateur du métabolisme mitochondrial (**Borniquel et al., 2006**). Dans notre travail, nous constatons que la CIT augmente l'expression du gène PGC-1 α dans les explants de rats jeunes indépendamment du régime alimentaire des animaux. L'augmentation de la production de NO via la CIT pourrait expliquer ce phénomène. Ces résultats sont à mettre en parallèle de ceux obtenus par Fu et coll. montrant qu'un régime enrichi en ARG chez des rats augmente l'expression de PGC-1 α dans les TAB RET et EPI (**Fu et al., 2005**). Chez la souris, l'enrichissement du régime par des acides aminés essentiels pendant 3 mois améliore dans le muscle la biogenèse mitochondriale en induisant l'expression des gènes PGC-1 α et TFAM et augmente la production d'énergie via l'induction de l'expression de la

NOS III (**D'Antona et al., 2010**). Ces effets seraient la conséquence de l'activation de la voie mTOR via la production de NO issu de la NOS III (**D'Antona et al., 2010**).

Il serait intéressant d'envisager d'étudier in vitro dans des explants de TA de rats l'implication du NO dans les effets β -oxydants de la CIT. Tout d'abord, nous pourrions établir si la phosphorylation de la NOS III est augmentée dans le TA de rat traité par la CIT. Dans un deuxième temps, nous pourrions utiliser un prétraitement avec le L-NAME ou un inhibiteur sélectif de NOS III pour comprendre l'influence du NO dans l'augmentation de la capacité oxydative du TA de rat par la CIT. D'autre part, des études in vivo chez le rongeur obèse permettraient de définir l'impact de la CIT sur le métabolisme mitochondrial et de doser les ERO chez ces animaux afin d'envisager une stratégie thérapeutique chez l'humain par étude des effets de la CIT sur le TA issu de biopsie humaine de sujets obèses et normo-pondérés.

II.2.1.4 CIT, NO, inflammation et métabolisme

Nos résultats mettent en évidence également que la CIT peut avoir une action anti-inflammatoire *in vitro* à court terme chez le rat en surpoids et à long terme *in vivo* chez le rat âgé. *In vitro*, les deux cytokines pro-inflammatoires, IL-6 et TNF- α , sont surexprimées dans le TAB des rats âgés et de rats jeunes HFD. Dans les explants de rats en surpoids, un traitement pendant 8h ou 24h avec de la CIT entraîne une diminution des gènes codant TNF- α et IL-6. Ces résultats sont en accord avec les études de Breuillard et coll. qui montrent à partir de culture primaire de macrophages issus de rats obèses et diabétiques qu'un traitement de 6h avec de la CIT (0,1 à 2mM) diminue la production de TNF- α de façon dose dépendante (**Breuillard et al., 2014**). Dans un modèle de septicémie chez le rat, l'enrichissement en CIT du régime alimentaire diminue l'IL-6 circulante (**Asgeirsson et al., 2011**). Bogdanski et coll en 2012 mettent en évidence qu'un régime supplémenté en ARG pendant 3 mois diminue TNF- α chez la femme obèse. L'ensemble de ces données sont en accord avec nos études *in vivo* chez le rat âgé montrent qu'un régime enrichi en CIT conduit à une diminution de TNF- α et IL-6 dans le TAB, bien que ce résultat ne soit pas observé in

in vitro dans des explants de TAB de rats âgés. Ceci pourrait être dû à la limite du modèle *in vitro* qui ne prend pas en considération les interactions avec les autres organes. Par exemple, le NO a un rôle dans la régulation des hormones corticoïdes au niveau cérébrale, ces hormones sont impliquées dans le contrôle de l'inflammation (**Gądek-Michalska et al., 2013**). L'ARG est également un modulateur clé de l'immunité, probablement en partie par l'intermédiaire de la synthèse de NO en favorisant la prolifération et la fonction des cellules T ainsi que l'activité des cellules NK (**Peranzoni et al., 2007; Berthe et al., 2011**). La diminution à la fois de la disponibilité en ARG et l'altération de son métabolisme dans les macrophages en cas d'obésité, conduit à une altération de la production de NO et de cytokines pro-inflammatoires. En effet, la diminution de la production de NO via la NOS III chez la souris obèse contribue à l'exacerbation de l'inflammation notamment au sein du TAB (**Kim et al., 2008; Handa et al., 2011**). D'autres études rapportent des effets anti-inflammatoires du NO issu de NOS III au niveau vasculaire (**Liu and Huang, 2008; Huang et al., 2009**).

Un régime HFD chez la souris diminue la phosphorylation de la NOS III dans le TAB via l'activation de la voie NF- κ B (**Handa et al., 2011**). Or le NO issu de la NOS III apparaît comme un modulateur de la biogenèse mitochondriale. Il a été démontré que le TNF- α conduit à une diminution de la biogenèse mitochondriale en réduisant l'expression de la NOS III dans des adipocytes isolés de TAB de souris mâles *ob/ob* (**Valerio et al., 2006**). Ces effets sur les mitochondries peuvent être inversés par un traitement avec des donneurs de NO comme le SNAP (**Valerio et al., 2006**). Chez des souris obèses déficientes en TNF- α , la biogenèse mitochondriale dans le TAB est au moins partiellement restaurée (**Valerio et al., 2006**). Ces résultats suggèrent que TNF- α joue un rôle important dans la diminution de l'expression de NOS III et la biogenèse mitochondriale dans les tissus métaboliquement actifs d'animaux obèses. Les souris déficientes en NOS III développent une hyperlipidémie, une hyperleptinémie ainsi qu'une résistance à l'insuline, caractéristique du syndrome métabolique chez l'Homme (**Duplain et al., 2001**). Dans nos résultats complémentaires,

nous démontrons que la CIT augmente l'expression du gène codant la NOS III en corrélation avec une diminution de l'expression de TNF- α dans les explants de rats jeunes HFD. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la biogenèse mitochondriale chez le rat jeune CD ou HFD dans le TA et suggèrerait que la CIT puisse limiter le développement de l'insulino-résistance et de l'hyperleptinémie.

Compte tenu de ces résultats, il est légitime de s'interroger sur la régulation de la NOS III par la CIT dans le TA de rats HFD ou de rats âgés. En effet, la présence d'une inflammation chronique au sein du TA et la dérégulation métabolique qui en découle montre tout l'intérêt de déterminer si la NOS III est impliquée dans les effets anti-inflammatoires et métaboliques de la CIT. Ainsi, l'inhibition préalable de la NOS III avant le traitement d'explants de tissus adipeux de rats obèses mettrait en évidence le rôle du NO dans ces effets. De plus, une étude similaire des effets de la CIT sur le métabolisme du TA humain à partir de biopsies apporterait des éléments de réponses dans la compréhension des effets de la CIT chez l'Homme.

II.2.1.5 CIT, leptine et adiponectine

Nous montrons que dans les explants de TA de rats jeunes CD ou HFD et âgés, la CIT diminue l'expression de l'ARNm de la leptine.

La leptine a un rôle bivalent sur le système immunitaire. D'un côté, elle a un rôle protecteur contre les infections en régulant la prolifération et l'activation des cellules T (**La Cava and Matarese, 2004; Fantuzzi et al., 2005**). De l'autre côté, elle a un rôle pro-inflammatoire car elle est impliquée dans le développement de certaines pathologies inflammatoires et auto-immunes telle que l'arthrite (**Tartaglia et al., 1995; Fried et al., 1998; Otero et al., 2005**). La diminution de la de l'expression de l'ARNm de la leptine par la CIT pourrait expliquer ses effets anti-inflammatoires dans le TA de rats. A l'inverse le traitement par la leucine d'adipocytes isolés de rats augmente la sécrétion de leptine via l'activation de la voie mTOR (**Roh et al., 2003**). Ces données semblent réfuter l'hypothèse de l'activation de la voie

mTOR par la CIT. Cependant, l'augmentation de l'expression de la NOS III dans le TA RET CD ou HFD pourrait être impliquée dans la diminution de la leptine due à la CIT.

La CIT augmente l'expression de l'ARNm de l'adiponectine dans les explants de TA de rats jeunes CD ou HFD et âgés. Ces résultats sont à mettre en lien avec les conclusions des études mettant en évidence que la supplémentation à court terme ou à long terme en ARG de patients âgés ou obèses diabétiques augmente la production d'adiponectine (**Lucotti et al., 2006; De Luis et al., 2014**). Cette adipokine exerce des effets protecteurs contre le développement des maladies liées à l'obésité telles que le DT2 et l'athérosclérose notamment en atténuant l'inflammation chronique du TAB (**Ohashi et al., 2012**). Elle diminue également la production des cytokines inflammatoires, TNF- α et IL-6, par les macrophages. Elle réduit l'inflammation du TAB en favorisant la colonisation du tissu par des macrophages M2 (anti-inflammatoires) au détriment des macrophages M1 (pro-inflammatoires) (**Ohashi et al., 2010**). L'augmentation de l'expression de l'adiponectine du TAB de rat pourrait expliquer les propriétés anti-inflammatoires de la CIT.

De plus, l'adiponectine augmente la biogenèse mitochondriale via PPAR α dans le foie et le muscle notamment (**Berg and Scherer, 2005**). Ainsi, l'adiponectine augmente la β -oxydation des AG et réduit le stockage des TG dans le muscle conduisant à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Maeda et al., 2008; Yamauchi and Kadowaki, 2013**). L'augmentation de l'adiponectine dans le TAB par la CIT permettrait d'expliquer l'augmentation de la capacité oxydative de ce tissu via PPAR α chez le rat.

Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de l'adiponectine dans les effets de la CIT pour tenter d'expliquer, en partie, l'action anti-inflammatoire et β -oxydante mises en évidence dans le TAB de rats. Ainsi, des études in vivo de complémentation en CIT de l'alimentation de rats jeunes HFD ou de rats âgés apporterait des éléments supplémentaires de compréhension des mécanismes d'action de la CIT. De plus, ces études permettraient de déterminer si la CIT peut avoir une action sensibilisatrice à l'insuline dans le muscle et le foie via l'adiponectine. Un dosage sérique de l'adiponectine et de la leptine chez ces animaux

serait nécessaire pour confirmer les résultats in vitro. D'autre part, des expériences in vitro sur TAB humain seraient importantes pour décrypter les mécanismes de cet acide aminé.

L'ensemble de nos données constitue la première démonstration d'un effet direct de la CIT sur le métabolisme du TAB. Ce travail de thèse suggère que la CIT « vide » les adipocytes de leurs TG de stockage et pourrait expliquer la diminution de la masse du TAB viscéral induite par un régime enrichi en CIT. Nos études mettent en évidence une induction d'UCP1 par la CIT. Cette augmentation peut être en partie responsable de la diminution de la masse du TAB, en permettant une possible conversion partielle en TABr, le brunissement. Ceci aurait pour conséquence une augmentation des dépenses d'énergie. Ces données ouvrent alors la voie pour le développement d'une nouvelle stratégie nutritionnelle impliquée dans l'intervention thérapeutique contre le surpoids et l'obésité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., and Grimaldi, P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* *268*, 17665–17668.
- Adamczak, M., and Wiecek, A. (2013). The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin. Nephrol.* *33*, 2–13.
- Adamczak, M., Rzepka, E., Chudek, J., and Wiecek, A. (2005). Ageing and plasma adiponectin concentration in apparently healthy males and females. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *62*, 114–118.
- Adams, T.D., Gress, R.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Rosamond, W.D., Lamonte, M.J., Stroup, A.M., and Hunt, S.C. (2007). Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* *357*, 753–761.
- Adams, T.D., Stroup, A.M., Gress, R.E., Adams, K.F., Calle, E.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Hopkins, P.N., and Hunt, S.C. (2009). Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery. *Obes. Silver Spring Md* *17*, 796–802.
- Adler, A.S., Sinha, S., Kawahara, T.L.A., Zhang, J.Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2007). Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev.* *21*, 3244–3257.
- Ailhaud, G. (2006). Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C. R. Biol.* *329*, 570–577; discussion 653–655.
- Akashi, K., Miyake, C., and Yokota, A. (2001). Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* *508*, 438–442.
- Albala, C., Yáñez, M., Devoto, E., Sostin, C., Zeballos, L., and Santos, J.L. (1996). Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *20*, 1027–1032.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* *357*, 593–615.
- Almind, K., Manieri, M., Sivitz, W.I., Cinti, S., and Kahn, C.R. (2007). Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2366–2371.
- Anderson, L.A., McTernan, P.G., Barnett, A.H., and Kumar, S. (2001). The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 5045–5051.

- Anghel, S.I., and Wahli, W. (2007). Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res.* *17*, 486–511.
- Anisimov, V.N. (2007). Biology of aging and cancer. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *14*, 23–31.
- Arakawa, M., Masaki, T., Nishimura, J., Seike, M., and Yoshimatsu, H. (2011). The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocr. J.* *58*, 161–170.
- Asgeirsson, T., Zhang, S., Nunoo, R., Mascarenas, C., Dujovny, N., Luchtefeld, M., Cavey, G.S., and Senagore, A. (2011). Citrulline: A potential immunomodulator in sepsis. *Surgery* *150*, 744–751.
- Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J. Cell Sci.* *125*, 4963–4971.
- Avram, A.S., Avram, M.M., and James, W.D. (2005a). Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.* *53*, 671–683.
- Avram, M.M., Avram, A.S., and James, W.D. (2005b). Subcutaneous fat in normal and diseased states: 1. Introduction. *J. Am. Acad. Dermatol.* *53*, 663–670.
- Baka, Z., György, B., Géher, P., Buzás, E.I., Falus, A., and Nagy, G. (2012). Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine* *79*, 431–436.
- Ballard, F.J., Hanson, R.W., and Leveille, G.A. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* *242*, 2746–2750.
- Ballou, S.P., Lozanski, F.B., Hodder, S., Rzewnicki, D.L., Mion, L.C., Sipe, J.D., Ford, A.B., and Kushner, I. (1996). Quantitative and qualitative alterations of acute-phase proteins in healthy elderly persons. *Age Ageing* *25*, 224–230.
- Barbera, M.J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giralt, M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* *276*, 1486–1493.
- Bartness, T.J., Vaughan, C.H., and Song, C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* *2005 34 Suppl 1*, S36–S42.
- Basen-Engquist, K., and Chang, M. (2011). Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr. Oncol. Rep.* *13*, 71–76.
- Beale, E.G., Antoine, B., and Forest, C. (2003). Glyceroneogenesis in adipocytes: another textbook case. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 402–403.
- Beale, E.G., Harvey, B.J., and Forest, C. (2007). PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochem. Biophys.* *48*, 89–95.

- Bélanger, C., Luu-The, V., Dupont, P., and Tchernof, A. (2002). Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* *34*, 737–745.
- Berg, A.H., and Scherer, P.E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* *96*, 939–949.
- Berger, N.A. (2014). Obesity and cancer pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1311*, 57–76.
- Berthe, M.-C., Darquy, S., Breuillard, C., Lamoudi, L., Marc, J., Cynober, L., Chaumeil, J.-C., and Couderc, R. (2011). High plasma citrulline and arginine levels ensured by sustained-release citrulline supplementation in rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *27*, 1168–1171.
- Bijlsma, A.Y., Meskers, C.G.M., van Heemst, D., Westendorp, R.G.J., de Craen, A.J.M., and Maier, A.B. (2013). Diagnostic criteria for sarcopenia relate differently to insulin resistance. *Age Dordr. Neth.* *35*, 2367–2375.
- Björntorp, P. (1996). The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *20*, 291–302.
- Bollhalder, L., Pfeil, A.M., Tomonaga, Y., and Schwenkglens, M. (2013). A systematic literature review and meta-analysis of randomized clinical trials of parenteral glutamine supplementation. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *32*, 213–223.
- Borniquel, S., Valle, I., Cadenas, S., Lamas, S., and Monsalve, M. (2006). Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1889–1891.
- Bouloumié, A., Curat, C.A., Sengenès, C., Lolmède, K., Miranville, A., and Busse, R. (2005). Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *8*, 347–354.
- Breuillard, C., Bonhomme, S., Couderc, R., Cynober, L., and De Bandt, J.-P. (2014). In vitro anti-inflammatory effects of citrulline on peritoneal macrophages in Zucker diabetic fatty rats. *Br. J. Nutr.* *1–5*.
- Brown, K.A., and Simpson, E.R. (2012). Obesity and breast cancer: mechanisms and therapeutic implications. *Front. Biosci. Elite Ed.* *4*, 2515–2524.
- Brown, L.M., and Clegg, D.J. (2010). Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *122*, 65–73.
- Bulun, S.E., Chen, D., Moy, I., Brooks, D.C., and Zhao, H. (2012). Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *23*, 83–89.
- Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.-M., Collinet, M., Bortoli, S., Forest, C., and Benelli, C. (2008). Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* *57*, 2272–2279.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.

- Cao, H. (2014). Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease. *J. Endocrinol.* *220*, T47–T59.
- Carbone, F., La Rocca, C., and Matarese, G. (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* *94*, 2082–2088.
- Carrière, A., Jeanson, Y., Cousin, B., Arnaud, E., and Casteilla, L. (2013). Le recrutement et l'activation d'adipocytes bruns et/ou BRITE: Une perspective réelle pour le traitement des maladies métaboliques ? *Médecine/sciences* *29*, 729–735.
- Carrière, A., Jeanson, Y., Berger-Müller, S., André, M., Chenouard, V., Arnaud, E., Barreau, C., Walther, R., Galinier, A., Wdziekonski, B., et al. (2014). Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* *63*, 3253–3265.
- Cartier, A., Côté, M., Lemieux, I., Pérusse, L., Tremblay, A., Bouchard, C., and Després, J.-P. (2009a). Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? *Am. J. Clin. Nutr.* *89*, 1307–1314.
- Cartier, A., Côté, M., Lemieux, I., Pérusse, L., Tremblay, A., Bouchard, C., and Després, J.-P. (2009b). Age-related differences in inflammatory markers in men: contribution of visceral adiposity. *Metabolism*. *58*, 1452–1458.
- Cartwright, M.J., Tchkonina, T., and Kirkland, J.L. (2007). Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp. Gerontol.* *42*, 463–471.
- Caspersen, C.J., Pereira, M.A., and Curran, K.M. (2000). Changes in physical activity patterns in the United States, by sex and cross-sectional age. *Med. Sci. Sports Exerc.* *32*, 1601–1609.
- La Cava, A., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 371–379.
- Cederberg, A., Grønning, L.M., Ahrén, B., Taskén, K., Carlsson, P., and Enerbäck, S. (2001). FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* *106*, 563–573.
- Cevenini, E., Caruso, C., Candore, G., Capri, M., Nuzzo, D., Duro, G., Rizzo, C., Colonna-Romano, G., Lio, D., Di Carlo, D., et al. (2010). Age-related inflammation: the contribution of different organs, tissues and systems. How to face it for therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 609–618.
- Cevenini, E., Monti, D., and Franceschi, C. (2013). Inflamm-ageing: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *16*, 14–20.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., et al. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* *84*, 491–495.
- Chistiakov, D.A., Sobenin, I.A., Revin, V.V., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2014). Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *BioMed Res. Int.* *2014*, 238463.

- Chung, J.-Y., Kang, H.-T., Lee, D.-C., Lee, H.-R., and Lee, Y.-J. (2013). Body composition and its association with cardiometabolic risk factors in the elderly: a focus on sarcopenic obesity. *Arch. Gerontol. Geriatr.* *56*, 270–278.
- Cinti, S. (2011). Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann. Med.* *43*, 104–115.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* *46*, 2347–2355.
- Clément, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C.A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J.-D., et al. (2004). Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1657–1669.
- Cohen, H.J., Pieper, C.F., Harris, T., Rao, K.M., and Currie, M.S. (1997). The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *52*, M201–M208.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., et al. (2009). Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science* *325*, 201–204.
- Colom, B., Oliver, J., Roca, P., and Garcia-Palmer, F.J. (2007). Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage. *Cardiovasc. Res.* *74*, 456–465.
- Commins, S.P., Watson, P.M., Padgett, M.A., Dudley, A., Argyropoulos, G., and Gettys, T.W. (1999). Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology* *140*, 292–300.
- Corcoran, M.P., Lamon-Fava, S., and Fielding, R.A. (2007). Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* *85*, 662–677.
- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* *103* (Pt 4), 931–942.
- Cowie, C.C., Rust, K.F., Byrd-Holt, D.D., Eberhardt, M.S., Flegal, K.M., Engelgau, M.M., Saydah, S.H., Williams, D.E., Geiss, L.S., and Gregg, E.W. (2006). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population: National Health And Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* *29*, 1263–1268.
- Crenn, P., and Cynober, L. (2010). Effect of intestinal resections on arginine metabolism: practical implications for nutrition support. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 65–69.
- Crenn, P., Vahedi, K., Lavergne-Slove, A., Cynober, L., Matuchansky, C., and Messing, B. (2003). Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology* *124*, 1210–1219.
- Crenn, P., Messing, B., and Cynober, L. (2008). Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *27*, 328–339.

- Crenn, P., Hanachi, M., Neveux, N., and Cynober, L. (2011). Circulating citrulline levels: a biomarker for intestinal functionality assessment. *Ann. Biol. Clin.* 69, 513–521.
- Cynober, L., Jourdan, M., Aussel, C., Guillet, C., Walrand, S., and Boirie, Y. (2004). Sarcopénie des sujets âgés : libérez les acides aminés ! *Nutr. Clin. Métabolisme* 18, 198–204.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.
- Dagenais, S., Garbedian, S., and Wai, E.K. (2009). Systematic review of the prevalence of radiographic primary hip osteoarthritis. *Clin. Orthop.* 467, 623–637.
- D'Antona, G., Ragni, M., Cardile, A., Tedesco, L., Dossena, M., Bruttini, F., Caliaro, F., Corsetti, G., Bottinelli, R., Carruba, M.O., et al. (2010). Branched-Chain Amino Acid Supplementation Promotes Survival and Supports Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis in Middle-Aged Mice. *Cell Metab.* 12, 362–372.
- Dardevet, D., Sornet, C., Bayle, G., Prugnaud, J., Pouyet, C., and Grizard, J. (2002). Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J. Nutr.* 132, 95–100.
- Dellow, W.J., Chambers, S.T., Lever, M., Lunt, H., and Robson, R.A. (1999). Elevated glycine betaine excretion in diabetes mellitus patients is associated with proximal tubular dysfunction and hyperglycemia. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 43, 91–99.
- Delmonico, M.J., Harris, T.B., Lee, J.-S., Visser, M., Nevitt, M., Kritchevsky, S.B., Tylavsky, F.A., Newman, A.B., and Health, Aging and Body Composition Study (2007). Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. *J. Am. Geriatr. Soc.* 55, 769–774.
- Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887.
- Dieudonné, M.N., Leneuve, M.C., Giudicelli, Y., and Pecquery, R. (2004). Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C655–C661.
- Diouf, I., Charles, M.A., Ducimetière, P., Basdevant, A., Eschwege, E., and Heude, B. (2010). Evolution of obesity prevalence in France: an age-period-cohort analysis. *Epidemiol. Camb. Mass* 21, 360–365.
- Dirinck, E., Jorens, P.G., Covaci, A., Geens, T., Roosens, L., Neels, H., Mertens, I., and van Gaal, L. (2011). Obesity and Persistent Organic Pollutants: Possible Obesogenic Effect of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls. *Obesity* 19, 709–714.
- Dreyer, H.C., and Volpi, E. (2005). Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 140S – 145S.
- Driver, J.A., Djoussé, L., Logroscino, G., Gaziano, J.M., and Kurth, T. (2008). Incidence of cardiovascular disease and cancer in advanced age: prospective cohort study. *BMJ* 337, a2467.

- Dumond, H., Presle, N., Terlain, B., Mainard, D., Loeuille, D., Netter, P., and Pottie, P. (2003). Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 3118–3129.
- Duplain, H., Burcelin, R., Sartori, C., Cook, S., Egli, M., Lepori, M., Vollenweider, P., Pedrazzini, T., Nicod, P., Thorens, B., et al. (2001). Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* *104*, 342–345.
- Ekstrand, M.I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C.B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.-G. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 935–944.
- Elizalde, M., Rydén, M., van Harmelen, V., Eneroth, P., Gyllenhammar, H., Holm, C., Ramel, S., Olund, A., Arner, P., and Andersson, K. (2000). Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J. Lipid Res.* *41*, 1244–1251.
- Enzi, G., Gasparo, M., Biondetti, P.R., Fiore, D., Semisa, M., and Zurlo, F. (1986). Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *Am. J. Clin. Nutr.* *44*, 739–746.
- Ershler, W.B., Sun, W.H., Binkley, N., Gravenstein, S., Volk, M.J., Kamoske, G., Klopp, R.G., Roecker, E.B., Daynes, R.A., and Weindruch, R. (1993). Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine Cytokine Res.* *12*, 225–230.
- Fagiolo, U., Cossarizza, A., Scala, E., Fanales-Belasio, E., Ortolani, C., Cozzi, E., Monti, D., Franceschi, C., and Paganelli, R. (1993). Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur. J. Immunol.* *23*, 2375–2378.
- Fain, J.N. (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam. Horm.* *74*, 443–477.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., and Bahouth, S.W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* *145*, 2273–2282.
- Fantin, F., Di Francesco, V., Fontana, G., Zivelonghi, A., Bissoli, L., Zoico, E., Rossi, A., Micciolo, R., Bosello, O., and Zamboni, M. (2007). Longitudinal body composition changes in old men and women: interrelationships with worsening disability. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *62*, 1375–1381.
- Fantuzzi, G., Sennello, J.A., Batra, A., Fedke, I., Lehr, H.A., Zeitz, M., and Siegmund, B. (2005). Defining the role of T cell-derived leptin in the modulation of hepatic or intestinal inflammation in mice. *Clin. Exp. Immunol.* *142*, 31–38.
- Farmer, S.R. (2009). Obesity: Be cool, lose weight. *Nature* *458*, 839–840.
- Farooqi, I.S., and O’Rahilly, S. (2000). Recent advances in the genetics of severe childhood obesity. *Arch. Dis. Child.* *83*, 31–34.
- Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S., et al. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.* *110*, 1093–1103.

- Faure, C., Raynaud-Simon, A., Ferry, A., Daugé, V., Cynober, L., Aussel, C., and Moinard, C. (2012). Leucine and citrulline modulate muscle function in malnourished aged rats. *Amino Acids* *42*, 1425–1433.
- Faure, C., Morio, B., Chafey, P., Le Plénier, S., Noirez, P., Randrianarison-Huetz, V., Cynober, L., Aussel, C., and Moinard, C. (2013). Citrulline enhances myofibrillar constituents expression of skeletal muscle and induces a switch in muscle energy metabolism in malnourished aged rats. *Proteomics* *13*, 2191–2201.
- Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* *9*, 203–209.
- Fernández-Fígares, I., Wray-Cahen, D., Steele, N.C., Campbell, R.G., Hall, D.D., Virtanen, E., and Caperna, T.J. (2002). Effect of dietary betaine on nutrient utilization and partitioning in the young growing feed-restricted pig. *J. Anim. Sci.* *80*, 421–428.
- Ferrucci, L., Corsi, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Bartali, B., Taub, D.D., Guralnik, J.M., and Longo, D.L. (2005). The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* *105*, 2294–2299.
- Fessler, M.B., Rudel, L.L., and Brown, J.M. (2009). Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* *20*, 379–385.
- Fève, B., Bastard, J.-P., and Vidal, H. (2006). Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts. *C. R. Biol.* *329*, 587–597; discussion 653–655.
- Field, A.E., Coakley, E.H., Must, A., Spadano, J.L., Laird, N., Dietz, W.H., Rimm, E., and Colditz, G.A. (2001). Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch. Intern. Med.* *161*, 1581–1586.
- Fietta, P., and Delsante, G. (2013). Focus on adipokines. *Theor. Biol. Forum* *106*, 103–129.
- Fitzgibbons, S., Ching, Y.A., Valim, C., Zhou, J., Iglesias, J., Duggan, C., and Jaksic, T. (2009). Relationship between serum citrulline levels and progression to parenteral nutrition independence in children with short bowel syndrome. *J. Pediatr. Surg.* *44*, 928–932.
- Forest, C., Doglio, A., Casteilla, L., Ricquier, D., and Ailhaud, G. (1987). Expression of the mitochondrial uncoupling protein in brown adipocytes. Absence in brown preadipocytes and BFC-1 cells. Modulation by isoproterenol in adipocytes. *Exp. Cell Res.* *168*, 233–246.
- Forest, C., Tordjman, J., Glorian, M., Duplus, E., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E.G., and Antoine, B. (2003). Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 1125–1129.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., and De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *908*, 244–254.
- Franckhauser, S., Antras-Ferry, J., Robin, P., Robin, D., Granner, D.K., and Forest, C. (1995). Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: opposite effects of dexamethasone and isoprenaline on transcription. *Biochem. J.* *305* (Pt 1), 65–71.
- Fried, S.K., Bunkin, D.A., and Greenberg, A.S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 847–850.

- Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., Guerrieri, M., and Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 950–959.
- Frühbeck, G., and Gómez-Ambrosi, J. (2001). Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *Cell. Signal.* *13*, 827–833.
- Fu, W.J., Haynes, T.E., Kohli, R., Hu, J., Shi, W., Spencer, T.E., Carroll, R.J., Meininger, C.J., and Wu, G. (2005). Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* *135*, 714–721.
- Fujita, S., and Volpi, E. (2006). Amino acids and muscle loss with aging. *J. Nutr.* *136*, 277S – 80S.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* *288*, 373–376.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* *114*, 1752–1761.
- Gabaldon, A.M., Florez-Duquet, M.L., Hamilton, J.S., McDonald, R.B., and Horwitz, B.A. (1995). Effects of age and gender on brown fat and skeletal muscle metabolic responses to cold in F344 rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *268*, R931–R941.
- Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., and Bugajski, J. (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacol. Rep. PR* *65*, 1655–1662.
- Gambacciani, M., Ciaponi, M., Cappagli, B., Piaggese, L., De Simone, L., Orlandi, R., and Genazzani, A.R. (1997). Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 414–417.
- Gaudiot, N., Jaubert, A.M., Charbonnier, E., Sabourault, D., Lacasa, D., Giudicelli, Y., and Ribière, C. (1998). Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* *273*, 13475–13481.
- Gaudiot, N., Ribière, C., Jaubert, A.M., and Giudicelli, Y. (2000). Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *279*, C1603–C1610.
- Gill, R., Tsung, A., and Billiar, T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 1121–1132.
- Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Cozzi, V., Cinti, S., Carruba, M.O., and Nisoli, E. (2002). Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett.* *514*, 135–140.
- Girard, J. (2000). [Fatty acids and beta cells]. *Diabetes Metab.* *26 Suppl 3*, 6–9.
- Girard, J. (2003). [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Médecine Sci. MS* *19*, 827–833.

- Gnad, T., Scheibler, S., von Kügelgen, I., Scheele, C., Kilić, A., Glöde, A., Hoffmann, L.S., Reverte-Salisa, L., Horn, P., Mutlu, S., et al. (2014). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*.
- Goldring, S.R., and Goldring, M.B. (2004). The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop.* S27–S36.
- Gonzalez, M.C., Pastore, C.A., Orlandi, S.P., and Heymsfield, S.B. (2014). Obesity paradox in cancer: new insights provided by body composition. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 999–1005.
- Goodpaster, B.H., Carlson, C.L., Visser, M., Kelley, D.E., Scherzinger, A., Harris, T.B., Stamm, E., and Newman, A.B. (2001). Attenuation of skeletal muscle and strength in the elderly: The Health ABC Study. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 90, 2157–2165.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35.
- Govindarajan, G., Whaley-Connell, A., Mugo, M., Stump, C., and Sowers, J.R. (2005). The cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Med. Sci.* 330, 311–318.
- Griendling, K.K., and Alexander, R.W. (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96, 3264–3265.
- Guerre-Millo, M. (2006). [Adipose tissue secretory function: implication in metabolic and cardiovascular complications of obesity]. *J. Société Biol.* 200, 37–43.
- Guiu, B., Petit, J.M., Bonnetain, F., Ladoire, S., Guiu, S., Cercueil, J.-P., Krausé, D., Hillon, P., Borg, C., Chauffert, B., et al. (2010). Visceral fat area is an independent predictive biomarker of outcome after first-line bevacizumab-based treatment in metastatic colorectal cancer. *Gut* 59, 341–347.
- Von Hafe, P., Pina, F., Pérez, A., Tavares, M., and Barros, H. (2004). Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer. *Obes. Res.* 12, 1930–1935.
- Handa, P., Tateya, S., Rizzo, N.O., Cheng, A.M., Morgan-Stevenson, V., Han, C.-Y., Clowes, A.W., Daum, G., O'Brien, K.D., Schwartz, M.W., et al. (2011). Reduced Vascular Nitric Oxide–cGMP Signaling Contributes to Adipose Tissue Inflammation During High-Fat Feeding. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2827–2835.
- Harman, D. (1965). The free radical theory of aging : effect of age on serum copper levels. *J. Gerontol.* 20, 151–153.
- Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19, 1252–1263.
- Hartman, W.J., Seyoum, E., Villalobos-Molina, R., Joseph, J.A., and Prior, R.L. (1997). Responses of circulating urea cycle and branched-chain amino acids to feeding in adult and aged Fischer-344 rats. *Aging Milan Italy* 9, 198–206.
- Hausman, G.J., Barb, C.R., and Lents, C.A. (2012). Leptin and reproductive function. *Biochimie* 94, 2075–2081.
- Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B., and Cooke, P.S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12729–12734.

- Helenius, M., Hänninen, M., Lehtinen, S.K., and Salminen, A. (1996). Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *28*, 487–498.
- Henkin, L., Bergman, R.N., Bowden, D.W., Ellsworth, D.L., Haffner, S.M., Langefeld, C.D., Mitchell, B.D., Norris, J.M., Rewers, M., Saad, M.F., et al. (2003). Genetic epidemiology of insulin resistance and visceral adiposity. The IRAS Family Study design and methods. *Ann. Epidemiol.* *13*, 211–217.
- Hepple, R.T., Baker, D.J., McConkey, M., Murynka, T., and Norris, R. (2006). Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. *Rejuvenation Res.* *9*, 219–222.
- Holecek, M. (2013). Side effects of long-term glutamine supplementation. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* *37*, 607–616.
- Hoogenraad, N., Totino, N., Elmer, H., Wraight, C., Alewood, P., and Johns, R.B. (1985). Inhibition of intestinal citrulline synthesis causes severe growth retardation in rats. *Am. J. Physiol.* *249*, G792–G799.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* *259*, 87–91.
- Huang, H., Xin, H., Liu, X., Xu, Y., Wen, D., Zhang, Y., and Zhu, Y.Z. (2012). Novel anti-diabetic effect of SCM-198 via inhibiting the hepatic NF- κ B pathway in db/db mice. *Biosci. Rep.* *32*, 185–195.
- Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Ortmeyer, H.K., Stefanovic-Racic, M., and O’Doherty, R.M. (2009). Leptin augments the acute suppressive effects of insulin on hepatic very low-density lipoprotein production in rats. *Endocrinology* *150*, 2169–2174.
- Hughes, V.A., Roubenoff, R., Wood, M., Frontera, W.R., Evans, W.J., and Singh, M.A.F. (2004). Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* *80*, 475–482.
- Janand-Delenne, B., Chagnaud, C., Raccah, D., Alessi, M.C., Juhan-Vague, I., and Vague, P. (1998). Visceral fat as a main determinant of plasminogen activator inhibitor 1 level in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *22*, 312–317.
- Järvinen, K., Vuolteenaho, K., Nieminen, R., Moilanen, T., Knowles, R.G., and Moilanen, E. (2008). Selective iNOS inhibitor 1400W enhances anti-catabolic IL-10 and reduces destructive MMP-10 in OA cartilage. Survey of the effects of 1400W on inflammatory mediators produced by OA cartilage as detected by protein antibody array. *Clin. Exp. Rheumatol.* *26*, 275–282.
- Jaubert, A.-M., Mehebik-Mojaat, N., Lacasa, D., Sabourault, D., Giudicelli, Y., and Ribière, C. (2007). Nongenomic estrogen effects on nitric oxide synthase activity in rat adipocytes. *Endocrinology* *148*, 2444–2452.
- Jaubert, A.-M., Penot, G., Niang, F., Durant, S., and Forest, C. (2012). Rapid nitration of adipocyte phosphoenolpyruvate carboxykinase by leptin reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release. *PLoS One* *7*, e40650.

- Jenkins, K.R. (2004). Body-weight change and physical functioning among young old adults. *J. Aging Health* 16, 248–266.
- Jianfeng, G., Weiming, Z., Ning, L., Fangnan, L., Li, T., Nan, L., and Jieshou, L. (2005). Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *J. Surg. Res.* 127, 177–182.
- Jilka, R.L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D.C., Abrams, J.S., Boyce, B., Broxmeyer, H., and Manolagas, S.C. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257, 88–91.
- Jobgen, W., Fu, W.J., Gao, H., Li, P., Meininger, C.J., Smith, S.B., Spencer, T.E., and Wu, G. (2009). High fat feeding and dietary L-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue. *Amino Acids* 37, 187–198.
- Jobgen, W.S., Fried, S.K., Fu, W.J., Meininger, C.J., and Wu, G. (2006). Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 17, 571–588.
- Joffin, N., Niang, F., Forest, C., and Jaubert, A.-M. (2012). Is there NO help for leptin? *Biochimie* 94, 2104–2110.
- Jourdan, M., Cynober, L., Moinard, C., Blanc, M.C., Neveux, N., De Bandt, J.P., and Aussel, C. (2008). Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats: in vivo and ex vivo experiments using a model of isolated perfused liver. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R748–R755.
- Kalaria, R.N., Maestre, G.E., Arizaga, R., Friedland, R.P., Galasko, D., Hall, K., Luchsinger, J.A., Ogunniyi, A., Perry, E.K., Potocnik, F., et al. (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol.* 7, 812–826.
- Kang, H.W., Kim, D., Kim, H.J., Kim, C.H., Kim, Y.S., Park, M.J., Kim, J.S., Cho, S.-H., Sung, M.-W., Jung, H.C., et al. (2010). Visceral obesity and insulin resistance as risk factors for colorectal adenoma: a cross-sectional, case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 178–187.
- Kania, D.M., Binkley, N., Checovich, M., Havighurst, T., Schilling, M., and Ershler, W.B. (1995). Elevated plasma levels of interleukin-6 in postmenopausal women do not correlate with bone density. *J. Am. Geriatr. Soc.* 43, 236–239.
- Kanner, J., Harel, S., and Granit, R. (1991). Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 130–136.
- Kaplan, M.S., Huguette, N., Newsom, J.T., McFarland, B.H., and Lindsay, J. (2003). Prevalence and correlates of overweight and obesity among older adults: findings from the Canadian National Population Health Survey. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 58, 1018–1030.
- Karamitri, A., Shore, A.M., Docherty, K., Speakman, J.R., and Lomax, M.A. (2009). Combinatorial transcription factor regulation of the cyclic AMP-response element on the Pgc-1alpha promoter in white 3T3-L1 and brown HIB-1B preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 20738–20752.

- Katsanos, C.S., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Aarsland, A., and Wolfe, R.R. (2006). A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E381–E387.
- Katsuki, A., Sumida, Y., Murashima, S., Murata, K., Takarada, Y., Ito, K., Fujii, M., Tsuchihashi, K., Goto, H., Nakatani, K., et al. (1998). Serum levels of tumor necrosis factor- α are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 859–862.
- Kawakami, M., Murase, T., Ogawa, H., Ishibashi, S., Mori, N., Takaku, F., and Shibata, S. (1987). Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* *101*, 331–338.
- Kikuchi-Utsumi, K., Gao, B., Ohinata, H., Hashimoto, M., Yamamoto, N., and Kuroshima, A. (2002). Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *282*, R623–R626.
- Kim, F., Pham, M., Maloney, E., Rizzo, N.O., Morton, G.J., Wisse, B.E., Kirk, E.A., Chait, A., and Schwartz, M.W. (2008). Vascular Inflammation, Insulin Resistance, and Reduced Nitric Oxide Production Precede the Onset of Peripheral Insulin Resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1982–1988.
- Kim, J.-Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., et al. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *117*, 2621–2637.
- Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2006). Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* *136*, 227S – 31S.
- Kissebah, A.H., Freedman, D.S., and Peiris, A.N. (1989). Health risks of obesity. *Med. Clin. North Am.* *73*, 111–138.
- Kopecky, J., Clarke, G., Enerbäck, S., Spiegelman, B., and Kozak, L.P. (1995). Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the α P2 gene promoter prevents genetic obesity. *J. Clin. Invest.* *96*, 2914–2923.
- Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A.W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *120*, 3466–3479.
- Kregel, K.C., and Zhang, H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *292*, R18–R36.
- Kuhn, E., Binart, N., and Lombès, M. (2012). Brun, blanc, beige : la couleur du gras et nouvelles perspectives thérapeutiques de l'obésité.... *Ann. Endocrinol.* *73*, S2–S8.
- Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab.* *23*, 435–443.
- Lafontan, M. (2006). Activités endocrines de l'adipocyte. L'obésité Un Problème D'actualité Une Quest. D'avenir» Colloq. L'Institut Servier Elsevier SAS Paris 37–53.

- Lafontan, M., and Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* *24*, 276–283.
- Langin, D. (2006). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *53*, 482–491.
- Langin, D. (2010). Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1801*, 372–376.
- Langin, D., Tavernier, G., and Lafontan, M. (1995). Regulation of beta 3-adrenoceptor expression in white fat cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *9*, 97–106.
- Lanthier, N., and Leclercq, I.A. (2014). Adipose tissues as endocrine target organs. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *28*, 545–558.
- Lapidus, L., Bengtsson, C., Larsson, B., Pennert, K., Rybo, E., and Sjöström, L. (1984). Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* *289*, 1257–1261.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* *30*, 294–309.
- Larrouy, D., Vidal, H., Andreelli, F., Laville, M., and Langin, D. (1999). Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *23*, 1327–1332.
- Larsson, S.C., and Wolk, A. (2007). Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Clin. Nutr.* *86*, 556–565.
- Larsson, B., Bengtsson, C., Björntorp, P., Lapidus, L., Sjöström, L., Svärdsudd, K., Tibblin, G., Wedel, H., Welin, L., and Wilhelmsen, L. (1992). Is abdominal body fat distribution a major explanation for the sex difference in the incidence of myocardial infarction? The study of men born in 1913 and the study of women, Göteborg, Sweden. *Am. J. Epidemiol.* *135*, 266–273.
- Lee, H.-C., and Wei, Y.-H. (2012). Mitochondria and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* *942*, 311–327.
- Lee, C.G., Carr, M.C., Murdoch, S.J., Mitchell, E., Woods, N.F., Wener, M.H., Chandler, W.L., Boyko, E.J., and Brunzell, J.D. (2009). Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: a prospective study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1104–1110.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., and Unger, R.H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 10878–10882.
- Lee, Y., Yu, X., Gonzales, F., Mangelsdorf, D.J., Wang, M.-Y., Richardson, C., Witters, L.A., and Unger, R.H. (2002). PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11848–11853.

- Lee, Y.-H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* *15*, 480–491.
- Lemieux, I., Pascot, A., Prud'homme, D., Alméras, N., Bogaty, P., Nadeau, A., Bergeron, J., and Després, J.P. (2001). Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *21*, 961–967.
- Lemieux, S., Prud'homme, D., Bouchard, C., Tremblay, A., and Després, J.P. (1993). Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am. J. Clin. Nutr.* *58*, 463–467.
- Lever, M., and Slow, S. (2010). The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin. Biochem.* *43*, 732–744.
- Ley, C.J., Lees, B., and Stevenson, J.C. (1992). Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am. J. Clin. Nutr.* *55*, 950–954.
- Li, P., Zhu, Z., Lu, Y., and Granneman, J.G. (2005). Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *289*, E617–E626.
- Lim, S., Kim, J.H., Yoon, J.W., Kang, S.M., Choi, S.H., Park, Y.J., Kim, K.W., Lim, J.Y., Park, K.S., and Jang, H.C. (2010). Sarcopenic obesity: prevalence and association with metabolic syndrome in the Korean Longitudinal Study on Health and Aging (KLoSHA). *Diabetes Care* *33*, 1652–1654.
- Liu, V.W.T., and Huang, P.L. (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc. Res.* *77*, 19–29.
- Loncar, D. (1991). Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res.* *266*, 149–161.
- Lönnqvist, F., Krief, S., Strosberg, A.D., Nyberg, S., Emorine, L.J., and Arner, P. (1993). Evidence for a functional beta 3-adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.* *110*, 929–936.
- Lönnqvist, F., Thöme, A., Nilsell, K., Hoffstedt, J., and Arner, P. (1995). A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. *J. Clin. Invest.* *95*, 1109–1116.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Lowell, B.B., S-Susulic, V., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., and Flier, J.S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* *366*, 740–742.
- Lucotti, P., Setola, E., Monti, L.D., Galluccio, E., Costa, S., Sandoli, E.P., Fermo, I., Rabaiotti, G., Gatti, R., and Piatti, P. (2006). Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E906–E912.
- De Luis, D., Izaola, O., De la Fuente, B., and Aller, R. (2014). Effect of L-arginine supplementation on insulin resistance and adipocytokines levels in head and neck cancer non diabetic patients after surgery. *Nutr. Hosp.* *30*, 870–875.

- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* *117*, 175–184.
- Lynch, C.J., Patson, B.J., Anthony, J., Vaval, A., Jefferson, L.S., and Vary, T.C. (2002). Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *283*, E503–E513.
- Macaulay, R., Akbar, A.N., and Henson, S.M. (2013). The role of the T cell in age-related inflammation. *Age Dordr. Neth.* *35*, 563–572.
- Macotela, Y., Emanuelli, B., Bång, A.M., Espinoza, D.O., Boucher, J., Beebe, K., Gall, W., and Kahn, C.R. (2011). Dietary Leucine - An Environmental Modifier of Insulin Resistance Acting on Multiple Levels of Metabolism. *PLoS ONE* *6*, e21187.
- Maeda, N., Funahashi, T., and Shimomura, I. (2008). Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol.* *38* Metab.
- Maggio, M., Basaria, S., Ceda, G.P., Ble, A., Ling, S.M., Bandinelli, S., Valenti, G., and Ferrucci, L. (2005). The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J. Endocrinol. Invest.* *28*, 116–119.
- Maggio, M., Basaria, S., Ble, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Ceda, G.P., Valenti, G., Ling, S.M., and Ferrucci, L. (2006). Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 345–347.
- Mahabadi, A.A., Massaro, J.M., Rosito, G.A., Levy, D., Murabito, J.M., Wolf, P.A., O'Donnell, C.J., Fox, C.S., and Hoffmann, U. (2009). Association of pericardial fat, intrathoracic fat, and visceral abdominal fat with cardiovascular disease burden: the Framingham Heart Study. *Eur. Heart J.* *30*, 850–856.
- De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., and Ginaldi, L. (2005). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* *579*, 2035–2039.
- Matsuzawa, Y. (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett.* *580*, 2917–2921.
- De Matteis, R., Arch, J.R.S., Petroni, M.L., Ferrari, D., Cinti, S., and Stock, M.J. (2002). Immunohistochemical identification of the beta(3)-adrenoceptor in intact human adipocytes and ventricular myocardium: effect of obesity and treatment with ephedrine and caffeine. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *26*, 1442–1450.
- Mattsson, C., and Olsson, T. (2007). Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Curr. Med. Chem.* *14*, 2918–2924.
- Mazzucotelli, A., Viguerie, N., Tiraby, C., Annicotte, J.-S., Mairal, A., Klimcakova, E., Lepin, E., Delmar, P., Dejean, S., Tavernier, G., et al. (2007). The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes. *Diabetes* *56*, 2467–2475.

- McDonald, R.B., Horwitz, B.A., Hamilton, J.S., and Stern, J.S. (1988). Cold- and norepinephrine-induced thermogenesis in younger and older Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* *254*, R457–R462.
- McDonald, R.B., Day, C., Carlson, K., Stern, J.S., and Horwitz, B.A. (1989). Effect of age and gender on thermoregulation. *Am. J. Physiol.* *257*, R700–R704.
- McKnight, J.R., Satterfield, M.C., Jobgen, W.S., Smith, S.B., Spencer, T.E., Meininger, C.J., McNeal, C.J., and Wu, G. (2010). Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids* *39*, 349–357.
- Meek, S.E., Nair, K.S., and Jensen, M.D. (1999). Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism. *Diabetes* *48*, 10–14.
- Mehebig, N., Jaubert, A.-M., Sabourault, D., Giudicelli, Y., and Ribière, C. (2005). Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *289*, C379–C387.
- Moinard, C., Le Plénier, S., Cynober, L., and Raynaud-Simon, A. (2009). Long-term effect of citrulline supplementation in healthy aged rats : effect on body composition. *Clin. Nutr. Suppl.* *0025* *4*, 12.
- Moinard, C., Le Plénier, S., Noirez, P., Morio, B., Bonnefont-Rousselot, D., Kharchi, C., Ferry, A., Neveux, N., Cynober, L., and Raynaud-Simon, A. (2014). Citrulline supplementation induces changes in body composition and limits metabolic alterations in healthy aged rats. *J. Nutr.*
- Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Nelson, D.E., Engelgau, M.M., Vinicor, F., and Marks, J.S. (2000). Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* *23*, 1278–1283.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O’Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 683–765.
- Müller, D.M., Seim, H., Kiess, W., Löster, H., and Richter, T. (2002). Effects of oral L-carnitine supplementation on in vivo long-chain fatty acid oxidation in healthy adults. *Metabolism* *51*, 1389–1391.
- Myre, M., and Imbeault, P. (2014). Persistent organic pollutants meet adipose tissue hypoxia: does cross-talk contribute to inflammation during obesity? *Obes. Rev.* *15*, 19–28.
- Nagashima, T., Ohinata, H., and Kuroshima, A. (1994). Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sci.* *54*, 17–25.
- Nair, K.S. (2005). Aging muscle. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 953–963.
- Nakamura, T., Tokunaga, K., Shimomura, I., Nishida, M., Yoshida, S., Kotani, K., Islam, A.H., Keno, Y., Kobatake, T., and Nagai, Y. (1994). Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis* *107*, 239–246.
- Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E.M., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2005). PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* *1740*, 293–304.

- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* *480*, 104–108.
- Niang, F., Benelli, C., Ribière, C., Collinet, M., Mehebi-Mojaat, N., Penot, G., Forest, C., and Jaubert, A.-M. (2011). Leptin induces nitric oxide-mediated inhibition of lipolysis and glyceroneogenesis in rat white adipose tissue. *J. Nutr.* *141*, 4–9.
- Nishimura, J., Masaki, T., Arakawa, M., Seike, M., and Yoshimatsu, H. (2010). Isoleucine Prevents the Accumulation of Tissue Triglycerides and Upregulates the Expression of PPAR α and Uncoupling Protein in Diet-Induced Obese Mice. *J. Nutr.* *140*, 496–500.
- Nisoli, E., Tonello, C., Briscini, L., and Carruba, M.O. (1997). Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology* *138*, 676–682.
- Nitori, N., Hasegawa, H., Ishii, Y., Endo, T., and Kitagawa, Y. (2009). Impact of visceral obesity on short-term outcome after laparoscopic surgery for colorectal cancer: a single Japanese center study. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* *19*, 324–327.
- Nolan, C.J., Leahy, J.L., Delghingaro-Augusto, V., Moibi, J., Soni, K., Peyot, M.-L., Fortier, M., Guay, C., Lamontagne, J., Barbeau, A., et al. (2006). Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* *49*, 2120–2130.
- Noland, R.C., Koves, T.R., Seiler, S.E., Lum, H., Lust, R.M., Ilkayeva, O., Stevens, R.D., Hegardt, F.G., and Muoio, D.M. (2009). Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J. Biol. Chem.* *284*, 22840–22852.
- Norman, D.C., Grahn, D., and Yoshikawa, T.T. (1985). Fever and aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* *33*, 859–863.
- Nye, C., Kim, J., Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2008). Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *19*, 356–361.
- Ohashi, K., Parker, J.L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J.A., Gokce, N., Pedersen, A.A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., et al. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* *285*, 6153–6160.
- Ohashi, K., Ouchi, N., and Matsuzawa, Y. (2012). Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie* *94*, 2137–2142.
- Olli, K., Lahtinen, S., Rautonen, N., and Tiihonen, K. (2013). Betaine reduces the expression of inflammatory adipokines caused by hypoxia in human adipocytes. *Br. J. Nutr.* *109*, 43–49.
- Osowska, S., Moinard, C., Neveux, N., Loï, C., and Cynober, L. (2004). Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut* *53*, 1781–1786.
- Osowska, S., Duchemann, T., Walrand, S., Paillard, A., Boirie, Y., Cynober, L., and Moinard, C. (2006). Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E582–E586.

- Otero, M., Gomez Reino, J.J., and Gualillo, O. (2003). Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: in vitro effect of leptin and interferon-gamma in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis Rheum.* *48*, 404–409.
- Otero, M., Lago, R., Lago, F., Reino, J.J.G., and Gualillo, O. (2005). Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res. Ther.* *7*, R581–R591.
- Ozaki, K., Sano, T., Tsuji, N., Matsuura, T., and Narama, I. (2011). Carnitine is necessary to maintain the phenotype and function of brown adipose tissue. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *91*, 704–710.
- Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Zhang, X.-J., Volpi, E., Wolf, S.E., Aarsland, A., Ferrando, A.A., and Wolfe, R.R. (2004). Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E321–E328.
- Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Katsanos, C.S., Zhang, X.-J., and Wolfe, R.R. (2006). Differential stimulation of muscle protein synthesis in elderly humans following isocaloric ingestion of amino acids or whey protein. *Exp. Gerontol.* *41*, 215–219.
- Palin, S.L., McTernan, P.G., Anderson, L.A., Sturdee, D.W., Barnett, A.H., and Kumar, S. (2003). 17Beta-estradiol and anti-estrogen ICI:compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism.* *52*, 383–388.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Stojanovski, D., and Ryan, M.T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell. Signal.* *23*, 1534–1545.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* *327*, 524–526.
- Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W., and Ye, J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *295*, E313–E322.
- Park, C.B., and Larsson, N.-G. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* *193*, 809–818.
- Passeri, G., Girasole, G., Jilka, R.L., and Manolagas, S.C. (1993). Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* *133*, 822–828.
- Patel, R.P., Levonen, A., Crawford, J.H., and Darley-Usmar, V.M. (2000). Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* *47*, 465–474.
- Patti, M.-E., and Corvera, S. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* *31*, 364–395.
- Pedersen, S.B., Hansen, P.S., Lund, S., Andersen, P.H., Odgaard, A., and Richelsen, B. (1996). Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* *26*, 262–269.
- Peirce, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2014). The different shades of fat. *Nature* *510*, 76–83.

- Peng, Y., Liu, J., Tang, Y., Liu, J., Han, T., Han, S., Li, H., Hou, C., Liu, J., and Long, J. (2014). High-Fat-Diet-Induced Weight Gain Ameliorates Bone Loss without Exacerbating A β PP Processing and Cognition in Female APP/PS1 Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 225.
- Pénicaud, L., Meillon, S., and Brondel, L. (2012). Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* 94, 2069–2074.
- Peraldi, P., and Spiegelman, B.M. (1997). TNF-alpha: molecular tie between obesity and insulin resistance. *Journ. Annu. Diabétologie Hôtel-Dieu* 149–159.
- Peranzoni, E., Marigo, I., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Taschin, E., Mantelli, B., Bronte, V., and Zanovello, P. (2007). Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 212, 795–812.
- Petronini, P.G., De Angelis, E.M., Borghetti, P., Borghetti, A.F., and Wheeler, K.P. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem. J.* 282 (Pt 1), 69–73.
- Pfeilschifter, J., Köditz, R., Pfohl, M., and Schatz, H. (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr. Rev.* 23, 90–119.
- Phillips, L.K., and Prins, J.B. (2008). The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 10, 156–164.
- Pischon, T., Nöthlings, U., and Boeing, H. (2008). Obesity and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 128–145.
- Poonpet, T. (2014). Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J. Orthop.* 5, 319.
- Porter, S.A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., O'Donnell, C.J., and Fox, C.S. (2009). Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot? *Diabetes Care* 32, 1068–1075.
- Pottratz, S.T., Bellido, T., Mocharla, H., Crabb, D., and Manolagas, S.C. (1994). 17 beta-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 93, 944–950.
- Prada, P.O., Hirabara, S.M., de Souza, C.T., Schenka, A.A., Zecchin, H.G., Vassallo, J., Velloso, L.A., Carneiro, E., Carvalheira, J.B.C., Curi, R., et al. (2007). L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia* 50, 1949–1959.
- Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hämmerle, G., and Zechner, R. (2002). Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 471–481.
- Prentice, A.M., and Jebb, S.A. (2001). Beyond body mass index. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 2, 141–147.
- Presle, N., Pottie, P., Dumond, H., Guillaume, C., Lapique, F., Pallu, S., Mainard, D., Netter, P., and Terlain, B. (2006). Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 14, 690–695.

- Proud, C.G. (2007). Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 1187–1190.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* *92*, 829–839.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4003–4008.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* *266*, 4244–4250.
- Ray, A., Prefontaine, K.E., and Ray, P. (1994). Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 12940–12946.
- Reilly, S.M., Chiang, S.-H., Decker, S.J., Chang, L., Uhm, M., Larsen, M.J., Rubin, J.R., Mowers, J., White, N.M., Hochberg, I., et al. (2013). An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK- ϵ improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat. Med.* *19*, 313–321.
- Reshef, L., and Hanson, R.W. (1972). The interaction of catecholamines and adrenal corticosteroids in the induction of phosphopyruvate carboxylase in rat liver and adipose tissue. *Biochem. J.* *127*, 809–818.
- Reshef, L., Hanson, R.W., and Ballard, F.J. (1969). Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate. Adaptive changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver. *J. Biol. Chem.* *244*, 1994–2001.
- Reynolds, S.L., Saito, Y., and Crimmins, E.M. (2005). The impact of obesity on active life expectancy in older American men and women. *The Gerontologist* *45*, 438–444.
- Rhoads, J.M., Plunkett, E., Galanko, J., Lichtman, S., Taylor, L., Maynor, A., Weiner, T., Freeman, K., Guarisco, J.L., and Wu, G.Y. (2005). Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. *J. Pediatr.* *146*, 542–547.
- Ribiere, C., Jaubert, A.M., Gaudiot, N., Sabourault, D., Marcus, M.L., Boucher, J.L., Denis-Henriot, D., and Giudicelli, Y. (1996). White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *222*, 706–712.
- Ribière, C., Jaubert, A.-M., Sabourault, D., Lacasa, D., and Giudicelli, Y. (2002). Insulin stimulates nitric oxide production in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *291*, 394–399.
- Richards, M.R., Harp, J.D., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2006). Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J. Lipid Res.* *47*, 665–672.

- Ricquier, D., Bouillaud, F., Toumelin, P., Mory, G., Bazin, R., Arch, J., and Pénicaud, L. (1986). Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J. Biol. Chem.* *261*, 13905–13910.
- Rieu, I., Balage, M., Sornet, C., Debras, E., Ripes, S., Rochon-Bonhomme, C., Pouyet, C., Grizard, J., and Dardevet, D. (2007). Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *23*, 323–331.
- Rogers, N.H., and Smith, R.G. (2012). Brown-to-white transition in subcutaneous fat: linking aging and disease. *Aging* *4*, 728–729.
- Rogers, N.H., Landa, A., Park, S., and Smith, R.G. (2012). Aging leads to a programmed loss of brown adipocytes in murine subcutaneous white adipose tissue. *Aging Cell* *11*, 1074–1083.
- Roh, C., Han, J., Tzatsos, A., and Kandror, K.V. (2003). Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E322–E330.
- Rose, D.P., Haffner, S.M., and Baillargeon, J. (2007). Adiposity, the metabolic syndrome, and breast cancer in African-American and white American women. *Endocr. Rev.* *28*, 763–777.
- Rose, G., Crocco, P., D'Aquila, P., Montesanto, A., Bellizzi, D., and Passarino, G. (2011a). Two variants located in the upstream enhancer region of human UCP1 gene affect gene expression and are correlated with human longevity. *Exp. Gerontol.* *46*, 897–904.
- Rose, G., Crocco, P., De Rango, F., Montesanto, A., and Passarino, G. (2011b). Further Support to the Uncoupling-to-Survive Theory: The Genetic Variation of Human UCP Genes Is Associated with Longevity. *PLoS ONE* *6*, e29650.
- Rossi, A.P., Fantin, F., Zamboni, G.A., Mazzali, G., Rinaldi, C.A., Del Giglio, M., Di Francesco, V., Barillari, M., Pozzi Mucelli, R., and Zamboni, M. (2011). Predictors of ectopic fat accumulation in liver and pancreas in obese men and women. *Obes. Silver Spring Md* *19*, 1747–1754.
- Ryan, A.M., Duong, M., Healy, L., Ryan, S.A., Parekh, N., Reynolds, J.V., and Power, D.G. (2011). Obesity, metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma: epidemiology, etiology and new targets. *Cancer Epidemiol.* *35*, 309–319.
- Saisho, Y., Butler, A.E., Meier, J.J., Monchamp, T., Allen-Auerbach, M., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2007). Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clin. Anat. N. Y. N* *20*, 933–942.
- Sakamoto, Y., Harada, T., Horie, S., Iba, Y., Taniguchi, F., Yoshida, S., Iwabe, T., and Terakawa, N. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-kappa B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 730–735.

- Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., and Suuronen, T. (2008). Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res. Rev.* 7, 83–105.
- Santarpia, L., Catanzano, F., Ruoppolo, M., Alfonsi, L., Vitale, D.F., Pecce, R., Pasanisi, F., Contaldo, F., and Salvatore, F. (2008). Citrulline blood levels as indicators of residual intestinal absorption in patients with short bowel syndrome. *Ann. Nutr. Metab.* 53, 137–142.
- Sarmiento, U., Benson, B., Kaufman, S., Ross, L., Qi, M., Scully, S., and DiPalma, C. (1997). Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissues of C57BL/6 mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 77, 243–256.
- Sawada, M., Suzumura, A., and Marunouchi, T. (1992). TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res.* 583, 296–299.
- Scarpace, P.J., Dove, J., and Matheny, M. (1996). Effects of age on beta adrenergic subtype activation of adenylyl cyclase in brown adipose tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 213, 262–267.
- Scarpace, P.J., Nicolson, M., and Matheny, M. (1998). UCP2, UCP3 and leptin gene expression: modulation by food restriction and leptin. *J. Endocrinol.* 159, 349–357.
- Schapira, D.V., Clark, R.A., Wolff, P.A., Jarrett, A.R., Kumar, N.B., and Aziz, N.M. (1994). Visceral obesity and breast cancer risk. *Cancer* 74, 632–639.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746–26749.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6, 38–54.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.
- She, P., Van Horn, C., Reid, T., Hutson, S.M., Cooney, R.N., and Lynch, C.J. (2007). Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1552–E1563.
- Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 171–176.
- Simopoulou, T., Malizos, K.N., Iliopoulos, D., Stefanou, N., Papatheodorou, L., Ioannou, M., and Tsezou, A. (2007). Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 15, 872–883.
- Simpson, E.R., and Brown, K.A. (2013). Obesity and breast cancer: role of inflammation and aromatase. *J. Mol. Endocrinol.* 51, T51–T59.

- Singh, T., and Newman, A.B. (2011). Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res. Rev.* *10*, 319–329.
- Sjöström, L., Narbro, K., Sjöström, C.D., Karason, K., Larsson, B., Wedel, H., Lystig, T., Sullivan, M., Bouchard, C., Carlsson, B., et al. (2007). Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N. Engl. J. Med.* *357*, 741–752.
- Sjöström, L., Gummesson, A., Sjöström, C.D., Narbro, K., Peltonen, M., Wedel, H., Bengtsson, C., Bouchard, C., Carlsson, B., Dahlgren, S., et al. (2009). Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol.* *10*, 653–662.
- Solomon, A.M., and Bouloux, P.M.G. (2006). Modifying muscle mass - the endocrine perspective. *J. Endocrinol.* *191*, 349–360.
- Souza, J.M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Obin, M., Ara, J., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. (2000). Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* *380*, 360–366.
- Sperka, T., Wang, J., and Rudolph, K.L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 579–590.
- Spitsberg, V.L., Matitashvili, E., and Gorewit, R.C. (1995). Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. *Eur. J. Biochem. FEBS* *230*, 872–878.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* *258*, 1898–1902.
- Stevens, J., Truesdale, K.P., Katz, E.G., and Cai, J. (2008). Impact of body mass index on incident hypertension and diabetes in Chinese Asians, American Whites, and American Blacks: the People's Republic of China Study and the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am. J. Epidemiol.* *167*, 1365–1374.
- Stremmel, W. (1988). Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. *J. Clin. Invest.* *81*, 844–852.
- Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* *56*, 2910–2918.
- Sun, X., and Zemel, M.B. (2007). Leucine and calcium regulate fat metabolism and energy partitioning in murine adipocytes and muscle cells. *Lipids* *42*, 297–305.
- Szlosarek, P., Charles, K.A., and Balkwill, F.R. (2006). Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *42*, 745–750.
- Szulc, P., Duboeuf, F., Marchand, F., and Delmas, P.D. (2004). Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. *Am. J. Clin. Nutr.* *80*, 496–503.
- Takiguchi, M., and Mori, M. (1995). Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochem. J.* *312* (Pt 3), 649–659.

- Tamura, Y., Ogihara, T., Uchida, T., Ikeda, F., Kumashiro, N., Nomiya, T., Sato, F., Hirose, T., Tanaka, Y., Mochizuki, H., et al. (2007). Amelioration of glucose tolerance by hepatic inhibition of nuclear factor kappaB in db/db mice. *Diabetologia* *50*, 131–141.
- Tan, B., Yin, Y., Liu, Z., Tang, W., Xu, H., Kong, X., Li, X., Yao, K., Gu, W., Smith, S.B., et al. (2011). Dietary L-arginine supplementation differentially regulates expression of lipid-metabolic genes in porcine adipose tissue and skeletal muscle. *J. Nutr. Biochem.* *22*, 441–445.
- Tan, B., Li, X., Yin, Y., Wu, Z., Liu, C., Tekwe, C.D., and Wu, G. (2012). Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *17*, 2237–2246.
- Tang, Y., Reay, D.P., Salay, M.N., Mi, M.Y., Clemens, P.R., Guttridge, D.C., Robbins, P.D., Huard, J., and Wang, B. (2010). Inhibition of the IKK/NF- κ B pathway by AAV gene transfer improves muscle regeneration in older mdx mice. *Gene Ther.* *17*, 1476–1483.
- Tang-Péronard, J.L., Andersen, H.R., Jensen, T.K., and Heitmann, B.L. (2011). Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *12*, 622–636.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* *83*, 1263–1271.
- Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* *93*, 359–404.
- Tchkonia, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Thomou, T., DePonte, M., Koo, A., Forse, R.A., Chinnappan, D., Martin-Ruiz, C., von Zglinicki, T., et al. (2006). Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* *55*, 2571–2578.
- Timmons, J.A., and Pedersen, B.K. (2009). The importance of brown adipose tissue. *N. Engl. J. Med.* *361*, 415–416; author reply 418–421.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., et al. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4401–4406.
- Tiraby, C., and Langin, D. (2003). Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *14*, 439–441.
- Tordjman, J., Khazen, W., Antoine, B., Chauvet, G., Quette, J., Fouque, F., Beale, E.G., Benelli, C., and Forest, C. (2003). Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie* *85*, 1213–1218.
- Toth, M.J., Tchernof, A., Sites, C.K., and Poehlman, E.T. (2000). Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *904*, 502–506.

- Tran, K.-V., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M.C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., Sbarbati, A., et al. (2012). The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab.* *15*, 222–229.
- Tsang, T.W., Briody, J., Kohn, M., Chow, C.M., and Singh, M.F. (2009). Abdominal fat assessment in adolescents using dual-energy X-ray absorptiometry. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* *22*, 781–794.
- Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* *454*, 1000–1004.
- Ueno, N., Oh-ishi, S., Segawa, M., Nishida, M., Fukuwatari, Y., Kizaki, T., Ookawara, T., and Ohno, H. (1998). Effect of age on brown adipose tissue activity in the obese (ob/ob) mouse. *Mech. Ageing Dev.* *100*, 67–76.
- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* *389*, 610–614.
- Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., Palomba, L., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., et al. (2006). TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J. Clin. Invest.* *116*, 2791–2798.
- Valle, A., Guevara, R., García-Palmer, F.J., Roca, P., and Oliver, J. (2008). Caloric restriction retards the age-related decline in mitochondrial function of brown adipose tissue. *Rejuvenation Res.* *11*, 597–604.
- Vernochet, C., and Kahn, C.R. (2012). Mitochondria, obesity and aging. *Aging* *4*, 859–860.
- Vianna, D., Resende, G.F.T., Torres-Leal, F.L., Pantaleão, L.C., Donato Jr., J., and Tirapegui, J. (2012). Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats. *Nutrition* *28*, 182–189.
- Villarroya, F., Iglesias, R., and Giral, M. (2007). PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res.* *2007*, 74364.
- Visser, M., Pahor, M., Taaffe, D.R., Goodpaster, B.H., Simonsick, E.M., Newman, A.B., Nevitt, M., and Harris, T.B. (2002). Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *57*, M326–M332.
- Vona-Davis, L., Howard-McNatt, M., and Rose, D.P. (2007). Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *8*, 395–408.
- Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Knowles, R.G., and Moilanen, E. (2007). The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand. J. Rheumatol.* *36*, 247–258.
- Wang, H., and Eckel, R.H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *297*, E271–E288.

- Wang, J.C., and Bennett, M. (2012). Aging and Atherosclerosis Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence. *Circ. Res.* *111*, 245–259.
- Wang, Z., Yao, T., Pini, M., Zhou, Z., Fantuzzi, G., and Song, Z. (2010). Betaine improved adipose tissue function in mice fed a high-fat diet: a mechanism for hepatoprotective effect of betaine in nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G634–G642.
- Wannamethee, S.G., Shaper, A.G., Durrington, P.N., and Perry, I.J. (1998). Hypertension, serum insulin, obesity and the metabolic syndrome. *J. Hum. Hypertens.* *12*, 735–741.
- Watt, M.J., and Steinberg, G.R. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem. J.* *414*, 313–325.
- Wei, J., Xu, H., Davies, J.L., and Hemmings, G.P. (1992). Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci.* *51*, 1953–1956.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1796–1808.
- White, P.J., Charbonneau, A., Cooney, G.J., and Marette, A. (2010). Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E868–E878.
- Williams, L.M., Lali, F., Willetts, K., Balague, C., Godessart, N., Brennan, F., Feldmann, M., and Foxwell, B.M.J. (2008). Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF-kappaB. *Mol. Immunol.* *45*, 2446–2454.
- Wilson, P.W.F., D'Agostino, R.B., Sullivan, L., Parise, H., and Kannel, W.B. (2002). Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch. Intern. Med.* *162*, 1867–1872.
- Woo, D.K., Green, P.D., Santos, J.H., D'Souza, A.D., Walther, Z., Martin, W.D., Christian, B.E., Chandel, N.S., and Shadel, G.S. (2012). Mitochondrial genome instability and ROS enhance intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice. *Am. J. Pathol.* *180*, 24–31.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012a). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* *150*, 366–376.
- Wu, Z., Satterfield, M.C., Bazer, F.W., and Wu, G. (2012b). Regulation of brown adipose tissue development and white fat reduction by L-arginine. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *15*, 529–538.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *112*, 1821–1830.
- Xue, B., Rim, J.-S., Hogan, J.C., Coulter, A.A., Koza, R.A., and Kozak, L.P. (2007). Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J. Lipid Res.* *48*, 41–51.

- Yamamoto, S., Nakagawa, T., Matsushita, Y., Kusano, S., Hayashi, T., Irokawa, M., Aoki, T., Korogi, Y., and Mizoue, T. (2010). Visceral fat area and markers of insulin resistance in relation to colorectal neoplasia. *Diabetes Care* 33, 184–189.
- Yamashita, H., Sato, Y., and Mori, N. (1999). Difference in induction of uncoupling protein genes in adipose tissues between young and old rats during cold exposure. *FEBS Lett.* 458, 157–161.
- Yamauchi, T., and Kadowaki, T. (2013). Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab.* 17, 185–196.
- Yang, J., Reshef, L., Cassuto, H., Aleman, G., and Hanson, R.W. (2009). Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* 284, 27031–27035.
- Yehuda-Shnaidman, E., Buehrer, B., Pi, J., Kumar, N., and Collins, S. (2010). Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis. *Diabetes* 59, 2474–2483.
- Yoneshiro, T., Ogawa, T., Okamoto, N., Matsushita, M., Aita, S., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. (2013). Impact of UCP1 and β 3AR gene polymorphisms on age-related changes in brown adipose tissue and adiposity in humans. *Int. J. Obes.* 2005 37, 993–998.
- Zamboni, M., Mazzali, G., Fantin, F., Rossi, A., and Di Francesco, V. (2008). Sarcopenic obesity: A new category of obesity in the elderly. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 388–395.
- Zamboni, M., Rossi, A.P., Fantin, F., Zamboni, G., Chirumbolo, S., Zoico, E., and Mazzali, G. (2013). Adipose tissue, diet and aging. *Mech. Ageing Dev.* 136-137, 129–137.
- Zeanandin, G., Balage, M., Schneider, S.M., Dupont, J., Hebuterne, X., Mothe-Satney, I., and Dardevet, D. (2012). Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *Age* 34, 371–387.
- Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid Res.* 50, 3–21.
- Zhang, Y., Guo, K., LeBlanc, R.E., Loh, D., Schwartz, G.J., and Yu, Y.-H. (2007). Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* 56, 1647–1654.
- Zhou, S.L., Stump, D., Sorrentino, D., Potter, B.J., and Berk, P.D. (1992). Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 267, 14456–14461.
- Zhou, Y.T., Wang, Z.W., Higa, M., Newgard, C.B., and Unger, R.H. (1999). Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2391–2395.
- Zhu, J., Wang, K.Z.Q., and Chu, C.T. (2013). After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy* 9, 1663–1676.
- Zimmerman, A.W., and Veerkamp, J.H. (2002). New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 1096–1116.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et al. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383–1386.

ANNEXE 1: Liste des communications

Publications

1. Joffin N, Niang F, Forest C, Jaubert A-M (2012) Is there NO help for leptin? *Biochimie* 94: 2104–2110. doi:10.1016/j.biochi.2012.06.017.
2. Joffin N, Jaubert A-M, Durant S, Bastin J, De Bandt J-P, et al. (2014) Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats. *Mol Nutr Food Res*. 58: 1765-1775. doi:10.1002/mnfr.201400053.
3. Joffin N, Jaubert A-M, Durant S, Bastin J, De Bandt J-P, et al. (2014) Citrulline reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release in visceral adipose tissue from overweight rats. *Mol Nutr Food Res*. doi:10.1002/mnfr.201400507.
4. Joffin N, Jaubert A-M, Bamba J, Barouki R, Noirez P, Forest C (2014) Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats. *Adipocyte* (accepté).

Congrès

Congrès des Journées Francophones de Nutrition (JFN)

Reims, Décembre 2011 (Poster)

Lyon, Décembre 2012 (communication orale)

Bruxelles, Décembre 2014 (Poster)

Congrès de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire (SPTC)

Paris, Mai 2012 (Poster)

Congrès des jeunes chercheurs de l'Université Paris Descartes

Paris, Octobre 2012 (Poster)

Congrès international du Groupe d'étude et de recherche en lipidomique (GERLI)

Paris, Octobre 2012 (Communication orale)

Congrès FEBS-EMBO-SFBBM

Paris, Septembre 2014 (Poster)

Famlab (INSERM 1124)

Paris, Novembre 2014 (communication orale) **Prix de la meilleure présentation**

Divers :

Consultante Scientifique pour la société Newmed Publishing Services (2011-2013)

Diplôme Universitaire d'expérimentation animale (Janvier 2014)

Nouveau Chapitre de la Thèse-validation des compétences, avec l'ABG Intelligence, sous la tutelle d'Anne-Sophie Langevin (Janvier-Juin 2014)

Résumé :

L'obésité s'accompagne de pathologies comme le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, liées à des dérégulations métaboliques et endocriniennes du tissu adipeux blanc (TAB). Au cours du vieillissement, la perte de masse musculaire peut être associée à l'obésité et définit le concept d'obésité sarcopénique. Les traitements mis en œuvre pour contrecarrer ces pathologies n'ont qu'un succès très partiel. Il est donc opportun de développer des stratégies alternatives originales qui pourraient aboutir à des thérapies ciblées. Notre équipe étudie les régulations métaboliques du TAB, source majeure de stockage de l'énergie de l'organisme. Les triglycérides stockés sont libérés à jeun grâce à la lipolyse qui libère les acides gras non-estérifiés (AGNE) et le glycérol dans le sang, comme source d'énergie des autres tissus. En plus de la β -oxydation des AGNE, leur ré-estérification partielle intervient pour limiter leur libération lors de la lipolyse. La glycéronéogenèse est nécessaire à la ré-estérification en situation de jeûne. Des études préalables ont montré que l'administration de citrulline (CIT) pendant trois mois à des rats vieillissants induit une diminution d'environ 40% de la masse viscérale du TAB. Cet acide aminé non protéique est un complément alimentaire donné au cours du vieillissement ou à des sportifs pour augmenter la masse musculaire. Nous avons étudié les effets de la CIT sur des cultures d'explants de TAB de rats. *Dans la première partie de ce travail*, nous montrons que la CIT a un effet direct lipolytique et anti-glycéronogénique sur les explants des rats qu'ils soient jeunes ou âgés. Cependant, la libération des AGNE du TAB des rats jeunes est limitée par une augmentation de la capacité oxydative du tissu. Avec l'âge, la masse du TAB augmente en parallèle à l'augmentation d'un état pro-inflammatoire. Afin de comprendre l'influence de ces deux paramètres indépendamment de l'âge, nous avons étudié *dans la deuxième partie de ce travail*, les effets de la CIT sur les explants de TAB de rats jeunes soumis à un régime contrôle (CD) ou hyperlipidique (HFD). Nous observons une augmentation, induite par la CIT, de la lipolyse et de la capacité β -oxydative du TAB des rats quel que soit le régime, alors que la glycéronéogenèse est diminuée. Toutefois, les AGNE sont sélectivement libérés par le TAB de rats HFD, en relation avec une réduction drastique de leur ré-estérification. Le NO est un médiateur de ces effets. *Dans une troisième partie*, nous démontrons que la CIT agit directement sur le TAB de rats CD et HFD pour induire l'expression de la protéine découplante, UCP1, en lien avec le « brunissement » potentiel du TAB par cet acide aminé. Ces effets ne sont pas observés au sein du TAB des rats âgés. L'ensemble de nos résultats établit les bases pour de futures investigations visant à élucider les mécanismes par lesquels la CIT réduit la masse adipeuse et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour lutter contre le surpoids et l'obésité sarcopénique.

Mots clés : Citrulline, tissu adipeux, métabolisme, acides gras, lipolyse, glycéronéogenèse, ré-estérification, β -oxydation, UCP1, obésité, vieillissement.