



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Marine Coué

le vendredi 25 septembre 2015

Titre :

ROLE DES PEPTIDES NATRIURETIQUES DANS LA REGULATION DE
L'HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

INSERM, U1048, INSTITUT DES MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES (I2MC)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr Cédric Moro

Pr Dominique Langin

Jury :

Dr Jennifer Rieusset (rapporteur)

Dr Hélène Duez (rapporteur)

Dr Eric Hajdich (rapporteur)

Pr Atul Pathak (examineur)

Pr Max Lafontan (membre invité)

Dr Cédric Moro (directeur de thèse)

A tous les miens,

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »

Marie Curie

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier profondément mon directeur de thèse, le Dr **Cédric Moro**. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe, de ta *famille*. Bien que l'on ne se connaissait pas un mois avant le concours de l'école doctorale, en juin 2012, tu as visiblement cru en moi, je t'en suis très reconnaissante. Tu m'as appris énormément de choses et permis de travailler sur un sujet que j'ai adoré, que je vais lâcher avec regret et qui ouvre sur une multitude de futurs projets.

Je tiens ensuite à remercier le directeur de l'équipe et mon codirecteur de thèse le Pr **Dominique Langin**, sans qui ce travail n'aurait pas non plus pu voir le jour. Merci de nous permettre d'utiliser autant de techniques et d'outils différents allant de la cellule à la souris, cela est très enrichissant.

Merci aux différents membres de mon jury de thèse qui ont accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit de thèse : Dr **Jennifer Rieusset** (Rapporteur), Dr **Hélène Duez** (Rapporteur), Dr **Eric Hajdich** (Rapporteur), Pr **Atul Pathak** (Président du jury) et Pr **Max Lafontan** (Membre invité).

Dans la même veine, merci au Dr **Hervé Guillou** et au Pr **Christophe Magnan** qui ont constitué mon comité de thèse et dont les remarques constructives ont participé à la réussite de cette thèse.

Cette thèse est bien sûr le fruit de l'entraide de nombreuses personnes et je souhaite remercier en premier lieu les « musclés ». Merci à **Katie Louche** qui m'a formé aux pratiques du laboratoire à mes débuts, ton efficacité et ton savoir faire ont été d'une aide précieuse à l'aboutissement de ce projet (je suis sûre que les chercheurs du monde entier envient tes westerns blots !). Merci au Dr **Virginie Bourlier** pour tes discussions enrichissantes, tu auras toujours pris le temps de m'aider quand je criais à l'aide, en particulier pour mes présentations. Merci à **Claire Laurens**, ou devrais je dire Clairette, dont la bienveillance n'a d'égale que son amour du café (c'est dire !!!). Nos brunchs, nos sorties, nos discussions vont me manquer... Merci aux deux anciens thésards, les Dr **Isabelle Vila** et **Pierre Marie Badin** pour m'avoir également formé au début de mon doctorat et pour leurs sujets de conversation toujours rigolardes.

Merci bien évidemment à tous les membres de l'équipe 4, mon seul regret aura été de ne pas avoir fait plus connaissance avec certains d'entre vous. Merci à **Aline Mairal** pour m'avoir déjà supporté pendant un an et demi comme collègue de bureau et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions (pourtant nombreuses !). Merci au Dr **Geneviève Tavernier** pour ton expertise « animale » et ton aide à la confection de lignées mutantes. Merci à **Marie Adeline Marquès** qui dégage les ELISA plus vite que son ombre (tout comme les pinces à cheveux, GRRRR). Merci au Dr **Etienne Mouisel**, notamment pour m'avoir guidé lors de mes enseignements de TD et de TP « respi ». Merci au Dr **Nathalie Viguerie** qui répond toujours présente pour *désobscurcir* les statistiques et relire les manuscrits de thèse. Merci également à **Corinne Lefort**, après trois ans, tes éternuements me surprennent encore ! Merci au Dr **Valentin Barquiseau**

qui surclasse les bretons en certains traits de caractère, ce qui n'est pas peu dire... Merci aux Dr **Emilie Montastier** et **Jennifer Saussède** qui ont été des collègues de travail avec qui il est agréable de partager la pause déjeuner. Merci au Dr **Dominique Larrouy**, même si je dois dire que tes groins et tes oreilles de cochons à l'apéro me manqueront que très peu. Merci au Dr **Sylvie Caspar-Bauguil** pour ta gentillesse. Merci à **Balbine Roussel** et **Laurent Monbrun**, deux anciens collègues de bureau. Merci à **François Crampes**, une personne qui donne beaucoup, sans attendre en retour.

Merci aux thésardes/ex membre de l'équipe : **Diane Beuzelin** (qui ne sait pas qu'il faut faire 1000 km au jeu du 1000 bornes), **Pauline Morigny**, Dr **Marianne Houssier**, **Clairette** (encore ?!), **Lucile Mir** et **Véronika Mayerova**. Bien plus que des collègues de boulot, vous m'avez soutenu et apporté beaucoup de bonne humeur, je dirai même plus d'alacrité (tiens, un mot que Marianne pourra ajouter au mur de ses toilettes). J'espère sincèrement garder contact avec vous et jouer encore longtemps avec vous.

Une expérience importante aura été l'enseignement, une vraie chance à mes yeux. Merci à **Manolita Belliure** et à **Pascale Guillou** qui sont des aides précieuses pour la bonne réalisation des TP avec les étudiants. Merci aux différentes personnes qui m'ont fait confiance et m'ont délégué une partie de leurs cours : Pr **Claude Knauf**, Dr **Cédric Dray**, Pr **Michelle Gué** et le Pr **Anne Lorsignol**.

En plus de l'enseignement, j'ai également eu la chance d'accompagner des étudiants durant leur stage de Master comme c'est le cas de **Laëtitia Carrié**, **Hélène Clavel** et **Mickaël Pujo-Menjouet**. Vous m'avez non seulement aidé lors de ma thèse mais également permis d'apprendre beaucoup entre autre sur la pédagogie, l'encadrement et la confiance.

Merci aux différents étudiants que l'on a eu la chance d'accueillir au laboratoire et dont les échanges sont toujours très enrichissants. Merci notamment à **Yuan Zeng Feng**, à **Arnaud Fraysse** dit Nono, et à **Maria Luisa Mitzger** pour leur enthousiasme.

Merci aux collègues de l'équipe 3 (**Audren, Chantal, Claire, Carline, Philippe, Aurélie, Simon, Isabelle, Mylène...**) et de l'équipe 10 (**Anne, Magali, Aude, Cristel, Christophe...**). Merci au Dr **Nathalie Augé** pour avoir semé dans mon esprit que j'en étais capable. Merci au Dr **Coralie Sengenès** pour ses conseils précieux lors la préparation de ma soutenance.

Merci au personnel administratif (**Pascale Limousin, Sébastien Mortier, Emeline Guittonneau**) et technique (Plateformes **Get-TQ, Lipidomique, Phénotypage**, le **CREFRE** et la **Zootchnie**).

La réalisation de cette thèse, avec ces moments difficiles, a bien sûr été rendue possible grâce au soutien de mes proches. Donc merci aux gens de la JSCVTT, à mes amis et à ma famille.

Je devrais sans doute encore remercier bon nombre de personnes, à toutes celles que j'oublie, je leur demande d'accepter mes plus sincères excuses.

Table des matières

<u>PRINCIPALES ABREVIATIONS.....</u>	12
<u>LISTE DES FIGURES</u>	14
<u>LISTE DES TABLEAUX.....</u>	15
<u>AVANT-PROPOS.....</u>	16
<u>INTRODUCTION.....</u>	18
<u>I LA PHYSIOLOGIE DES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....</u>	18
I.1 SECRETION DES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....	18
I.1.1 PEPTIDE NATRIURETIQUE AURICULAIRE.....	20
I.1.1.1 Expression	20
I.1.1.2 Biosynthèse	22
I.1.2 PEPTIDE NATRIURETIQUE DE TYPE B.....	23
I.1.2.1 Expression	23
I.1.2.2 Biosynthèse	24
I.2 EFFETS BIOLOGIQUES DES PEPTIDES NATRIURETIQUES	25
I.2.1 RECEPTEUR AUX PEPTIDES NATRIURETIQUES DE TYPE A.....	26
I.2.1.1 Structure.....	27
I.2.1.2 Expression	29
I.2.1.3 Désensibilisation.....	30
I.2.2 EFFECTEURS DU GMPC.....	31
I.2.2.1 Protéines kinases dépendantes du GMPC.....	31
I.2.2.2 Phosphodiesterases	34
I.2.2.3 Canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques	34
I.2.3 FONCTIONS CARDIOVASCULAIRES DU SYSTEME PN/NPRA.....	35
1.2.3.1 Rôles en condition physiologique.....	36
1.2.3.2 Rôles en condition pathologique.....	38
I.3 CLAIRANCE/DEGRADATION DES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....	40
I.3.1 RECEPTEUR AUX PEPTIDES NATRIURETIQUES DE TYPE C	40
I.3.1.1 Structure.....	40
I.3.1.2 Expression	41
I.3.1.3 Internalisation.....	42
I.4.1 ENDOPEPTIDASES	43
I.4.1.1 Néprilysine	43
I.4.1.2 Dipeptidyl Peptidase IV.....	45
I.4.1.3 Insulin degrading enzyme et Méprine A	45
I.3.3 L'ELIMINATION "PASSIVE" DES PN	46

<u>II LES EFFETS METABOLIQUES DES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....</u>	48
II. 1 LIPOLYSE ADIPOCYTAIRE	48
II.1.1 CATECHOLAMINES.....	51
II.1.1.1 Récepteurs adrénergiques.....	51
II.1.1.2 Signalisation	51
II.1.1.3 Insuline	52
II.1.2 LIPOLYSE INDUITE PAR LES PEPTIDES NATRIURETIQUES	53
II.1.2.1 Caractérisation pharmacologique	53
II.1.2.2 Signalisation et régulation.....	54
II.1.2.3 Dérégulation.....	55
II.1.2.4 Spécificité.....	56
II.2 OXYDATION LIPIDIQUE	56
II.2.1 GENERALITES	57
II.2.2 REGULATION DE L' OXYDATION LIPIDIQUE PAR LES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....	58
II.2.2.1 Musculaire.....	58
II.2.2.2 Hépatique	58
II.2.2.3 Adipocytaire	59
II.3 THERMOGENESE.....	59
II.3.1 THERMOGENESE NON FRISSONNANTE.....	59
II.3.2 LES PEPTIDES NATRIURETIQUES ET LE <i>BRUNISSEMENT</i>	62
II.4 INFLAMMATION.....	63
II.4.1 OBESITE ET INFLAMMATION DE BAS GRADE	63
II.4.2 PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....	65
II.4.2.1 Adipocytaire	65
II.4.2.2 Hépatique	66
II.5 SECRETION INSULINIQUE	67
II.5.1 INTRODUCTION	67
II.5.2 SECRETION DE L'INSULINE ET SYSTEME ANP/NPRA.....	68
II.6 DIGESTION	70
II.7 PRISE ALIMENTAIRE.....	71
II.8 CACHEXIE : UNE HYPERSENSIBILITE AUX PEPTIDES NATRIURETIQUES ?.....	72
II.9 SENSIBILITE A L'INSULINE.....	73
II.9.1 LIEN INSULINORESISTANCE ET OBESITE	73
II.9.2 PEPTIDES NATRIURETIQUES ET SENSIBILITE A L'INSULINE.....	74
<u>III LE NATRIURETIC PEPTIDE HANDICAP</u>	78
III.1 DEFINITION	78
III.1.1 ASSOCIATION AVEC LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	78
III.1.2 ASSOCIATION AVEC LES MALADIES METABOLIQUES.....	79

III.2 MECANISMES DU <i>NATRIURETIC PEPTIDE HANDICAP</i> AU COURS DE L'OBESITE/DT2	81
III.2.1 SECRETION DES PEPTIDES NATRIURETIQUES	82
III.2.1.1 Polymorphisme génétique	82
III.2.1.2 Facteurs environnementaux	82
III.2.2 ACTIVITE BIOLOGIQUE DES PEPTIDES NATRIURETIQUES	84
III.2.3 REGULATION DU RECEPTEUR AUX PEPTIDES NATRIURETIQUES DE TYPE A.....	85
III.2.3.1 Aspect quantitatif : expression du NPRA.....	85
III.2.3.2 Aspect qualitatif : désensibilisation du NPRA.....	85
III.2.4 CLAIRANCE/DEGRADATION DES PN	86
III.2.4.1 Récepteur aux peptides natriurétiques de type C.....	87
III.2.4.2 Endopeptidases	88
III.2.5 SIGNALISATION POST RECEPTEUR.....	88
III.3 REVERSION/TRAIEMENT DU <i>NATRIURETIC PEPTIDE HANDICAP</i>	89
III.3.1 AMELIORATION DE L'HYGIENE DE VIE	89
III.3.2 INTERVENTION MEDICAMENTEUSE	90
<u>HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....</u>	<u>94</u>
<u>RESULTATS</u>	<u>96</u>
<u>PREMIERE PARTIE.....</u>	<u>96</u>
LES PEPTIDES NATRIURETIQUES FAVORISENT LE TRANSPORT DE GLUCOSE DANS L'ADIPOCYTE HUMAIN : LIEN AVEC LA SENSIBILITE A L'INSULINE	96
<u>DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE.....</u>	<u>98</u>
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	<u>102</u>
UNE ALTERATION DE LA SIGNALISATION MUSCULAIRE AUX RECEPTEURS AUX PEPTIDES NATRIURETIQUES RELIE LE DIABETE DE TYPE 2 A L'OBESITE	102
<u>DISCUSSION DE LA DEUXIEME PARTIE</u>	<u>103</u>
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>109</u>
<u>ANNEXE I.....</u>	<u>115</u>
CONTROLE DE LA BALANCE ENERGETIQUE ET DE L'HOMEOSTASIE DU GLUCOSE PAR LES PEPTIDES NATRIURETIQUES.....	115
<u>ANNEXE II</u>	<u>117</u>
DEFAUTS PRIMAIRES DANS LA LIPOLYSE ET DANS L'ACTION DE L'INSULINE DANS DES CELLULES MUSCULAIRES ISSUES D'INDIVIDUS DIABETIQUES DE TYPE 2.....	117
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>119</u>

Principales abréviations

A.A. : Acide aminé

AG : Acide gras

AMPc : Adénosine 3',5' monophosphate cyclique

ANP : Peptide natriurétique auriculaire

BNP : Peptide natriurétique de type B

DT2: Diabète de type 2

GC : Guanylate cyclase

GMPc : Guanosine 3',5' monophosphate cyclique

hMADS : Human multipotent adipose-derived stem (cells)

ICC : Insuffisance cardiaque congestive

IMC : Indice de masse corporelle

LHS : Lipase hormonosensible

NEP : Néprilysine

NPH : Natriuretic peptide handicap

NPR : Récepteur aux peptides natriurétiques

PDE : Phosphodiesterase

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKG : Protéine kinase dépendante du GMPc

PN : Peptides natriurétiques

TABr : Tissu adipeux brun

TAG : Triacylglycérol

TASC : Tissu adipeux sous cutané

TAV : Tissu adipeux viscéral

UCP1 : Protéine découplante de type 1

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du cœur et micrographie électronique d'un cardiomyocyte de l'oreillette.

Figure 2 : Structure et séquence des principaux membres de la famille des peptides natriurétiques.

Figure 3 : Représentation schématique des sites de clivage nécessaires à la maturation et la dégradation des peptides natriurétiques.

Figure 4 : Structure des récepteurs NPRA et NPRC.

Figure 5 : Modèle schématique de PKG I.

Figure 6 : Structure schématique de PDE3B.

Figure 7 : Structure des canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques.

Figure 8 : Principaux effets physiologiques des peptides natriurétiques en réponse à un changement aigu du volume sanguin.

Figure 9 : Récepteur de clairance et endopeptidases des PN.

Figure 10 : Etapes successives de la lipolyse.

Figure 11 : Voies majeures de signalisation régulant la lipolyse humaine.

Figure 12 : Modèle d'activation parallèle de p38 MAPK par les récepteurs β -adrénergiques et le NPRA pour induire l'expression des gènes thermogéniques.

Figure 13 : Modèle de protection de l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité par les peptides natriurétiques.

Figure 14 : Mécanismes potentiels du *Natriuretic peptide handicap*.

Figure 15 : Hypothétique désensibilisation hétérologue chronique du récepteur NPRA chez les personnes obèses.

Figure 16 : Modèle du transport de glucose et de son devenir stimulé par les PN dans l'adipocyte humain.

Figure 17 : Modèle illustrant la relation entre la signalisation aux PN et la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique.

Figure 18 : Caractérisation métabolique préliminaire des souris ANP -/-.

Figure 19 : Dialogue hypothétique cœur/tissu adipeux/muscle squelettique lors de l'exercice physique.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Famille des peptides natriurétiques chez l'homme.

Tableau 2 : Récepteurs membranaires à activité guanylate cyclase chez l'homme.

Tableau 3 : Affinité des PN pour leurs récepteurs endogènes.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des différentes PKG chez l'homme.

Tableau 5 : Rôles cardiovasculaires induits par l'activation du NPRA.

Tableau 6 : Facteurs régulant la lipolyse chez l'homme.

Tableau 7 : Phénotype métabolique des modèles murins gain ou perte de fonction dans la voie de signalisation aux PN.

Tableau 8 : Etudes cliniques humaines liant les niveaux circulants de PN aux maladies métaboliques.

Avant-propos

Le mot obésité apparaît en 1550 du latin *obesitas* pour décrire un excès d'embonpoint. A cette époque, « en bon point » signifie alors « en bonne santé ». Pourtant, 4 siècles plus tard, en 1997, l'obésité est reconnue comme une maladie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et est définie comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé. Elle est même devenue aujourd'hui la première épidémie non infectieuse.

En 2014, sur 7 milliards d'habitants que compte la planète, près de deux milliards d'adultes étaient en surpoids dont 600 millions d'obèses. Et en parallèle, il est estimé à 805 millions, le nombre de personnes souffrant de la faim dans le monde, soit 1 personne sur 9. Ainsi, l'obésité et le surpoids sont liés à davantage de décès que l'insuffisance pondérale. Et il convient de tout à fait cerner ce fléau pour l'endiguer car la prévalence de l'obésité a plus que doublé entre 1980 et 2014 au niveau mondial. Sur le plan national, la France compte 32% d'adultes en surpoids et 15% d'obèses. Et même si l'on peut s'enthousiasmer que la progression de l'obésité en France subit une décélération (+ 0,5% depuis 2009, contre + 1% lors de l'enquête ObEpi précédente), il n'empêche que cette pathologie continue de toucher de plus en plus de personnes (ObEpi, 2012). L'évolution de cette épidémie est alarmante en particulier car l'obésité est un risque majeur de développer des complications cardiovasculaires et métaboliques. Plus qu'une menace sur la probabilité de diminuer la qualité de vie, l'obésité tend aujourd'hui de diminuer la durée de vie.

Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes moléculaires de l'insulinorésistance associée à l'obésité et plus particulièrement à la régulation de la lipolyse adipocytaire dans ce contexte. En 2000, l'équipe de Max Lafontan caractérise une nouvelle voie d'activation de la lipolyse du tissu adipeux humain par des hormones d'origine cardiaque que sont les peptides natriurétiques (PN). Cette découverte sera suivie quelques années plus tard par la mise en évidence d'une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle (IMC), l'insulinorésistance et les concentrations plasmatiques de PN. Plusieurs études prospectives ont ainsi pointé du doigt un lien

prédictif entre baisse des niveaux circulants de PN et incidence du diabète de type 2 (DT2). Ce phénomène a été dénommé le *natriuretic peptide handicap (NPH)* et malgré la multiplication de ces observations dans la littérature, il n'y a actuellement aucun lien causal établi entre la diminution des quantités de PN et le développement du DT2. De récents travaux du laboratoire démontrent la présence des récepteurs aux PN dans le muscle squelettique humain et que leur activation induit la capacité oxydative lipidique. Nous avons donc posé l'hypothèse qu'une dérégulation du système PN, c'est à dire des niveaux circulants et/ou de leur signalisation tissulaire, peut contribuer au développement des altérations métaboliques liées à l'obésité et au DT2.

Le but de ce travail de thèse a donc été d'étudier les liens existant entre la signalisation aux PN et la sensibilité à l'insuline dans deux organes métaboliques clés de la régulation de la sensibilité à l'insuline que sont le tissu adipeux et le muscle squelettique. Nous avons également étudié le potentiel thérapeutique de l'activation du système PN dans l'obésité et le DT2.

Introduction

I La physiologie des peptides natriurétiques

En 1956, Kisch publie que les cardiomyocytes de l'oreillette de mammifères, contrairement à ceux du ventricule, possèdent un réticulum endoplasmique rugueux et un appareil de Golgi très développés, témoin d'une activité de sécrétion (Kisch 1956) (**Figure 1**). La même année, sans aucun lien apparent, il est observé qu'une distension de l'oreillette gauche induit la diurèse chez le chien (Henry, Gauer et al. 1956). Il faudra attendre deux décennies pour que le lien soit fait entre ces deux observations : de Bold et coll., démontrent que la perfusion d'un homogénat d'oreillette du myocarde à des rats cause une augmentation de l'excrétion de sodium (Na^+) et du volume urinaire (de Bold, Borenstein et al. 1981), via le facteur natriurétique auriculaire qui sera plus tard dénommé ANP (Atrial Natriuretic Peptide) (de Bold 1982). Cette découverte est d'une importance capitale car elle place le cœur comme un organe endocrine capable de communiquer avec le reste de l'organisme.

I.1 Sécrétion des peptides natriurétiques

Les membres de la famille des peptides natriurétiques (PN) sont caractérisés par un anneau de 17 acides aminés (A.A.), dont 10 sont conservés, fermé par un pont disulfure intramoléculaire. Cette famille comprend 5 adhérents qui sont l'ANP, le BNP (Brain ou B-type Natriuretic Peptide) (Sudoh, Kangawa et al. 1988), le CNP (C-type Natriuretic Peptide) (Sudoh, Minamino et al. 1990), le DNP (Dendroaspis Natriuretic Peptide) (Schweitz, Vigne et al. 1992) et le VNP (Ventricular Natriuretic Peptide) (Takei, Takahashi et al. 1991) (**Figure 2**). Ces deux derniers membres ont été respectivement

isolés à partir du venin de Mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*) et du ventricule cardiaque de l'anguille (*Anguilla japonica*). Un autre critère d'appartenance à cette famille est que les PN se lient à un récepteur à activité guanylate cyclase (GC) membranaire. Basé sur ce dernier critère uniquement, des peptides homologues se sont greffés à cette famille que sont : l'entérotoxine thermostable d'*Escherichia coli* (Field, Graf et al. 1978), la guanyline (Currie, Fok et al. 1992), l'uroguanyline (Hamra, Forte et al. 1993) l'ostéocrine (Thomas, Moffatt et al. 2003), la lymphoguanyline (Forte, Eber et al. 1999) et la rénoguanyline (Yuge, Inoue et al. 2003). Ces deux dernières hormones ont été isolées respectivement de l'opossum et de l'anguille. Le **tableau 1** présente très brièvement les PN retrouvés chez l'homme et par la suite, seuls l'ANP et le BNP seront détaillés.

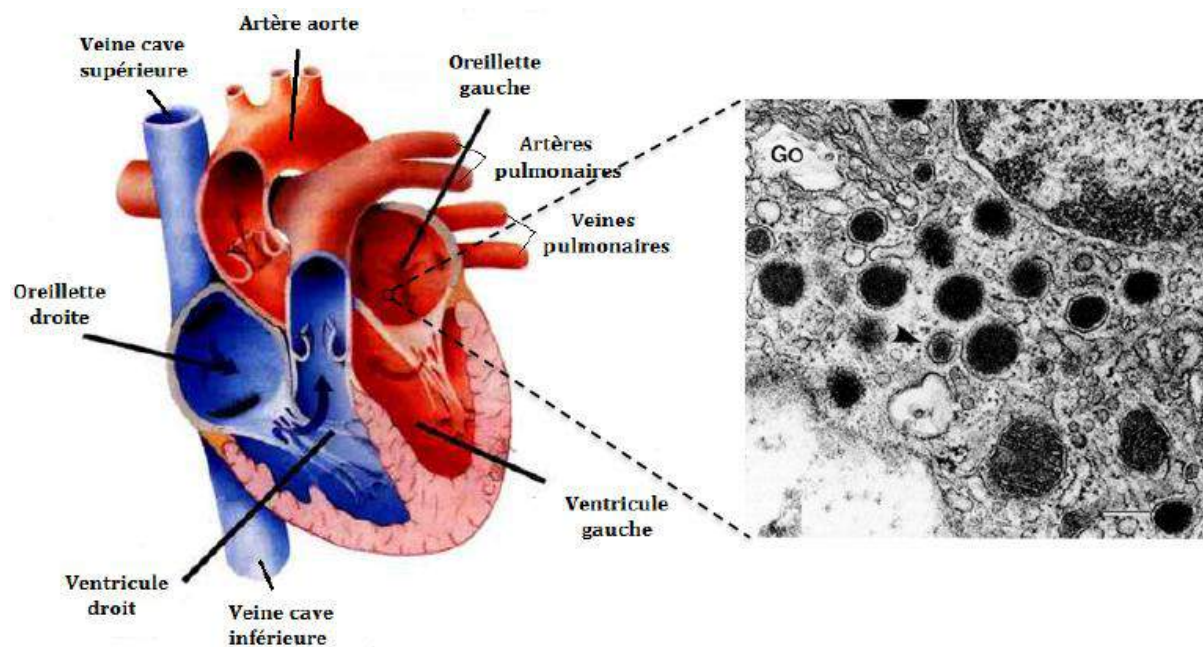


Figure 1 : Schéma du cœur et micrographie électronique d'un cardiomyocyte de l'oreillette. Le cœur droit (oreillette et ventricule droits) permet de renouveler les gaz du sang (circulation pulmonaire), alors que le cœur gauche (oreillette et ventricule gauche) pompe le sang vers le reste de l'organisme (circulation systémique). Les parties du cœur en bleu véhiculent du sang pauvre en oxygène et celles en rouge, du sang riche en oxygène. La micrographie montre le cytoplasme péri-nucléaire d'un cardiomyocyte issu de l'oreillette et présentant un développement important de l'appareil de Golgi (Go) et des granules de sécrétion (tête de flèche). Barre = 0,2 µm. Modifié de (Iida and Shibata 1994).

Tableau 1 : Famille des peptides natriurétiques chez l'homme.

PN	Lieux de production (Chromosome)	Forme mature	Rôles cardiovasculaires
ANP	Cardiomyocytes (Chr 1p36.21)	28 A.A.	Homéostasie hydrosodée
BNP	Cardiomyocytes (Chr 1p36.2)	32 A.A.	Homéostasie hydrosodée
CNP	Cerveau, Cellules endothéliales et osseuses (Chr 2q37.1)	22 A.A.	Vasodilation, Régulation de la croissance osseuse, antithrombotique
Urodilatine	Rein (Chr 1p36.21)	32 A.A.	Régulation du transport de sodium et d'eau à travers le tubule proximal rénal
Guanyline	Cellules caliciformes du colon (Chr 1p35-p34)	15 A.A.	Régule le transport intestinal d'eau et d'électrolytes
Uroguanyline	Cellules entérochromaffines du duodénum et de l'intestin grêle (Chr 1p34-p33)	16 A.A.	Régule le transport intestinal d'eau et d'électrolytes
Entérotoxine thermostable	<i>Escherichia coli</i>	18 A.A.	Sécrétion excessive de chlorure dans la lumière intestinale menant à des selles liquides
Ostéocrine	Ostéoblaste (Chr 3q28)	103 A.A.	Occupe NPRC pour augmenter la demi-vie du CNP, inhibe la minéralisation

I.1.1 Peptide natriurétique auriculaire

I.1.1.1 Expression

L'ANP (également connu sous le nom de facteur natriurétique auriculaire, cardionatine, cardiodilatine ou atriopeptine) est codé par le gène *NPPA* (*Natriuretic Peptide Precursor A*) de 2,7 kpb (kilos paires de bases) situé sur le chromosome 1p36.21 et est composé de 3 exons et 2 introns (Gene ID 4878). Les éléments de réponse dans le promoteur du gène *NPPA* sont conservés chez la souris, le rat et l'homme. Parmi les facteurs de transcription connus figurent GATA (Globin Transcription Factor)-4 et 6 et

Srf (Serum Response Factor) (Rosenzweig, Halazonetis et al. 1991, Small and Krieg 2003, Houweling, van Borren et al. 2005). La transcription de ce gène est également activée au cours de l'hypertrophie ventriculaire (Knowlton, Rockman et al. 1995), par les glucocorticoïdes (Argentin, Sun et al. 1991), les agonistes α -adrénergiques (Knowlton, Baracchini et al. 1991), l'hypoxie (Chun, Hyun et al. 2003), l'endothéline-1 (ET-1) (Morin, Paradis et al. 2001) et les β -bloquants (Ohta, Watanabe et al. 2000). Une étude du locus *NPPA*, réalisée sur 14 743 individus, a permis de corrélérer positivement les niveaux circulants d'ANP avec les polymorphismes liés à un seul nucléotide (SNP) suivant : rs5068, rs198358 et rs632793 (Newton-Cheh, Larson et al. 2009). La surexpression du gène *Nppa* chez la souris induit une hypotension artérielle (Steinhelper, Cochrane et al. 1990) et sa délétion, une hypertension suite à une ingestion de sel sans autre changement des paramètres physiologiques rénaux et cardiaques (John, Veress et al. 1996).

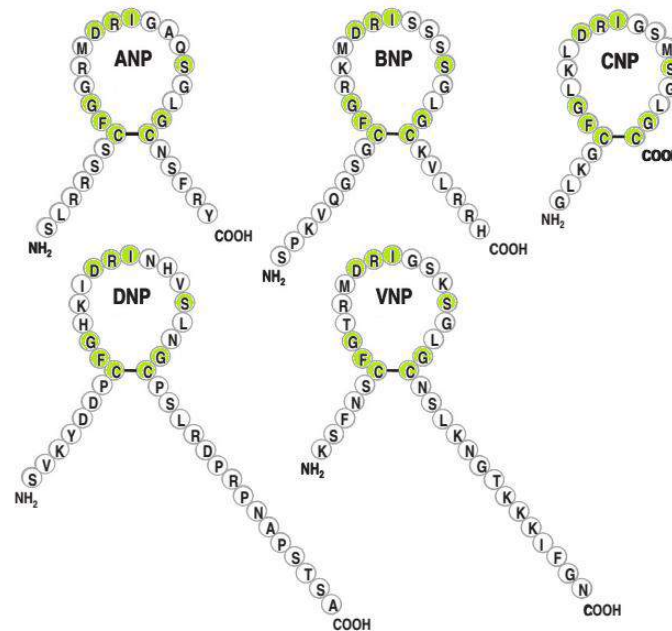


Figure 2 : Structure et séquence des principaux membres de la famille des peptides natriurétiques. Les ronds verts représentent les acides aminés conservés entre les différents PN. ANP : Atrial Natriuretic Peptide ; BNP : B-type Natriuretic Peptide ; CNP : C-type Natriuretic Peptide ; DNP : Dendroaspis Natriuretic Peptide ; VNP : Ventricular Natriuretic Peptide. Modifié de (Tota, Cerra et al. 2010).

I.1.1.2 Biosynthèse

Tous les PN sont synthétisés sous forme de pré-pro-hormone. La biosynthèse de l'ANP est semi constitutive, c'est à dire que, après clivage du peptide signal, 40% du peptide nouvellement synthétisé est directement sécrété dans la circulation sans même de stimulus et 60% est stocké sous forme de proANP dans des granules de sécrétion de l'oreillette cardiaque (Iida and Shibata 1994) **(Figure 1)**. Puis lors de l'exocytose des granules, le proANP fini de maturer grâce au clivage catalysé par la corine (EC 3.4.21.-), une protéase à sérine transmembranaire des cardiomyocytes (Yan, Wu et al. 2000) **(Figure 3)**. La corine peut également être soluble et active après clivage de sa partie transmembranaire par des métalloprotéases ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) (Jiang, Wu et al. 2011). Les souris déficientes pour la corine n'ont pas d'ANP mature et développent une hypertension spontanée (Chan, Knudson et al. 2005). Les concentrations plasmatiques d'ANP, comprises entre 3 et 20 pM, s'élèvent rapidement après le stimulus de sécrétion puis déclinent mais restent significativement augmentées durant 24h (Qi, Kjekshus et al. 2000). L'ANP est produit et sécrété en quantité plus importante par l'oreillette gauche que la droite chez l'homme (Tsuchimochi, Kurimoto et al. 1988). L'ANP mature de 28 A.A. est très conservé parmi les espèces et ne diffère que d'un A.A. avec celui du rat. Une maturation alternative du proANP peut également produire l'urodilatine (ANP₍₉₅₋₁₂₆₎) dans le tubule rénal distal, le proANP y ayant été détecté mais seulement au 1/190^e des quantités de proANP produites par l'oreillette. Cela signifie que l'urodilatine, qui contient donc 4 A.A. de plus que l'ANP mature du côté N-terminal, est directement produite et maturée dans les reins et jouerait un rôle important dans la régulation du flux hydrique et sodique (Schulz-Knappe, Forssmann et al. 1988, Vesely 2007) **(Tableau 1 et Figure 3)**.

Le stimulus majeur de sécrétion de l'ANP est un étirement de la paroi cardiaque induite par une hypervolémie, comme lors d'un décubitus, d'une immersion dans l'eau ou d'un exercice physique. Un régime riche en sel (Hollister, Tanaka et al. 1986), une hémorragie sévère (Frajewicki, Kahana et al. 1997) ainsi que certaines hormones peuvent également activer la sécrétion de l'ANP comme l'ET-1 (Stasch, Hirth-Dietrich et al. 1989), l'angiotensine II (Ang II) (Soualmia, Barthelemy et al. 1997), l'ocytocine (Gutkowska, Jankowski et al. 1997), le Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) (au moins chez la souris) (Kim, Platt et al. 2013), les estrogènes (Clerico, Del Ry et al. 2002), et les agonistes α - et β -adrénergiques (Schiebinger, Baker et al. 1987). A l'inverse, les

androgènes l'inhibent (Clerico, Del Ry et al. 2002). Le Carperitide (Carbetocin®, Cetrorelix®), un recombinant de l'ANP humain, est prescrit au Japon dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (IC) décompensée aiguë depuis 1995 (Hata, Seino et al. 2008).

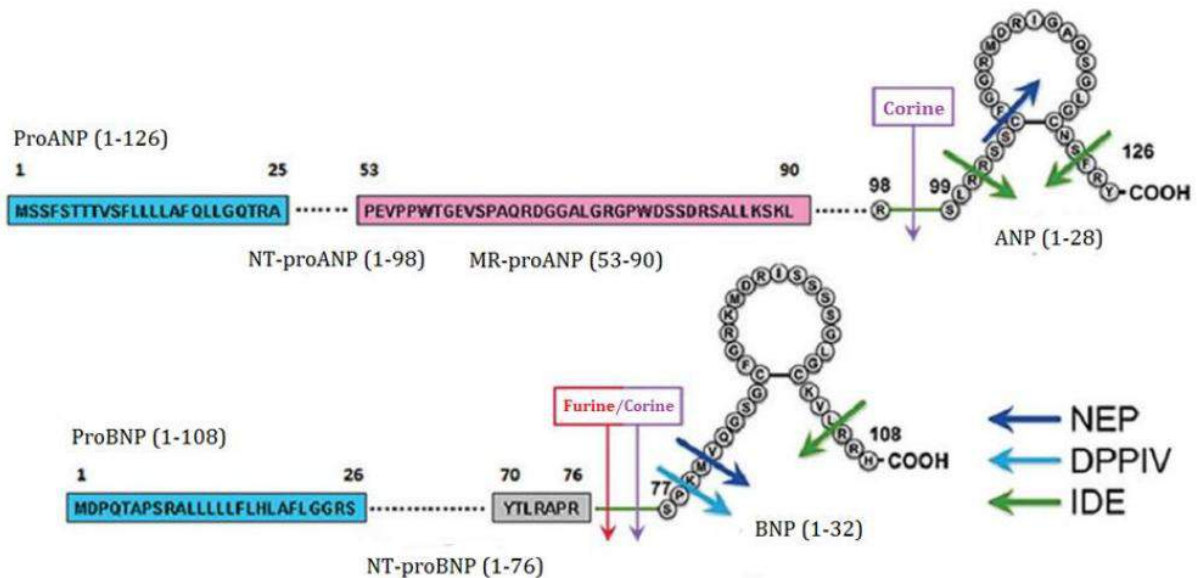


Figure 3: Représentation schématique des sites de clivage nécessaires à la maturation et la dégradation des peptides natriurétiques. Les flèches rouges et violettes montrent respectivement les sites de clivage par la furine et la corine. NEP : Neprilysine (flèche bleue foncée) ; DPPIV : Dipeptidyl Peptidase IV (flèche bleue claire) ; IDE : Insulin Degrading Enzyme (flèche verte). Modifié de (Volpe, Rubattu et al. 2014).

I.1.2 Peptide natriurétique de type B

I.1.2.1 Expression

Le BNP a originellement été isolé dans le cerveau de porc en 1988 grâce à ces propriétés pharmacologiques très similaires de celles de l'ANP (Sudoh, Kangawa et al. 1988). Il est codé par le gène *NPPB* (*Natriuretic Peptide Precursor B*) (Gene ID 4879) localisé sur le chromosome 1p36.2 et composé de 3 exons et 2 introns. L'expression du gène *NPPB* est induit dans l'heure suivant un étirement pariétal (D'Souza, Davis et al. 2004). La régulation de son expression est essentiellement transcriptionnelle et les principaux régulateurs sont les agonistes α -adrénergiques (Hanford, Thuerlauf et al. 1994), l'interleukine 1β (He and LaPointe 1999), l'Ang II (Wiese, Breyer et al. 2000), l'ET-1 (Pikkarainen, Tokola et al. 2003), l'ischémie (Goetze, Christoffersen et al. 2003), un étirement de la paroi (Martinez-Rumayor, Richards et al. 2008) et les β -bloquants (Ohta, Watanabe et al. 2000). Des cellules surexprimant GATA-4 présentent également

une augmentation marquée de la transcription du BNP (Grepin, Dagnino et al. 1994). Le locus *NPPB* possède des polymorphismes dans son promoteur qui peuvent être communs avec ceux du *NPPA* (rs5068, rs632793, rs198358) ou non tels que rs198389 et leurs présences au sein d'une population corrèlent également positivement avec l'augmentation des niveaux circulants de BNP (Meirhaeghe, Sandhu et al. 2007, Newton-Cheh, Larson et al. 2009) et de NT-proBNP (Ellis, Newton-Cheh et al. 2011). Le gène *NPPB* est situé 8 Kb en amont de *NPPA* sur le même chromosome, il semblerait donc qu'ils comportent certaines régulations communes. Les souris ayant des concentrations de BNP 100 fois plus élevées que les valeurs physiologiques développent une hypotension artérielle (Ogawa, Itoh et al. 1994) et une surcroissance osseuse (Suda, Ogawa et al. 1998) alors que les souris *Nppb* *-/-* souffrent de fibrose cardiaque (Tamura, Ogawa et al. 2000).

I.1.2.2 Biosynthèse

Contrairement à l'ANP, le processus de maturation du BNP est plus incertain. Des expérimentations *in vitro* ont démontré que la corine (Yan, Wu et al. 2000) et la furine (Sawada, Suda et al. 1997) sont capables de cliver le proBNP en BNP mature (**Figure 3**). La furine (EC 3.4.21.75) est une endopeptidase clivant une large gamme de peptides présentant le motif RXXR et dont l'expression est fortement induite dans les cardiomyocytes hypertrophiques (Sawada, Suda et al. 1997). Le proBNP comporte de multiples sites de O-glycosylation dont un, sur le résidu T71, empêche le clivage du peptide par les convertases (Semenov, Postnikov et al. 2009). Le BNP a été retrouvé colocalisé sous forme mature avec l'ANP dans les mêmes granules de sécrétion atriales (Nakamura, Naruse et al. 1991). Une augmentation de la tension pariétale cardiaque induit une synthèse rapide du BNP (Mantymaa, Vuolteenaho et al. 1993). Donc le mécanisme majeur de sécrétion du BNP semble être la voie constitutive c'est à dire dès sa transcription (D'Souza, Davis et al. 2004). L'oreillette est le site primaire de synthèse du BNP en condition physiologique et les concentrations plasmatiques de BNP sont 10 fois plus faibles que celles de l'ANP (1–15 pM). Tout comme pour l'ANP, les quantités circulantes de BNP et NT-proBNP (produits issus du processus de maturation du proBNP) varie en fonction de l'âge (Davis, Fish et al. 1996, Redfield, Rodeheffer et al. 2002), du sexe (Clerico, Del Ry et al. 2002), de l'appartenance ethnique (Gupta, de

Lemos et al. 2015) et du statut physiopathologique de l'individu (Mukoyama, Nakao et al. 1990). Ainsi ils peuvent être multipliés jusqu'à 300 fois lors d'un stress pariétal chronique comme lors d'une IC congestive (ICC). C'est pourquoi, le BNP est aujourd'hui un biomarqueur de référence pour le diagnostic et le pronostic d'une dysfonction ventriculaire (Mukoyama, Nakao et al. 1991). Avec seulement 35% d'homologie entre le BNP humain (32 A.A.) et murin (45 A.A.), c'est le PN le plus variable (Potter, Yoder et al. 2009). Depuis 2001, le Nesiritide (Natreacor®), un recombinant du BNP humain a été approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux dans le traitement de l'IC en décompensation aiguë (Lee and Burnett 2007).

I.2 Effets biologiques des peptides natriurétiques

C'est l'anneau de 17 A.A. des PN qui permet la liaison à leurs récepteurs qui sont des GC membranaires, à la différence du récepteur au NO qui est soluble. Il existe 7 récepteurs à activité GC membranaires dénommés GC-A à GC-G et ils partagent tous la même topologie générale (**Tableau 2**). Seul le GC-A sera détaillé par la suite car il correspond au récepteur biologique de l'ANP et du BNP et est plus connu sous le nom de NPRA (récepteur aux PN de type A) (Potter 2011) (**Figure 4**).

Tableau 2 : Récepteurs membranaires à activité guanylate cyclase chez l'homme.
D'après (Kuhn 2003, Karan, Frederick et al. 2010).

Récepteurs (gène)	Localisation chromosomique Taille	Distribution tissulaire	Ligand et ordre d'affinité	Fonctions
GC-A/NPRA (NPR1)	1q21-q22 1061 A.A.	Muscle lisse vasculaire, endothélium, cœur, glande surrénale, rein, poumon, cœur, rate, système nerveux central, tissu adipeux, muscle squelettique, pancréas	ANP > BNP >> CNP	Régulation de l'homéostasie hydrosodée
GC-B/NPRB (NPR2)	9p21-p12 1047 A.A.	Cerveau, chondrocytes, fibroblastes cardiaques, aorte thoracique, cellules mésangiales du rein, poumons, rétine, tractus urogénital, cœur	CNP >> ANP > BNP	Croissance osseuse, vasodilatation
GC-C (GUCY2C)	12p12 (pseudogène) 1073 A.A.	Intestins, foie	Entérotoxine > Guanyline, Uroguanyline,	Transport électrolytes et eau Croissance et différenciation épithéliale
GC-D (GUCY2D)	17p13.1 1103 A.A.	Neuroépithélium olfactif	Guanyline, Uroguanyline	Perception olfactive ?
GC-E (GUCY2E)	11q13.5 1054 A.A.	Rétine (cônes et bâtonnets), glande pinéale	GCAP (Ca ²⁺ bound GC-activating proteins)	Vision
GC-F (GUCY2F)	Xq22 1058 A.A.	Rétine (cônes)	GCAP	Vision
GC-G (GUCY2G)	12p12 (pseudogène) Prédit à 1100 A.A.	Muscle squelettique, poumons, intestins	Orphelin	?

I.2.1 Récepteur aux peptides natriurétiques de type A

Les PN sont maintenant reconnus comme un système ubiquitaire de régulation de l'homéostasie hydrosodée chez les mammifères et les non mammifères. Une fois activé, le NPRA génère de puissantes réponses relaxantes via des actions autocrines/paracrines et endocrines. Ces effets sont la conséquence d'une élévation des concentrations intracellulaires de GMPc (Guanosine 3',5' monophosphate cyclique) permis par l'activation de la GC. La famille des PN et leurs homologues sont les seules molécules connues à pouvoir activer une GC membranaire, les structures du NPRA ainsi que du récepteur de clairance NPRC sont présentées en **Figure 4**.

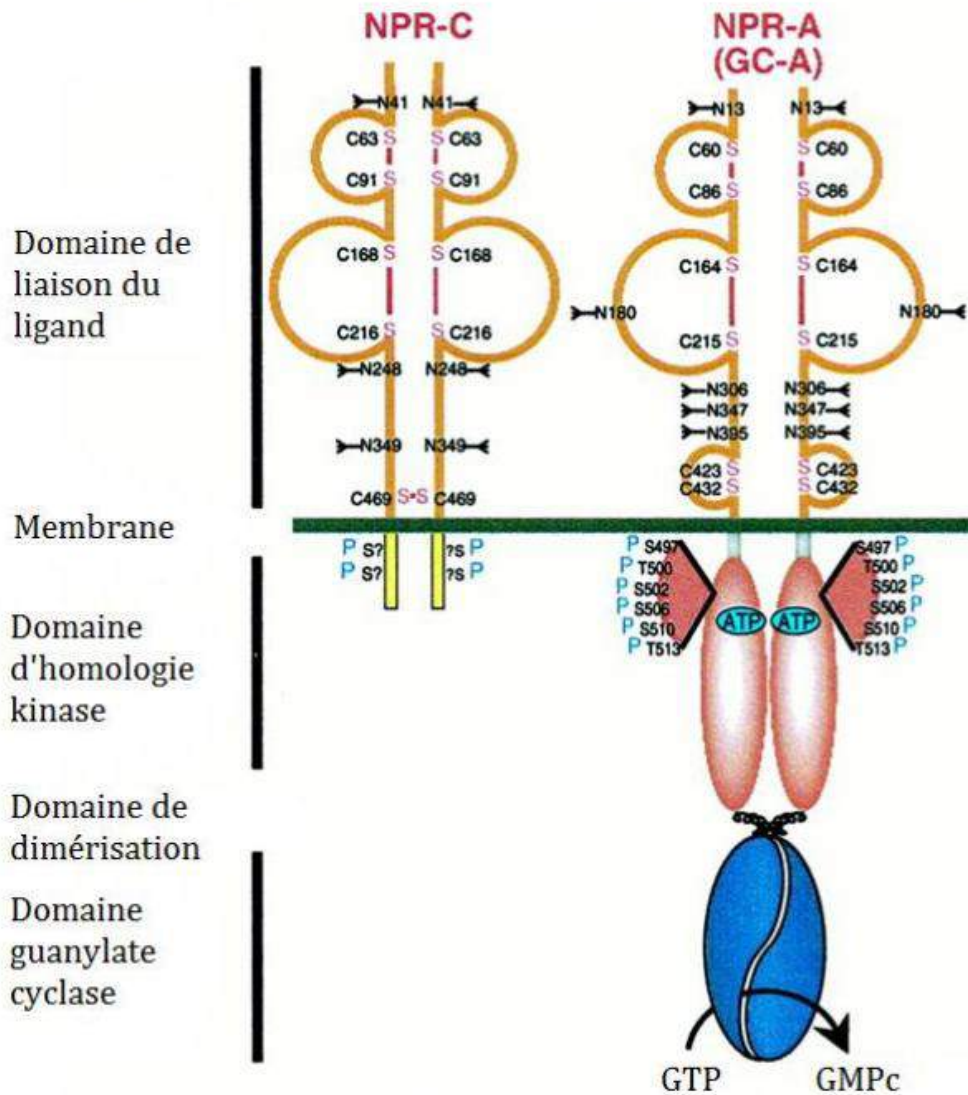


Figure 4 : Structure des récepteurs NPRA et NPRC. La numérotation correspond aux séquences chez le rat. D'après (Potter and Hunter 2001).

I.2.1.1 Structure

Le NPRA est le récepteur de l'ANP et du BNP, ce dernier étant 4 fois moins affiné pour le NPRA que l'ANP (**tableau 3**). La liaison de l'ANP sur son récepteur homodimérique de 135 kDa est dépendante de la présence de l'ion chlore dans le lobe distal de chaque monomère (van den Akker, Zhang et al. 2000). Le domaine extracellulaire (ECD) du NPRA est conservé et l'ECD humain partage 86% et 97% d'homologie respectivement avec celui de la souris et du rat. Les PN lient leur récepteur selon une stœchiométrie (ligand:récepteur) 1:2 et l'activent en créant une torsion intermoléculaire de l'ECD. Cela altère l'angle relatif entre les deux domaines

juxtamembranaires, réoriente les domaines d'homologie aux kinases (KHD) et les domaines de dimérisation (ou régions de Hinge) pour enfin lever l'inhibition sur la GC (Pandey 2005). Le KHD peut être fortement phosphorylé sur les Ser473, Ser487, Ser497, Thr500, Thr502, Thr506, Ser510 et Thr513 et l'état de phosphorylation de ce domaine module l'activation du récepteur (Theilig and Wu 2015). Les kinases responsables de ces phosphorylations restent globalement méconnues mais certaines protéines kinases C (PKC) ont été démontrées pour pouvoir déphosphoryler le KHD via l'activation d'une phosphatase (Haneda, Kikkawa et al. 1991, Potter and Garbers 1994, Kumar, Cartledge et al. 1997). Il a aussi été proposé que la liaison de l'ANP permettrait la fixation de l'adénosine triphosphate (ATP) au KHD et, en retour, ce dernier augmenterait la vitesse de dissociation de l'ANP (Potter and Garbers 1992). La GC catalyse la lyse du guanosine triphosphate (GTP) en GMPc + Pyrophosphate (PPi), réaction qui est dépendante du magnésium (Mg^{2+}) ou du manganèse (Mn^{2+}). La concentration efficace médiane ou EC50 induite par la liaison des PN sur leur NPR c'est à dire, leur capacité à stimuler la production de GMPc, est alors 10 fois plus élevée pour l'ANP que pour le BNP (Koller and Goeddel 1992). Chaque sous-unité de la GC comporte un site catalytique fonctionnel et une coopérativité positive a été observée, à savoir que la fixation d'un GTP favorise la fixation du deuxième GTP sur l'autre site catalytique (Joubert, McNicoll et al. 2007, Potter 2011) (**Figure 4**). En 2012, Robinson et Potter ont proposé un "nouveau modèle" d'activation des NPR. Ils avancent que, en condition basale, l'ATP serait liée au site allostérique de la GC et que cela impose une coopération linéaire à la GC. La liaison des PN au récepteur rapprocherait les 2 sites catalytiques pour former un unique site actif et augmenter l'affinité du GTP pour le site catalytique de la GC et favoriser une coopérativité positive, l'ATP aidant à la transduction du signal (Robinson and Potter 2012). D'autres études sont nécessaires pour pleinement comprendre les mécanismes d'activation des NPR.

Tableau 3 : Affinité des PN pour leurs récepteurs endogènes. D'après (Bennett, Bennett et al. 1991).

Récepteurs	ANP	BNP
NPRA	1,9 pM	7,3 pM
NPRC	2,6 pM	13 pM

I.2.1.2 Expression

Codé par le gène *NPR1* (*Natriuretic Peptide Receptor 1*) de 20 kpb (Gene ID 4881), l'acide ribonucléique messenger (ARNm) du NPRA est retrouvé dans de nombreux tissus répertoriés dans le **Tableau 2**. L'activité transcriptionnelle du gène *NPR1* est gouvernée par 3 sites de liaison SP1 (Specificity Protein 1) dans le promoteur et des mutations dans ces sites diminuent de plus de 90% l'activité du promoteur (Liang, Schaufele et al. 1999). Une surexpression de Ets-1 (avian Erythroblastosis virus E26 homolog-1) augmente l'expression du gène *NPR1* de 12 fois alors qu'une surexpression de GATA-1 et Lyf-1 (Lymphoid transcription Factor 1) réprime respectivement de 50% et 80% l'activité du promoteur (Kumar, Arise et al. 2006). L'activité du promoteur de *NPR1* est régulée négativement par l'ANP de façon dose dépendante et en fonction du temps à travers un mécanisme dépendant du GMPc (Cao, Wu et al. 1995). L'expression du NPRA est par ailleurs stimulée positivement par les stimuli osmotiques (Chen and Gardner 2002), la vitamine D (Chen, Ni et al. 2005), la grossesse (Itoh, Bird et al. 1998), l'hypertrophie cardiaque (Brown, Nunez et al. 1993) et négativement par l'Ang II (Garg and Pandey 2003), l'ET-I (Ye, Chen et al. 2003) et le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) (Agui, Xin et al. 1995). Une étude des polymorphismes génétiques réalisée sur 34 individus a démontré la présence d'au moins 10 variants génétiques communs dans la région non codante de *NPR1* : 5 sont des SNP et les 5 autres sont des polymorphismes de longueur (Knowles, Erickson et al. 2003). Ainsi, porter un A au lieu d'un G en -293 de la région 5'UTR (Untranslated Region) augmente significativement l'activité transcriptionnelle du promoteur *NPR1*, tout comme avoir 4 nucléotides en plus (AGAA) en position 14 649 en 3'UTR (Knowles, Erickson et al. 2003). Un autre groupe a montré que la délétion de 8 nucléotides dans le promoteur du gène, cause une diminution de 30% de l'activité transcriptionnelle, ce qui est associée à une

hypertrophie ventriculaire ou à une hypertension artérielle essentielle dans la population japonaise (Nakayama, Soma et al. 2000). Les souris exprimant 4 allèles du gène *Npr1* sont hypotensives et résistantes à une hypertension sensible au sel (Oliver, John et al. 1998). A l'opposée, une absence complète de NPRA mène à une hypertension, une hypertrophie cardiaque indépendante de la pression sanguine et une susceptibilité accrue à la mort subite surtout chez les mâles (Oliver, Fox et al. 1997).

I.2.1.3 Désensibilisation

Le NPRA est considéré comme une macromolécule cellulaire dynamique et la liaison du ligand entraîne l'internalisation du complexe qui est ensuite dégradé dans les lysosomes et une faible proportion du complexe serait recyclée à la membrane plasmique (environ 25%) (Pandey 2015). Jewett et coll. ont également publié une diminution de liaison de l'ANP sur NPRA après 15 min de stimulation et que cela était dû à une moindre affinité du ligand pour son récepteur plutôt qu'à une diminution du nombre de NPRA (Jewett, Koller et al. 1993). D'autres études ont révélé que la liaison de l'ANP sur son récepteur entraîne la déphosphorylation du KHD du NPRA pour *in fine* favoriser la libération de l'ANP intact (Potter and Hunter 1998). C'est la désensibilisation homologue. Il est considéré que la désensibilisation du NPRA se produit au niveau intracellulaire et que l'inhibition de l'internalisation pourrait prévenir ce processus. Celui-ci impliquerait la calcineurine. En effet, son inhibition ou la chélation du calcium (Ca^{2+}) potentialisent l'accumulation de GMPC induite par l'ANP alors que la surexpression de la calcineurine l'empêche, ce qui est concomitant avec un état de déphosphorylation du NPRA dans une lignée de cellules de Leydig. De plus, un modèle mathématique propose qu'à l'état basal, 67% du pool de NPRA peut répondre à l'agoniste, alors qu'un traitement avec un inhibiteur de la calcineurine augmente ce pourcentage à 93%, suggérant une régulation du récepteur par la calcineurine également à l'état basal (Henesy, Britain et al. 2012). Le NPRA ayant échappé à la dégradation lysosomale pourrait à nouveau transduire un signal dès que le KHD est rephosphorylé (Koh, Nussenzveig et al. 1992). Il doit cependant être mentionné l'exception de la Ser487. En effet, la désensibilisation consécutive à la liaison de l'ANP induit une hyperphosphorylation de la Ser487 contrairement aux autres sites et va prévenir une future activation du NPRA (Theilig and Wu 2015).

Il existe également la désensibilisation hétérologue induite par tout processus autre que la fixation du ligand sur son récepteur. Elle est entraînée, en général, par des facteurs qui favorisent la vasoconstriction, la croissance ou la prolifération cellulaire. Comme c'est le cas pour le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), l'arginine vasopressine, l'Ang II (Haneda, Kikkawa et al. 1991) et l'ET-1 (Pandey 2005). Ces facteurs se lient sur des récepteurs à tyrosine kinase ou à 7 domaines transmembranaires, ce qui va activer la PKC via une signalisation phospholipase C (PLC) dépendante. Et il a été démontré que la PKC induite par l'Ang II diminue l'activité du NPRA par déphosphorylation (Haneda, Kikkawa et al. 1991, Potter and Garbers 1994). Cela signifie que la PKC en question active une phosphatase ou inhibe une kinase capable d'agir sur le KHD du NPRA pour inhiber l'activité du récepteur (Potter and Garbers 1994). Globalement, la littérature reste assez pauvre concernant les mécanismes de désensibilisation des récepteurs à GC particulière.

I.2.2 Effecteurs du GMPc

Le GMPc a été mis en évidence dans l'urine de rat dans les années 1960 bien avant la découverte de ces régulateurs (Ashman, Lipton et al. 1963). Il peut interagir avec 3 cibles différentes que sont : les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG), les phosphodiésterases (PDE) et les canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques (CNG) (Lucas, Pitari et al. 2000, D'Souza, Davis et al. 2004). Les quantités intracellulaires de GMPc peuvent être diminuées par une forte activité catalytique des PDE, une extrusion du GMPc dans le milieu extracellulaire et/ou un transit du nucléotide cyclique d'une cellule à une autre (Francis, Blount et al. 2011).

I.2.2.1 Protéines kinases dépendantes du GMPc

Les PKG sont des sérine/thréonine kinases et sont les principaux médiateurs de la signalisation du GMPc. Il existe deux gènes différents codant pour les PKG chez les mammifères : *PRKG1* (*Protein Kinase, cGMP-dependent, type 1*) et *PRKG2*. PKG I est cytosolique et comporte 2 isoformes : PKG I α et β (Keilbach, Ruth et al. 1992, Tamura, Itoh et al. 1996). PKG II est liée à la membrane par myristoylation d'une glycine à l'extrémité N-terminale. Cette protéine est absente du système cardiovasculaire mais

c'est la seule PKG que l'on peut rencontrer dans l'utérus (Lohmann, Vaandrager et al. 1997). Les PKG sont des homodimères composés d'un domaine catalytique en C-terminal et d'un domaine régulateur en N-terminal (**Figure 5**). La partie catalytique comprend un sous-domaine liant Mg^{2+}/ATP et un sous-domaine de liaison au substrat. Le domaine régulateur contient 1) un sous-domaine de dimérisation, 2) un sous-domaine auto-inhibiteur/d'auto-phosphorylation et 3) un sous-domaine de liaison au GMPc (Francis, Busch et al. 2010). La liaison du GMPc sur son site régulateur réorganise totalement la conformation tridimensionnelle de la PKG et rend le domaine catalytique accessible. Les PKG phosphorylent de nombreuses protéines cibles comme les facteurs CREB (cAMP Response Element-Binding protein), ATF-1 (Activating Transcription Factor-1), facteur générale de transcription TFII-I, SF1 (Splicing Factor 1), NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) ou encore JNK (c-Jun amino-terminal Kinase) (Pilz and Broderick 2005). Les PKG peuvent également directement phosphoryler les CNG qui régulent les flux transmembranaires de sodium et de calcium (Ludwig, Zong et al. 1999).

La distribution et le rôle des différentes PKG sont donnés dans le **Tableau 4**. Les souris invalidées pour les deux isoformes de PKG I sont hypertendues, ont d'importantes dysfonctions gastro-intestinales et meurent prématurément à l'âge de 6 semaines environ (Pfeifer, Klatt et al. 1998, Weber, Bernhard et al. 2007). Les souris déficientes en PKG II souffrent de nanisme et sont résistantes à l'entérotoxine thermostable d'*Escherichia coli* (Pfeifer, Aszodi et al. 1996). Il a également été démontré que PKG II active l'ouverture des canaux CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), un canal chlore dont la mutation provoque la mucoviscidose (Vaandrager, Tilly et al. 1997). Mise à part certains chondrocytes, PKG I et PKG II ne sont jamais retrouvées dans le même type cellulaire.

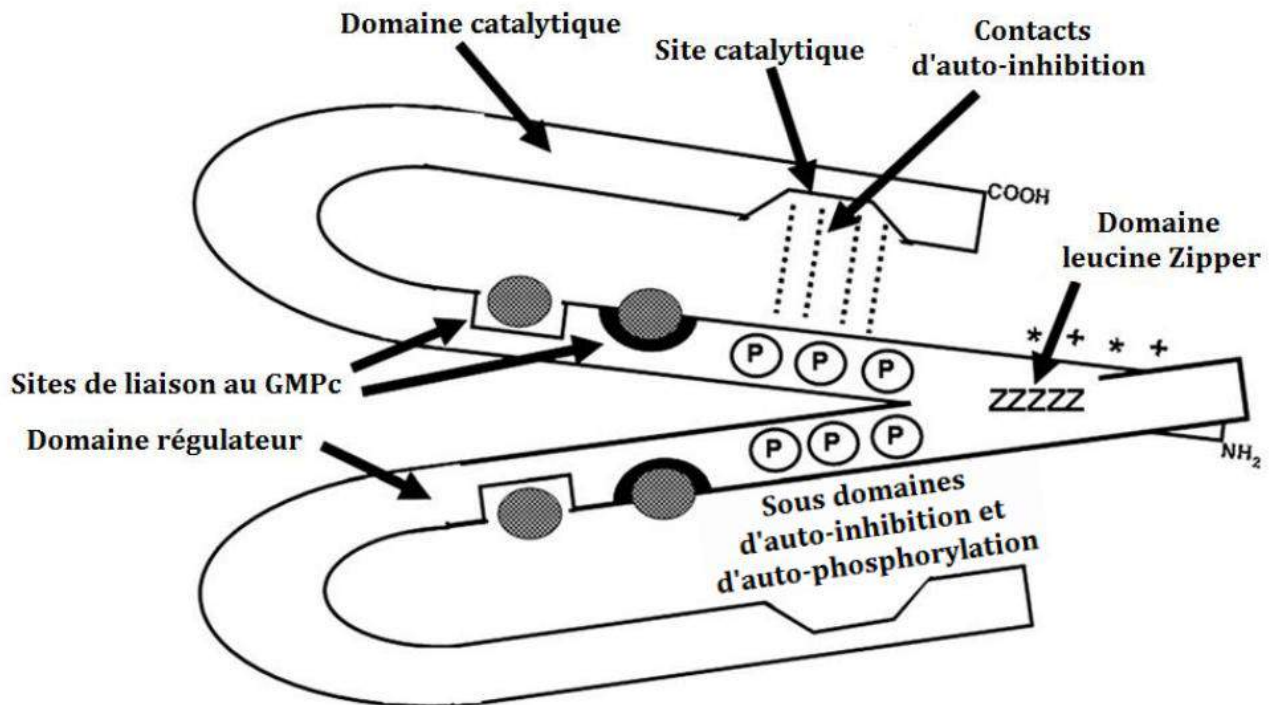


Figure 5 : Modèle schématique de PKG I. Les PKG I se dimérisent au niveau de leur région leucine zipper (ZZZZZ). La face unique de ces régions qui permet l'homodimérisation sélective de PKG I α et β ainsi que l'interaction avec des protéines cellulaires spécifiques est indiquée par les symboles (*+*). Les sites de liaison au GMPc sont homologues mais les sites du côté N-terminal ont une plus grande affinité pour le GMPc comme indiqué par les demi-cercles noirs. D'après (Francis, Busch et al. 2010).

Tableau 4 : Principales caractéristiques des différents PKG chez l'homme.

PKG	Affinité pour le GMPc (Kd)	Distribution	Principaux rôles
PKG I α	0,1 μ M	Poumon, cœur, cervelet, racine dorsale des ganglions, tissu adipeux	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle du tonus vasculaire, • Prolifération, différenciation, dédifférenciation des cellules musculaires lisses • Développement embryonnaire
PKG I β	0,5 à 1.0 μ M	Poumon, cœur, cervelet, racine dorsale des ganglions, plaquettes, neurones de l'hippocampe et du bulbe olfactif, muscles lisses de l'utérus, vaisseaux, de l'intestin et de la trachée	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle du tonus vasculaire, • Prolifération, différenciation, dédifférenciation des cellules musculaires lisses, • Agrégation et activation plaquettaire <ul style="list-style-type: none"> • Apprentissage
PKG II	0,07 μ M	Certains noyaux du cerveau, muqueuse intestinale, rein, corticosurrénale, chondrocytes, poumon	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion, • Croissance osseuse • Rythme circadien

I.2.2.2 Phosphodiesterases

Cette superfamille comprend 11 membres (PDE1-11), pouvant chacun comprendre des isoformes et codés par 21 gènes. Ils diffèrent de par leurs structures primaires, leurs affinités pour l'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc) et/ou le GMPc, leurs sensibilités aux inhibiteurs spécifiques et leurs mécanismes de régulation (**Figure 6**). Leur rôle est de dégrader les nucléotides cycliques en nucléotides 5'phosphate inactifs. Seul le domaine catalytique est conservé entre les PDE (Kleppisch 2009). Les PDE1, 2, 3, 10 et 11 reconnaissent communément le GMPc et l'AMPc, les PDE4, 7 et 8 sont spécifiques de l'AMPc et les PDE5, 6 et 9 sont spécifiques du GMPc. Le GMPc peut réguler l'activité des PDE selon 3 mécanismes : 1) en élevant leur activité par action de masse (PDE5, 6 et 9), 2) en diminuant les niveaux d'hydrolyse de l'AMPc par compétition pour le site actif (PDE1, 2 et 3) et 3) en modulant l'activité enzymatique par liaison directe à des sites allostériques spécifiques (PDE2, 5, 6, 10 et 11) (Kleppisch 2009). Par exemple, la PDE3B, activée par l'insuline dans les adipocytes, agit avec un V_{MAX} 4-10 fois supérieur pour l'AMPc. Cela signifie que le GMPc peut mobiliser la PDE3B et ainsi augmenter la demi-vie de l'AMPc (Degerman, Belfrage et al. 1997). Les PDE1, 2, 3 et 4 sont exprimées dans de très nombreux tissus alors que la distribution des autres PDE est plus restreinte (Francis, Blount et al. 2011).

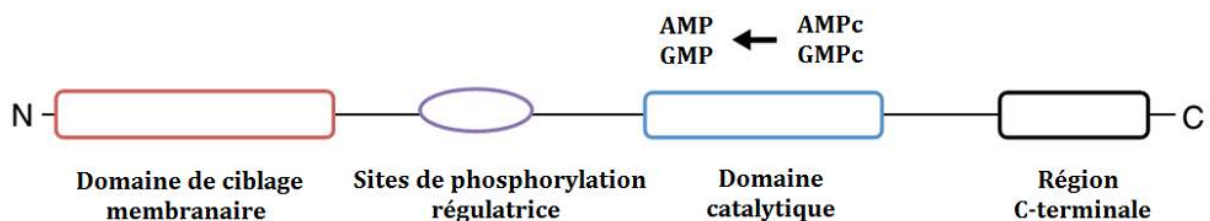


Figure 6 : Structure schématique de PDE3B. D'après (Degerman, Ahmad et al. 2011).

I.2.2.3 Canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques

Les canaux CNG appartiennent à la superfamille des canaux ioniques voltage-dépendants. 6 membres composent cette famille chez les mammifères : 4 sous-unités α (CNG α 1-4) et 2 sous-unités β (CNG β 1 et 3). Un canal est constitué de 4 sous-unités qui sont organisés autour d'un pore central. Chaque sous-unité est caractérisée par 6 segments transmembranaires (S1-S6), un pore entre les segments S5 et S6 et 2

domaines régulateurs cytoplasmiques portés par les queues C- et N-terminales (**Figure 7**) (Podda and Grassi 2014). Les canaux CNG peuvent être composés de différents isotopes, qui vont moduler leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques. Les sous-unités β sont considérées comme les régulateurs internes de l'activité des canaux CNG alors que les sous-unités α forment les monomères fonctionnels. Tous les canaux CNG sont activés directement par liaison de l'AMPc et du GMPc, avec différentes affinités pour l'un ou l'autre nucléotide selon les hétérotétramères. Leur rôle est de conduire des cations monovalents néanmoins, ils sont plus perméables au Ca^{2+} et au Na^+ en conditions physiologiques (Biel and Michalakakis 2009). Les canaux CNG ont été intensément étudiés pour leurs rôles dans la transduction des signaux visuels et olfactifs chez les vertébrés. A l'inverse, peu d'études sont menées sur leurs autres rôles potentiels bien que leur expression en ARNm ait été rapportée dans le système nerveux central, le pancréas, la rate, les testicules, les ovaires, les reins, les poumons, le cœur, les surrénales et l'intestin (McCoy, Guggino et al. 1995, Lucas, Pitari et al. 2000).

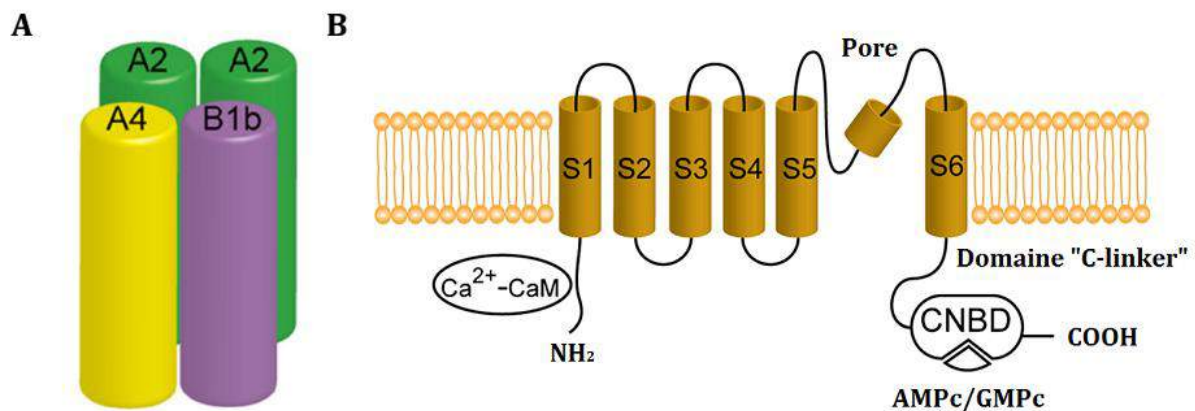


Figure 7 : Structure des canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques. A) Exemple d'assemblage tétramérique de différentes sous-unités qui constituent les CNG des récepteurs olfactifs. B) Représentation schématique d'une sous-unité consistant en 6 segments transmembranaires (S1-S6). Le CNBD indique le domaine de liaison au nucléotide cyclique et le domaine "C-linker" relie ce domaine au pore. On peut également remarquer le site régulateur au Ca^{2+} et à la Calmoduline (CaM). D'après (Podda and Grassi 2014).

I.2.3 Fonctions cardiovasculaires du système PN/NPRA

La caractérisation du cœur comme un organe endocrine s'est effectuée par la découverte des propriétés natriurétiques/diurétiques des PN. Puis très vite, se sont

rajouté leurs effets vasodilatateurs, autocrines et centraux. Un récapitulatif des rôles induits par le NPRA est donné dans le **tableau 5**. Le système PN/NPRA participe donc à l'une des fonctions les plus importantes de l'organisme, à savoir le maintien de l'homéostasie hydrosodée (Theilig and Wu 2015) (**Figure 8**).

Tableau 5 : Rôles cardiovasculaires induits par l'activation du NPRA. D'après (Kuhn 2003).

Effets	NPRA
Hormonaux	Inhibition du système rénine angiotensine aldostérone ↘ des niveaux circulants d'aldostérone et de cortisol
Cardiaques	Antihypertrophique Antifibrotique Antiapoptotique ↗ de la relaxation myocardiale
Rénaux	↗ du débit de filtration glomérulaire ↗ de la fraction de filtration ↘ de la réabsorption de sodium par le canal collecteur ↗ du volume urinaire
Spléniques	↗ de la pression microvasculaire Extravasation des fluides vers le système lymphatique
Vasculaires	Vasodilatation Modulation de la perméabilité endothéliale Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses
Centraux	↘ de l'activité sympathique ↘ de la sécrétion d'arginine vasopressine ↘ de la soif et de l'appétence pour le sel Effets sur les centres neuronaux régulateurs de la pression et de la volémie

1.2.3.1 Rôles en condition physiologique

➤ Actions rénales

Globalement, l'ANP réduit la résistance vasculaire rénale, et cela même si la pression de perfusion rénale est maintenue constante. Plus précisément, les PN agissent en au moins 3 endroits différents du rein : au niveau du glomérule, du tubule proximal et distal et du canal collecteur. L'ANP a été démontré pour augmenter le débit de filtration glomérulaire (DFG) et la perméabilité glomérulaire. Cela se produit en élevant la pression des capillaires glomérulaires via une relaxation de l'artériole afférente et une contraction de l'artériole efférente (Dunn, Ichikawa et al. 1986). L'ANP promeut la

natriurèse via l'inhibition de la réabsorption de sodium au niveau du tubule proximal, distal et du canal collecteur en empêchant l'action du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) via un antagonisme de sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires (Harris, Thomas et al. 1987) et en inhibant directement les systèmes de transport du Na⁺, comme les antiports Na⁺/H⁺ (Winaver, Burnett et al. 1990). L'ANP restreint le transport de Cl⁻ de manière PKG dépendante en limitant l'activité du cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC2) au niveau du tubule distal (Nonoguchi, Tomita et al. 1992). Le canal collecteur est le principal site d'excrétion du sodium induit par les PN (Zhao, Pandey et al. 2010). L'urodilatine est aussi efficace que l'ANP pour induire la diurèse, cependant elle est plus stable car plus résistante à la dégradation par le NPRC et la néprilysine, tous deux présents en fortes concentrations sur la bordure en brosse rénale (Kumar, Viau et al. 2015).

➤ Actions vasculaires

Les effets hypovolémiques/hypotensifs des PN ne sont pas uniquement la résultante d'effets rénaux mais sont également consécutifs aux actions vasculaires. Plus précisément, une élévation du volume vasculaire aigu, induisant donc une sécrétion d'ANP, augmente rapidement la pression sanguine chez les souris sélectivement délétées pour le gène *Npr1* dans les cellules musculaires lisses contrairement aux souris contrôles (Holtwick, Gotthardt et al. 2002). Par contre, ces souris ont une pression artérielle basale identique aux contrôles suggérant que le système PN/NPRA vasculaire est critique pour la régulation aiguë de la pression artérielle mais dispensable pour la régulation chronique. Les PN induisent une vasodilatation dont la signalisation implique PKG I, car les cellules musculaires lisses de souris déficientes en PKG I ne répondent plus à une vasodilatation induite par le GMPc (Pfeifer, Klatt et al. 1998). L'ANP module la pression sanguine et le volume intravasculaire en augmentant la perméabilité microvasculaire. En effet, l'ANP élève la conductivité hydraulique des capillaires et la perméabilité de l'endothélium aux macromolécules telles que l'albumine sans altérer la sélectivité de la barrière capillaire (McKay and Huxley 1995). L'ANP augmente également l'hématocrite puisque les souris n'ayant pas de NPRA sélectivement au niveau de l'endothélium vasculaire ont un volume plasmatique augmenté (Sabrane, Kruse et al. 2005).

➤ Actions cardiaques

Les PN exercent également des effets propres au niveau cardiaque. Les souris NPRA -/- souffrent d'une hypertrophie cardiaque malgré la normalisation de leur pression artérielle via un traitement antihypertenseur (Knowles, Esposito et al. 2001). Une autre étude a également démontré une hausse d'environ 20% de la taille des cardiomyocytes chez ces souris NPRA -/- et l'introduction du transgène *Npr1* chez ces souris diminue significativement l'hypertrophie cardiaque (Kishimoto, Rossi et al. 2001). L'ANP a aussi une portée inotrope positive (augmente la contractilité myocardique) et lusitrope positive (améliore la relaxation cardiaque d'où une fréquence cardiaque plus rapide) (Nakajima, Onishi et al. 2005).

➤ Actions centrales

Une administration centrale d'ANP a, quant à elle, été démontrée pour inhiber la prise hydrique en antagonisant l'Ang II et l'appétence pour le sel chez des rats hypertendus (Hodes and Lichtstein 2014). L'ANP ne serait donc pas directement impliqué dans la régulation centrale de la pression artérielle mais exercerait plutôt ces effets en agissant comme un modulateur d'autres molécules comme c'est le cas pour l'arginine vasopressine et l'Ang II. Les PN diminuent le tonus sympathique et limitent la sécrétion de corticotrophine (ACTH), freinant ainsi la libération d'aldostérone par les glandes surrénales (Hodes and Lichtstein 2014).

1.2.3.2 Rôles en condition pathologique

Le fait que 1) les niveaux circulants de BNP soient très faibles en condition physiologique, 2) ils augmentent fortement en cas de pathologie cardiaque en réponse à une réexpression des gènes fœtaux, 3) la demi vie plasmatique du BNP soit supérieure à celle de l'ANP (20 min *versus* 3 min environ) et 4) les concentrations sanguines corrèlent bien avec la sévérité de la maladie font du BNP un marqueur de choix dans le diagnostic et le pronostic de l'IC (Clerico, Recchia et al. 2006). La forte sécrétion des PN est la réponse de l'organisme pour ralentir le remodelage cardiaque et la rétention en sodium lors d'une IC. Les souris n'exprimant pas le gène *Nppb* développent une fibrose cardiaque liée à une augmentation de l'expression du TGF- β 3 et du procollagène- α 1 à la

suite de surcharges ventriculaires (Tamura, Ogawa et al. 2000). Le BNP diminue également les lésions tissulaires consécutives à une ischémie/reperfusion. En effet, chez le rat souffrant d'un infarctus du myocarde, le BNP limite de manière dose dépendante la taille de l'infarctus (Takagi, Kiuchi et al. 2000). Via son antagonisme avec le SRAA et son action vasodilatatrice propre et diurétique/natriurétique, le BNP diminue la pré- et la post-charge cardiaque. Le BNP exerce également des effets inotropes positifs, anti-mitotiques et anticoagulants. Cependant, les fortes doses extra-physiologiques de PN circulants ne suffisent pas toujours à empêcher la progression de l'IC vers un état décompensé, suggérant une résistance à l'action des PN. Sachant que les PN sont diminués lors de l'obésité et connaissant leurs effets protecteurs sur la sphère cardiovasculaire, cela pourrait, en partie, expliquer pourquoi l'obésité est un facteur de risque pour le développement de pathologies cardiovasculaires (Moro and Berlan 2006).

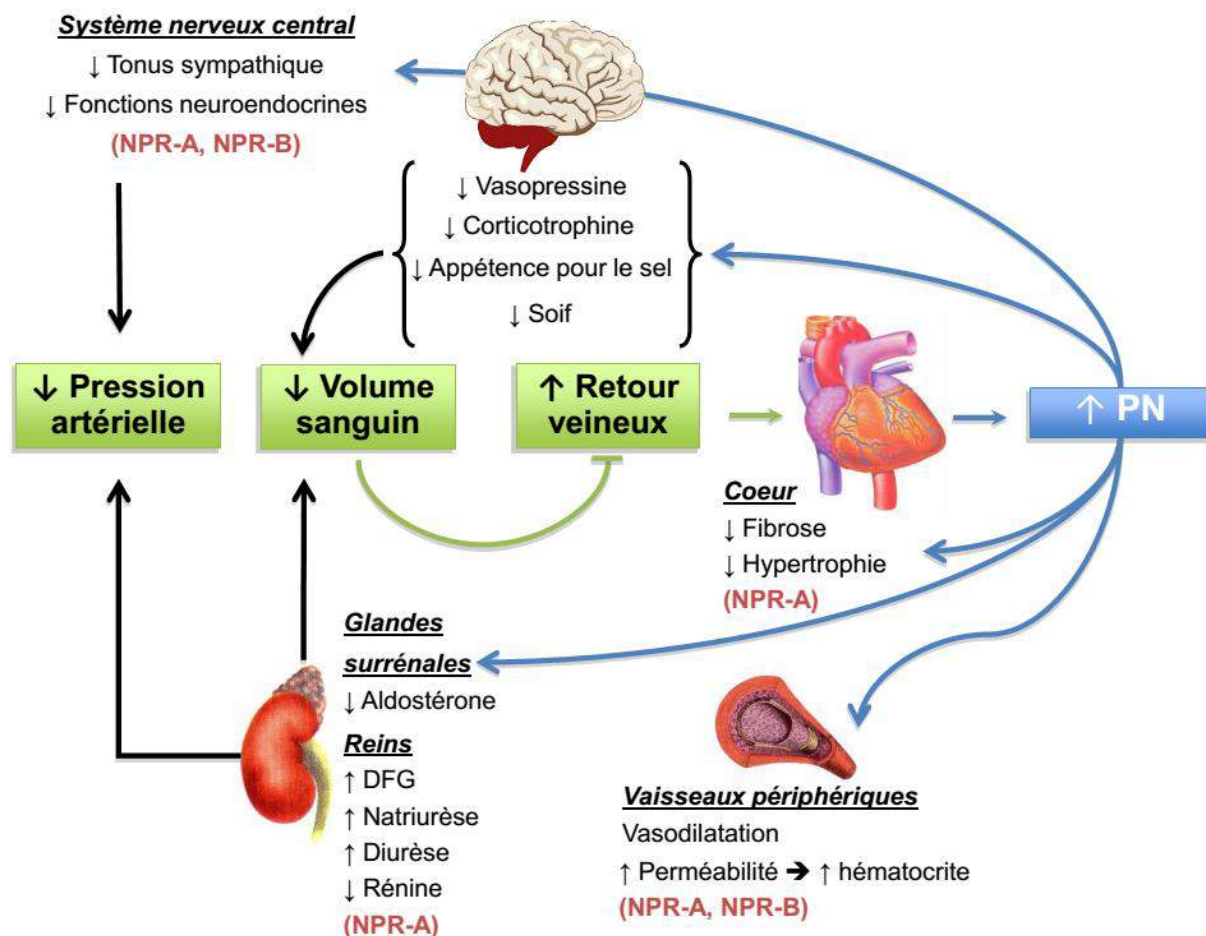


Figure 8 : Principaux effets physiologiques des peptides natriurétiques en réponse à un changement aigu du volume sanguin. DFG : débit de filtration glomérulaire. ↑ : élévation et ↓ : diminution. D'après (Moro and Lafontan 2013).

I.3 Clairance/Dégradation des peptides natriurétiques

Les PN sont rapidement éliminés de la circulation sanguine. Cela est expliqué par au moins 3 mécanismes différents : 1) la dégradation des PN via les récepteurs NPRC, 2) l'inactivation des PN par les endopeptidases et 3) leur excrétion dans les fluides biologiques corporels tels que l'urine ou la bile (Potter 2011). La clairance de l'ANP diffère beaucoup selon les organes et dépend bien sûr du flux sanguin. Des expériences de différences artérioveineuses ont permis de déterminer qu'environ 50% de la clairance de l'ANP est induite par les poumons, 20% par le foie et environ 15% par les reins. Il est à garder en mémoire que la majorité de ces expériences a été réalisée sur des patients présentant des pathologies cardiovasculaires comme une ICC, ces données peuvent donc varier chez les individus en bonne santé (Gerbes and Vollmar 1990).

I.3.1 Récepteur aux peptides natriurétiques de type C

I.3.1.1 Structure

Ce récepteur n'est pas couplé à une GC, il ne fait donc pas partie de la nomenclature des récepteurs à GC évoquée précédemment. Le NPRC possède un poids moléculaire de 65 kDa et est composé d'un ECD de 436 A.A., d'un seul domaine transmembranaire de 23 A.A. et d'une courte séquence intracellulaire de 37 A.A. (Fuller, Porter et al. 1988). C'est un homodimère covalent, contrairement au NPRA, qui présente une stœchiométrie (ligand:récepteur) 1:2 (He, Dukkipati et al. 2006) (**Figure 4 et 9**). La région extracellulaire, impliquée dans la reconnaissance du ligand, est homologue à 30% avec celui du NPRA. Le NPRC est le récepteur le plus abondant de tous les NPR puisqu'il représente plus de 90% des sites de liaison aux PN comme c'est le cas à la surface des cellules rénales (Maack, Okolicany et al. 1993) et des cellules endothéliales (Leitman, Andresen et al. 1986). La clairance des PN induite par le NPRC a été démontrée pour la première fois en 1987 via l'utilisation d'un analogue de l'ANP, le C-ANF₄₋₂₃, dépourvu de queue C-terminal ainsi que de 5 A.A. dans la structure en anneau (Maack, Suzuki et al. 1987). Le C-ANF₄₋₂₃ lie préférentiellement le NPRC au NPRA et sa perfusion dans des reins isolés ne stimule pas la filtration glomérulaire ou l'excrétion de sodium, contrairement à sa perfusion *in vivo* chez le rat. Donc le C-ANF₄₋₂₃ occupe le NPRC,

permettant à l'ANP endogène d'agir sur le NPRA. L'ordre d'affinité pour le NPRC humain est le suivant : ANP>CNP>BNP, ceci est expliqué par la plus longue queue N-terminal du BNP (Bennett, Bennett et al. 1991) (**Tableau 3**). Cette différence d'affinité justifierait également en partie la demi-vie plus longue du BNP. Par contre, les PN ont une plus faible affinité pour le NPRC humain que pour celui de rat. Engel et coll., ont démontré que cela était dû à la modification d'un seul A.A. en position 188 du NPRC qui est une isoleucine chez l'homme et une alanine chez le rat (Engel, Schoenfeld et al. 1994).

I.3.1.2 Expression

Cette protéine est codée par le gène *NPR3* (Gene ID 4883). Chez la souris, la région de 2,3 kpb en amont du codon ATG contient de nombreux éléments régulateurs putatifs : une boîte TATA, une boîte CAAT, un élément de réponse à l'AMPc, AP (Activator Protein) 1 et 2, SP-1 et deux éléments de réponse aux forces de cisaillement (Garg and Pandey 2005). Il a également été démontré que l'expression du *NPR3* est diminuée par le GMPc (Kato, Lanier-Smith et al. 1991), l'Ang II (Yoshimoto, Naruse et al. 1996), l'ET-1 (Boumati, Li et al. 2002), l'hypoxie et ses médiateurs (FGF-1, FGF-2, PDGF-BB) (Sun, Oparil et al. 2001), la grossesse (Itoh, Bird et al. 1998), un régime enrichi en sel (sélectivement au niveau rénal) (Sun, Chen et al. 2002), les bloquants β_2 -adrénergiques (Kishimoto, Yoshimasa et al. 1994), l'hypertrophie cardiaque (Brown, Nunez et al. 1993) ou encore une hémorragie sévère (Frajewicki, Kahana et al. 1997). En revanche, le TGF- β_1 (Agui, Xin et al. 1995), la vitamine D (Yanaka, Akatsuka et al. 1998) et l'ICC (Andreassi, Del Ry et al. 2001) augmentent l'expression du *NPR3*. Il est à noter que la régulation du NPRC est en miroir de celle du NPRA : beaucoup de molécules qui favorisent l'expression de l'un, inhibent la transcription de l'autre et *vice versa*. Si beaucoup de SNP ont été identifiés dans le gène *NPR3* humain, au moins 3, sont significativement associés à la pression artérielle systolique (rs6889608, rs1173773 et rs2270915) (Saulnier, Roussel et al. 2011). Les souris invalidées pour le gène *Npr3* expriment une cyphose et une excroissance osseuse à la suite d'un défaut d'ossification endochondrale, en accord avec le phénotype d'une surexpression du BNP ou du CNP (Jaubert, Jaubert et al. 1999). Ces souris manifestent aussi une légère hypotension et une diminution du volume sanguin et de la capacité à concentrer l'urine (Matsukawa,

Grzesik et al. 1999). Si ces souris conservent les mêmes concentrations plasmatiques de PN que leurs contrôles, la demi-vie de ces peptides est significativement augmentée.

I.3.1.3 Internalisation

L'internalisation du NPRC est un phénomène constitutif, indépendant de la liaison du ligand (Dickey, Flora et al. 2011). De 5% par min en condition basale, le niveau d'internalisation du NPRC est inhibé à basses températures et avec l'utilisation d'agents bloquant la dégradation lysosomale des protéines (Nussenzveig, Lewicki et al. 1990). Il est également inhibé par du sucrose hyperosmolaire suggérant que le mécanisme impliqué est clathrine dépendant. Le NPRC libère l'ANP plus lentement que son niveau d'internalisation. Cela permet l'internalisation et la dégradation de la majeure partie de l'ANP lié. Les taux d'endocytose et d'hydrolyse lysosomale du C-ANF₄₋₂₃ sont diminués de plus de 10 fois lors de la délétion totale de la partie intracellulaire du NPRC et jusqu'à 50% lors de la mutation de la Tyr508 de la partie intracellulaire (Cohen, Koh et al. 1996). Le NPRC libéré de son ligand est ensuite recyclé à la membrane (Pandey 1992).

Le rôle du NPRC ne s'arrêterait pas à celui de récepteur silencieux comme il a pu être abondamment décrit dans la littérature. Il a été démontré qu'une séquence de 17 A.A. de sa partie cytoplasmique est impliquée dans l'activation des protéines G α 1 et G α 2, qui inhibent l'adénylate cyclase (AC) et activent la PLC, après liaison de l'ANP au NPRC (Pagano and Anand-Srivastava 2001, Zhou and Murthy 2003). D'autres études sont nécessaires pour valider la pertinence de ces observations *in vivo*.

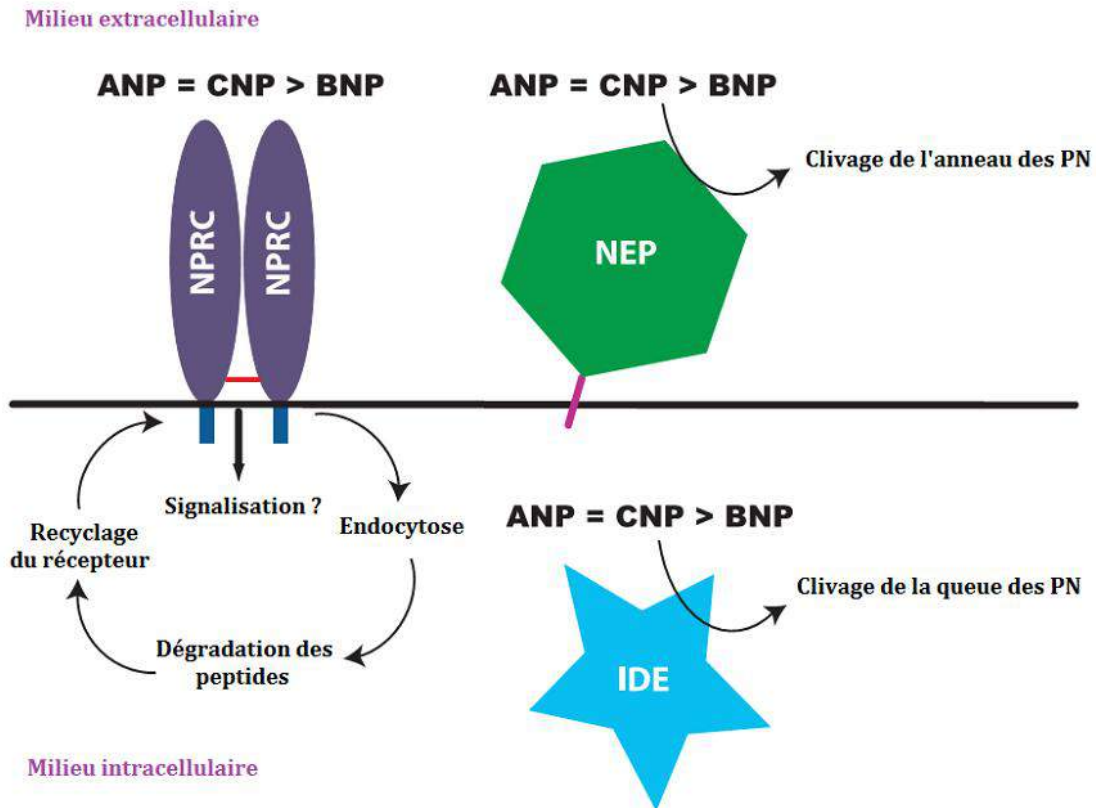


Figure 9 : Récepteur de clairance et endopeptidases des PN. L'IDE est une enzyme intracellulaire mais elle a également été retrouvée dans des fractions membranaires. NEP : Néphrilyse ; IDE : Insulin degrading enzyme. D'après (Potter 2011).

I.4.1 Endopeptidases

I.4.1.1 Néphrilyse

La néphrilyse (NEP, endopeptidase neutre, CD10, Common acute lymphoblastic leukemia antigen, EC 3.4.24.11) est une glycoprotéine membranaire de 100 kDa très largement distribuée dans l'organisme (**Figure 9**). Cette métalloprotéase à zinc clive les peptides vasoactifs tels que les neuropeptides, l'ET-1, l'Ang I et les PN matures en catalysant le clivage de groupes amines des résidus hydrophobes (Okolicany, McEnroe et al. 1992, Muangman, Spenny et al. 2003) (**Figure 3**). Le site de clivage préférentiel de la NEP sur les PN se situe entre les résidus Cys-Phe de la boucle (Kenny, Bourne et al. 1993). La NEP est très exprimée dans la bordure en brosse rénale et intestinale ainsi que sur les adipocytes et elle est également retrouvée en quantité moindre dans le cerveau, les glandes salivaires, les îlots de Langerhans, le colon, la muqueuse nasale et les poumons (Olerud, Usui et al. 1999). La NEP peut également être sécrétée dans certains fluides physiologiques comme le plasma sanguin et sérial et le liquide

céphalorachidien et amniotique (Spillantini, Sicuteri et al. 1990). L'ectodomaine contient 5 sites putatifs de N-glycosylation qui régulent le transport et l'activité de l'enzyme à la surface cellulaire. Les souris invalidées pour la NEP présentent une létalité plus élevée que les souris sauvages à la suite d'un choc septique induit par le lipopolysaccharide (Lu, Gerard et al. 1995). De plus, ces souris ont une diminution de la dégradation rénale de l'ANP mais pas du BNP (Pankow, Wang et al. 2007). Cela est concordant avec des données humaines où l'inhibition de la NEP seule suffit à augmenter les concentrations circulantes d'ANP, contrairement au BNP (Smith, Espiner et al. 2000, Walther, Stepan et al. 2004). Il est à garder en mémoire que la dégradation du BNP par la NEP est espèce dépendante : un inhibiteur de la NEP empêche la dégradation du BNP dans le rein de rat alors que ce même inhibiteur est sans effet chez l'homme (Dickey and Potter 2010). Le gène de la NEP peut subir un épissage alternatif et donner naissance à la NEP-2. Avec 97% d'homologie avec la NEP, cette enzyme clive les mêmes substrats et lie les mêmes inhibiteurs (Voisin, Rognan et al. 2004).

De part son large champ de clivage, l'industrie pharmaceutique s'est intéressée à développer plusieurs inhibiteurs de la NEP pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Le Candoxatril est utilisé aujourd'hui dans le traitement de l'IC mais n'exerce pas d'effet sur la pression sanguine, bien que cet inhibiteur augmente les niveaux d'ANP circulants (Bevan, Connell et al. 1992, O'Connell, Jardine et al. 1992). Cela s'expliquerait par le fait que la NEP clive également des peptides vasoconstricteurs tels que l'Ang II. L'Omapatrilat est composé d'un inhibiteur de la NEP et de l'enzyme de conversion de l'Ang. Si cette molécule présente une certaine efficacité antihypertensive, elle a été retirée du marché pour cause d'angio-œdèmes (Messerli and Nussberger 2000). Le LCZ696 (Novartis Pharmaceuticals), inhibant simultanément la NEP et le récepteur à l'Ang II est actuellement en essai clinique de phase III et présente de bons résultats dans le traitement de l'IC et de l'hypertension (Ruilope, Dukat et al. 2010, Minguet, Sutton et al. 2015). Le LCZ696 augmente significativement les concentrations plasmatiques de GMPc et de PN de façon dose dépendante (Gu, Noe et al. 2010, Bavishi, Messerli et al. 2015).

I.4.1.2 Dipeptidyl Peptidase IV

La Dipeptidyl-Peptidase IV (DPPIV, CD26, EC 3.4.14.5) est une exopeptidase exprimée à la surface cellulaire et qui peut également être retrouvée sous forme soluble dans le plasma. La DPPIV clive préférentiellement les prolines ou les alanines du côté N-terminal en pénultième position. L'inhibition de cette enzyme, comme par exemple via les gliptines, est aujourd'hui très étudiée pour augmenter la demi-vie du GLP-1 qui améliore le contrôle glycémique. Mais il a également été démontré que la DPPIV peut cliver *in vitro* le BNP₍₁₋₃₂₎ mature en BNP₍₃₋₃₂₎, ce dernier étant présent dans le plasma chez l'homme et ayant une activité biologique réduite (Boerrigter, Costello-Boerrigter et al. 2007, Lam, Burnett et al. 2007) (**Figure 3**). De plus, le BNP₍₃₋₃₂₎ a été reporté pour être élevé dans le sang des patients souffrant d'IC, condition où l'activité de la DPPIV plasmatique est augmentée de 130% (dos Santos, Salles et al. 2013). La perte du dipeptide N-terminal du BNP mature ne change pas son affinité pour la NEP (Brandt, Lambeir et al. 2006). Si le DPPIV ne reconnaît pas l'ANP, l'expression protéique cardiaque de ce peptide est pourtant très induite chez les souris n'exprimant pas la DPPIV (Sauve, Ban et al. 2010). Cela pourrait être expliqué par l'augmentation de la demi-vie du GLP-1 qui va stimuler la sécrétion atriale d'ANP (Kim, 2013, Nature). D'autres études sont nécessaires pour prouver la relevance physiologique de DPPIV directement sur les niveaux circulants de PN.

I.4.1.3 Insulin degrading enzyme et Méprine A

L'Insulin Degrading Enzyme (IDE, EC 3.4.24.56) est une métalloprotéase à zinc ubiquitaire retrouvée dans les fractions cytosoliques et membranaires. L'IDE clive rapidement l'ANP et le CNP (**Figure 3 et 9**), inactivant leur aptitude à élever le GMPc intracellulaire. Si cette enzyme a moins d'affinité pour le BNP, son clivage par l'IDE potentialise sa capacité à activer le NPRA (Ralat, Guo et al. 2011). Même si la pertinence de ce modèle reste à être prouvée *in vivo*, Maianti et coll., ont modélisé un inhibiteur de l'IDE dont une partie des effets métaboliques bénéfiques pourrait impliquer les PN une fois injecté dans des souris obèses (Maianti, McFedries et al. 2014).

La métalloprotéase multimérique méprine A (EC 3.4.24.18) a été rapportée pour cliver le BNP₍₁₋₃₂₎ murin en BNP₍₇₋₃₂₎, métabolite toujours actif qui est ensuite définitivement inactivé par la NEP (Pankow, Wang et al. 2007). Boerrigter et coll., ont

testé la bioactivité du BNP₍₈₋₃₂₎, produit de dégradation du BNP humain par la méprine A murine, chez le chien et ont rapporté une diminution de la natriurèse avec le BNP₍₈₋₃₂₎ comparé au BNP₍₁₋₃₂₎ (Boerrigter, Costello-Boerrigter et al. 2009). Une coopération méprine A/NEP a été mise en évidence dans des membranes rénales humaines où la dégradation du BNP₍₁₋₃₂₎ est restée inchangée après l'utilisation d'inhibiteurs de ces 2 enzymes (Dickey and Potter 2010).

I.3.3 L'élimination "passive" des PN

La concentration urinaire d'ANP₍₁₋₂₈₎ chez des sujets masculins et sains est de 26 pg/ml pour une concentration plasmatique de 32 pg/ml (Marumo, Sakamoto et al. 1986). La diminution de la fonction rénale ne semble pas augmenter les niveaux plasmatiques d'ANP (Marumo, Sakamoto et al. 1990). En revanche, des patients souffrant d'ICC présentent des concentrations d'ANP urinaires de 119,2 ng/jour, contre 25 ng/jour chez des sujets sains, et ce chiffre diminue à 53,3 ng/jour après intervention thérapeutique (Ando, Umetani et al. 1988). De plus, la mesure du NT-proBNP urinaire a une précision diagnostique comparable à celle du NT-proBNP plasmatique chez les patients souffrants d'IC (Ng, Geeranavar et al. 2004). Enfin, l'ANP a également été retrouvé dans la bile à une concentration de 1,3 pg/ml (Oh, Cho et al. 1994).

Les PN jouent un rôle fondamental dans la régulation de la balance hydrosodée, de la volémie et de la pression artérielle. Le système PN/NPRA, qui est extrêmement conservé dans le règne du vivant, possède une distribution de ces récepteurs sur l'ensemble des organes composant le corps humain, y compris les organes métaboliques. Cela laisse supposer que le rôle physiologique des PN ne s'arrête pas au seul contrôle fluidique mais s'étend bien au delà dans le contrôle du métabolisme énergétique.

II Les effets métaboliques des peptides natriurétiques

Une des toutes premières expériences étudiant les actions métaboliques des PN remonte à 1985. Il est alors démontré qu'un traitement à l'ANP promeut la gluconéogenèse rénale, phénomène connu pour être régulé par la réabsorption de sodium et de potassium (Obara, Yamada et al. 1985). Quelques années plus tard, les tests des effets métaboliques potentiels des PN seront élargis aux adipocytes. Sur ces cellules provenant de rats, il est mis en évidence que l'ANP peut lier et activer la production de GMPc sans induire la lipolyse (Jeandel, Okamura et al. 1989). La même année, 2 études publient que l'ANP possède des liaisons de haute affinité sur des adipocytes bruns issus de souris (Bacay, Mantyh et al. 1988) et de moutons (Okamura, Kelly et al. 1988). Et à défaut d'avoir mis en évidence un effet biologique, Bacay et coll. concluent que les PN doivent avoir un rôle dans la thermorégulation du rat. C'est en 1996, que l'expression génique des récepteurs aux PN est analysée dans le tissu adipeux humain. Le NPRA y est 2,5 fois et 5 fois plus abondant que dans les reins et les glandes surrénales respectivement (Sarzani, Dessi-Fulgheri et al. 1996). L'ARN messenger du NPRC y est également très exprimé mais en moindre quantité que dans les reins. Ces données ont suscité la curiosité de l'équipe de Max Lafontan qui va alors étudier les effets des PN sur l'adipocyte humain et mettre en évidence une nouvelle voie d'activation de la lipolyse (Sengenès, Berlan et al. 2000).

II. 1 Lipolyse adipocytaire

La lipolyse est l'hydrolyse des ponts esters d'une molécule de triacylglycérol (TAG) en un glycérol et 3 acides gras (AG). Si ce processus est réalisé dans de multiples organes comme le muscle squelettique, le pancréas, ou encore l'intestin, seul le tissu adipeux (TA) est capable de déverser les produits de cette hydrolyse dans la circulation sanguine pour alimenter l'organisme en cas de jeûne, d'exercice physique, de froid ou de stress. Chez les mammifères, la libération successive d'un AG fait intervenir respectivement l'adipose triglyceride lipase (ATGL) (encore appelée Patatin-like phospholipase domain containing 2 ou Desnutrine), puis la lipase hormonosensible

(LHS) et enfin la monoacylglycerol lipase (MGL) (Arner and Langin 2014, Nielsen, Jessen et al. 2014) (**Figure 10**). Dans cette rubrique, ne vont être brièvement abordés que les principaux acteurs de la lipolyse chez l'homme, à savoir les catécholamines, les PN et l'insuline. Les autres régulateurs de la lipolyse sont mentionnés dans le **Tableau 6**.

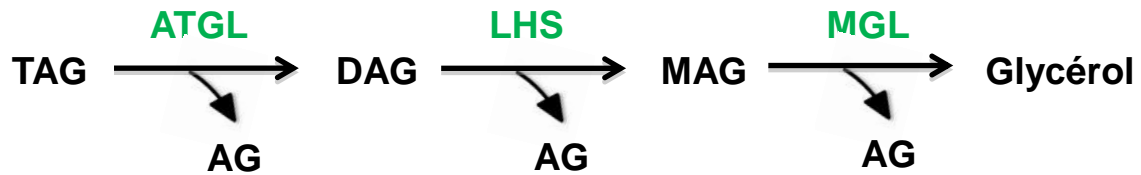


Figure 10 : Etapes successives de la lipolyse. AG : acide gras ; ATGL : adipose triglyceride lipase ; DAG : diacylglycérol ; LHS : lipase hormonosensible ; MAG : monoacylglycérol ; MGL : monoacylglycerol lipase ; TAG : triacylglycérol.

Tableau 6 : Facteurs régulant la lipolyse chez l'homme.

Facteurs	Récepteurs	Signalisation	Références
<i>Pro-lipolytiques</i>			
Catécholamines	β_1 et β_2 AR	Activation AC, ↗ AMPc	(Lafontan, Berlan et al. 1985)
Cortisol	GR	↗ sensibilité de la voie adrénérgique	(Divertie, Jensen et al. 1991)
Hormone de croissance	GHR	Redistribution des $G\alpha i2$	(Harant, Beauville et al. 1994)
Interleukine 6	IL6R/Gp130	↗ expression ERK, PGC1 α	(Yang, Ju et al. 2008)
Parathormone	PTHr	Activation AC, ↗ AMPc	(Sinha, Thajchayapong et al. 1976)
Peptides natriurétiques	NPRA	Activation GC, ↗ GMPc	(Sengenès, Berlan et al. 2000)
TNFα	TNFR1	↘ expression PLIN, ↘ IRS1, ↘ $G\alpha i$	(Langin and Arner 2006)
Triiodotyronine (T3)	TR- α	↗ β_2 AR, ↘ PDE3B, $\alpha 2$ -AR et $G\alpha i2$	(Viguerie, Millet et al. 2002)
Testostérone	SHR	?	(O'Reilly, House et al. 2014)
Zinc $\alpha 2$ glycoprotéine	β_2 AR	Activation AC, ↗ AMPc ?	(Cabassi and Tedeschi 2013)
<i>Anti-lipolytiques</i>			
Acide nicotinique (Vit B8, Niacin)	GPR109A	Inhibition AC, ↘ AMPc	(Kamanna and Kashyap 2007)
Adénosine	A1	Inhibition AC, ↘ AMPc	(Larrouy, Galitzky et al. 1991)
Adrénaline	$\alpha 2$ -AR	Inhibition AC, ↘ AMPc	(Lafontan and Berlan 1995)
Insulin like growth factor 1 (IGF-1)	IR	↗ PDE3B,	(Bolinder, Lindblad et al. 1987)
Insuline	IR	↗ PDE3B, ↘ phosphorylation PLIN1	(Stich, Pelikanova et al. 2003)
Neuropeptide Y et peptide YY	NPY-Y1	Inhibition AC, ↘ AMPc	(Serradeil-Le Gal, Lafontan et al. 2000)
Œstrogène	ER- α	↗ densité des $\alpha 2$ -AR	(Luglio 2014)
Prostaglandine	EP3R	Inhibition AC, ↘ AMPc	(Kather 1982)

AR : Adrenergic Receptor ; AC : Adénylate Cyclase ; GR : Glucocorticoid Receptor ; GHR : Growth Hormone Receptor ; IL6R : Interleukin 6 Receptor ; Gp130 : Glycoprotein 130 ; ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases ; PTHr : Parathyroid Hormone Receptor ; TNFR1 : Tumor Necrosis Factor- α -Receptor-1 ; TR- α : Thyroid hormone Receptor α ; SHR : Steroid Hormone Receptor ; GPR109A : G Protein-coupled Receptor 109A ; IR : Insulin Receptor ; NPY-Y1 : Neuropeptide Y receptor Y1 ; ER- α : Estrogen Receptor- α ; EP3R : Prostaglandin E Receptor 3

II.1.1 Catécholamines

II.1.1.1 Récepteurs adrénérgiques

Les agonistes adrénérgiques ont la particularité de pouvoir être activateurs ou inhibiteurs de la lipolyse selon qu'ils se lient respectivement aux récepteurs β - ou α_2 -adrénérgiques. Ce sont essentiellement les concentrations locales en catécholamines qui vont moduler le type de récepteur activé. Les récepteurs β -adrénérgiques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) associés à des molécules hétérotrimériques constituées des sous-unités β , γ et α_s pour la protéine activatrice G_s ou α_i pour la protéine inhibitrice G_i . L'importance physiologique de ces récepteurs varie selon l'espèce, le sexe, l'âge, la localisation anatomique du TA et le degré d'obésité (Lafontan, Bousquet-Melou et al. 1995). La noradrénaline lie ses récepteurs adrénérgiques dans l'ordre suivant : $\alpha_2 > \beta_1 \geq \beta_2 > \beta_3$, alors que l'adrénaline lie préférentiellement : $\alpha_2 > \beta_2 > \beta_1 > \beta_3$. La lipolyse est activée via les récepteurs adrénérgiques β_1 et β_2 chez l'homme, à la fois *in vitro* (Mauriege, De Pergola et al. 1988) et *in vivo* (Barbe, Millet et al. 1996) et via les β_3 chez le rongeur (Robidoux, Martin et al. 2004). Sur l'adipocyte humain, il existe autant de récepteurs β_1 que de β_2 et ils sont 5 à 10 fois plus nombreux dans le TA omental que dans le TA sous cutané (TASC) (Hellmer, Marcus et al. 1992). A faible dose, l'adrénaline est anti-lipolytique dans les adipocytes issus de TASC et de TA fémoral et devient lipolytique à forte dose. Cependant, l'adrénaline est toujours un facteur induisant la lipolyse dans le TA omental dû au ratio plus élevé de récepteurs β_{1-2}/α_2 adrénérgiques (Mauriege, Galitzky et al. 1987). L'adrénaline atteint son effet maximal quand sa concentration circulante est multipliée par 3 (Marker, Hirsch et al. 1991). Chez l'obèse, la diminution de la lipolyse stimulée est attribuée à une diminution et à une augmentation de la sensibilité, respectivement, des récepteurs β et α_2 adrénérgiques induites par les catécholamines ainsi qu'à une diminution de l'expression de la LHS (Mauriege, Despres et al. 1991, Lafontan and Berlan 1993, Large, Reynisdottir et al. 1999).

II.1.1.2 Signalisation

La liaison du ligand au RCPG libère α_s qui active alors l'AC pour stimuler la production d'AMPc à partir d'ATP. Chez les mammifères, il existe 9 isoformes d'AC

membranaires et 1 isoforme soluble (Tasken and Aandahl 2004). Une des cibles de l'AMPc nouvellement formée est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Dès lors que 2 molécules d'AMPc se lient à ces sous-unités régulatrices, cela libère l'activité catalytique de la PKA qui phosphoryle et active la périlipine 1 (PLIN1 ou PLINA) sur les Ser497 et Ser522 chez l'homme (Ser492 et 517 chez la souris) (McDonough, Maciejewski-Lenoir et al. 2013). Insérée dans la membrane des gouttelettes lipidiques, PLIN1 une fois phosphorylée libère comparative gene identification-58 (CGI-58), qui est un puissant co-activateur de l'ATGL et initie ainsi la lipolyse (Lass, Zimmermann et al. 2006). PKA active également la LHS en phosphorylant les sérines 552, 649 et 650 dans des adipocytes humains (Ser563, 659 et 660 pour la LHS de rat) (Watt, Holmes et al. 2006, McDonough, Maciejewski-Lenoir et al. 2013). Ces phosphorylations permettent la translocation de la LHS du cytosol à la membrane des gouttelettes lipidiques (Ser552) ainsi que l'activation de l'activité enzymatique (Ser649 et Ser650) pour continuer la lipolyse initiée par l'ATGL (Egan, Greenberg et al. 1992, Nielsen, Jessen et al. 2014) **(Figure 11)**.

II.1.1.3 Insuline

Le facteur anti-lipolytique majeur est sans conteste l'insuline normalement sécrétée en période post prandiale par le pancréas pour stimuler le stockage des nutriments (Stich, Pelikanova et al. 2003). L'effet de l'insuline est immédiat et puissant puisqu'il inhibe 80-90% des AG circulants lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (Jensen, Caruso et al. 1989). Son récepteur à activité tyrosine kinase induit une auto-/trans-phosphorylation de ces sous-unités β après liaison de l'insuline. Cela entraîne ensuite une longue chaîne de phosphorylation/activation de molécules comme suivant : insulin receptor substrate 1/2 (IRS1/2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui catalyse la conversion du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), Akt et enfin PDE3B qui dégrade l'AMPc (Choi, Park et al. 2006) **(Figure 11)**. La sensibilité à cet effet anti-lipolytique de l'insuline est altérée chez des sujets souffrant d'une obésité viscérale (Roust and Jensen 1993) ou d'un DT2 (Jensen, Caruso et al. 1989). Ainsi l'IC₅₀ de l'insuline plasmatique, mesurée comme étant la suppression de 50% du flux d'AG, oscille entre 12 pM chez des sujets sains et 33 pM chez des individus DT2. Un autre effet majeur de l'insuline, via sa

signalisation Akt dépendante, est d'induire la translocation des vésicules contenant glucose transporter type 4 (GLUT4) à la membrane plasmique pour permettre le transport de glucose dans la cellule quand la glycémie est élevée (Carvalho, Schellhorn et al. 2004).

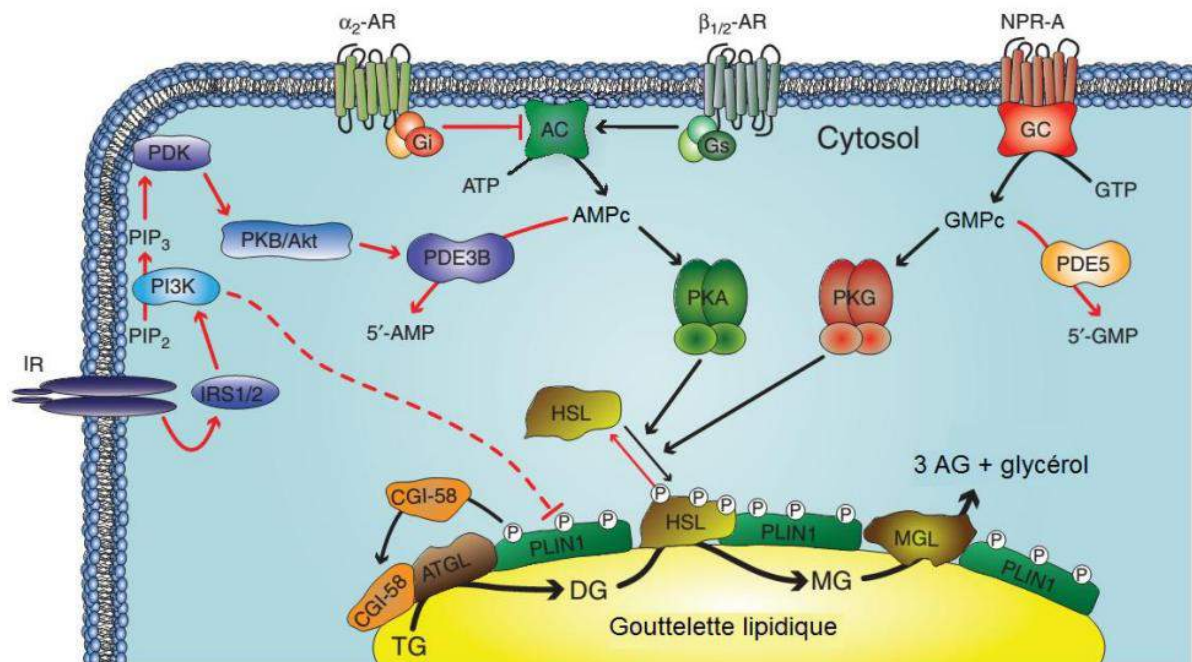


Figure 11 : Voies majeures de signalisation régulant la lipolyse humaine. Les lignes noires et rouges indiquent une voie pro-lipolytique et anti-lipolytique respectivement. Les flèches reflètent une activation et les lignes barrées, une inhibition. La ligne en pointillés montre une voie putative activée par l'insuline agissant sélectivement sur PLIN1. α_2 - ou $\beta_{1/2}$ -AR : récepteurs α_2 - ou $\beta_{1/2}$ -adrénergiques ; CGI-58 : Comparative gene identification-58 ; IR : Insulin Receptor ; IRS1/2 : IR Substrates 1 et 2 ; PDK : Phosphoinositide-dependent kinase ; PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase ; PIP_{2/3} : Phosphatidylinositol bi-/tri-phosphate ; PKB/Akt : Protein kinase B ; PLIN1 : Perilipine 1. Issu de (Nielsen, Jessen et al. 2014).

II.1.2 Lipolyse induite par les peptides natriurétiques

II.1.2.1 Caractérisation pharmacologique

Dès les années 1990, les NPR étaient connus pour être très exprimés à la surface des adipocytes sans rôle associé (Sarvani, Dessi-Fulgheri et al. 1996). En 2000, notre laboratoire a mis en évidence le rôle lipolytique des PN *in vitro* sur des adipocytes isolés du TASC de femmes en surpoids (Sengenès, Berlan et al. 2000). La libération de glycérol est alors la même après une stimulation à l'isoprotérénol (agoniste β_1 et β_2

adrénergique) ou à l'ANP, soit 1,48 μmol de glycérol/mg de lipides/90 min, pour des pD2 (-log EC₅₀) respectives de 7,70 et 9,82. L'ANP est lipolytique dès 100 pM c'est à dire à des doses physiologiques. La potentialité lipolytique des PN est classée selon l'ordre suivant : ANP>BNP>>CNP (respectivement 92,8%, 84,5% et 17,7% de l'effet maximal de l'isoprotérénol). Cette observation a également été avérée *in situ* grâce à l'infusion d'ANP (10 μM) en microdialyse dans le TASC d'hommes minces (Sengenes, Berlan et al. 2000). L'effet maximum est atteint 45 min après le début de la perfusion et augmente la libération de glycérol de 250% pour revenir à la normale 45 min après ce pic.

II.1.2.2 Signalisation et régulation

La voie lipolytique induite par les PN conduit à l'activation des mêmes acteurs moléculaires finaux qu'une stimulation par les catécholamines (**Figure 11**). Un traitement d'adipocytes isolés à l'ANP (0,1 μM) induit une augmentation de GMPc de 187 fois sans faire varier les niveaux d'AMPc (Sengenes, Berlan et al. 2000). Le GMPc ainsi produit, active PKG I qui phosphoryle et active la LHS ainsi que PLIN1 (Sengenes, Bouloumie et al. 2003, Lafontan, Moro et al. 2008). Dans l'adipocyte, deux PDE régulent essentiellement les concentrations de GMPc. Il y a d'abord la PDE5 qui clive le GMPc, mais les signaux régulant ce processus sont encore ignorés à ce jour. La PDE3B a, quant à elle, pour cible commune l'AMPc/GMPc. Des adipocytes préincubés avec un puissant inhibiteur de la PDE3B, voit leur activité lipolytique potentialisée avec de l'isoprotérénol, et sans changement de réponse en présence d'ANP (Sengenes, Berlan et al. 2000). De plus, le pouvoir lipolytique des PN reste inchangé après préincubation des adipocytes à l'insuline, qui multiplie par 2,2 fois l'activité de la PDE3B, alors que l'isoprotérénol a son effet significativement altéré (Moro, Galitzky et al. 2004, Moro, Polak et al. 2005). L'utilisation de sildénafil ou de thiorphan pour inhiber respectivement la PDE5A ou la NEP ne modifie pas la lipolyse induite par l'ANP sur des adipocytes isolés issus de patients sains (Moro, Klimcakova et al. 2007). La voie lipolytique des PN est donc parallèle et indépendante à celle des catécholamines et est également additive avec l'utilisation d'un agoniste β -adrénergique tel que l'isoprotérénol (Moro, Galitzky et al. 2004).

II.1.2.3 Dérégulation

La régulation de la lipolyse adipocytaire dépendante des PN reste méconnue. Des expériences de microdialyse dans le TASC de sujets sains ont révélé une diminution de 44% de l'activité lipolytique induite par 10 μ M d'ANP, 2h après une première stimulation à l'ANP (Birkenfeld, Boschmann et al. 2006). Ces résultats ont été reproduits *in vitro* et mettent en évidence une désensibilisation homologue physiologique du NPRA dans la régulation de la lipolyse adipocytaire humaine. Cette dernière est émoussée dans un certain nombre de conditions pathophysiologiques telles le syndrome de Stein-Leventhal ou syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (Moro, Pasarica et al. 2009), l'hypothyroïdisme (Polak, Moro et al. 2007). Par contre, cette lipolyse est augmentée après un régime pauvre en calories (Sengenès, Stich et al. 2002), chez les patients atteints d'IC (Polak, Kotrc et al. 2011), de cachexie cancéreuse (Agustsson, Ryden et al. 2007) ou durant l'hyperthyroïdisme (Polak, Moro et al. 2007). Le statut de cette lipolyse induite par les PN durant le surpoids ou l'obésité n'est pas clairement établi. Si certains la démontrent altérée *in vivo* (Moro, Pillard et al. 2005), d'autres la voient inchangée chez des jeunes hommes obèses dits "métaboliquement sains" (Galitzky, Sengenès et al. 2001). Cette dernière étude avait été menée avec l'utilisation d'une dose largement extra physiologique d'ANP et relate également que les adipocytes isolés de sujets sains ou obèses ont la même réponse lipolytique induite par l'isoprotérénol, cette dernière voie étant pourtant bien caractérisée comme altérée durant l'obésité (Lafontan and Berlan 1993). D'autres études restent donc à être menées pour pouvoir conclure quant à l'impact des désordres métaboliques sur la lipolyse induite par les PN.

Cependant, il est reconnu que la part des PN dans la lipolyse adipocytaire est plus importante que les catécholamines chez les femmes en surpoids durant une activité physique d'intensité faible ou modérée (respectivement 30 et 50% de la VO_{2MAX}) comparativement aux hommes ayant le même IMC (Moro, Pillard et al. 2007). Comme pour les catécholamines, l'ANP est plus lipolytique sur les adipocytes dits « gros » que petits (respectivement 595 vs 293 picolitres) provenant de TASC d'un même individu obèse (Laurencikienė, Skurk et al. 2011). Et pour cause, les gros adipocytes comportent plus de NPRA à leur surface et une stimulation à l'ANP (100 nM, 10 min) augmente significativement plus le GMPc intracellulaire dans ces gros adipocytes (Yu, Yu et al. 2008). L'importance des PN dans la régulation de la lipolyse ne doit pas être négligée. En effet, ils deviennent les régulateurs majeurs de ce processus durant un exercice

physique (Moro, Crampes et al. 2004, Moro, Pillard et al. 2008), ou en situation de prise de bloquants β -adrénergiques (Birkenfeld, Boschmann et al. 2006). De plus, la perfusion d'un β -bloquant au cours d'une expérience de microdialyse ne réduit que de 40% la hausse de glycérol extracellulaire consécutive à un exercice physique (Moro, Crampes et al. 2004). Ils démontrent aussi que l'élévation de la sécrétion d'ANP induite par l'exercice physique est significativement plus forte en cas de prise de β -bloquants oraux et que les concentrations de GMPc corrént positivement avec le glycérol extracellulaire (Moro, Crampes et al. 2004). Cependant, il est à noter que toutes ces études sont basées sur des corrélations à cause du manque d'antagoniste du récepteur NPRA utilisable lors d'études cliniques.

II.1.2.4 Spécificité

La lipolyse induite par les PN semble être une spécificité des primates depuis que les adipocytes de souris, de rat, de lapin ou encore de chien ne répondent pas à l'ANP (Sengenès, Zakaroff-Girard et al. 2002). Ce phénomène est expliqué par la différence du ratio NPRA/NPRC qui est environ 100 fois plus faible dans les adipocytes issus de rongeurs que ceux humains. Cela est physiologiquement relevant depuis qu'une stimulation de ces adipocytes avec 1 μ M d'ANP pendant 15 min augmente de 2,8 fois le GMPc intracellulaire chez le rat contre 258 fois chez l'humain (Sengenès, Zakaroff-Girard et al. 2002). D'ailleurs, les adipocytes de souris invalidées pour le NPRC présentent une activité lipolytique fonctionnelle après traitement à l'ANP (100 nM) (Bordicchia, Liu et al. 2012). Ceci explique pourquoi cet effet, puissant chez l'homme, a mis si longtemps pour être mis en évidence bien que suspecté et testé chez le rat dès la fin des années 80 (Jeandel, Okamura et al. 1989).

II.2 Oxydation lipidique

Le but final de la lipolyse est d'approvisionner en AG les organes capables de fonctionner sur l'oxydation des lipides pour produire de l'énergie tels que le foie, les muscles squelettiques, le cœur, les TA beige et brun. Plusieurs études ont démontré un rôle des PN dans l'augmentation de la capacité oxydative lipidique de ces différents organes.

II.2.1 Généralités

Les AG sont véhiculés dans le sang sous forme liée à l'albumine s'ils proviennent du TA ou sont encapsulés dans des lipoprotéines pour être clivés par la lipoprotéine lipase. Les AG à longue chaîne requièrent des protéines de transport membranaires, tels que la fatty acids transport protein (FATP), fatty acids binding protein (FABP), cluster of differentiation 36 (CD36), et cytoplasmiques comme l'adipocyte lipid binding protein (ALBP) pour pouvoir rentrer dans la cellule et y être transportés (Stahl, Gimeno et al. 2001). Une fois dans la cellule, les AG peuvent être estérifiés en TAG pour être stockés dans les gouttelettes lipidiques ou subir la β -oxydation. Ce dernier processus requiert l'activation des AG par liaison à l'acyl-coenzyme A pour ensuite être transféré dans la mitochondrie via la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) et la carnitine-acylcarnitine translocase (CACT). La β -oxydation peut également avoir lieu dans les péroxysomes mais cela ne concernerait qu'un maximum de 10% de la dégradation des AG à longue chaîne. Une fois dans la matrice mitochondriale, les AG subissent la β -oxydation pour fournir de l'acétyl-coenzyme A, qui alimente le cycle des acides tricarboxyliques pour être complètement oxydés en CO_2 et H_2O . L'ATP et les molécules réduites, nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide (FADH_2), entrent alors dans la chaîne mitochondriale respiratoire pour permettre la production d'énergie via les protéines permettant la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Eaton 2002, Aon, Bhatt et al. 2014).

Parmi les grands régulateurs du métabolisme énergétique figure le coactivateur transcriptionnel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-coactivator-1 α (PGC1 α). Celui-ci interagit avec une large gamme de facteurs transcriptionnels contrôlant, entre autres, la mitochondriogenèse (NRF1 et NRF2), la thermogénèse (PPAR γ), l'oxydation des AG (PPAR α et PPAR β/δ) et le changement de fibres musculaires (MEF2C) (Liang and Ward 2006). PGC1 α a donc un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme lipidique comme en témoigne les souris invalidées pour cette molécule qui présentent une activité de la β -oxydation et du cycle des acides tricarboxyliques défectueuse (Vega, Huss et al. 2000, Burgess, Leone et al. 2006).

II.2.2 Régulation de l'oxydation lipidique par les peptides natriurétiques

II.2.2.1 Musculaire

La hausse de la consommation d'oxygène et de l'oxydation des graisses est retrouvée chez des souris transgéniques (Tg) ayant soit une élévation de plus de 100 fois des niveaux plasmatiques de BNP, soit une PKG I constitutivement active (Miyashita, Itoh et al. 2009). Cet effet est expliqué par une augmentation musculaire du nombre de copies d'ADN mitochondrial et des capacités oxydatives (plus forte expression de *Pgc1 α* , *ATP synthase*, *Fatp*, *Cpt1b*) chez les souris Tg. Ces résultats sont retrouvés après traitement de C2C12 (lignée murine de myoblastes) avec seulement 1 nM d'ANP ou de BNP (Miyashita, Itoh et al. 2009). Chez l'homme, l'expression du *NPRA* musculaire corrèle positivement avec celle de *PGC1 α* (Engeli, Birkenfeld et al. 2012). De plus, un traitement chronique d'une culture primaire de myotubes humains avec 10 nM d'ANP augmente également l'expression de *FATP1*, *CD36*, *FABP3*, des protéines OXPHOS, l'oxydation du palmitate et la consommation d'oxygène. Ces myotubes, exprimant *NPRA*, répondent avec une augmentation dose dépendante de la production de GMPC à une stimulation aux PN. Cela rappelle tout à fait le mode d'action musculaire du NO révélé par Nisoli et coll., en 2003 (Nisoli, Clementi et al. 2003).

II.2.2.2 Hépatique

Il a été démontré qu'un traitement au 8-bromo-GMPc, un analogue perméable du GMPC, sur des hépatocytes de rat inhibe la synthèse *de novo* de lipides et augmente l'oxydation des AG (Garcia-Villafranca, Guillen et al. 2003). De plus, une infusion intraveineuse d'ANP à 25 ng/kg/min, multipliant par 4 les concentrations d'ANP chez des hommes sains, augmente l'oxydation des graisses post prandiale et diminue le quotient respiratoire (Birkenfeld, Budziarek et al. 2008). Dans cette étude, les niveaux circulants de β -hydroxybutyrate ont triplé durant la perfusion, reflétant une augmentation de l'oxydation hépatique. L'élévation des AG libres induite par les PN est parallèle à une augmentation de l'insulinémie sans changement de la glycémie, ceci indique que cet effet serait consécutif à l'installation d'une insulino-résistance transitoire. De plus, une autre étude démontre que la perfusion de 40 nM d'ANP dans des foies de rats nourris inhibe la glycolyse, via une diminution de 30% de l'activité pyruvate kinase (Rashed, Nair et al.

1992).

II.2.2.3 Adipocytaire

Des souris totalement invalidées pour le NPRC révèlent une augmentation de l'expression de *Pgc1α* et du *cytochrome c* dans le TA brun (TABr), épидидymaire et sous cutané (Bordicchia, Liu et al. 2012). Ces résultats sont retrouvés lors d'un traitement à 100 nM d'ANP sur des cellules hMADS (human multipotent adipose-derived stem cells), cellules mésenchymateuses à haut potentiel d'auto-renouvellement exprimant les caractéristiques clés des adipocytes blancs (Bezaire, Mairal et al. 2009, Bordicchia, Liu et al. 2012). Ces adipocytes traitées aux PN voient également l'expression de *CPT1b*, de facteurs mitochondriaux (*MTF1*, *MTF2* et *COX10*) et leur respiration cellulaire augmentée de façon PKG dépendante. Au vu de toutes ces observations, les PN semblent donc exercer un rôle important dans l'oxydation des lipides. Et sachant qu'une augmentation concomitante de la lipolyse et de l'oxydation lipidique dans le TA est souvent couplée à un accroissement de la thermogénèse, la question des éventuels effets thermogéniques des PN a été soulevée.

II.3 Thermogénèse

II.3.1 Thermogénèse non frissonnante

Le siège de la thermogénèse chimique ou non frissonnante est le TABr puisqu'il produit environ 60% de la chaleur indépendante du frisson (Liang and Ward 2006). Ce tissu est activé en réponse au froid et possède en fait peu de points communs avec le TA blanc (TABl). Les adipocytes bruns possèdent des gouttelettes lipidiques multiloculées et une densité importante de mitochondries qui expriment de fortes concentrations de la protéine découplante de type 1 (UCP1). Cette protéine catalyse la fuite des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale, ce qui a pour conséquence de dissiper le potentiel de membrane mitochondriale. Le flux très élevé du transport d'électrons ainsi que de l'oxydation des substrats résultent en la production de chaleur et la dépense d'énorme quantité d'énergie (Seale, Kajimura et al. 2009). UCP1 est activée par les catécholamines via les récepteurs adrénergiques et leur signalisation AMPc

dépendante (Cao, Daniel et al. 2004) (**Figure 12**). L'AMPc et la PKA nouvellement activée vont respectivement stimuler p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) et activating transcription factor 2 (ATF2), 2 activateurs importants de PGC1 α (Cao, Medvedev et al. 2001). Ce dernier est un coactivateur majeur de l'expression d'UCP1 via sa liaison avec PPAR γ et ses ligands (Sears, MacGinnitie et al. 1996).

Les adipocytes du TABl ne dérivent pas des mêmes progéniteurs que ceux du TABr, ces derniers exprimant le gène myogenic factor 5 (MYF5), un régulateur clé de la différenciation myogénique. Autrement dit, les cellules musculaires et les adipocytes bruns auraient la même origine (Seale, Bjork et al. 2008). Entre les deux, il existe les adipocytes « beiges », ayant les mêmes précurseurs que les adipocytes blancs mais affichant des propriétés similaires aux adipocytes bruns comme de fortes quantités d'UCP1. Et c'est vers la *beigisation* ou le *brunissement* du TABl que se tourne aujourd'hui la recherche. En effet, la quantité de TABr chez l'homme est négativement corrélée avec l'IMC et la masse grasse (Cypess, Lehman et al. 2009).

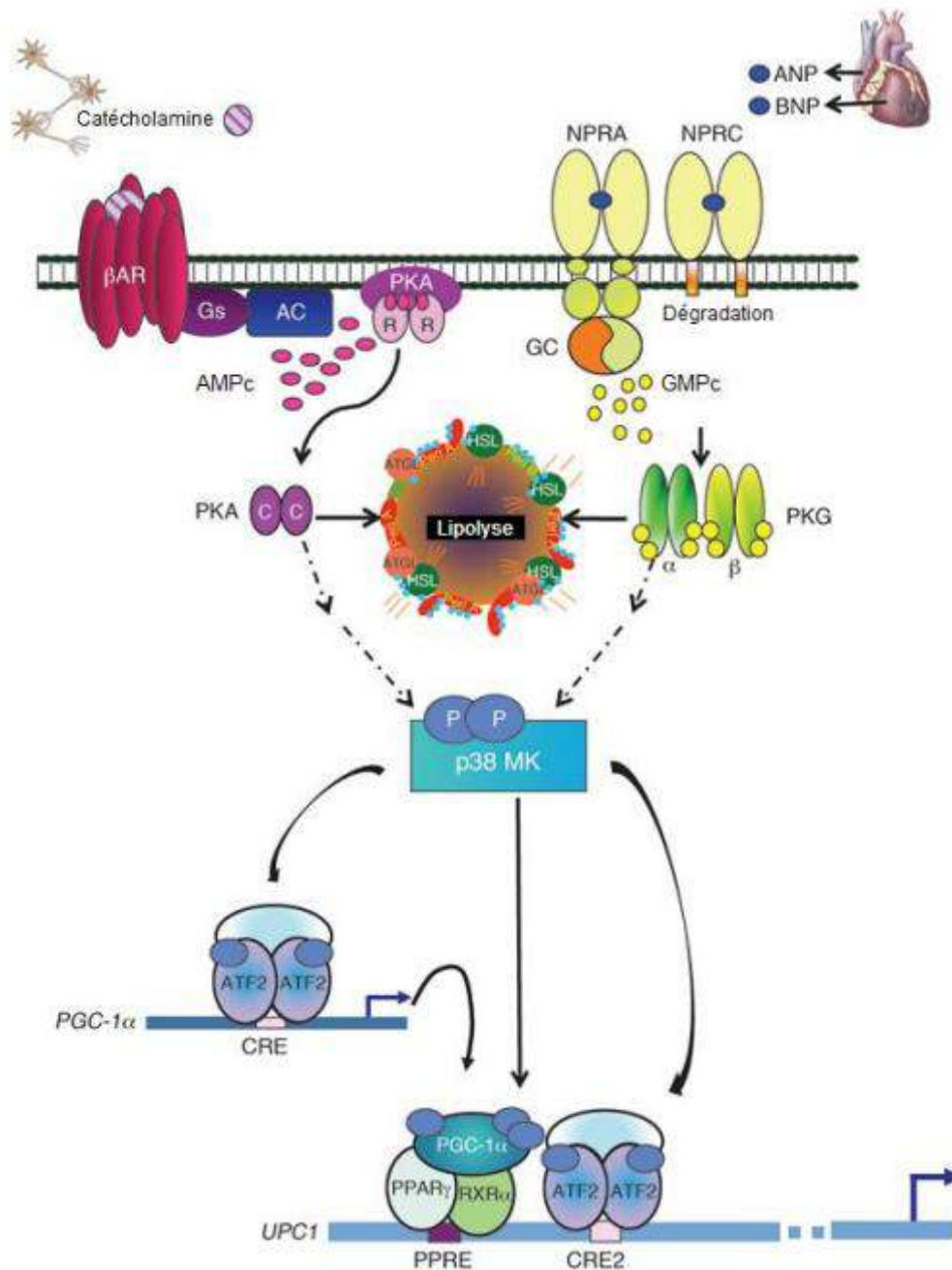


Figure 12 : Modèle d'activation parallèle de p38 MAPK par les récepteurs β -adrénergiques et NPRA pour induire l'expression des gènes thermogéniques. β AR : récepteurs β -adrénergiques ; C : sous-unités catalytiques ; CRE : C-AMP Response Element ; p38 MK : p38 α MAPK ; Peri A : Périlipine 1 ; PPRE : PPAR Response Element ; R : sous-unités régulatrices ; RXR α : Retinoid X receptor α . D'après (Bordicchia, Liu et al. 2012).

II.3.2 Les peptides natriurétiques et le brunissement

Dès 1988, Bacay et coll., font l'observation que le TABr néonatal de rat et de mouton comporte beaucoup de sites de liaison à l'ANP et donc que ce dernier pourrait jouer un rôle dans la thermorégulation (Bacay, Mantyh et al. 1988). Il faudra cependant attendre 2012 pour démontrer qu'une exposition de 6h à 4°C augmente très significativement les niveaux circulants de BNP chez la souris et diminue l'expression du NPRC au niveau du TABl. De plus, une infusion chronique de BNP augmente l'expression protéique de UCP1 dans le TASC de souris métaboliquement saines (Bordicchia, Liu et al. 2012) ou obèses et DT2 (Plante, Menaouar et al. 2014). Certains marqueurs du TABr (PGC1 α , UCP1 et CYT C) sont également plus exprimés dans le TABr, le TASC et le TAV chez les souris dépourvues de NPRC (Bordicchia, Liu et al. 2012). De plus, une injection de sildenafil (12 mg/kg) pendant 7 jours, un inhibiteur de la PDE5, élève l'expression protéique de PGC1 α et de UCP1 dans le TASC murin (Mitschke, Hoffmann et al. 2013). Ces résultats prouvent que les processus augmentant la demi-vie du GMPc intracellulaire stimulent l'expression des marqueurs du TABr.

Comme pour la lipolyse, la voie de signalisation impliquée est parallèle à celle de l'AMPc via l'activation de p38 α MAPK et ATF2 de façon PKG dépendante (**Figure 12**). D'autres études avaient préalablement démontré *in vitro* l'importance de PKG I dans la différenciation des adipocytes bruns et la biogénèse mitochondriale chez la souris (Haas, Mayer et al. 2009, Mitschke, Hoffmann et al. 2013). Ce n'est que tout récemment que la relevance de ces travaux a été démontrée dans des hMADS et des adipocytes primaires humains (Souza, Chau et al. 2011, Bordicchia, Liu et al. 2012). En effet, l'activation de la signalisation aux PN élève la consommation d'oxygène et active l'expression des gènes de l'oxydation mitochondriale. Cependant, des concentrations élevées de PN et une exposition au froid sont tous deux connues pour activer le système nerveux sympathique. Il reste encore donc à définir si les PN activent directement la thermogénèse du TABr indépendamment ou de façon additive/synergique avec les catécholamines. Un début de réponse à cette question est que les catécholamines et les PN agissent de façon additive sur l'induction des marqueurs du brun dans des cellules hMADS (Bordicchia, Liu et al. 2012).

L'ensemble de ces données illustre tout à fait l'importance des PN dans la régulation du métabolisme lipidique de l'adipocyte. En revanche, à l'heure actuelle, rien n'a encore été démontré quant aux rôles des PN sur le métabolisme du glucose dans le tissu adipeux.

II.4 Inflammation

Il est maintenant bien reconnu que l'obésité est associée à une inflammation de bas grade et que cette inflammation serait un des mécanismes potentiels expliquant la morbidité associée à l'obésité comme l'athérosclérose ou l'insulinorésistance (Moro, Klimcakova et al. 2007). Mieux comprendre les propriétés anti-inflammatoires des PN apparait donc important dans le but de mieux appréhender leurs rôles sur le métabolisme énergétique.

II.4.1 Obésité et inflammation de bas grade

Durant le développement de l'obésité, les adipocytes doivent tamponner le surplus de nutriments apportés continuellement durant des années en devenant hypertrophiques. Les adipocytes vont sécréter des adipokines de stress (tels que la leptine) pour attirer les macrophages qui vont s'accumuler autour des adipocytes morts pour former les structures en couronnes. Des corrélations positives ont été mises en évidence entre l'IMC et le pourcentage de macrophages résidents du TA (Curat, Miranville et al. 2004). Ces macrophages résidents vont devenir de plus en plus pro-inflammatoires (acquisition du statut M1) et par conséquent sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interleukine 6 (IL6)) et des chémoattractants (Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), Activator Protein-1 (AP-1)) qui vont attirer d'autres macrophages et ainsi alimenter un cercle vicieux, au moins chez la souris (Lumeng and Saltiel 2011). Chez l'homme, le statut inflammatoire des macrophages du TA est encore sujet à débat (Bourlier and Bouloumie 2009). De plus, des études suggèrent que certaines adipokines, telles que la leptine, sont des acteurs majeurs de la diapédèse des monocytes sanguins à travers l'endothélium (Curat, Miranville et al. 2004). Cette accumulation de macrophages est surtout visible dans le TASC et le TAV et se déroule

via l'activation, entre autres, du NF- κ B, molécule clé dans l'activation des réponses inflammatoires (Hameed, Masoodi et al. 2015) (**Figure 13**). Parmi les acteurs phares de ce processus, le TNF α fait l'objet d'intenses recherches. Il est retrouvé surexprimé durant l'obésité et est proposé par certains pour expliquer le développement de l'insulinorésistance car ces concentrations corrélerent avec la réduction de glucose disponible sous stimulation insulinique (Hotamisligil, Shargill et al. 1993). De plus, l'exposition au TNF α altère le transport de glucose dans l'adipocyte et le myocyte (Nieto-Vazquez, Fernandez-Veledo et al. 2008). Les recherches dans ce domaine ont démontré le développement d'une inflammation basale dans le muscle squelettique, le pancréas et le foie de sujets obèses/DT2 (Lumeng and Saltiel 2011).

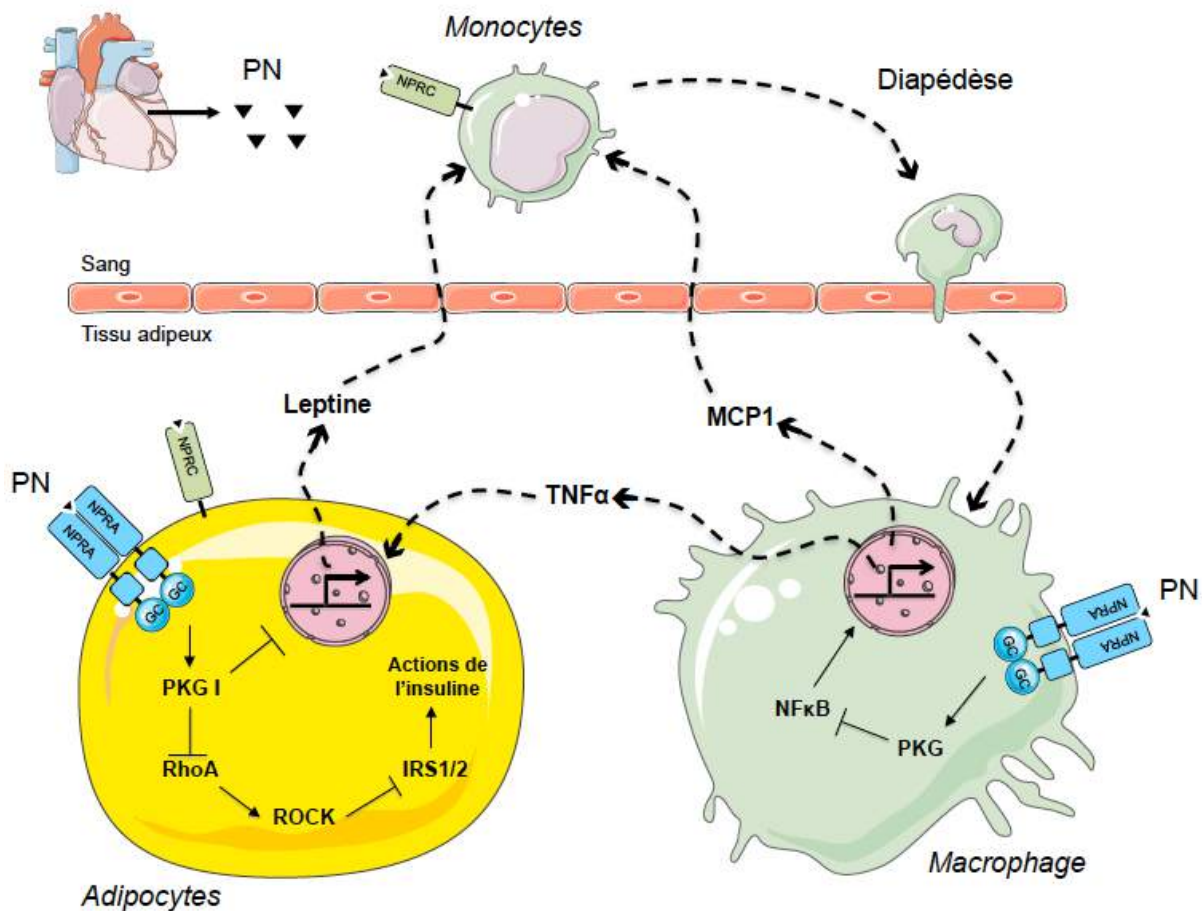


Figure 13 : Modèle de protection de l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité par les peptides natriurétiques. Les flèches représentent une activation et les flèches barrées une inhibition. IRS1/2 : IR Substrates 1 et 2 ; MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1 ; NF- κ B : Nuclear Factor- κ B ; ROCK : Rho-associated protein Kinase ; TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

II.4.2 Propriétés anti-inflammatoires des peptides natriurétiques

II.4.2.1 Adipocytaire

Un traitement à 10 nM d'ANP durant 24h sur des adipocytes issus de TASC de femmes en surpoids réduit la sécrétion dans le milieu de leptine, Retinol Binding Protein 4 (RBP4), IL6, TNF α , MCP1, MCP2, MIP1 β , GRO α alors que la sécrétion de l'adiponectine, hormone anti-inflammatoire, n'est pas modifiée (Moro, Klimcakova et al. 2007). Ces résultats ont été reproduits pour la leptine sur des adipocytes isolés de femmes très obèses (IMC moyen de 48) (Fain, Kanu et al. 2003). Ces changements de sécrétion ne sont pas associés à un changement de l'expression génique. De manière intéressante, un cotraitement des adipocytes à l'ANP et au BAY inhibe les effets bénéfiques de l'ANP sur la sécrétion de RBP4 et la leptine (Moro, Klimcakova et al. 2007). Le BAY est un inhibiteur sélectif de la LHS, sans effet sur la lipoprotéine lipase, l'ATGL ou la MGL (Langin, Dicker et al. 2005). De plus, un traitement au GMPc de cellules 3T3-L1 (lignée murine adipocytaire) augmente l'expression de l'adiponectine (Langin, Dicker et al. 2005). Le profil de sécrétion des adipocytes dépend de la taille de la cellule. Plus un adipocyte est « gros », plus il sécrète de molécules pro-inflammatoires (Skurk, Alberti-Huber et al. 2007). Ainsi, les effets des PN et du GMPc pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber la croissance adipocytaire (Sarvani, Marcucci et al. 2008, Mitschke, Hoffmann et al. 2013). Un traitement des 3T3-L1 avec du GMPc augmente également la phosphorylation de la petite GTPase RhoA sur la Ser188 (Mitschke, Hoffmann et al. 2013). RhoA, phosphorylée et inactivée, par PKG I prévient de l'activation de Rho-associated protein Kinase (ROCK) qui inhibe IRS1/2, une molécule clé de la transduction du signal de la voie insulinique. L'activité de RhoA/ROCK augmente avec une obésité nutritionnelle et joue un rôle important dans la régulation de la taille adipocytaire, dans l'expression d'adipokines et dans le recrutement des macrophages (Hara, Wakino et al. 2011). D'autres études sont attendues pour pouvoir évaluer l'implication du complexe RhoA/ROCK dans les effets adipocytaires des PN (**Figure 13**).

Pour discriminer les effets anti-inflammatoires de l'ANP, Moro et coll. ont isolé les macrophages des adipocytes du TASC de femmes en surpoids (Moro, Klimcakova et al. 2007). La voie de signalisation des PN (*NPR1*, *NPR3*, *PRKGI*, *PDE5A*) est également exprimée dans les macrophages et un traitement de ces cellules à l'ANP (1 μ M, 24h) diminue la sécrétion de l'IL6 et de MCP1. De plus, selon Pivovarova et coll., le NPRA n'est

exprimé que sur les macrophages et pas les monocytes plasmatiques, et inversement pour le NPRC (Pivovarova, Gogebakan et al. 2012). Ces données suggèrent donc que les PN n'agissent pas directement sur la mobilisation des monocytes mais agissent bien sur la sécrétion d'adipokines par les adipocytes et de chémoattractants par les macrophages résidants du TA. Il a été démontré que les macrophages peuvent également exprimer l'ANP et que son expression est augmentée de 2-5 fois après exposition au LPS (Vollmar and Schulz 1994, Vollmar and Schulz 1995). L'ANP, via le NPRA, inhibe l'activation de NF- κ B et de AP1 dans les macrophages, menant à une diminution significative de la sécrétion de TNF α et d'IL1 β (Kiemer, Hartung et al. 2000, Tsukagoshi, Shimizu et al. 2001). Cela s'expliquerait par l'activation de p38 MAPK qui irait ensuite phosphoryler IRS1/2 sur des sérines inactivatrices. Par contre, l'ANP ne modifie pas la production d'IL10, ni d'IL1ra, des molécules anti-inflammatoires (Kiemer, Hartung et al. 2000, Moro, Klimcakova et al. 2007).

II.4.2.2 Hépatique

Un traitement de 200 nM d'ANP sur des foies isolés de rat, pendant une ischémie de 24 heures, protège des dommages hépatocellulaires durant la reperfusion. Cet effet, transmis par le NPRA et le GMPC, semble expliqué par une moindre réponse pro-inflammatoire telle qu'une diminution de NF- κ B (Gerbes, Vollmar et al. 1998), de AP-1 et de TNF α (Kiemer, Vollmar et al. 2000) ainsi qu'une augmentation des protéines de choc thermique (Kiemer, Gerbes et al. 2002). La décroissance de l'activité p38 MAPK, observée par certains seulement, qui accompagne le processus d'ischémie/reperfusion est également protégée par un traitement à l'ANP observé chez des foies de rats (Kiemer, Kulhanek-Heinze et al. 2002) et de porcs (Kobayashi, Oshima et al. 2007). Lors de transplantations hépatiques, les rats au préalable perfusés avec 5 μ g/kg d'ANP pendant 20 min montrent une augmentation de l'activité de la voie PI3K et Akt ce qui active la phosphorylation de Bad (Ser136) et inhibe l'activité de caspase 3, menant ainsi à un effet anti-apoptotique des PN (Grutzner, Keller et al. 2006). Ces effets bénéfiques de l'ANP sur l'ischémie/reperfusion seraient, au moins en partie, directement dus à leurs propriétés cardiovasculaires, comme le démontre cette étude sur les lapins où l'ANP protège de l'altération du flux sanguin microvasculaire hépatique sans modifier les données hémodynamiques systémiques (pression artérielle, pression sanguine aortique,

fréquence cardiaque) (Yamada, Kotake et al. 2013). Une autre partie des effets hépatoprotecteurs semblent être relayée par les cellules de Kupffer sachant que leur exposition à l'ANP diminue l'expression du TNF α (Kiemer, Baron et al. 2002).

Au vu des actions anti-inflammatoires des PN, il est tout à fait cohérent de penser qu'ils pourraient également moduler le métabolisme énergétique hépatique. Si peu de travaux existent à l'heure actuelle, des études portant sur la voie de signalisation du GMPc/PKG donnent un élément de réponse quant aux éventuels rôles hépatiques des PN. L'étude de Lutz et coll. rapporte que la protéine PKG I est présente dans les cellules stellaires mais pas dans les hépatocytes (Lutz, Hennige et al. 2011). De plus, les souris n'exprimant PKG I qu'au niveau des cellules musculaires lisses pour palier aux dysfonctions vasculaires létales, ont une hyperglycémie à jeun, une moindre sensibilité à l'insuline hépatique, concomitant avec une activation de la voie IL6 uniquement dans le foie (Lutz, Hennige et al. 2011). Cela est cohérent avec le fait que les souris exprimant une PKG I constitutivement active ont une augmentation de la tolérance au glucose ainsi qu'une diminution de la glycémie à jeun, même en régime normal (Miyashita, Itoh et al. 2009). Les PN pourraient donc exercer un rôle bénéfique sur le métabolisme énergétique hépatique via leurs propriétés vasculaires et anti-inflammatoires sur les cellules immunitaires résidentes. De plus, la combinaison des effets anti-inflammatoires des PN, au moins mise en évidence dans le TA et le foie, pourrait participer à diminuer les comorbidités associées à l'obésité, comme les dysfonctions cardiovasculaires et l'insulinorésistance/DT2.

II.5 Sécrétion insulinique

II.5.1 Introduction

Le pancréas est une glande dite mixte, c'est à dire possédant à la fois une sécrétion exocrine et endocrine. Cette dernière fonction est assurée par les îlots de Langerhans composés, entre autres, des cellules α et β sécrétant respectivement le glucagon et l'insuline. Ces deux hormones ont un rôle extrêmement important dans le contrôle de la glycémie. Le glucagon a une action essentiellement hépatique où il induit l'hydrolyse du glycogène et l'insuline comporte des récepteurs surtout au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux où elle provoque l'exocytose des vésicules de

GLUT4 et également au niveau hépatique pour freiner la néoglucogenèse et favoriser la glycogénèse. L'insuline est un peptide crucial à l'homéostasie glucidique car c'est la seule hormone hypoglycémisante que possède l'organisme et donc sa dérégulation va carencer en énergie certaines cellules de l'organisme (Quesada, Tuduri et al. 2008).

Lorsque la concentration de glucose plasmatique est faible, les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) des cellules β restent ouverts. L'efflux de potassium garde alors la membrane hyperpolarisée prévenant toute activité électrique et échanges calciques. En revanche, une augmentation de la glycémie entraîne une captation du glucose via GLUT2 des cellules β , sa métabolisation, d'où une élévation des concentrations intracellulaires d'ATP. Cela va fermer les canaux K_{ATP} , initier la dépolarisation membranaire, les influx de calcium et permettre l'exocytose des granules contenant l'insuline (Ashcroft and Rorsman 2012). Les incrétines, telles que le GLP-1, peuvent potentialiser l'exocytose des granules via des mécanismes PKA et/ou exchange protein activated by cAMP-2 (Epac2) dépendants (Holz 2004).

II.5.2 Sécrétion de l'insuline et système ANP/NPRA

Peu de temps après la mise en évidence des PN, Uehlinger et coll. observent qu'une perfusion d'ANP à des doses supraphysiologiques (100 ng/kg/min) augmente significativement l'insulinémie chez l'homme (Uehlinger, Weidmann et al. 1986). De plus, une administration intra-veineuse d'ANP pendant 2 h à 25 ng/kg/min, multipliant par 4 les concentrations plasmatiques d'ANP et considérée comme une élévation physiologique, accroît significativement l'insulinémie après un repas chez des volontaires sains pour une même glycémie comparativement au placebo (Birkenfeld, Budziarek et al. 2008). Cet effet est couplé à une élévation des niveaux circulants d'AG et de leur oxydation. Donc cette étude ne permet pas de discriminer une action directe des PN au niveau pancréatique, d'une augmentation transitoire de l'insulinorésistance conduisant à une hyperinsulinémie. En revanche, l'insulinémie n'est pas modifiée lors d'une perfusion plus faible d'ANP à 16 ng/kg/min (Ferrari, Shaw et al. 1992).

En 1981, il est remarqué que la stimulation d'îlots de rat avec du glucose augmente les concentrations de GMPc (Laychock 1981). Puis, d'autres études chez le rongeur ont démontré la présence du NPRA à la fois sur les cellules β et α des îlots de Langerhans alors que le NPRC n'est présent que sur les cellules α (Burgess, Leone et al.

2006, Moro, Pasarica et al. 2009). Un traitement aigu d'îlots de souris avec 1 nM d'ANP augmente le contenu et la sécrétion d'insuline basale (Ropero, Soriano et al. 2010). Une autre étude a démontré qu'un traitement à 10 pM d'ANP sur des îlots pancréatiques isolés de rats suffit à augmenter la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Fehmann, Noll et al. 1990) alors qu'un traitement de 7 jours à 1 μ M d'ANP a été rapporté pour l'inhiber chez la souris (You and Laychock 2011). Cette dernière publication démontre une augmentation de la phosphorylation de la LHS après traitement à l'ANP et pose l'hypothèse que c'est la déplétion du réservoir en TAG de la cellule pancréatique qui impacte négativement la sécrétion d'insuline comme précédemment démontré (Koyama, Chen et al. 1997). La lipotoxicité induite par la production d'AG libres intracellulaires découlant d'une lipolyse prolongée pourrait également perturber les fonctions cellulaires (Zhou and Grill 1994).

En revanche, les îlots de souris dépourvus de NPRA ont une taille, un nombre de cellules β ainsi qu'un contenu en insuline diminués et montrent un accroissement de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose comparé à ceux des souris contrôles (Ropero, Soriano et al. 2010). Le mécanisme sous jacent impliquerait une diminution du nombre de canaux K_{ATP} chez les souris n'exprimant pas le NPRA, ce qui induirait une augmentation du calcium intracellulaire en réponse au glucose nécessaire à l'exocytose des vésicules d'insuline (Ropero, Soriano et al. 2010). La diminution du nombre de cellules β , et donc de la taille des îlots, pourrait aussi être expliquée par le fait que les PN favorisent la croissance de ces cellules. En effet, un traitement par l'ANP de cellules INS-1E (lignée de cellules β issue du rat) favorise la transcription de molécules du cycle cellulaire de façon PI3K dépendante (You and Laychock 2009). En résumé, il semblerait qu'un traitement aigu aux PN des cellules β ait un effet insulino-tropique positif contrairement à un traitement chronique. Mais d'autres études sont nécessaires pour éclaircir les mécanismes expliquant cette dichotomie d'action des PN au niveau pancréatique et si ces effets sont conservés chez l'homme.

II.6 Digestion

Les patients souffrant d'IC se plaignent souvent de troubles digestifs fonctionnels tels que des nausées, des dyspepsies, des indigestions et des malabsorptions (Krack, Sharma et al. 2005). Il a été rapporté que des souris subissant un infarctus du myocarde au niveau du ventricule gauche, phénomène accompagné d'une augmentation de plus de 40% des niveaux circulants de BNP, ont une diminution significative de la vidange gastrique et de l'absorption intestinale. Et ces troubles digestifs ne sont pas retrouvés chez les souris déficientes en NPRA (Addisu, Gower et al. 2011). Une autre étude du même groupe a démontré qu'une administration intra-veineuse de BNP inhibe de façon dose dépendante la vidange gastrique (Addisu, Gower et al. 2008).

Il a également été démontré que les cellules entérochromaffines de l'antrum gastrique de rat peuvent synthétiser et sécréter de l'ANP (Gower, Salhab et al. 2000). Cette expression de l'ANP est inhibée durant un jeûne prolongé de 72h chez le rat. Une perfusion d'ANP dans l'antrum gastrique de rat inhibe la libération de gastrine, de sécrétions acides (Stapelfeldt, Schusdziarra et al. 1988) et augmente la sécrétion de somatostatine par les cellules Δ via le NPRA (Gower, McCuen et al. 2003). La somatostatine est une hormone inhibant la sécrétion de nombreuses molécules exocrines et endocrines telles que la ghréline, seule hormone orexigène connue (Shimada, Date et al. 2003). Or il a été démontré que les concentrations plasmatiques de ghréline sont significativement diminuées chez les patients souffrant d'ICC et corrélat négativement avec les niveaux de NT-proBNP (Chen, Ji et al. 2014). D'autres parts, une étude en simple aveugle menée sur 10 volontaires sains a analysé l'effet d'une perfusion de BNP à 3 pmol/kg/min durant 4 heures sur la ghréline plasmatique. Les individus étaient tenus de rester en position allongée, pour prévenir toute modulation de la pression sanguine. Les patients recevant le BNP avaient des concentrations plasmatiques réduites de ghréline totale et acétylée ainsi qu'une diminution de la sensation de faim comparée aux contrôles (Vila, Grimm et al. 2012). D'autres études sont nécessaires pour savoir si les effets satiétogènes d'une perfusion intra-veineuse de PN sont la conséquence d'une action périphérique, centrale ou d'une combinaison des deux.

II.7 Prise alimentaire

Les PN sont très largement présents dans le système nerveux central (SNC) où ils ont notamment un rôle dans le contrôle du comportement dipsique. En 1986, Standaert et coll. publient que les neurones contenant le plus d'ANP dans le cerveau de rat proviennent du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus, de l'éminence médiane et du noyau interpédonculaire (Standaert, Needleman et al. 1986). Et que ces noyaux contiennent des sites de liaison à l'ANP de haute affinité dans le cerveau de l'homme et du rat (Mantyh, Kruger et al. 1987, Castren and Saavedra 1989). En ce qui concerne le BNP, un examen par immunohistochimie a démontré sa présence dans le PVN, le noyau supraoptique et le noyau périventriculaire de l'hypothalamus de singe (Abdelalim, Takada et al. 2006). Il est à noter que les auteurs émettent l'hypothèse que le BNP est produit par le cœur et pénètre dans le cerveau via l'organe subfornical, une zone dépourvue de barrière hémato-encéphalique, pour expliquer l'absence d'ARNm de BNP détecté dans ces zones (Langub, Dolgas et al. 1995). L'ARNm du CNP est présent dans le noyau arqué (ARC) et le PVN de rat (Herman, Langub et al. 1993), tout comme l'ARNm du NPRB (Langub, Dolgas et al. 1995).

De façon intéressante, une administration intra-cérébro-ventriculaire de CNP (1,5 nmol/souris) supprime significativement la prise alimentaire après un jeûne de 48h contrairement à une administration intra-péritonéale. Cet effet perdure durant une co-administration avec le neuropeptide Y ou encore avec la ghréline, qui sont deux molécules orexigènes. Par contre, cette inhibition est abrogée dès l'administration d'un antagoniste des récepteurs 3 et 4 aux mélanocortines, le SHU9119 (Yamada-Goto, Katsuura et al. 2013). Cela laisse à penser que le CNP pourrait exercer son action anorexigène via l'activation des neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) de l'ARC, le centre intégrateur hypothalamique le plus étudié de l'état énergétique.

L'uroguanyline, a également été impliquée dans le contrôle du comportement alimentaire. Une belle étude a démontré que le propeptide peut agir comme une hormone en étant relarguée dans le sang à la suite d'un repas pour être spécifiquement reconnue et clivée par l'hypothalamus où elle induit la satiété. Cela se traduit par une augmentation de l'ARNm de *Pomc* (sans variation de l'expression du neuropeptide Y) via une signalisation GMPc dépendante dans l'hypothalamus (Valentino, Lin et al. 2011).

Une étude récente a démontré que l'uroguanyline était sécrétée à la suite d'une prise alimentaire chez la souris de façon leptine dépendante (Folgueira, Sanchez-Rebordelo et al. 2015). Suite à ces observations, il est donc possible que l'effet satiétogène du BNP après une administration intra-veineuse, décrite dans la **section II.6 digestion**, soit en partie due à une action centrale du BNP sur la prise alimentaire (Vila, Grimm et al. 2012). D'autres investigations sont nécessaires pour pouvoir conclure quant aux rôles centraux des PN.

II.8 Cachexie : une hypersensibilité aux peptides natriurétiques ?

Bien qu'il n'y ait pas de définition universelle de la cachexie, un consensus semble être admis sur le fait que ce syndrome se caractérise par une fonte de la masse musculaire et adipocytaire qui ne peut être rectifiée nutritionnellement. La cachexie est toujours associée à une autre maladie comme le syndrome de l'immunodéficience acquise, certains cancers ou troubles cardiaques. La cachexie cardiaque atteindrait 15% des patients souffrant d'une ICC (Kalra and Tigas 2002) et plus de la moitié des individus cancéreux (Aoyagi, Terracina et al. 2015). La mort survient lorsque le patient perd 30% de son poids initial. L'implication des PN a depuis longtemps été soupçonnée dans le développement des cachexies cardiaques connaissant les concentrations importantes de ces peptides lors d'ICC et leur rôle lipolytique (Costello-Boerrigter 2012, Arner and Langin 2014). De plus, une perfusion de BNP chez des insuffisants cardiaques exerce une activité lipolytique plus importante que chez les contrôles (Polak, Kotrc et al. 2011). Néanmoins, aucune étude à notre connaissance n'a publié une augmentation des niveaux de PN circulants lors de la cachexie. Un papier très intéressant a comparé la lipolyse adipocytaire chez des cancéreux cachexiques avec leurs homologues non cachexiques et présentant la même perte de poids, due à une autre cause comme une occlusion intestinale (Agustsson, Ryden et al. 2007). L'activité lipolytique des adipocytes *in vivo* et *in vitro* est doublée dans le groupe cachexique comparativement au groupe contrôle après stimulation à la noradrénaline et à l'ANP. Il n'y a pas de changement des niveaux circulants de noradrénaline/adrénaline, d'insuline ou d'ANP entre les différents groupes de patients. Cela s'expliquerait par un effet post récepteur : l'expression protéique de la LHS est 2 fois plus importante et la lipolyse est inhibée à 90% lors d'un

traitement des adipocytes de patients cachexiques au BAY, un inhibiteur sélectif de la LHS (Agustsson, Ryden et al. 2007). Si cette étude ne relate pas de changement des niveaux circulants de PN durant la cachexie cancéreuse (il ne faut néanmoins pas oublier le faible échantillonnage, n=11 patients au maximum/groupe), cela pourrait être très différent lors d'une cachexie cardiaque. Connaissant le puissant effet lipolytique des PN sur le TA (Sengenès, Berlan et al. 2000), leur pouvoir oxydatif récemment mis en évidence sur des biopsies musculaires humaines (Engeli, Birkenfeld et al. 2012), ainsi que leurs potentiels rôles anorexigènes (Vila, Grimm et al. 2012), ces peptides pourraient être impliqués dans le développement de la cachexie cardiaque. Auquel cas, on pourrait imaginer que la résistance à l'action des PN observée durant certaines pathologies cardiovasculaires (**cf section III *Le natriuretic peptide handicap***) serait un mécanisme de protection de l'organisme vis à vis de leurs effets métaboliques, et que les individus cachexiques seraient « hypersensibles » aux PN.

II.9 Sensibilité à l'insuline

II.9.1 Lien insulinorésistance et obésité

La sensibilité à l'insuline est une fonction de l'organisme qui doit être absolument préservée. La dérégulation des effets de l'insuline, c'est à dire son incapacité à faire entrer le glucose dans les cellules, entraîne alors le diabète. Cette maladie existe sous deux formes : le DT1, qui résulte d'une incapacité des cellules β à sécréter l'insuline, et le DT2, provoqué par une résistance des organes à l'action de l'insuline concomitante avec une sécrétion d'insuline par le pancréas insuffisante pour normaliser la glycémie. La définition clinique du DT2 est une glycémie à jeun supérieure à 1.26 g/l et une glycémie dépassant les 2 g/l 2 heures après un test de tolérance au glucose oral (American Diabetes 2015). Le DT2 est la forme la plus répandue de la maladie, comptant pour 90-95% des diabètes. Et pour cause, l'insulinorésistance est un état souvent associé à l'obésité, au vieillissement, à la sédentarité et certains facteurs génétiques y prédisposent (Saltiel 2001).

80% des patients souffrant d'un DT2 sont obèses (Bloomgarden 2000) et l'IMC et/ou le pourcentage de masse grasse corréleront négativement avec la sensibilité à l'insuline (Moro, Bajpeyi et al. 2008). En fait, cette baisse de l'action de l'insuline corréle

de façon encore plus robuste avec l'infiltration de lipides, dits alors ectopiques, au niveau des tissus cibles tels que le muscle squelettique, ce qui a fait naître le concept de "lipotoxicité" (Samuel and Shulman 2012). Ces lipides, plus précisément les DAG et les céramides, interfèrent avec la signalisation de l'insuline dans le muscle et le foie. En condition physiologique, la fixation de l'insuline sur son récepteur induit une signalisation Akt-dépendante (**Figure 11**), où Akt phosphoryle AS160 (Akt substrate of 160 kDa), permettant l'exocytose des vésicules de GLUT4. Dans un contexte de lipotoxicité comme dans l'obésité, les céramides ont été montrés pour 1) activer PKC ξ qui phosphoryle Akt sur un résidu sérine inactivateur (Powell, Hajduch et al. 2003) et 2) activer la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui va déphosphoryler Akt sur une sérine activatrice (Ser473) (Teruel, Hernandez et al. 2001). Les DAG, quant à eux, sont connus pour activer les PKC conventionnelles et nouvelles. Ainsi il est reconnu que les DAG activent PKC θ et PKC ϵ pouvant interférer avec la signalisation insulinique respectivement dans le muscle squelettique et le foie. Et enfin les PKC peuvent également inactiver IRS1 via la phosphorylation de la Ser1101 et de la Ser307 (Schmitz-Peiffer and Biden 2008). D'autres travaux sont nécessaires pour pleinement comprendre le développement de l'insulinorésistance au cours de l'obésité.

II.9.2 Peptides natriurétiques et sensibilité à l'insuline

La vraie question est de savoir si une, plusieurs ou l'ensemble des actions métaboliques des PN citées précédemment s'accompagne(nt) d'effets bénéfiques sur les désordres métaboliques liés à l'obésité. Les souris surexprimant le BNP, atteignant jusqu'à 100 fois les doses circulantes physiologiques, ou ayant une PKG I constitutivement active sont partiellement protégées contre une insulinorésistance et une intolérance au glucose induite par un régime riche en graisses (Miyashita, Itoh et al. 2009). Des souris db/db perfusées au BNP (10 ng/kg de poids/min) pendant 12 semaines ont une baisse significative de la prise de poids, de la masse grasse, de la glycémie et de l'insulinémie à jeun, menant à une amélioration de l'HOMA-IR (Plante, Menaouar et al. 2014). Le **tableau 7** récapitule les principaux phénotypes métaboliques à la suite d'extinction ou de surexpression de gènes impliqués dans la voie de signalisation des PN. Les mécanismes sous-jacents de ces phénotypes ne sont pas

connus mais les souris Tg pour le BNP ou la PKG I ont une moindre accumulation de TAG musculaires et hépatiques (Miyashita, Itoh et al. 2009). Chez l'homme, quelques études ont rapporté une corrélation inverse entre les niveaux circulants de PN et la sensibilité à l'insuline (Khan, Cheng et al. 2011, Magnusson, Jujic et al. 2012, Walford, Ma et al. 2014). Plusieurs études suggèrent également que l'ANP augmente la sécrétion adipocytaire de l'adiponectine, une adipokine qui améliore la sensibilité à l'insuline, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Tsukamoto, Fujita et al. 2009, Naruse, Yamasaki et al. 2011, Birkenfeld, Boschmann et al. 2012). Si peu de données sont actuellement disponibles pour expliquer le lien entre l'insulinosensibilité et la signalisation aux PN, on peut émettre l'hypothèse que leurs effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique découlent d'une combinaison entre des actions anti-inflammatoires et une augmentation de la capacité oxydative lipidique. De plus, une partie des actions des PN pourrait résulter d'un antagonisme avec le SRAA, système très actif durant l'obésité/DT2 (Favre, Esnault et al. 2015). En résumé, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes reliant les PN aux maladies métaboliques et analyser l'implication des muscles squelettiques, du foie et du TA.

Tableau 7 : Phénotype métabolique des modèles murins gain ou perte de fonction dans la voie de signalisation aux PN. D'après (Coue and Moro 2015).

Modèle	Phénotype	Effets biologiques	Références
BNP-Tg	Prévention de la néphropathie diabétique	<ul style="list-style-type: none"> ↘ excrétion urinaire d'albumine ↘ hypertrophie glomérulaire 	(Makino, Mukoyama et al. 2006),
BNP-Tg	Résistance à l'OIA	<ul style="list-style-type: none"> ↘ masse grasse corporelle ↘ TAG dans le foie et les Msk ↘ glycémie et insulínémie à jeun ↗ oxydation des graisses 	(Miyashita, Itoh et al. 2009)
NPRA+/-	Sensible à l'OIA	<ul style="list-style-type: none"> ↗ masse grasse corporelle ↘ tolérance glucose 	(Miyashita, Itoh et al. 2009)
NPRA-/-	Augmentation de la vidange gastrique et de l'absorption intestinale	<ul style="list-style-type: none"> ↗ pression intra-gastrique ↗ contractilité gastrique ↗ perméabilité gastro-intestinale 	(Addisu, Gower et al. 2008)
NPRA-/-	Altération de la fonction des cellules β-pancréatiques	<ul style="list-style-type: none"> ↘ SISG ↘ taille des îlots ↘ masse des cellules β ↘ contenu en insuline ↗ glycémie à jeun 	(Ropero, Soriano et al. 2010)
NPRC-/-	Augmentation de la thermogénèse	<ul style="list-style-type: none"> ↘ masse grasse ↗ expression des gènes thermogéniques dans le TABl et le TABr 	(Bordicchia, Liu et al. 2012)
PKG I-Tg	Amélioration du profile métabolique et résistance à l'OIA	<ul style="list-style-type: none"> ↘ prise de poids ↘ TAG dans le foie et les Msk ↘ glycémie et de l'insulínémie à jeun ↗ consommation d'oxygène ↘ quotient respiratoire ↗ densité mitochondriale musculaire 	(Miyashita, Itoh et al. 2009)
PKG I-/-	Inflammation hépatique et insulínorésistance	<ul style="list-style-type: none"> ↗ hyperglycémie à jeun ↗ signalisation hépatique de l'IL6 ↘ activation hépatique d'Akt ↘ adiponectine sérique 	(Lutz, Hennige et al. 2011)
NEP-/-	Protection des cellules β pancréatiques	<ul style="list-style-type: none"> ↗ SISG ↗ influx de calcium 	(Zraika, Koh et al. 2013)
GUCY2C-/-	Obèses et hyperphages	<ul style="list-style-type: none"> ↗ prise de poids ↗ leptinémie et de l'insulínémie à jeun ↗ prise alimentaire ↘ satiété 	(Valentino, Lin et al. 2011)
Corine-/-	Hypertension spontanée, pas d'ANP mature	<ul style="list-style-type: none"> ↗ poids corporel 	(Chan, Knudson et al. 2005)

Msk : Muscles squelettiques ; OIA : Obésité induite par l'alimentation ; SISG: sécrétion d'insuline stimulée par le glucose ; TAG: triacylglycérol

III Le *natriuretic peptide handicap*

III.1 Définition

III.1.1 Association avec les maladies cardiovasculaires

Le NT-proBNP est actuellement utilisé en clinique comme biomarqueur de l'IC aigue et congestive (Costello-Boerrigter, Lapp et al. 2013). Les niveaux circulants de BNP corrént positivement avec la sévérité de l'IC selon le système de classification du *New York Heart Association* (Wieczorek, Wu et al. 2002). Avec le système nerveux sympathique et le SRAA (Engeli 2006), les PN ont été intensément étudiés pour démêler le lien physiopathologique qui existe entre l'obésité, l'hypertension et les maladies métaboliques. L'obésité est le facteur de risque majeur de l'hypertension et de ses pathologies associées telles que l'hypertrophie du ventricule gauche (Stamler, Stamler et al. 1978, MacMahon, Cutler et al. 1987). Il a été démontré que le gain de poids *per se* augmente la pression sanguine et inversement lors d'une perte de poids, chez des individus normotendus et hypertendus, même quand la natrémie est maintenue constante (Rocchini, Moorehead et al. 1989, Hall, Brands et al. 1993). De plus, les premiers temps d'une perte de poids liée à une restriction calorique sont associés à une augmentation de la natriurèse et de la diurèse (Sigler 1975). De même, les patients diabétiques ont une augmentation du sodium corporel, de la réabsorption rénale tubulaire du sodium et une capacité altérée à excréter une surcharge en sodium (Saulnier, Roussel et al. 2011). Suite à ces observations, il a donc été proposé l'existence d'un *natriuretic peptide handicap* (NPH) chez le sujet obèse et/ou DT2 (Dessi-Fulgheri, Sarzani et al. 1997).

III.1.2 Association avec les maladies métaboliques

Ce terme sera ensuite repris par Wang et coll., dans son étude révélant que les niveaux circulants de BNP et de NT-proANP corrèlent négativement avec l'IMC dans une cohorte de plus de 3000 sujets (Wang, Larson et al. 2004). Et cela persiste même en cas d'une plus grande pression dans le ventricule gauche en fin de diastole, une mesure de la fonction cardiaque (Taylor, Christenson et al. 2006). Une étude prospective suivie sur 16 années révèle que de faibles concentrations sanguines de MR-proANP prédisent une augmentation de la glycémie à jeun au cours du temps et la survenue d'un DT2 (Magnusson, Jujic et al. 2012). Plus que l'obésité, ce serait l'insulinorésistance qui serait le médiateur du faible niveau circulant de PN, parce que la relation avec l'obésité est diminuée après ajustement à l'HOMA-IR dans 2 cohortes de 7770 individus (Khan, Cheng et al. 2011). De plus, les concentrations de PN sont plus faibles chez les personnes non-obèses insulinorésistantes comparativement aux obèses insulinosensibles. Cela est retrouvé chez la souris diabétique non obèse qui a une diminution des niveaux circulants d'ANP (Yano, Tanigawa et al. 1991). Puis l'appauvrissement en PN plasmatiques sera ensuite généralisé au syndrome métabolique où le NT-proBNP est plus faible en cas d'IMC élevé, de dyslipidémie et d'hyperinsulinémie (Olsen, Hansen et al. 2005). Le **Tableau 8** résume les principales études cliniques humaines faisant le lien entre les maladies métaboliques et les niveaux circulants de PN.

De façon intéressante, les concentrations plasmatiques de PN restent significativement réduites chez les obèses comparativement aux sujets minces même en cas d'IC (Mehra, Uber et al. 2004, Horwich, Hamilton et al. 2006). Chez les souris obèses/DT2, l'expression cardiaque de l'ANP et du BNP est diminuée alors que celle du NPRC adipocytaire est très augmentée mais ces souris db/db possèdent pourtant une natriurèse et une excrétion urinaire identiques aux souris contrôles db/+ et ces paramètres répondent tout à fait à une perfusion de BNP (Plante, Menaouar et al. 2014). Il semblerait donc que le *NPH* accompagnant les troubles métaboliques précède l'apparition de dysfonctions du système cardiovasculaire.

Tableau 8 : Etudes cliniques humaines liant les niveaux circulants de PN aux maladies métaboliques. D'après (Coue and Moro 2015).

Nom de l'étude	Echantillon	Principaux résultats	Références
The Framingham Heart Study	3389	Corrélation inverse entre les concentrations plasmatiques de BNP/proANP et l'IMC et le DT2	(Wang, Larson et al. 2004)
The Olivetti Heart Study	787	Les sujets portant le SNP A(-55)A dans le promoteur du gène <i>NPR3</i> ont une prévalence plus faible de surpoids, d'obésité et d'adiposité abdominale	(Sarzani, Strazzullo et al. 2004)
The Dallas Heart Study	2971	Relation inverse entre les niveaux plasmatiques de BNP/NT-proBNP et l'IMC	(Das, Drazner et al. 2005)
The FINRISK97 Study	7827	L'ANP, le BNP et le NT-proBNP appartiennent aux 31 nouveaux prédicteurs d'incidence du DT2	(Salomaa, Havulinna et al. 2010)
Méta-analyse de 11 études		Le variant génétique rs198389 dans le locus du gène <i>NPPB</i> est associé avec un plus faible risque de développer le DT2	(Pfister, Sharp et al. 2011)
Prevalence of left ventricular dysfunction study	1608	rs5068, un variant génétique du gène <i>NPPA</i> est associé avec une protection cardiométabolique	(Cannone, Boerrigter et al. 2011)
Malmö Diet and Cancer study	1828	De faibles niveaux d'ANP prédisent le développement futur de DT2	(Magnusson, Jujic et al. 2012)
The Atherosclerosis Risk on Communities study	7822	Des concentrations élevées de NT-proBNP sont associées à une réduction du risque de DT2	(Lazo, Young et al. 2013)
The Dallas Heart Study	2619	Des niveaux élevés de BNP/NT-proBNP sont associés à une distribution de TA favorable	(Neeland, Winders et al. 2013)
Malmö Diet and Cancer study	27,307	Les porteurs d'au moins une copie de l'allèle G du SNP rs5068 ont une incidence réduite de DT2 sur 14 ans	(Jujic, Nilsson et al. 2014)
The Diabetes Prevention Program	2411	Les niveaux circulants de NT-proBNP corrént avec la sensibilité à l'insuline avant et pendant les interventions préventives du DT2	(Walford, Ma et al. 2014)
Méta-analyse de 5 études		NT-proBNP est un prédicteur de maladies cardiovasculaires chez les sujets DT2	(Looker, Colombo et al. 2015)
Patients consultant le National Center for Global Health and Medicine Kohnodai Hospital	60	Les concentrations plasmatiques de BNP sont associées avec le niveau d'activité physique	(Hamasaki, Yanai et al. 2015)

III.2 Mécanismes du *natriuretic peptide handicap* au cours de l'obésité/DT2

Le(s) mécanisme(s) menant au *natriuretic peptide handicap* au cours de l'obésité peut(peuvent) inclure : 1) une diminution de la sécrétion des PN, 2) une réduction de leur activité biologique, 3) une activité du NPRA altérée, 4) une augmentation de la dégradation des PN, et 5) une dérégulation de la signalisation post récepteur (**Figure 14**).

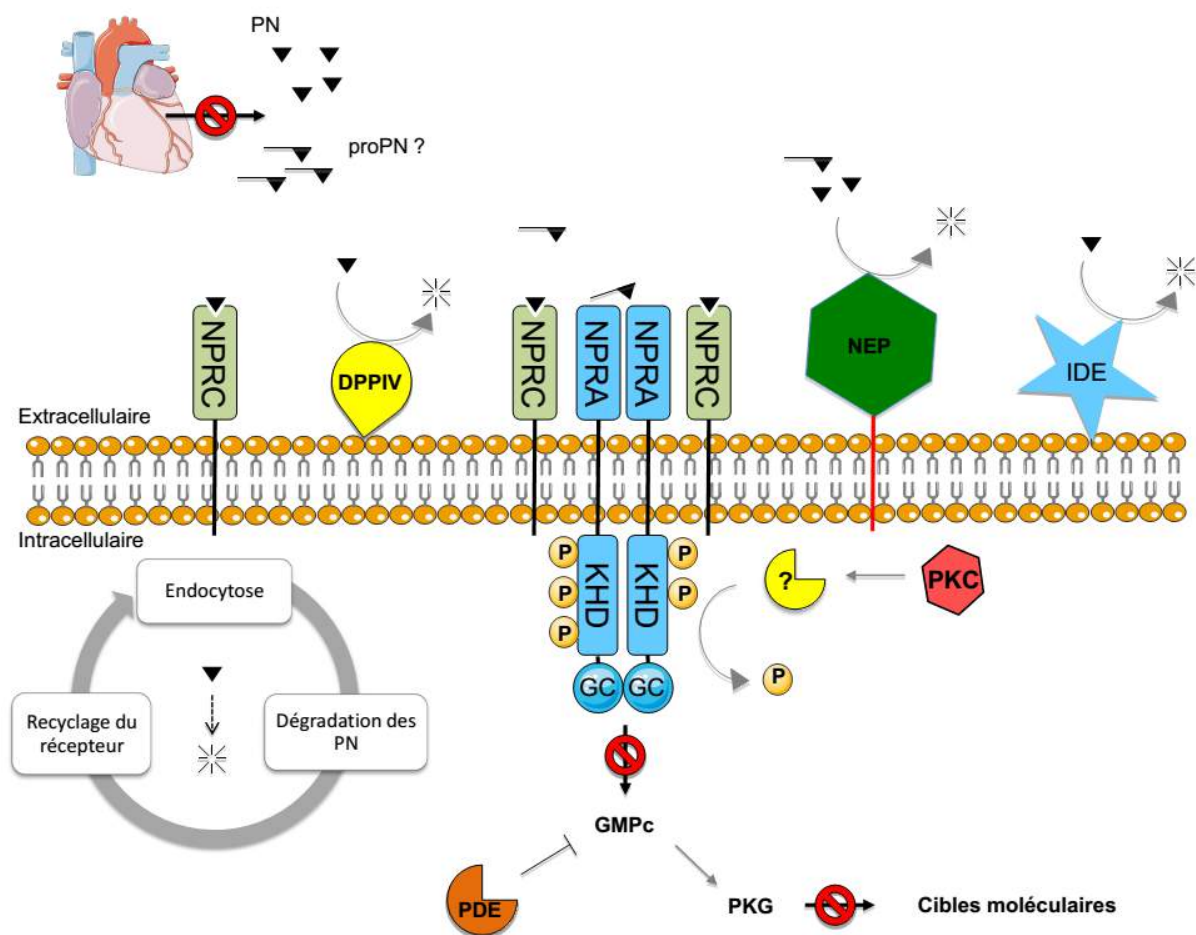


Figure 14 : Mécanismes potentiels du Natriuretic peptide handicap. Ce schéma représente les possibles mécanismes responsables du NPH. Les étoiles représentent l'inactivation/dégradation des PN. Les sens interdits indiquent une inhibition de l'activation de la voie indiquée. Le camembert jaune représente une phosphatase activée par une PKC. DPPIV : Dipeptidyl Peptidase IV ; IDE : Insulin Degrading Enzyme ; NEP : Nephylisine ; PDE : Phosphodiesterase ; PKC : Protéine kinase C.

III.2.1 Sécrétion des peptides natriurétiques

III.2.1.1 Polymorphisme génétique

Le lien entre maladies métaboliques et niveaux circulants de PN a été renforcé, plus récemment par des études de variants alléliques impactant les concentrations plasmatiques de PN. Le SNP rs198389 est associé avec des niveaux circulants de BNP significativement plus élevés chez les porteurs CC que chez les TC ou les TT, et ces individus ont 15% de risque en moins de développer un DT2 (Meirhaeghe, Sandhu et al. 2007, Choquet, Cavalcanti-Proenca et al. 2009). Les individus porteurs des génotypes AG ou GG au niveau du SNP rs5068 ont significativement plus de NT-proANP circulant, une pression sanguine systolique diminuée, un plus faible IMC, tour de taille, et risque de développer un syndrome métabolique comparé aux porteurs AA (Cannone, Boerrigter et al. 2011, Cannone, Cefalu et al. 2013). Cette observation a été confirmée par une autre étude suivie sur 14 années où les porteurs d'au moins une copie de l'allèle G ont une incidence plus faible de DT2, même après ajustement pour l'âge, le sexe et l'IMC (Jujic, Nilsson et al. 2014). L'explication de ce phénomène reposerait sur l'identification du miR-425, exprimé dans l'oreillette et le ventricule, qui peut lier et inactiver l'ARNm du gène *NPPA* chez les porteurs de l'allèle A mais cette liaison serait empêchée en cas d'allèle G, stabilisant ainsi l'ARNm de l'ANP (Arora, Wu et al. 2013). Une étude récente a publié que l'expression de miR-425 était significativement augmentée chez des souris obèses comparée à leurs contrôles minces (Olivo-Marston, Hursting et al. 2014). Parce que les homozygotes pour l'allèle A représentent 90% de la population, la régulation de miR-425 mériterait à être connue.

III.2.1.2 Facteurs environnementaux

En plus d'un polymorphisme génétique, il semblerait que la sécrétion des PN soit fortement régulée par le statut métabolique de l'individu. Des sujets obèses normotendus ne montrent pas de sécrétion d'ANP en réponse à une infusion de sel contrairement aux sujets contrôles (Licata, Volpe et al. 1994). Chez le rat génétiquement obèse, la cascade de transduction menant à l'expression de l'ANP est altérée comparé aux rats contrôles (Morabito, Vallotton et al. 2001). L'expression cardiaque de l'ANP et du BNP est significativement diminuée chez des souris ob/ob, db/db (souris obèses/DT2 par invalidation génétique de la leptine ou de son récepteur

respectivement) ou rendues nutritionnellement obèses comparativement à leurs contrôles sans changement des fonctions cardiaques (Gutkowska, Broderick et al. 2009, Bartels, Nielsen et al. 2010, Plante, Menaouar et al. 2014). Ces souris obèses souffrent par contre d'une importante infiltration de TAG au niveau cardiaque. Dans la même veine, des cardiomyocytes atriaux murins traités par de l'acide oléique à 0,5 mM durant 24h présentent une diminution de 35% de l'expression de l'ANP (Bartels, Nielsen et al. 2010). De plus, l'infusion d'une forte concentration d'AG pendant 3h à 8 hommes affecte les niveaux circulants de BNP et de NT-proBNP (Halbirk, Norrelund et al. 2010).

L'insuline pourrait également être un des vecteurs de l'inhibition chronique de la sécrétion des PN. Des études anciennes ont démontré qu'une hyperglycémie marquée augmente les concentrations sanguines d'ANP chez des volontaires sains normopondérés (Clark, Sclater et al. 1993, Bohlen, Ferrari et al. 1994, Baba, Heinemann et al. 1995, Tanabe, Naruse et al. 1995). L'ANP contrebalancerait ainsi la rétention rénale de sodium induite par l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie. Ces observations sont cohérentes avec le fait que le transporteur de glucose insulino-dépendant, GLUT4, colocalise avec l'ANP dans les granules de sécrétion de l'oreillette cardiaque (Martin, Rice et al. 1997, Slot, Garruti et al. 1997). En revanche, chez des sujets obèses normoglycotolérants, que ce soit lors d'un clamp euglycémique- ou hyperglycémique-hyperinsulinémique, le MR-proANP diminue de 20% par rapport aux valeurs basales (Pivovarova, Gogebakan et al. 2012). L'effet inhibiteur d'une perfusion hyperinsulinémique sur les concentrations plasmatiques de BNP et de NT-proBNP a également été reproduit chez des sujets insulino-résistants (Halbirk, Norrelund et al. 2010). De façon intéressante, le rat diabétique exprime une diminution du nombre de granules dans l'oreillette cardiaque (Hebden, Todd et al. 1989). Goetze a prouvé la pertinence physiologique de ces observations en constatant que les niveaux circulants de proANP étaient significativement abaissés de 50%, 2h après un repas chez de jeunes volontaires sains (Goetze 2013). Le fait que l'obésité/DT2 ou qu'un repas s'accompagne d'une diminution des niveaux circulants de PN peut poser des difficultés dans le diagnostic de l'IC et nécessite donc une caractérisation précise des mécanismes impliqués.

III.2.2 Activité biologique des peptides natriurétiques

Peu de données existent à l'heure actuelle sur la qualité biologique des PN circulants chez l'individu obèse. Et pour cause, l'idée d'une diminution de l'activité biologique des PN circulants au cours de pathologies cardiovasculaires commence tout juste à émerger. Cela est supporté par le fait qu'une perfusion de Nesiritide, du BNP₍₁₋₃₂₎ recombinant humain, mène à une amélioration symptomatique marquée de l'IC aigue (Mills, LeJemtel et al. 1999, Colucci, Elkayam et al. 2000). Le proBNP₍₁₋₁₀₈₎ a été rapporté pour être la forme circulante majoritaire du sujet IC, sa concentration peut être augmentée jusqu'à 40 fois comparé aux patients non IC (Seferian, Tamm et al. 2007, Niederkofler, Kiernan et al. 2008, Costello-Boerrigter, Lapp et al. 2013). Certains rapportent même l'absence totale de BNP₍₁₋₃₂₎ chez les IC sévères (Hawkrigde, Heublein et al. 2005). Le proBNP₍₁₋₁₀₈₎ est 6-8 fois moins puissant que le BNP mature pour activer le NPRA (Liang, O'Rear et al. 2007), et il a également moins d'affinité pour le NPRC (Dickey and Potter 2011). L'obésité est associée à une dilatation de la chambre cardiaque et une augmentation de l'épaisseur de la paroi du cœur, pouvant mener à une hypertrophie du ventricule gauche, une hypertension puis une ICC (Gradman and Alfayoumi 2006). Il serait intéressant de savoir si la sécrétion anormale de proBNP₍₁₋₁₀₈₎ est consécutive à l'IC ou à une dysfonction métabolique. Récemment, le gradient transcardiaque de proBNP₍₁₋₁₀₈₎ a été rapporté pour être significativement plus grand chez les individus DT2 comparés aux non DT2 (Costello-Boerrigter, Lapp et al. 2013). Une mutation dans le gène de la corine, enzyme permettant le clivage du proAPN en ANP mature, est associée à une hypertension chez l'homme (Dries, Victor et al. 2005) et la souris (Chan, Knudson et al. 2005). Ces souris n'exprimant pas la corine, et n'ayant donc pas d'ANP mature circulant, sont significativement plus grosses que leurs contrôles (Chan, Knudson et al. 2005). Une étude a récemment mis en évidence une corrélation inverse entre l'IMC et les niveaux de corine circulants chez l'homme (Ricciardi ,2015, MEC). Sachant que les hyperglycémies chroniques sont associées à une augmentation de la glycosylation des protéines, on pourrait également supposer que le DT2 s'accompagne d'une hausse de proBNP glycosylé sur la Thr71 empêchant son clivage en BNP mature (Semenov, Postnikov et al. 2009). D'autres études sont nécessaires pour établir un lien entre maladies métaboliques et activité biologique des PN.

III.2.3 Régulation du récepteur aux peptides natriurétiques de type A

III.2.3.1 Aspect quantitatif : expression du NPRA

Dès 1995, il est fait l'observation d'une diminution du nombre de NPRA et des niveaux de GMPc induit par l'ANP dans les reins de rats diabétiques (Sechi, Valentin et al. 1995). Puis, il a été mis en évidence que l'expression génique du *Npr1* est réprimée dans le muscle squelettique, le TABl et le TABr lorsque les souris sont nourries en régime riche en graisse et inversement lorsque les souris sont privées de nourriture (Miyashita, Itoh et al. 2009). Ces résultats sont retrouvés également dans le TABl de souris ob/ob obèses/DT2 (Nakatsuji, Maeda et al. 2010). Cet article démontre également qu'un traitement à 1 μ M d'insuline de la lignée adipocytaire 3T3-L1 murine est suffisant pour diminuer de moitié l'expression du *Npr1* via une signalisation PI3K dépendante. L'état nutritionnel de l'animal semble donc être un important déterminant de l'expression des NPR.

III.2.3.2 Aspect qualitatif : désensibilisation du NPRA

L'activité des récepteurs aux PN en conditions pathologiques reste largement inexplorée. Dickey et coll., ont démontré que l'activité du NPRA était sévèrement impactée dans des cardiomyocytes issus de cœurs IC mais le mécanisme sous jacent est inconnu (Dickey, Dries et al. 2012). La désensibilisation hétérologue du récepteur NPRA par des hormones vasoconstrictrices, comme l'Ang II, implique l'activation des PKC, ce qui est corrélé avec un état de déphosphorylation du KHD. Il est proposé que ces PKC vont activer une phosphatase ou inhiber une kinase capable d'agir sur le KHD du NPRA pour inhiber le récepteur en cas de vasodilatation excessive (Haneda, Kikkawa et al. 1991, Potter and Garbers 1994, Kumar, Cartledge et al. 1997). Un des mécanismes pour expliquer l'insulinorésistance liée à l'obésité est la suractivation des PKC par les DAG qui vont ensuite inhiber la signalisation insulinique (Schmitz-Peiffer and Biden 2008). On peut dès lors supposer que chez l'obèse ayant une accumulation de DAG ectopiques, cela induit la désensibilisation des récepteurs NPRA de façon chronique, via l'accumulation des PKC à la membrane (**Figure 15**). De plus, l'Ang II et d'autres composants du SRAA sont connus pour être surexprimés au cours de l'obésité (Saiki, Ohira et al. 2009). Ces

hormones viendraient ainsi amplifier le phénomène de désensibilisation hétérologue et empêcher la signalisation des PN.

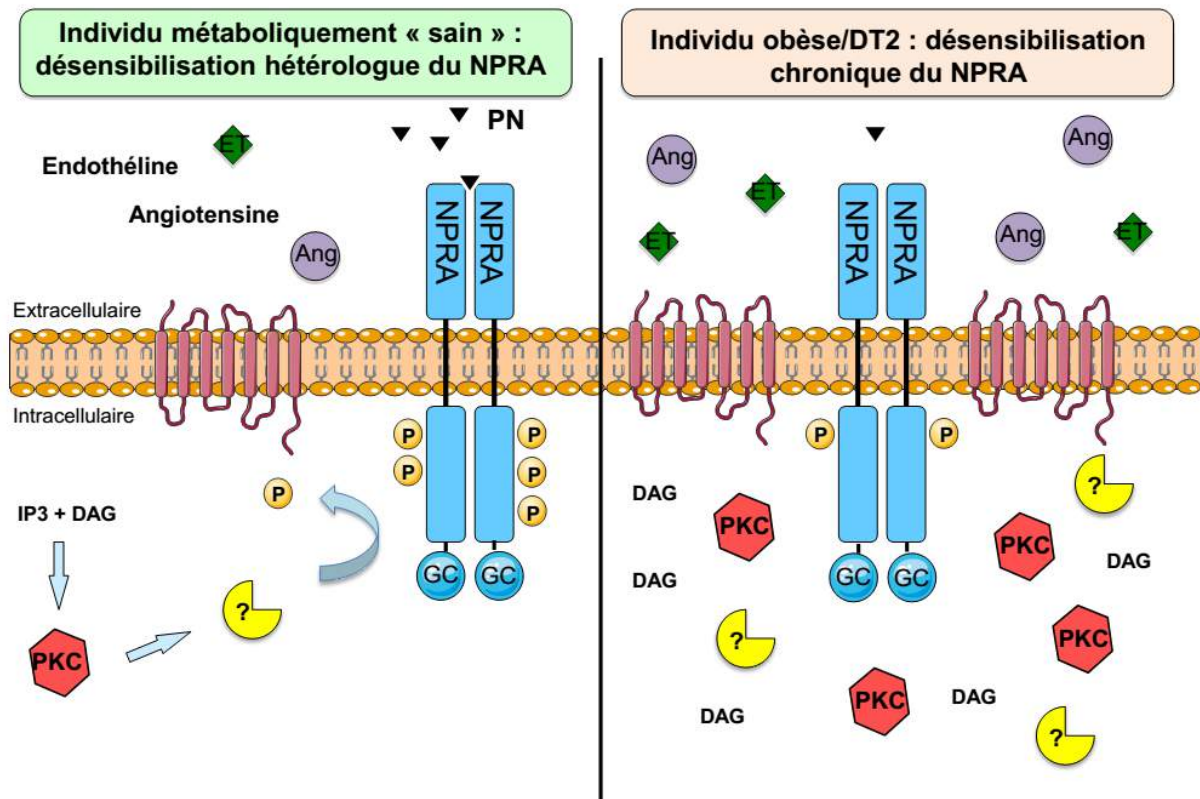


Figure 15 : Hypothétique désensibilisation hétérologue chronique du récepteur NPRA chez les personnes obèses. Cela se produirait par deux mécanismes distincts : par la suractivation du SRAA et par l'augmentation des PKC membranaires au cours de l'obésité/DT2. Le camembert jaune représente une phosphatase activée par une PKC. Ang : Angiotensine ; DAG : Diacylglycérol ; ET : Endothéline ; PIP₃ : Phosphatidylinositol triphosphate ; PKC : Protéine Kinase C.

III.2.4 Clairance/Dégradation des PN

Les molécules de clairance des PN exprimées par le TA, ont été proposées pour expliquer la diminution des niveaux circulants de PN durant l'obésité/DT2 (Sarzani, Paci et al. 1995, Dessi-Fulgheri, Sarzani et al. 1998). Or, cette hypothèse n'explique pas à elle seule l'appauvrissement des concentrations en NT-proANP et NT-proBNP qui ne sont pas reconnus par le NPRC, ni les endopeptidases (Das, Drazner et al. 2005) (**Figure 3**). Cependant, les adipocytes de souris dépourvues de NPRC répondent à la lipolyse induite

par les PN contrairement aux contrôles (Bordicchia, Liu et al. 2012). Ce qui a fait naître l'idée que c'est le ratio NPRA/NPRC qui dicte la transduction du signal aux PN. De plus, la demi-vie de l' $[^{125}\text{I}]\text{ANP}$ est 2 à 3 fois plus longue chez ces souris qui manifestent également une plus faible pression sanguine (Matsukawa, Grzesik et al. 1999). Cela prouve bien que ces molécules peuvent jouer un rôle important dans la clairance locale des PN et limiter leur accessibilité aux tissus cibles. Donc mieux comprendre leur régulation dans l'obésité/DT2 reste primordial.

III.2.4.1 Récepteur aux peptides natriurétiques de type C

Le SNP rs2270915 est associé avec les différences de pression sanguine diastolique observées chez le DT2, l'allèle G étant associé à une pression plus élevée (Saulnier, Roussel et al. 2011). Tout comme le variant C(-55) dans le promoteur du gène *NPR3* (Sarzani, Dessi-Fulgheri et al. 1999). De plus, les sujets porteurs du génotype A(-55)A ont une prévalence significativement plus faible de surpoids, d'obésité ou d'adiposité abdominale (Sarzani, Strazzullo et al. 2004). Il a également été mis en évidence qu'une variation du nombre de répétition en tandem dans la région 5' du gène *NPR3* influence l'hypertension liée à l'obésité (Aoi, Soma et al. 2004).

L'expression du NPRC est fortement impactée par l'état nutritionnel de l'animal mais en miroir du NPRA. En 1995, Sarzani et coll., observent que le jeûne abaisse de façon très importante l'expression du *Npr3* dans le TABl et le TABr de rat sans modification de son expression dans le cortex rénal (Sarzani, Paci et al. 1995). L'expression génique du *Npr3* est à l'inverse plus élevée dans le TABl, le TABr et le muscle squelettique lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse (Miyashita, Itoh et al. 2009, Nakatsuji, Maeda et al. 2010). Chez les souris db/db, son expression est très significativement augmentée au niveau cardiaque et dans le TAV (Plante, Menaouar et al. 2014). Les cellules 3T3-L1 murines exposées à l'insuline montrent une forte hausse de l'expression du *Npr3* de façon PI3K dépendante, à l'inverse de celle du *Npr1* (Nakatsuji, Maeda et al. 2010). Chez l'homme, le *NPR3* du TAV et du TASC corrént tous deux positivement avec l'insulinémie à jeun chez les DT2. Un clamp euglycémique- ou hyperglycémique-hyperinsulinémique augmente l'expression du *NPR3* dans le TASC après 4h (Pivovarova, Gogebakan et al. 2012). Ces résultats, reliés

à ceux décrits pour le NPRA, indiquent que l'insuline pourrait donc être l'un des médiateurs du déclin du ratio NPRA/NPRC au cours de l'obésité/DT2.

III.2.4.2 Endopeptidases

Une exposition des cellules endothéliales humaines à une forte concentration de glucose (40 mM) et d'AG (40 μ M) stimule intensément l'activité de la NEP en augmentant sa glycation et sa lipopéroxydation (Muangman, Spenny et al. 2003). L'augmentation de l'activité de la NEP ne s'accompagne pas nécessairement de changement de l'ARNm ou de la protéine sur des îlots pancréatiques murins (Zraika, Koh et al. 2013). De plus, l'activité plasmatique de la NEP a été associée avec le syndrome métabolique, l'insulinorésistance et les facteurs de risques cardiovasculaires chez l'homme et son expression plasmatique et adipocytaire est significativement augmentée chez la souris obèse insulinorésistante (Standeven, Hess et al. 2011). Deux papiers au moins ont démontré l'activation *in vitro* de la NEP par les PKC (Suzuki, Ino et al. 2002, Kikkawa, Shibata et al. 2004). Connaissant l'implication des PKC dans l'insulinorésistance, il serait intéressant d'étudier leur contribution dans l'expression de la NEP et dans l'action tissu-spécifique des PN. Par ailleurs, l'activité de la DPPIV est augmentée lors du DT2 (Fadini, Albiero et al. 2012). De plus, les sujets obèses non diabétiques ont une augmentation de l'expression du DPPIV dans le TAV et une plus forte sécrétion de l'enzyme dans la circulation (Lamers, Famulla et al. 2011).

III.2.5 Signalisation post récepteur

La littérature est relativement pauvre en ce qui concerne l'activité des PKG au cours de l'obésité/DT2. Les corps caverneux de rats diabétiques ont une diminution de l'activité de PKG I α et PKG I β (Bivalacqua, Kendirici et al. 2007). Des cellules musculaires lisses exposées à de fortes concentrations de glucose (30 mM) ont une diminution de l'activité de PKG comparée aux cellules non traitées via une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dérivés de la NADPH oxydase (Wang, Lincoln et al. 2010).

Un autre élément, qui pourrait contribuer au *NPH*, est une augmentation de la dégradation du GMPc par les PDE. L'activité globale des PDE a été rapportée pour être diminuée dans le TASC et le TAV de personnes obèses. Sachant que la PDE3B est

majoritaire dans le TA (PDE mixte pour le GMPc et l'AMPc), cela pourrait être un facteur contribuant à l'altération de l'inhibition lipolytique par l'insuline chez le sujet obèse (Omar, Banke et al. 2011). En revanche, l'activité des PDE est significativement augmentée dans le TASC de personnes obèses/DT2. Des adipocytes issus de rats diabétiques présentent également un accroissement de l'activité PDE après traitement à l'insuline (Makino, Osegawa et al. 1983). La surexpression de la PDE3B spécifiquement dans les cellules β provoque rapidement une altération de la sécrétion insulinaire, une intolérance au glucose et une déstructuration de l'architecture des îlots (Harndahl, Wierup et al. 2004, Walz, Harndahl et al. 2006). L'activité de la PDE3B, PDE activée par l'insuline pour inhiber la lipolyse dans les adipocytes, peut être phosphorylée et activée par IKK, une enzyme impliquée dans l'inflammation de bas grade liée à l'obésité (Mowers, Uhm et al. 2013).

III.3 Réversion/traitement du *natriuretic peptide handicap*

III.3.1 Amélioration de l'hygiène de vie

La diminution des niveaux circulants de PN durant l'obésité semble réversible. Les premiers jours suivant une restriction calorique (500 kcal/jour) sont immédiatement suivis d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'ANP et de GMPc chez l'individu en surpoids ou obèse (Maoz, Shamiss et al. 1992, Dessi-Fulgheri, Sarzani et al. 1999), ce qui est associé avec une répression de l'expression du *NPR3* dans le TA et pas dans le rein (Sarzani, Paci et al. 1995). Cette réduction persiste lors d'un régime prolongé pauvre en graisses ou en sucres (6 mois, -5% de poids corporel) (Haufe, Kaminski et al. 2015) et induit une augmentation de l'activité lipolytique de l'ANP dans le TASC (Sengenès, Stich et al. 2002). Une intervention sur l'hygiène de vie durant 3 mois (consultation diététique, exercice, gestion du stress, soutien social) élève les niveaux circulants de BNP chez des sujets obèses atteints de maladies coronaires ou à haut risque (Chainani-Wu, Weidner et al. 2010). De façon intéressante, les individus qui perdent le plus de poids sont ceux qui ont la plus grande augmentation de BNP. Un entraînement physique d'endurance pendant 4 mois permet également d'améliorer la lipolyse induite par l'ANP dans le TA (Moro, Pillard et al. 2005). 8 semaines d'exercice

aérobie accroît l'expression du *NPR1* au niveau du muscle squelettique chez l'individu obèse sans changement de l'IMC, ni des concentrations plasmatiques de PN (Engeli, Birkenfeld et al. 2012).

3, 6, 12 et 24 mois après une chirurgie bariatrique (bypass gastrique), les sujets obèses ont une forte augmentation des concentrations plasmatiques de BNP qui corrèlent significativement avec la perte de poids (St Peter, Hartley et al. 2006, van Kimmenade, van Dielen et al. 2006, Changchien, Ahmed et al. 2011, Marney, Brown et al. 2014). Ces effets post-opératoires sont reproductibles pour le BNP, le NT-proBNP, l'ANP et le NT-proANP (Arora, Reingold et al. 2015). L'élévation du NT-proBNP est significative dès un mois après l'opération, au moment où les patients ont déjà perdu 10% de leur poids corporel, ce qui est associé à une baisse de la pression sanguine et de la prise de diurétiques (Chen-Tournoux, Khan et al. 2010). De plus, ces changements de concentrations plasmatiques ne sont pas secondaires à des modifications de la fonction cardiaque mais attribuables à la perte de poids *per se* (Chen-Tournoux, Khan et al. 2010). Que ce soit chez des obèses normotendus ou hypertendus, les niveaux de MR-proANP sont significativement augmentés 6 semaines après un bypass gastrique en Roux-en-Y (Bonfils, Taskiran et al. 2015). De plus, ces résultats semblent reproductibles chez le rongeur. Une diminution de 40% du poids corporel chez le rat obèse, augmente significativement les concentrations plasmatiques d'ANP comparativement aux rats contrôles et l'hypertrophie cardiaque persiste même après normalisation du poids corporel (Crandall, Ferraro et al. 1989). Une chirurgie en Roux-en-Y chez la souris obèse mène également à une augmentation de l'expression du ratio *Npr1/Npr3* dans le TAV (Neinast, Frank et al. 2015).

III.3.2 Intervention médicamenteuse

Des souris obèses/DT2 voient leur expression cardiaque d'ANP significativement augmentée après une semaine de traitement à la sitagliptin (inhibiteur du DPPIV), à la metformine (antidiabétique) ou encore au liraglutide (agoniste des récepteurs au GLP-1) (Sauve, Ban et al. 2010). Même si la sécrétion de l'ANP induite par le GLP-1 semble être une spécificité murine (Skov, Holst et al. 2013, Lovshin, Barnie et al. 2015), de façon intéressante, la perte de poids observée après 12 semaines de traitement au Liraglutide chez des individus obèses/DT2 est significativement corrélée avec l'élévation des

niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP (Li, Yu et al. 2014). Un traitement de 12 semaines à l'acarbose (100 mg, 3 fois/jour), un inhibiteur de l' α -glucosidase utilisé dans le traitement du DT2, accroît de plus de 23% les concentrations plasmatiques de MR-proANP uniquement chez les sujets non diabétiques (Rudovich, Pivovarova et al. 2012). Le traitement n'est pas associé avec des modifications du poids corporel, ni de la sensibilité à l'insuline en fin de protocole. En revanche, la hausse de MR-proANP corrèle significativement avec la baisse de la glycémie et de l'insulinémie post prandiale.

La PDE5 (spécifique du GMPc ($K_m=1 \mu M$)), fait partie des PDE les plus étudiées car c'est la cible pharmacologique des traitements des dysfonctions érectiles (sildénafil (Viagra®), le tadalafil (Cialis®) ou encore le vardénafil (Levitra®)) (Corbin, Francis et al. 2002). La PDE5 peut être phosphorylée sur un résidu Ser92 par la PKG ou la PKA pour augmenter son affinité pour le GMPc (Corbin, Turko et al. 2000). Une étude conduite sur 53 obèses en hyperinsulinémie ($\geq 10 \mu U/ml$) a révélé une amélioration de leur insulino-résistance après traitement oral au tadalafil (20 mg/jour, 3 mois) comparé au groupe placebo (Ho, Arora et al. 2014). Une autre investigation a montré une amélioration de la fonction des cellules β de patientes obèses traitées au tadalafil (10 mg/jour, 3 semaines) (Hill, Eckhauser et al. 2009). Des souris injectées au sildénafil (12 mg/kg/jour, 12 semaines) ont une élévation des niveaux circulants de GMPc et de la dépense énergétique associée à une diminution de la prise de poids induite par un régime riche en graisses et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Ayala, Bracy et al. 2007). Ces souris traitées ont également une augmentation du transport de glucose *in vivo* dans les muscles squelettiques *soleus* et *gastrocnemius* associée avec une hausse de la phosphorylation d'IRS1. Un explant de TAV humain traité au vardénafil augmente l'expression de PPAR- γ , de l'adiponectine, de PGC-1 α et de l'ADN mitochondrial (De Toni, Strapazzon et al. 2011). Les effets bénéfiques d'une inhibition de la PDE5 seraient également liés, au moins en partie, à une diminution de l'inflammation systémique associée au DT2. En effet, des souris db/db traitées au tadalafil pendant 28 jours ont une diminution significative de la glycémie, du TNF- α et de l'IL-1 β circulants tout en ayant une élévation de l'IL10 (Varma, Das et al. 2012). Concernant les autres PDE, l'inhibition de la PDE10A (PDE commune à l'AMPc et au GMPc) a révélé une diminution de la prise de poids, de la prise alimentaire associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Nawrocki, Rodriguez et al. 2014).

Au vu de la littérature, il semblerait donc que le natriuretic peptide handicap soit associé à une signalisation qualitativement et quantitativement altérée chez les individus obèses/DT2. Si ce phénomène peut être restauré, au moins en partie, d'autres investigations sont nécessaires pour établir un lien causal entre le NPH et les complications de l'obésité notamment le DT2.

Hypothèse et objectifs

La mise en évidence, en 2000, de l'activité lipolytique des PN dans le TA humain est une découverte majeure. Cela a positionné le cœur comme un organe régulateur central du métabolisme énergétique via la sécrétion d'hormones ayant un puissant effet lipolytique. Quelques années plus tard, Thomas Wang et coll. sont les premiers à publier que les niveaux circulants de PN corrèlent négativement avec l'IMC, faisant émerger l'idée d'un *NPH* chez l'individu obèse. Plusieurs études de cohortes vont ensuite relier ce déficit avec un plus haut risque d'incidence de DT2. De plus, la mise en évidence récente de la présence des récepteurs aux PN sur le muscle squelettique élargie le potentiel champ d'action des PN dans la régulation du métabolisme énergétique. Sur la base de toutes ces observations, nous avons posé l'hypothèse que les désordres métaboliques s'accompagnent d'une diminution de l'activité biologique du système PN au niveau des organes métaboliques.

Objectif 1: Mettre en évidence un lien entre expression du système PN dans le TA et le muscle squelettique humain et la sensibilité à l'insuline.

Objectif 2: Etudier la signalisation aux PN dans le muscle squelettique dans un contexte d'obésité/DT2.

Objectif 3: Evaluer le potentiel thérapeutique d'une activation du système PN dans des modèles d'obésité et de DT2 chez la souris.

Résultats

PREMIERE PARTIE

**Les peptides natriurétiques favorisent le transport de glucose dans
l'adipocyte humain : lien avec la sensibilité à l'insuline**

**Natriuretic peptides promote glucose uptake in human adipocytes: relationship
with insulin sensitivity**

Marine Coué, Valentin Barquissau, Pauline Morigny, Katie Louche, Corinne Lefort,
Christian Carpéné, Nathalie Viguerie, Peter Arner, Dominique Langin, Mikael Rydén,
and Cedric Moro

Diabetologia (Soumis)

Natriuretic peptides promote glucose uptake in human adipocytes: relationship with insulin sensitivity

Journal:	<i>Diabetologia</i>
Manuscript ID:	Diab-15-1307
Manuscript Type:	Article
Keywords:	2.10 Human, 3.04.02 Insulin sensitivity and resistance, 3.04.09 Glucose transport

1 **Natriuretic peptides promote glucose uptake in human adipocytes: relationship with**
2 **insulin sensitivity**

3

4 Marine Coué^{1,2}, Valentin Barquissau^{1,2}, Pauline Morigny^{1,2}, Katie Louche^{1,2}, Corinne Lefort^{1,2},
5 Christian Carpéné^{2,3}, Nathalie Viguerie^{1,2}, Peter Arner⁴, Dominique Langin^{1,2,5}, Mikael
6 Rydén⁴, and Cedric Moro^{1,2}

7

8 ¹INSERM, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and
9 Cardiovascular Diseases, Toulouse, France; ²University of Toulouse, UMR1048, Paul
10 Sabatier University, France; ³INSERM, UMR1048, Team 1, Institute of Metabolic and
11 Cardiovascular Diseases, Toulouse, France; ⁴Department of Medicine-H7, Karolinska
12 Institutet, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden; ⁵Toulouse University
13 Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

14

15 **Corresponding author:** Cedric Moro, Ph.D.

16 Inserm UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Obesity Research
17 Laboratory, CHU Rangueil, BP84225, 1 avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse cedex 4,
18 France ; Phone: +33 561 32 5626; Fax: +33 561 32 5623; E-mail: Cedric.Moro@inserm.fr

19

20 **Main Text Word count: 3943**

21 **Abstract Word count: 249**

22 **Number of figures: 7**

23 **Electronic Supplementary Material**

24 **Abstract**

25 *Aims/Hypothesis* Although a robust association between reduced circulating natriuretic
26 peptide (NP) levels and increased risk of type 2 diabetes (T2D) has been reported in
27 humans, there is little direct evidence on the influence of NP on whole-body or target tissue
28 insulin sensitivity.

29 *Methods* NP receptor mRNA levels were measured by RT-qPCR in biopsy samples from
30 subcutaneous adipose tissue of two independent European cohort. Glucose uptake
31 experiments were carried out in human isolated adipocytes and multipotent adipose-derived
32 stem (hMADS) cells differentiated into adipocytes. Metabolic and signaling studies were
33 performed in hMADS cells.

34 *Results* We here demonstrate that NP receptor-A (NPRA) gene expression is reduced while
35 NP clearance receptor (NPRC) gene expression is strongly increased in human adipose
36 tissue as a function of body mass index (BMI). In addition, adipose *NPRA* expression
37 associated inversely with fasting blood glucose and was down-regulated in prediabetes and
38 T2D. Insulin resistance was negatively correlated with adipose *NPRA* mRNA levels ($r=-0.65$,
39 $p<0.0001$), while a strong positive correlation was found with adipose *GLUT4* and *ChREBP*
40 mRNA levels independently of BMI. NP activated Akt and AS160 through cGMP-dependent
41 protein kinase and promoted glucose uptake in a dose-dependent manner in human
42 adipocytes. NP treatment increased glucose oxidation and *de novo* lipogenesis
43 independently of significant changes in gene expression.

44 *Conclusions/Interpretation* Collectively, our data support a role for NP in the regulation of
45 blood glucose and insulin sensitivity through stimulation of glucose uptake in human adipose
46 tissue. Thus, NP signaling in obesity may constitute a potential target to alleviate insulin
47 resistance.

48

49 **Keywords**

50 Obesity; adipose tissue; glucose uptake; insulin resistance; natriuretic peptide

51

52 **Abbreviations**

53 ANP: atrial natriuretic peptide; BNP: brain natriuretic peptide; ChREBP: carbohydrate-
54 responsive element binding protein; cGK-I: cGMP-dependent protein kinase-I; GLUT4:
55 glucose transporter-4; hMADS: human multipotent adipose-derived stem cells; NP:
56 natriuretic peptide; NPRA: natriuretic peptide receptor-A; NPRC: natriuretic peptide
57 clearance receptor; T2D: type 2 diabetes.

For Peer Review

58 Introduction

59 Atrial- and Brain- Natriuretic Peptides (NP), ANP and BNP respectively, are well
60 known cardiovascular hormones produced by atria of the heart in response to mechanical
61 stretch. They signal through NPRA, a transmembrane receptor coupled to a guanylyl cyclase
62 activity [1-3]. ANP and BNP can also bind to a clearance receptor named NPRC that
63 sequesters, internalizes and degrades the peptides [4]. Over the last decade, NP have
64 emerged as potent metabolic hormones as recently discussed [5-7]. NP were first identified
65 as potent lipolytic hormones in human adipocytes [8]. Their signaling pathway involves the
66 production of the second messenger cGMP and the activation of a cGMP-dependent kinase-I
67 (cGK-I) [9]. NP have subsequently been shown to modulate adipokine secretion [10, 11], and
68 the browning of white fat cells [12].

69 Several cohort and community-based studies have reported a strong association
70 between plasma NP levels and obesity. In 2004, Thomas Wang and coworkers showed an
71 inverse relationship between plasma NP levels and body mass index (BMI) [13], findings
72 which were then confirmed in several independent studies [14, 15]. Kahn et al. latter
73 demonstrated an inverse relationship between plasma NP levels, insulin resistance and
74 fasting blood glucose [16]. More recently, at least three prospective studies demonstrated a
75 robust association between baseline plasma NP concentrations and the incidence of new
76 onset type 2 diabetes (T2D) [17-19]. However a causal link between reduced plasma NP
77 levels in obesity, and insulin resistance and T2D has not yet been demonstrated [20]. Thus it
78 is so far unclear how NP may influence blood glucose control in humans.

79 Considering that adipose tissue is a major target organ of NP [21], we hypothesized
80 that NP signaling in adipose tissue could be a determinant of insulin sensitivity and blood
81 glucose control. The aim of the present study was to, 1) explore the relationships between
82 adipose NP receptor expression and obesity, insulin resistance and T2D, and 2) to determine
83 the impact of NP on glucose metabolism in human adipocytes. Our data demonstrate a
84 robust link between adipose NPRA expression and insulin sensitivity, and highlight a novel

85 biological pathway in human adipocytes by which NP promote glucose uptake and
86 metabolism in a cGMP-dependent manner.

For Peer Review

87 **Methods**

88 **Clinical studies and human subjects**

89 **Cohort 1**

90 The samples investigated in this paper were collected from 2006 to 2007 during the
91 DiOGenes study, a pan-European randomized trial which was approved by the ethics
92 committees of each of the 8 European centers participating to the program (NCT00390637).

93 The DiOGenes project investigated the effects of diets with different content of protein and
94 glycemic index on weight-loss maintenance and metabolic and cardiovascular risk factors
95 after an 8-week calorie restriction phase, in obese/overweight individuals. Written informed
96 consent was obtained from each patient according to the local ethics committee of the
97 participating countries as previously described [22].

98 Healthy overweight (body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m²) individuals, aged <65 years were
99 eligible for the study. Exclusion criteria were BMI ≥ 45 kg/m², liver or kidney diseases,
100 cardiovascular diseases, diabetes mellitus type 1, special diets/eating disorders, systemic
101 infections/chronic diseases, cancer within the last 10 years, weight change >3 kg within the
102 previous 3 months, and other clinical disorders or use of prescription medication that might
103 interfere with the outcome of the study.

104 A detailed description of inclusion and exclusion criteria has been published previously [23].
105 BMI was calculated by dividing weight in kilograms by the square of height in meters. Waist
106 circumference was measured between the bottom of the ribs and the top of the hip bone. A
107 detailed description of the DiOGenes intervention trial and main outcomes can be found in
108 the core publication [22]. Briefly, among 1209 individuals screened, 932 entered a baseline
109 clinical investigation day including anthropometric measures (height, weight, waist
110 circumference, body composition), blood pressure measurements, fasting blood sampling,
111 and subcutaneous adipose tissue biopsies were performed (at baseline and at the end of
112 each phase). All procedures were standardized between the 8 study centers across Europe.

113 **Cohort 2**

114 Cohort 2 comprised 30 obese (BMI>30 kg/m²) otherwise healthy and 26 non-obese (BMI<30
115 kg/m²) healthy women that have been described in detail previously [24]. All were pre-
116 menopausal and free of continuous medication. They were investigated in the morning after
117 an overnight fast in the midst of their menstrual cycle. Height, weight and waist
118 circumference were determined. A venous blood sample was obtained for measurements of
119 glucose and insulin and the values were used to calculate HOMA-IR [25]. An abdominal
120 subcutaneous adipose tissue biopsy was obtained by needle aspiration as described [26].

121

122 **Glucose uptake assay in isolated adipocytes**

123 Fat cell suspensions were incubated with all tested agents for 45 min at 37°C in 400 µl final
124 volume, with or without insulin or ANP. Then, an isotopic dilution of 2-deoxy-D-[³H]glucose
125 (2-DG) was added to reach 50 nmol and 1,000,000 dpm/assay, and cells were incubated
126 again for 10 min as previously described [27]. After stopping by addition of 100 µM
127 cytochalasin B, cell suspension aliquots were centrifuged through diisononyl-phthalate layer
128 to separate the adipocytes from the medium allowing counting the intracellular radioactive 2-
129 DG, as an index of glucose uptake [28].

130

131 **Culture of human multipotent adipose-derived stem cells**

132 hMADS cells were cultured and maintained in proliferation medium (DMEM low glucose 1g/l,
133 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 50 units/ml of penicillin, 50 mg/ml of
134 streptomycin, supplemented with 2.5 ng/ml of human fibroblast growth factor 2 (FGF2)) as
135 previously described [29]. The cells were inoculated in 6-well plates at a density of 44,000
136 cells/ml and kept at 37°C in 5% CO₂. Six days post-seeding, FGF2 was removed from
137 proliferation medium. On the next day (day 0), the cells were incubated in differentiation
138 medium (DM; serum-free proliferation medium/Ham's F-12 medium containing 10 µg/ml of
139 transferrin, 10 nM of insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 100 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1
140 µM dexamethasone and 100 nM rosiglitazone). At day 3, dexamethasone and 3-isobutyl-1-
141 methylxanthine were omitted from DM and at day 10 rosiglitazone was also omitted. Human

142 ANP or BNP treatment (100 nM) were carried out between days 11 and 14 and the
143 experiments were performed at day 14. Human FGF2, insulin, triiodothyronine, transferrin, 3-
144 isobutyl-1-methylxanthine, and dexamethasone were from Sigma; L-glutamine, penicillin, and
145 streptomycin from Invitrogen; Hepes, Dulbecco's modified Eagle medium low glucose, and
146 Ham's F-12 medium from Lonza; and rosiglitazone from Alexis Biochemicals.

147

148 **Glucose uptake assay in hMADS adipocytes**

149 The day before the assay, insulin was removed from culture medium. After two washes with
150 PBS, cells were incubated 50 min at 37°C without or with various concentrations of BNP (10^{-11}
151 to 10^{-5} mol/L). Then, 125 μ M 2-deoxy-D-glucose and 0.4 μ Ci 2-deoxy-D- 3 H]glucose per
152 well were added for 10 min incubation. Culture plates were put on ice and rinsed with 10 mM
153 glucose in ice-cold PBS and then with ice-cold PBS. Cells were scraped in 0.05 N NaOH and
154 2-deoxy-D-glucose uptake was measured by liquid scintillation counting of cell lysate. Data
155 are expressed as nanomoles per minute and were normalized per mg of protein [29].

156

157 **Determination of glucose oxidation**

158 The day before the assay, insulin was removed from culture medium. Cells were
159 preincubated with a glucose- and serum-free medium for 90 min then exposed to DMEM low
160 glucose (5.5 mM) supplemented with D-[U- 14 C]glucose (1 μ Ci/ml; PerkinElmer, Boston, MA)
161 in the presence or absence of 100 nM insulin (Humulin®) for 3h. Following incubation,
162 glucose oxidation rate was determined by measuring [14 C]CO₂ by liquid scintillation counting
163 as previously described [30].

164

165 **Determination of glucose incorporation into glycerol and fatty acids**

166 To determine glucose carbon incorporation into fatty acid and glycerol, neutral lipids were
167 extracted after glucose oxidation as described above. They were dried and hydrolyzed in 1
168 ml 0.25 N NaOH in chloroform/methanol (1:1) for 1h at 37°C. The solution was neutralized
169 with 500 ml 0.5 N HCl in methanol. FA and glycerol were separated by adding 1.7 ml

170 chloroform, 860 ml water, and 1 ml chloroform/methanol (2:1). Incorporation of ^{14}C into
171 glycerol and FA was measured by liquid scintillation counting of upper and lower phases,
172 respectively. Specific activity was counted and used to determine the quantity of incorporated
173 glucose equivalent. Data were normalized to total cell protein content.

174

175 **Western blot**

176 Differentiated hMADS cell lysates were extracted, transferred onto nitrocellulose membranes
177 and blotted with the following primary antibodies: phospho-Akt Ser473, Akt, phospho-IRS1
178 Tyr612, IRS1, phospho-AS160 Thr642, AS160, phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182, and p38
179 MAPK (all from Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA). Subsequently, immunoreactive
180 proteins were revealed by enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Dura or
181 SuperSignal West Femto; Thermo Scientific), visualized using the ChemiDoc MP Imaging
182 System and data analyzed using the Image Lab 4.1 version software (Bio-Rad Laboratories,
183 Hercules, USA). α -tubulin (Sigma-Aldrich) was used as internal control.

184

185 **Statistical analyses**

186 All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad
187 Software Inc., San Diego, CA). Normal distribution and homogeneity of variance of the data
188 were tested using Shapiro-Wilk and F tests, respectively. One-way ANOVA followed by
189 Tukey's post-hoc tests and Student's *t*-tests were performed to determine differences
190 between groups, interventions and treatments. Two-way ANOVA followed by Bonferonni's
191 post hoc tests were applied when appropriate. Linear regression was performed after log
192 transformation of nonparametric data. The false discovery rate for multiple testing was
193 controlled by the Benjamini-Hochberg procedure with $p_{\text{adj.}}$ values ≤ 0.05 as threshold. All
194 values in Figures and Tables are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set
195 at $P < 0.05$.

196 **Results**

197 **Adipose NPR expression is altered in obesity and type 2 diabetes**

198 *NPRA* and *NPRC* gene expression was investigated in human adipose tissue biopsy
199 samples from Cohort 1. We observed a gradual down-regulation of adipose *NPRA* mRNA
200 levels as a function of the obesity grade, with the lowest expression levels in subjects with
201 BMI>40 kg/m² (Figure 1A). In contrast, adipose *NPRC* mRNA levels were progressively
202 higher as a function of BMI and were nearly doubled in subjects with BMI>40 kg.m⁻² (Figure
203 1B). Thus the ratio of *NPRA*-to-*NPRC* gene expression was significantly reduced by 39% for
204 BMI between 30 and 35 kg.m⁻², and by 63% for BMI>40 kg.m⁻² (Figure 1C). We also found a
205 significant decrease in adipose *NPRA* expression in prediabetic (subjects with impaired
206 fasting glucose or glucose tolerance) and type 2 diabetic subjects compared to individuals
207 with normal glucose tolerance (NGT) (Figure 1D). Adipose *NPRA* mRNA levels were
208 reduced as a function of the quartiles of HOMA-IR, demonstrating that the most insulin
209 resistant individuals have the lowest *NPRA* gene expression in their adipose tissue (Figure
210 1E). Finally, we observed a significant negative correlation ($r=-0.26$, $p<0.0001$) between
211 adipose *NPRA* gene expression and fasting blood glucose at baseline (Figure 1F). These
212 data demonstrate a strong link between adipose NPR expression, obesity and blood glucose
213 control.

214

215 **Adipose NPRA expression relates to insulin sensitivity**

216 The findings in Cohort 1 were validated in Cohort 2 showing a strong inverse relationship
217 between adipose *NPRA* mRNA levels and HOMA-IR (Figure 2A). As whole-body insulin
218 sensitivity has been linked to adipose *GLUT4* and *ChREBP* expression [31, 32], we studied
219 the relationships between these two genes and *NPRA* in cohort 2. *NPRA* was positively
220 correlated with both *GLUT4* (Figure 2B) and *ChREBP* (Figure 2C) mRNA levels in adipose
221 tissue. Importantly, the correlation between *NPRA*, HOMA-IR, *GLUT4* and *ChREBP* remained
222 very significant even after statistical adjustment for BMI (Table 1). These robust associations
223 were largely confirmed in cohort 1 (Supplemental Figure 1). Overall, our data indicate that

224 adipose *NPRA* expression is a significant determinant of whole-body insulin sensitivity
225 possibly through effects on adipocyte glucose metabolism.

226

227 **Natriuretic peptides promote glucose uptake in human adipocytes**

228 We assessed directly the effect of ANP on glucose uptake in human isolated adipocytes
229 obtained from surgical samples. ANP dose-dependently activated glucose uptake with a 1.6
230 fold increase at a dose of 10 nM and a 2.2 fold increase at the highest dose of 1 μ M (Figure
231 3A). Of importance, ANP exhibited an additive effect on insulin stimulated-glucose uptake at
232 lowest concentrations of 1 and 10 nM insulin (Figure 3B). To investigate the underlying
233 molecular mechanism, we next switched to an established human adipocyte cell model
234 system, i.e. human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells. This cell model has
235 been previously used to study lipolysis and the browning process in response to NP [12, 33].
236 These cells express all the components of the NPR signaling pathway evidenced by the fact
237 that *NPRA* was expressed at maximal levels early in the time-course of differentiation (day 3)
238 and remained steady till the end of the differentiation process (day 13) (Supplemental Figure
239 2). *NPRC* and *PRKGI* (cGK-I) were expressed at lower levels throughout the time-course of
240 differentiation (Supplemental Figure 2). Similar to the findings in freshly isolated human
241 adipocytes, ANP at the maximal concentration of 1 μ M induced a 1.6 fold increase in glucose
242 uptake in differentiated hMADS cells (Figure 4A). In comparison, insulin induced glucose
243 uptake by about 6 fold at 100 nM ($p < 0.001$) (data not shown). Moreover, BNP activated
244 glucose uptake in a concentration-dependent manner reaching a nearly 2-fold induction of
245 glucose uptake at 100 nM and an EC_{50} of 22 nM (Figure 4B). We next used BNP which is
246 more stable than ANP for all subsequent experiments. Interestingly, BNP-induced glucose
247 uptake was blunted in presence of (Rp)-8-pCPT-cGMPS 100 μ M, a specific pharmacological
248 inhibitor of cGK (Figure 4C). Collectively, these results indicate that NP promote glucose
249 uptake in a cGMP-dependent manner in human adipocytes.

250

251 **Natriuretic peptides activate Akt-signaling in human adipocytes**

252 Glucose uptake in human adipocyte is mediated by the glucose transporter GLUT4 in
253 response to insulin through activation of the IRS1-Akt-signaling pathway [34, 35]. Short-term
254 treatment with BNP induced a time-dependent activation of Akt Ser473 phosphorylation,
255 nearing 1.23 fold at 20 min and 3.7 fold at 60 min ($p < 0.0001$) (Figure 5). This effect was
256 completely abolished in presence of the cGK inhibitor (Rp)-8-pCPT-cGMPS (Figure 5). No
257 change in IRS1 Tyr612 phosphorylation was observed (Supplemental Figure 3), indicating
258 that the effect of NP is independent of that of the insulin signaling cascade. Moreover, BNP-
259 induced Akt activation was associated with a downstream activation of AS160, a GTPase
260 involved in GLUT4 translocation to the plasma membrane. As for Akt, BNP-mediated
261 phosphorylation of AS160 was totally abrogated by the addition of a pharmacological
262 inhibitor of cGK. We also confirmed previous findings [12] showing that BNP treatment
263 induces p38 MAPK (3.2 fold, $p < 0.0001$) in a cGK-dependent manner (Figure 5). Interestingly,
264 p38 MAPK phosphorylation was also induced by 8-bromo-cGMP (1.9 fold, $p < 0.01$), a stable
265 analog mimetic of cGMP (data not shown). In summary, our data demonstrate that NP
266 promote glucose uptake through a cGK-dependent activation of Akt signaling in human
267 adipocytes.

268

269 **Natriuretic peptides enhance glucose metabolism in human adipocytes**

270 We finally investigated the fate of the glucose taken up by the adipocytes in response to NP.
271 BNP treatment induced both glucose oxidation (+19%, $p < 0.05$) (Figure 6A), and glucose
272 incorporation into glycerol (+33%, $p < 0.05$) (Figure 6B) or fatty acids (+78%, $p < 0.05$) (Figure
273 6C). Average baseline values for glucose oxidation were 23.9 ± 0.9 nmol/3h/mg and 53.3 ± 0.2
274 nmol/3h/mg for glucose incorporation into glycerol pools. No significant change in mRNA
275 levels of prototypical *de novo* lipogenic genes such as *ChREBP*, *ACC1*, *FASN*, and *ELOVL6*
276 was observed in response to 6h treatment with ANP or BNP (Supplemental Figure 4).

277 **Discussion**

278 Despite the robust inverse link between plasma NP levels, obesity and the incidence
279 of T2D, no study has so far provided data showing a direct mechanistic link between NP
280 signaling and glucose homeostasis in any target tissue. Herein, we provide compelling
281 evidence that NP receptor expression, at least at the mRNA level, in adipose tissue is tightly
282 related to blood glucose control and insulin sensitivity in different European populations. We
283 further demonstrate a novel biological role of NP in human adipocytes where they directly
284 promote glucose uptake and *de novo* lipogenesis in fat cells through a cGK-dependent
285 pathway (Figure 7). Overall, our data suggest that NP signaling in human adipocytes is an
286 important determinant of insulin sensitivity that is altered in obesity and T2D.

287 Previous studies have established that adipose tissue is a key target organ of NP [9,
288 11, 12]. In this study, we took advantage of a large adipose tissue collection from cohort 1 to
289 investigate NPR gene expression in the context of obesity and T2D. Due to the large sample
290 size, we observed a very strong negative correlation between adipose *NPRA* gene
291 expression and insulin resistance, suggesting that low adipose *NPRA* expression relates to
292 low insulin sensitivity. Recent studies indicate that adipose glucose transporter-4 (*GLUT4*)
293 and carbohydrate-responsive element binding protein (*ChREBP*) are major determinants of
294 adipocyte and whole-body insulin sensitivity [31, 32]. In the current study, we found very
295 robust relationships between adipose *NPRA*, HOMA-IR, *GLUT4* and *ChREBP* mRNA levels
296 in two independent cohorts. These relationships remained significant even after statistical
297 adjustment for BMI in cohort 2, indicating that adipose *NPRA* behaves as a determinant of
298 whole-body insulin sensitivity independently of body weight. In addition, we observed major
299 changes in the pattern of expression of NPRs in adipose tissue with the grade of obesity and
300 the diabetic status. *NPRA* mRNA levels decreased while *NPRC* mRNA levels increased
301 gradually as a function of BMI. *NPRA* mRNA levels were also down-regulated in prediabetic
302 and type 2 diabetic subjects. This is in agreement with other studies in high-fat diet-fed and
303 db/db mice [36, 37].

304 In light of the tight relationship observed between adipose NPRA and GLUT4, we
305 next studied the effect of NP on glucose uptake in human adipocytes. We could first show
306 that ANP dose-dependently activated glucose uptake in human isolated adipocytes. Although
307 both the cGMP and the cAMP pathways promote lipolysis and browning of white adipocytes
308 [5], they display contrasting effects with respect to glucose uptake which is inhibited by
309 activating the cAMP-signaling pathway [38, 39]. Thus catecholamines inhibit glucose uptake
310 by inducing lipolysis and facilitating the dissociation of the mTORC1/2 complex [39]. In the
311 current study, we provide evidence that NP-mediated glucose uptake is independent of
312 insulin and requires downstream cGMP-signaling since pharmacological inhibition of cGK
313 blunts NP-mediated glucose uptake. Although, cGMP has been shown to mediate glucose
314 uptake in skeletal muscle [40], this is the first study reporting that activation of cGMP-
315 signaling by NP promotes glucose uptake in human adipocytes in a cGK-dependent manner.
316 Interestingly, NP exhibited an additive effect on insulin-stimulated glucose uptake at low
317 concentrations. This likely suggests that both pathways converge toward a common
318 molecular target.

319 Insulin promotes glucose uptake in skeletal muscle cells and adipocytes through
320 activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway leading to GLUT4 translocation
321 to the plasma membrane [34, 35]. We here demonstrate that BNP treatment in hMADS
322 adipocytes induces Akt Ser473 phosphorylation in a time-dependent fashion. Again this
323 effect appears to be mediated by cGMP since pharmacological blockade of cGK completely
324 abrogated BNP-mediated Akt phosphorylation. We could confirm that BNP-mediated cGMP
325 signaling induced p38 MAPK phosphorylation in hMADS adipocytes as previously described
326 [12]. Interestingly, BNP-mediated Akt activation was accompanied by an elevated
327 phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein AS160 (also termed TBC1D4), which
328 coordinates GLUT4 translocation to the plasma membrane in adipocytes and myocytes [41,
329 42]. Of interest, BNP did not change the phosphorylation state of IRS1 on the activating
330 Tyr612 residue, thus confirming an independent effect of BNP and insulin on glucose uptake.

331 Considering the tight relationship observed between adipose *NPRA* and *ChREBP*
332 mRNA levels, we examined the fate of the glucose taken up by adipocytes in response to
333 NP. We could demonstrate that a small fraction of glucose taken up by the adipocyte was
334 directed toward glucose oxidation (30%) while the majority was directed toward incorporation
335 into glycerol backbone for triglyceride synthesis (70%). Of interest, the fraction of glucose
336 oxidized in response to NP treatment served for *de novo* production of fatty acids, i.e. *de*
337 *novo* lipogenesis. Thus activation of NP signaling in adipocytes enhances *de novo*
338 lipogenesis. No significant changes in prototypical genes of *de novo* lipogenesis were
339 observed after NP treatment indicating that NP-mediated *de novo* lipogenesis likely results
340 from NP-mediated glucose uptake independently of the transcriptional activity of the glucose-
341 regulated transcription factor ChREBP.

342 In light of the potent lipolytic effect of NP previously observed in human adipocytes
343 [8], it may seem paradoxical that NP can also trigger glucose uptake. Although speculative,
344 this could reflect some sort of futile cycle by which NP enhances first glucose uptake and *de*
345 *novo* lipogenesis, and then promotes triglyceride breakdown through lipolysis. This could be
346 also viewed as a mechanism to prime the krebs cycle and induce ATP production to sustain
347 higher rates of lipolysis. The effect of NP on glucose uptake is also consistent with their
348 browning effect in white adipocytes as glucose is an important substrate for brown
349 adipocytes [12], and this futile cycle glucose uptake/lipolysis could provide an additional
350 energy dissipating process in beige/brown adipocytes. Such a dual effect on glucose uptake
351 and lipolysis has been observed in rat adipocytes treated with β -sitosterol [43].

352 In summary, our data suggest an important role of NPs in regulating adipocyte
353 glucose metabolism and insulin sensitivity in humans. This occurs through NPRA in a cGMP-
354 dependent manner and independently of the insulin pathway. Our clinical data also argue
355 that adipose NPRA expression is tightly associated with whole-body insulin sensitivity. Future
356 studies should investigate if increasing NPRA activation specifically in adipose tissue
357 improves systemic insulin sensitivity before considering NPRA activation as a potential target
358 to improve blood glucose control and insulin sensitivity.

359

360 **Acknowledgements**

361 The authors are very grateful to the study participants and to Pr. Max Lafontan (I2MC,
362 Toulouse) for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

363

364 **Funding**

365 This study was supported by grants from the National Research Agency ANR-12-JSV1-
366 0010-01 (CM), ANR Obelip (DL), Société Francophone du Diabète (CM) and Swedish
367 Research Council (PA and MR). DL is a member of Institut Universitaire de France.

368

369 **Duality of interest**

370 The authors have no conflict of interest to disclose.

371

372 **Contribution statement**

373 MC, VB, PM, KL, CL, CC, NV, PA, DL, MR, and CM, researched data, edited the manuscript,
374 MC and CM wrote the manuscript. CM is the guarantor of this work and, as such, had full
375 access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the
376 accuracy of the data analysis.

377 **References**

- 378 1. Gardner DG, Chen S, Glenn DJ and Grigsby CL (2007) Molecular biology of the
379 natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension*
380 49:419-26
- 381 2. Garg R and Pandey KN (2005) Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide
382 receptor-A gene expression. *Peptides* 26:1009-23
- 383 3. Kuhn M (2005) Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically
384 modified mice. *Peptides* 26:1078-85
- 385 4. Potter LR (2011) Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J*
386 278:1808-17
- 387 5. Collins S and Bordicchia M (2013) Heart hormones fueling a fire in fat. *Adipocyte*
388 2:104-8
- 389 6. Coue M and Moro C (2015) Natriuretic peptide control of energy balance and glucose
390 homeostasis. *Biochimie*
- 391 7. Moro C and Lafontan M (2013) Natriuretic peptides and cGMP signaling control of
392 energy homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H358-68
- 393 8. Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M and Galitzky J (2000) Natriuretic
394 peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 14:1345-51
- 395 9. Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H et al (2003) Involvement of a cGMP-dependent
396 pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in
397 human adipocytes. *J Biol Chem* 278:48617-26
- 398 10. Birkenfeld AL, Boschmann M, Engeli S et al (2012) Atrial natriuretic peptide and
399 adiponectin interactions in man. *PLoS One* 7:e43238
- 400 11. Moro C, Klimcakova E, Lolmede K et al (2007) Atrial natriuretic peptide inhibits the
401 production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in
402 human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 50:1038-47

- 403 12. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ et al (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38
404 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin*
405 *Invest* 122:1022-36
- 406 13. Wang TJ, Larson MG, Levy D et al (2004) Impact of obesity on plasma natriuretic
407 peptide levels. *Circulation* 109:594-600
- 408 14. Mehra MR, Uber PA, Park MH et al (2004) Obesity and suppressed B-type natriuretic
409 peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 43:1590-5
- 410 15. Taylor JA, Christenson RH, Rao K, Jorge M and Gottlieb SS (2006) B-type natriuretic
411 peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher
412 left ventricular end diastolic pressures. *Am Heart J* 152:1071-6
- 413 16. Khan AM, Cheng S, Magnusson M et al (2011) Cardiac natriuretic peptides, obesity,
414 and insulin resistance: evidence from two community-based studies. *J Clin Endocrinol Metab*
415 96:3242-9
- 416 17. Lazo M, Young JH, Brancati FL et al (2013) NH2-terminal pro-brain natriuretic peptide
417 and risk of diabetes. *Diabetes* 62:3189-93
- 418 18. Magnusson M, Jujic A, Hedblad B et al (2012) Low plasma level of atrial natriuretic
419 peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study. *J*
420 *Clin Endocrinol Metab* 97:638-45
- 421 19. Walford GA, Ma Y, Christophi CA et al (2014) Circulating natriuretic peptide
422 concentrations reflect changes in insulin sensitivity over time in the Diabetes Prevention
423 Program. *Diabetologia* 57:935-9
- 424 20. Moro C, Jordan J and Birkenfeld AL (2013) Comment on: Lazo et al. NH2-terminal
425 pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes. *Diabetes* 2013;62:3189-3193. *Diabetes*
426 62:e28
- 427 21. Moro C (2013) Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab*
428 *Care* 16:645-9
- 429 22. Larsen TM, Dalskov SM, van Baak M et al (2010) Diets with high or low protein
430 content and glycemic index for weight-loss maintenance. *N Engl J Med* 363:2102-13

- 431 23. Larsen TM, Dalskov S, van Baak M et al (2010) The Diet, Obesity and Genes
432 (Diogenes) Dietary Study in eight European countries - a comprehensive design for long-
433 term intervention. *Obes Rev* 11:76-91
- 434 24. Arner E, Mejhert N, Kulyte A et al (2012) Adipose tissue microRNAs as regulators of
435 CCL2 production in human obesity. *Diabetes* 61:1986-93
- 436 25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS et al (1985) Homeostasis model assessment:
437 insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin
438 concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-9
- 439 26. Kolaczynski JW, Morales LM, Moore JH, Jr. et al (1994) A new technique for biopsy
440 of human abdominal fat under local anaesthesia with Lidocaine. *Int J Obes Relat Metab*
441 *Disord* 18:161-6
- 442 27. Gomez-Zorita S, Treguer K, Mercader J and Carpene C (2013) Resveratrol directly
443 affects in vitro lipolysis and glucose transport in human fat cells. *J Physiol Biochem* 69:585-
444 93
- 445 28. Wanecq E, Prevot D and Carpene C (2009) Lack of direct insulin-like action of
446 visfatin/Nampt/PBEF1 in human adipocytes. *J Physiol Biochem* 65:351-9
- 447 29. Grousse A, Tavernier G, Valle C et al (2013) Partial inhibition of adipose tissue
448 lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass.
449 *PLoS Biol* 11:e1001485
- 450 30. Badin PM, Loubiere C, Coonen M et al (2012) Regulation of skeletal muscle lipolysis
451 and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58. *J Lipid Res* 53:839-48
- 452 31. Eissing L, Scherer T, Todter K et al (2013) De novo lipogenesis in human fat and liver
453 is linked to ChREBP-beta and metabolic health. *Nat Commun* 4:1528
- 454 32. Herman MA, Peroni OD, Villoria J et al (2012) A novel ChREBP isoform in adipose
455 tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484:333-8
- 456 33. Bezaire V, Mairal A, Ribet C et al (2009) Contribution of adipose triglyceride lipase
457 and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284:18282-91

- 458 34. Klip A, Sun Y, Chiu TT and Foley KP (2014) Signal transduction meets vesicle traffic:
459 the software and hardware of GLUT4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* 306:C879-86
- 460 35. Graham TE and Kahn BB (2007) Tissue-specific alterations of glucose transport and
461 molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm*
462 *Metab Res* 39:717-21
- 463 36. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H et al (2009) Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-
464 dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent
465 obesity. *Diabetes* 58:2880-92
- 466 37. Plante E, Menaouar A, Danalache BA et al (2014) Treatment with brain natriuretic
467 peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice.
468 *Diabetologia* 57:1257-67
- 469 38. Eriksson JW, Wesslau C and Smith U (1994) The cGMP-inhibitable
470 phosphodiesterase modulates glucose transport activation by insulin. *Biochim Biophys Acta*
471 1189:163-7
- 472 39. Mullins GR, Wang L, Raje V et al (2014) Catecholamine-induced lipolysis causes
473 mTOR complex dissociation and inhibits glucose uptake in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U*
474 *S A* 111:17450-5
- 475 40. Deshmukh AS, Long YC, de Castro Barbosa T et al (2010) Nitric oxide increases
476 cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose
477 transport in human skeletal muscle. *Diabetologia* 53:1142-50
- 478 41. Tan SX, Ng Y, Burchfield JG et al (2012) The Rab GTPase-activating protein
479 TBC1D4/AS160 contains an atypical phosphotyrosine-binding domain that interacts with
480 plasma membrane phospholipids to facilitate GLUT4 trafficking in adipocytes. *Mol Cell Biol*
481 32:4946-59
- 482 42. Lansey MN, Walker NN, Hargett SR, Stevens JR and Keller SR (2012) Deletion of
483 Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal
484 muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*
485 303:E1273-86

486 43. Chai JW, Lim SL, Kanthimathi MS and Kuppusamy UR (2011) Gene regulation in
487 beta-sitosterol-mediated stimulation of adipogenesis, glucose uptake, and lipid mobilization
488 in rat primary adipocytes. *Genes Nutr* 6:181-8

For Peer Review

489 **Table 1.** Correlations between adipose *NPRA* gene expression and HOMA-IR, and adipose
 490 *GLUT4* and *ChREBP* gene expression after adjustment for BMI.

491

Parameter	<i>NPRA</i>		BMI	
	Partial r	p value	Partial r	p value
HOMA-IR	-0.38	0.007	0.39	0.006
<i>GLUT4</i>	0.57	<0.0001	-0.18	0.19
<i>ChREBP</i>	0.57	0.0002	-0.13	0.37

492

For Peer Review

493 **Figures Legend**

494

495 **Figure 1. Natriuretic peptide receptor expression in human adipose tissue in obesity**
496 **and type 2 diabetes**

497 Human adipose tissue gene expression of *NPRA* (A), *NPRC* (B), and the ratio of *NPRA*-to-
498 *NPRC* (C) as a function of the obesity class. Human adipose *NPRA* expression in subjects
499 with prediabetes and type 2 diabetes (D), in relation to quartiles of HOMA-IR (E), and in
500 relation to blood fasting glucose (F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ (n=33-144 per group
501 from cohort 1).

502

503 **Figure 2. Natriuretic peptide receptor expression in human adipose tissue relates to**
504 **insulin resistance and glucose metabolism**

505 Relationships between human adipose tissue *NPRA* gene expression and HOMA-IR (A),
506 adipose *GLUT4* gene expression (B), adipose *ChREBP* gene expression (C). (n=56 from
507 cohort 2).

508

509 **Figure 3. Atrial natriuretic peptide promotes glucose uptake in human isolated**
510 **adipocytes**

511 Dose-response effect of ANP (A), and additive effect of ANP 100 nM with insulin (B), on 2-
512 deoxyglucose uptake in human isolated adipocytes (n=13-32).

513

514 **Figure 4. Natriuretic peptide induce glucose uptake in a cGMP-dependent manner in**
515 **hMADS adipocytes**

516 Effect of ANP 1 μ M (A) and dose-response effect of BNP (B) on 2-deoxyglucose uptake in
517 differentiated hMADS adipocytes (n=4). BNP (100 nM) mediated glucose uptake in absence
518 or presence of (Rp)-8-pCPT-cGMPS 100 μ M (PKG inhibitor) in differentiated hMADS
519 adipocytes (n=8-16) (C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ vs. control.

520

521 **Figure 5. Natriuretic peptide activates Akt-signaling in a cGMP-dependent manner in**
522 **hMADS adipocytes**

523 Representative blots (A) and quantitative bar graphs of Akt Ser473 phosphorylation relative
524 to total Akt (B), AS160 Thr642 phosphorylation relative to total AS160 (C), and p38 MAPK
525 Thr180/Tyr182 phosphorylation relative to total p38 MAPK (D) in response to 20 min and 60
526 min with BNP 100 nM in absence or presence of (Rp)-8-pCPT-cGMPS 100 μ M (PKG
527 inhibitor, PKGi). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs. control (n=6).

528

529 **Figure 6. Natriuretic peptide enhance glucose metabolism in hMADS adipocytes**

530 Effect of acute treatment with or without 100 nM of BNP on glucose oxidation (A), glucose
531 incorporation into glycerol (B), and glucose incorporation into fatty acids (C). * $p < 0.05$ vs.
532 control (n=4-7).

533

534 **Figure 7. Model of natriuretic peptide-mediated glucose uptake in human adipocytes**

535 Natriuretic peptides (NP) bind to a transmembrane receptor bearing a guanylyl cyclase
536 activity called NPRA. Binding of NP to NPRA induces the production of cGMP and activation
537 of cGK-I which phosphorylates Akt and enhances its downstream signaling up to GLUT4
538 translocation through AS160. NP therefore promote glucose uptake, and enhance glucose
539 incorporation into glycerol and fatty acid (FA) pools through *de novo* lipogenesis. This effect
540 is independent and additive to those of insulin.

Figure 1

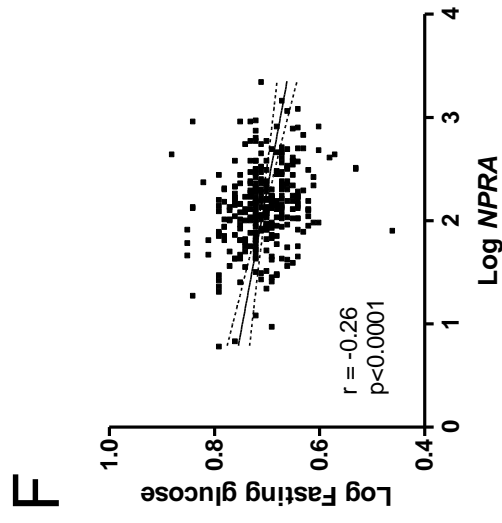
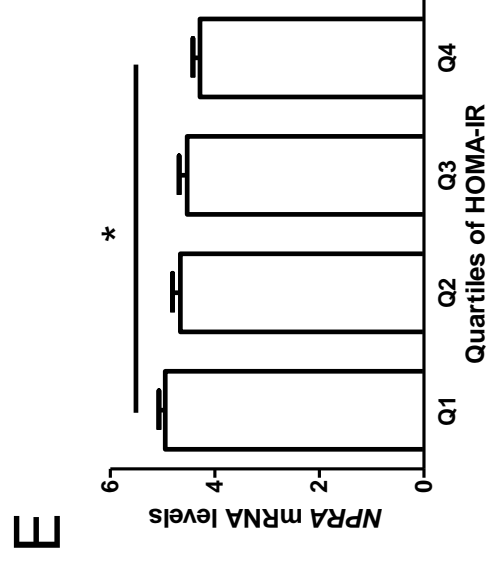
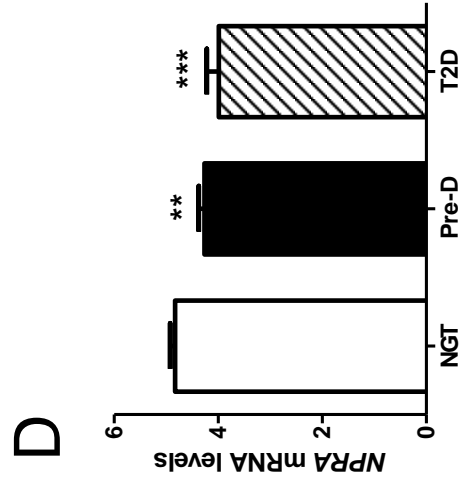
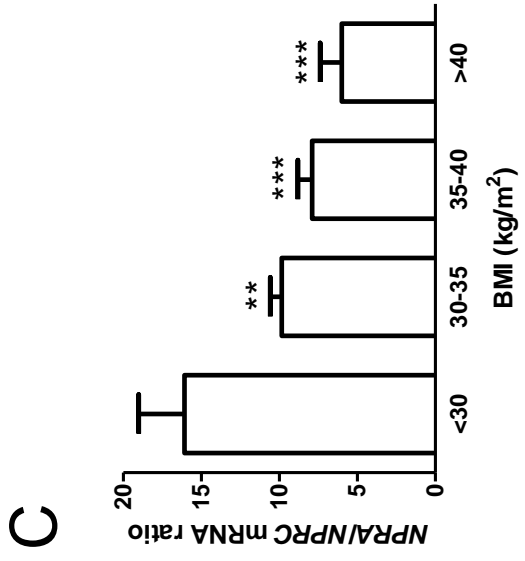
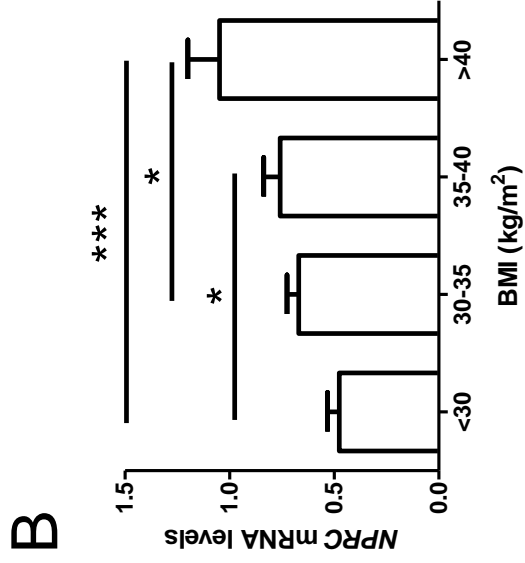
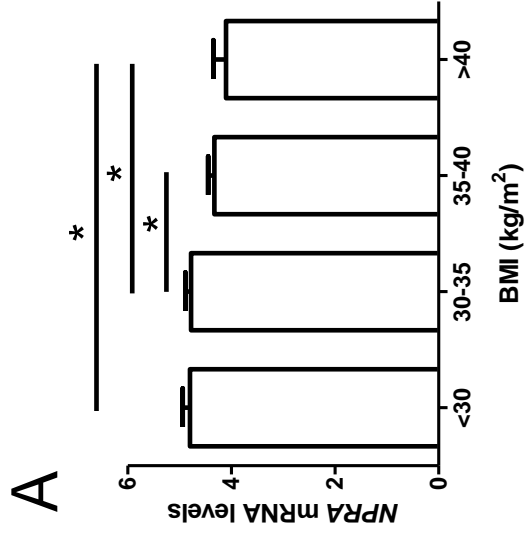
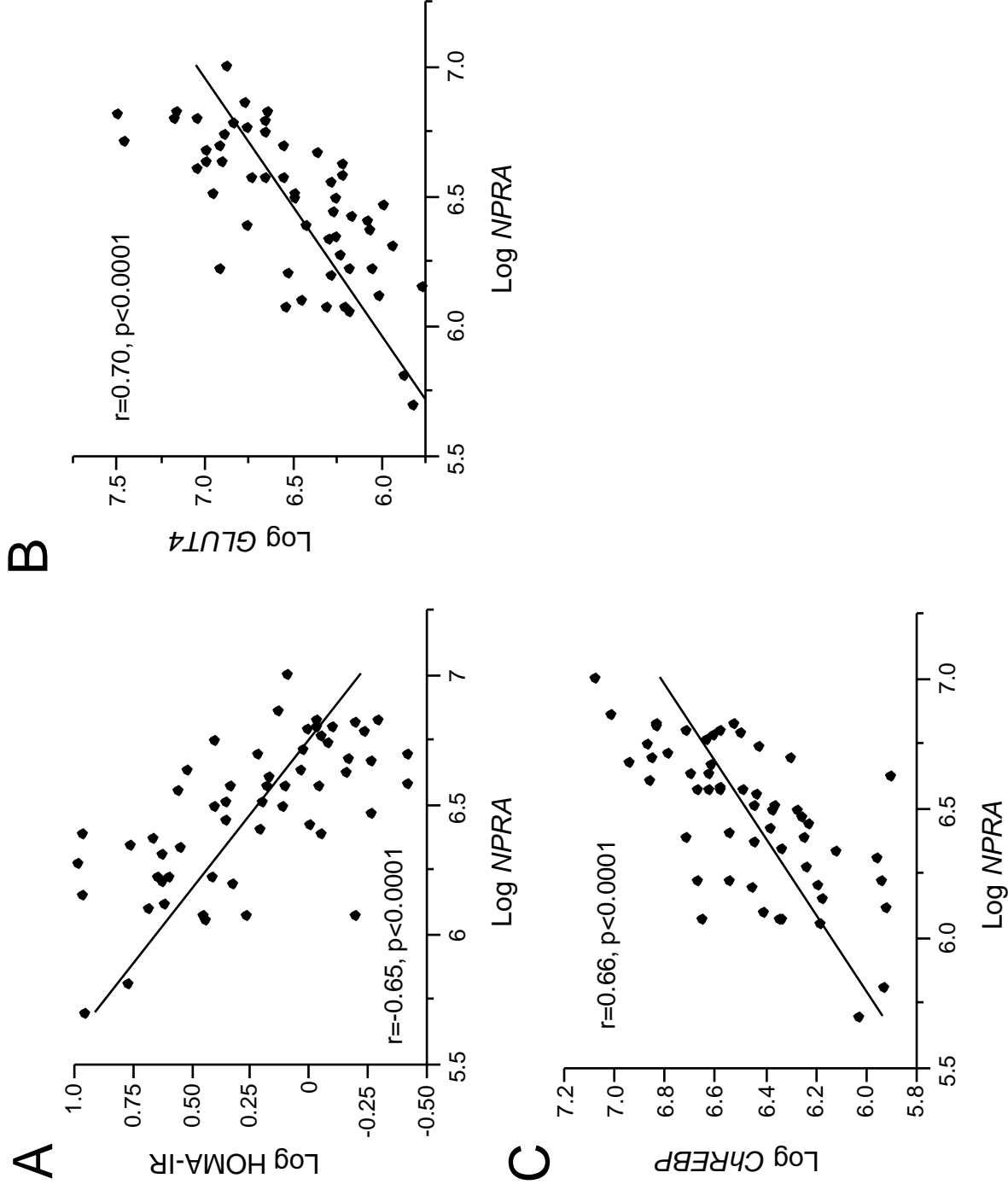


Figure 2



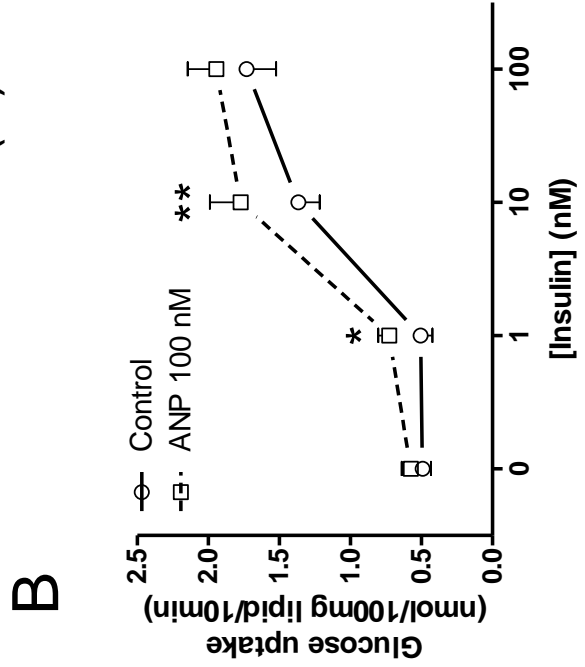
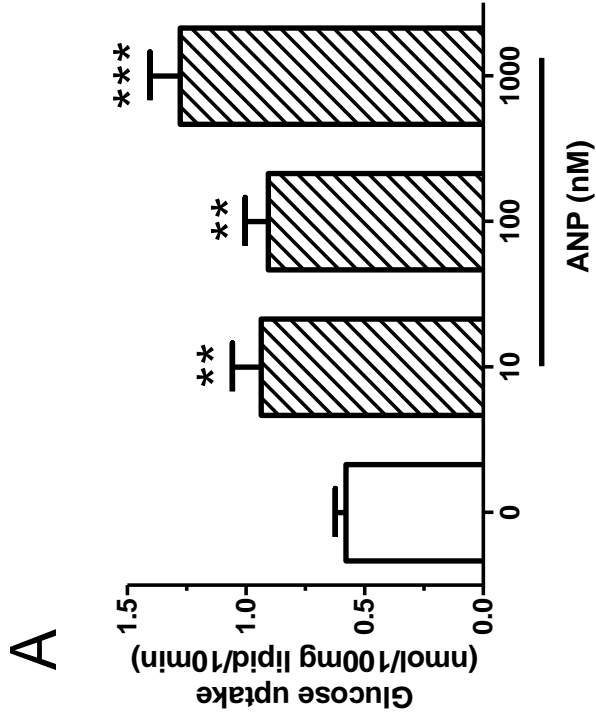


Figure 4

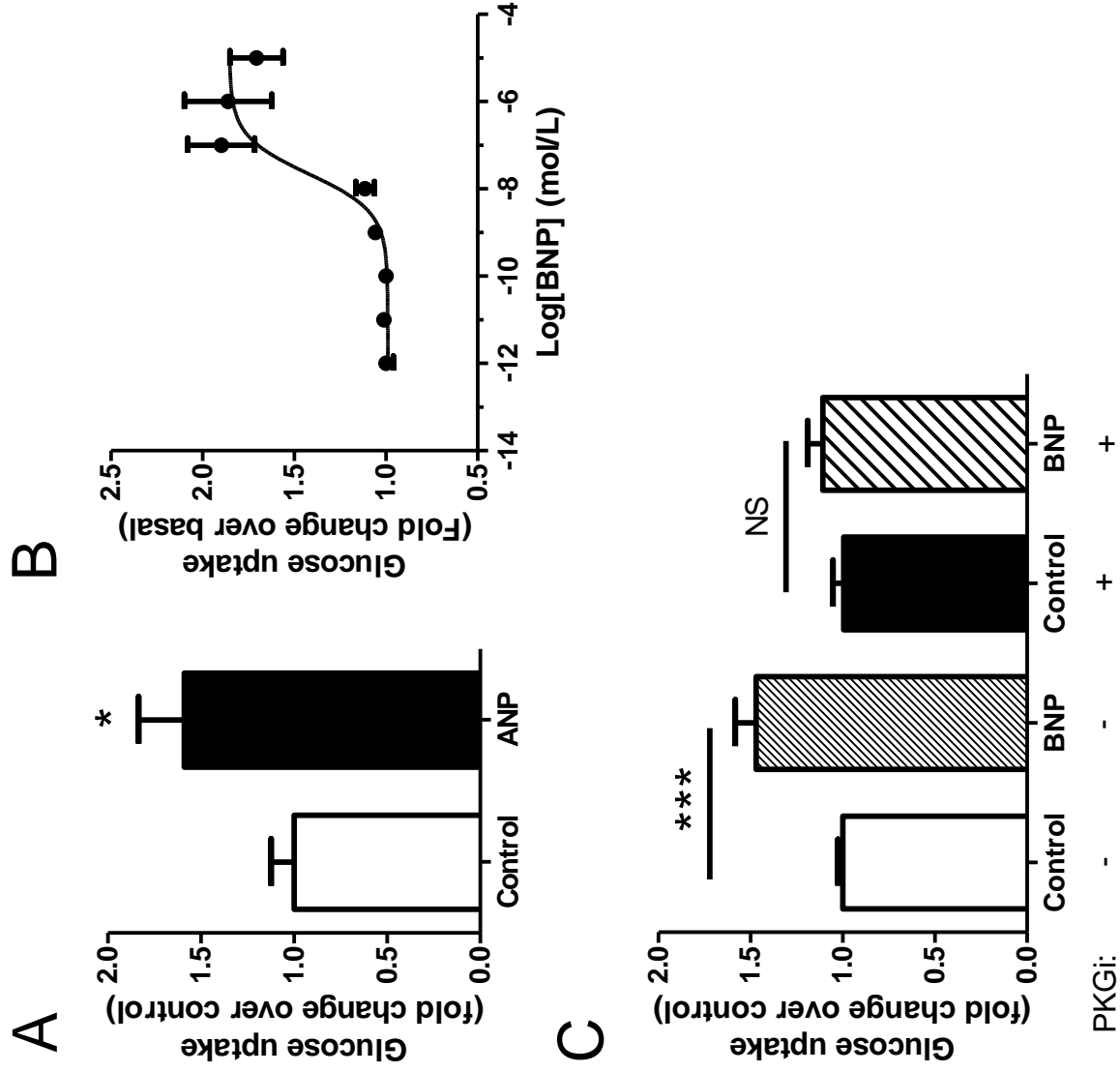


Figure 5

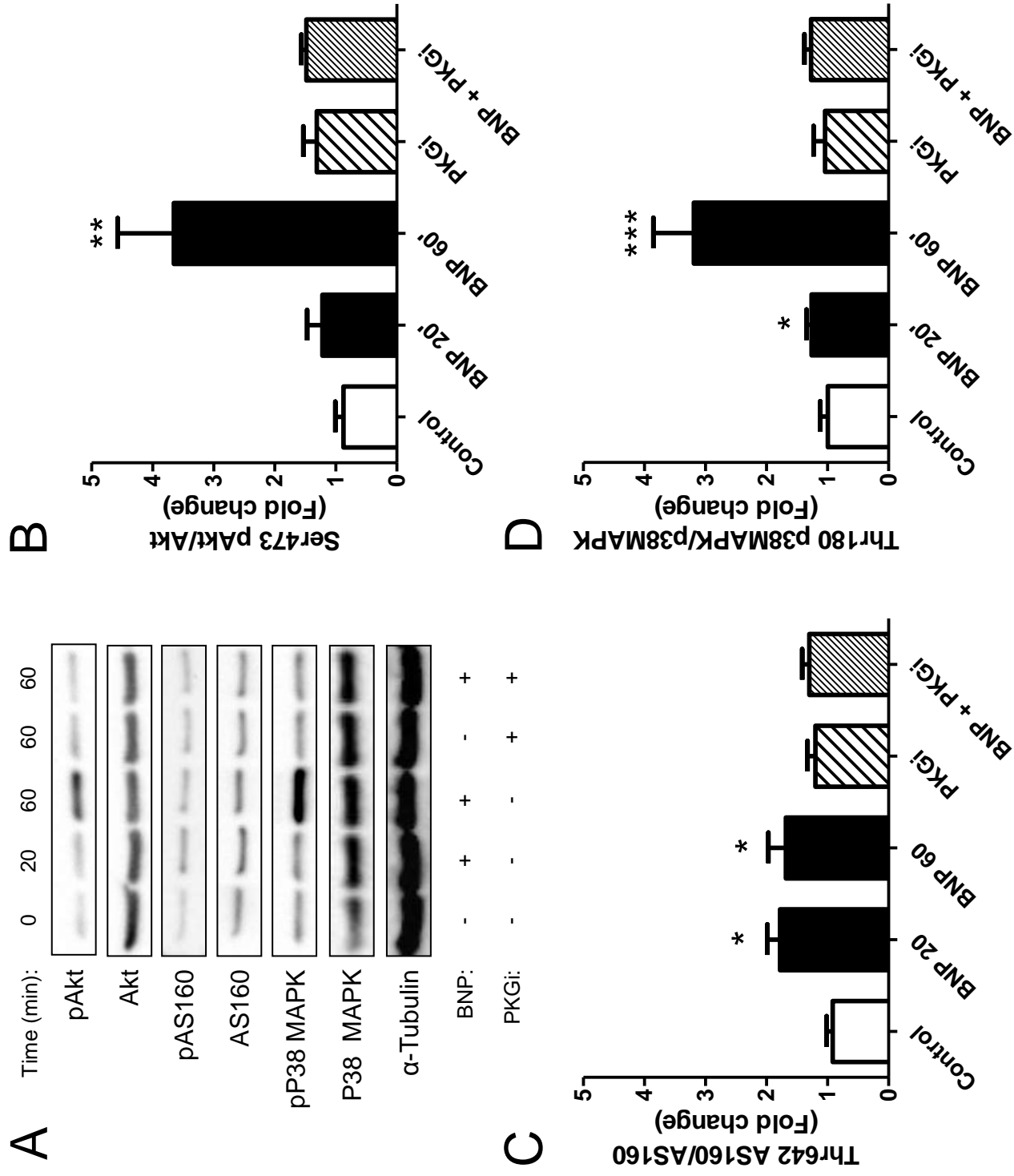


Figure 6

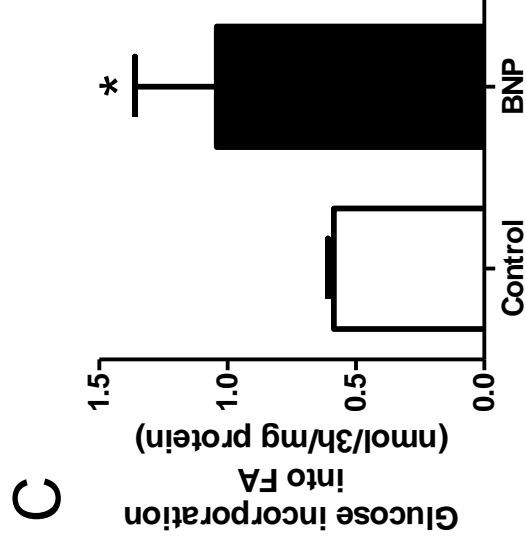
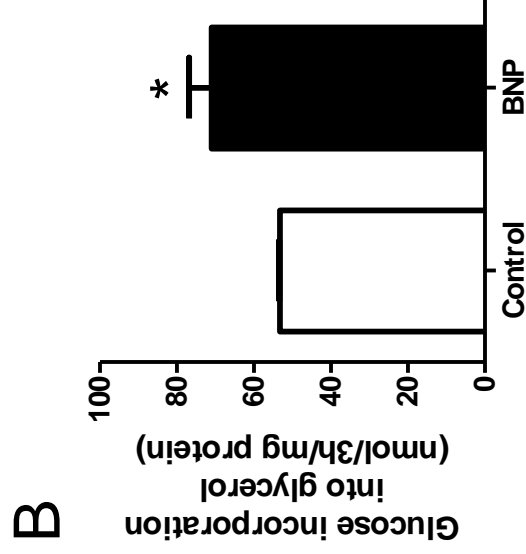
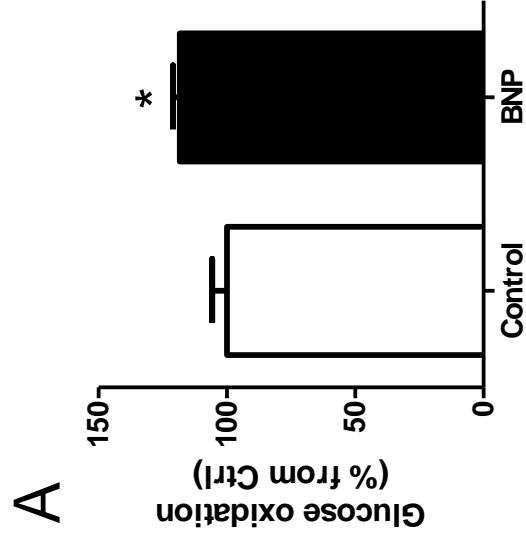
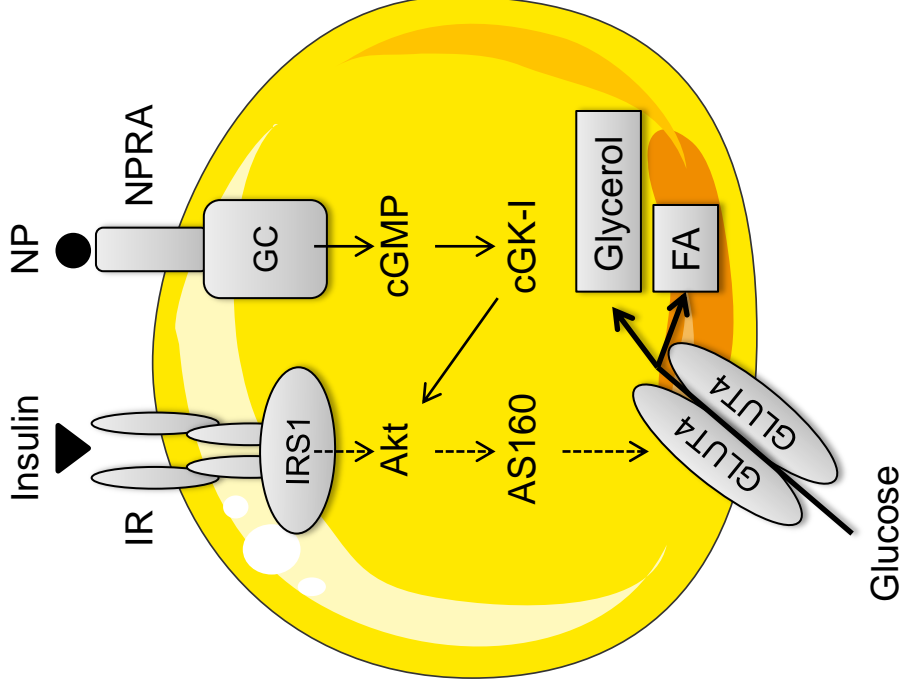


Figure 7



Electronic Supplementary Material for:

Natriuretic peptides promote glucose uptake in human adipocytes: relationship with insulin sensitivity

Marine Coué, Valentin Barquissau, Pauline Morigny, Katie Louche, Corinne Lefort, Christian Carpéné, Nathalie Viguerie, Peter Arner, Dominique Langin, Mikael Rydén, and Cedric Moro

Inventory of ESM:

- **Supplementary Figure Methods**
- **Supplementary Figure Legend**
- **Supplementary Figures: 4**
- **Supplementary References**

Supplementary Figure Methods

Preparation of human isolated adipocytes

Samples of subcutaneous abdominal adipose tissue were obtained from overweight women (mean age 38 years; mean body mass index 25.1 kg/m²) undergoing reconstructive surgery at Rangueil hospital, Toulouse (France) under the agreement of INSERM guidelines and ethics committee. After removal, pieces of adipose tissue were placed in cooled, sterile plastic box and immediately transported on foot to the laboratory. Then, adipose tissue was minced with scissors and digested by liberase (final concentration 15 µg/ml). Isolated adipocytes were obtained within 3h from the start of surgery. After filtration and washing as previously described [1], fat cell suspensions were diluted in the same medium as for digestion, but without liberase, i.e. Krebs – Ringer containing 15 mM sodium bicarbonate, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid and 3.5 % bovine serum albumin, pH was set at 7.4 after gassing with 95% CO₂/5% O₂. The cell amount per incubation vial was equivalent to 25.8± 2.5 mg lipid/400 µl for lipolysis measurements (with final glucose at 6 mM and without pyruvate, n=14) and 27.6±3.0 mg lipid/400 µl for glucose uptake assays (without glucose and with 2 mM pyruvate, n=13), as determined by slight modifications of the method of Atgié et al. [2].

Gene microarrays

From adipose tissue biopsy total RNA in Cohort 2, biotinylated complementary RNA was analysed using the GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Slides were washed, stained, scanned and analysed using standardised protocols (Affymetrix Inc.) as described previously [3]. Data are deposited at the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO; <http://ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under the accession number GSE25402.

Microfluidic card

Total RNA was extracted from adipose tissue biopsies and RT-qPCR was performed using the FluidigmBioMark System as described in [4]. Briefly, cDNA was prepared from 500 ng of total RNA and diluted in water to 5 ng/μl (RNA equivalent). The reverse transcription step was checked using the 18S RNA expression level using StepOnePlus (Applied Biosystems). A multiplexed preamplification process was performed on every 1.25 μl cDNA using 14 cycle cDNA preamplification step (95°C for 15 sec and 60°C 4 min) and Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) in a standard PCR thermocycler. Preamplified cDNA was diluted 1:5 in 10 mM Tris, 1 mM EDTA (TE). Diluted cDNA (2.25 μl) was added to 2.5 μl Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0.25 μl GE Sample Loading Reagent (Fluidigm). In a separate tube, 3.5 μl of Taqman Assay was added to 3.5 μl Sample Loading Reagent. Five μl cDNA samples were loaded into the sample inlet wells, and 5 μl assay samples were loaded into assay detector inlets. For each plate, 1 well was loaded with H₂O as control for contamination. The chip was primed and placed into the NanoFlex Integrated fluidic circuit controller where 8 nl of cDNA and 1 nl of Assay were mixed. Real time PCR was run on the BioMark System (Fluidigm). Raw data obtained from the system's software using the default global threshold setting (BioMark Real-time PCR Analysis V2.1.1, Fluidigm) were checked using the graphical representation of the plate layout. PUM1, was found as the most stable gene using the geNorm algorithm [5], then raw Ct values were transformed to relative gene expression using the $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ method using PUM1 mRNA level as reference.

Real-time qRT-PCR

Total RNA from cultured hMADS cells was isolated in RNeasy Lysis Buffer +/- mercaptoethanol reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The quantity of the RNA was determined on a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Reverse transcriptase PCR was performed on a GeneAmp PCR System 9700 using the Multiscribe Reverse Transcriptase method (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed to determine cDNA content. All primers were bought from Applied Biosystems. Primers used were : 18S (Taqman assay ID: Hs99999901_s1), ACC1

(Hs00167385_m1), FAS (Hs00188012_m1), ChREBP (Hs00975714_m1). ELOVL6, SYBR green primers, forward: CCATCCAATGGATGCAGGAAAAC; reverse: CCAGAGCACTAATGGCTTCCTC were purchased at Eurogentec. qPCR was then performed on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). For each primer, a standard curve was made prior to mRNA quantification to assess the optimal total cDNA quantity. All expression data were normalized by the $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ method using 18S as internal control [4, 6].

For Peer Review

Supplementary Figures Legend

Supplementary Figure 1. Correlation between human adipose tissue mRNA levels of *NPRA* and *ChREBP* (A), and *NPRA* and *GLUT4* (B) (n=323).

Supplementary Figure 2. mRNA levels of *NPRA*, *NPRC* and *PRKG1* (cGMP-dependent protein kinase 1) during the time-course of differentiation of hMADS adipocytes from day 0 to day 13. Data are expressed as % of day 0 (n=3).

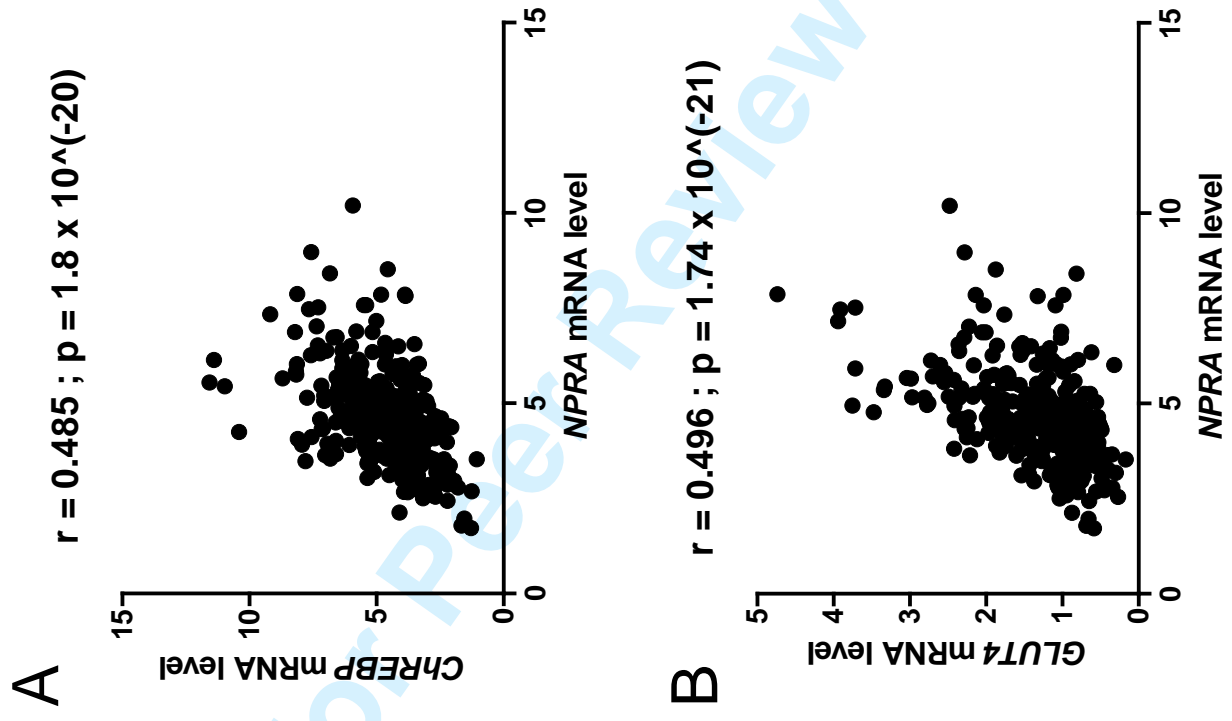
Supplementary Figure 3. Representative blot and quantitative bar graph of IRS1 Tyr612 phosphorylation and total transferred protein on the membrane (stain free) in response to 20 min and 60 min with BNP 100 nM (n=4).

Supplementary Figure 4. Effect of 6h treatment with ANP and BNP 100 nM on mRNA levels of *de novo* lipogenic genes such as *ACC1*, *ELOVL6*, *FASN* and *ChREBP* in differentiated hMADS adipocytes (n=6).

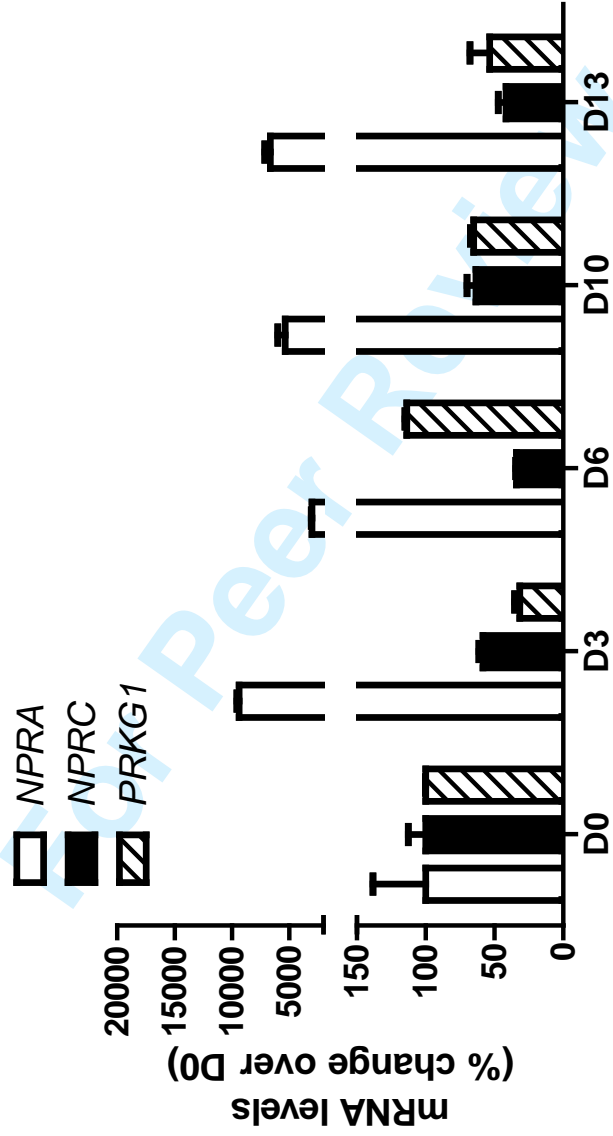
Supplementary References

1. Mercader J, Iffiu-Soltesz Z, Brenachot X et al (2010) SSAO substrates exhibiting insulin-like effects in adipocytes as a promising treatment option for metabolic disorders. *Future Med Chem* 2:1735-49
2. Atgie C, Sauvant P, Ambid L and Carpene C (2009) Possible mechanisms of weight loss of Siberian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*) exposed to short photoperiod. *J Physiol Biochem* 65:377-86
3. Arner E, Mejhert N, Kulyte A et al (2012) Adipose tissue microRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity. *Diabetes* 61:1986-93
4. Viguerie N, Montastier E, Maoret JJ et al (2012) Determinants of human adipose tissue gene expression: impact of diet, sex, metabolic status, and cis genetic regulation. *PLoS Genet* 8:e1002959
5. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
6. Badin PM, Loubiere C, Coonen M et al (2012) Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58. *J Lipid Res* 53:839-48

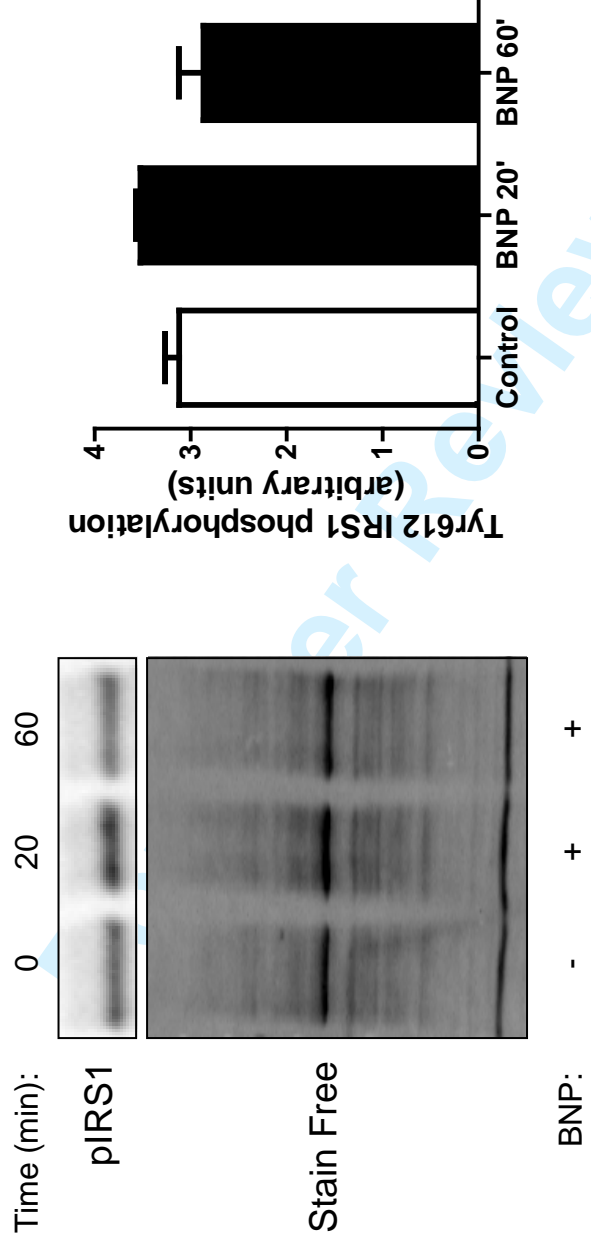
Supp. Figure 1



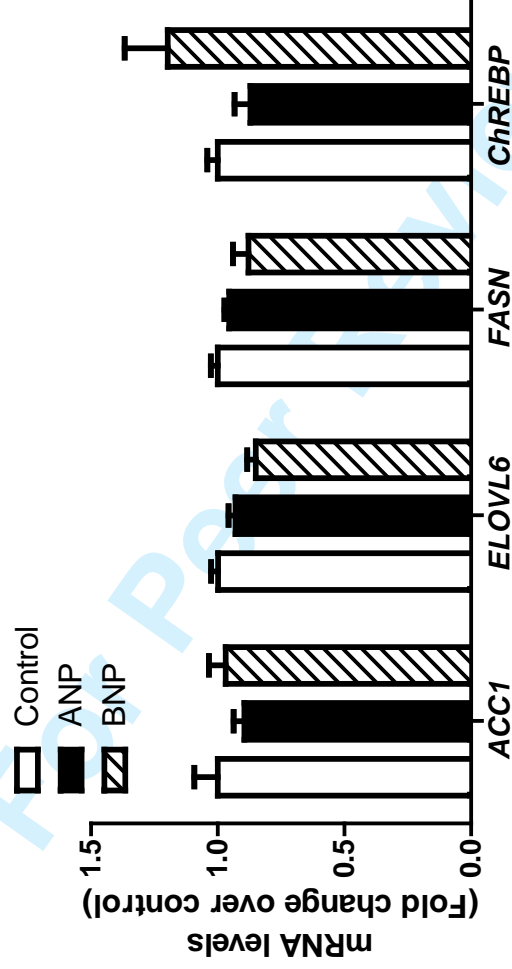
Supp. Figure 2



Supp. Figure 3



Supp. Figure 4



DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE

Les PN ont fait leur apparition dans le contrôle du métabolisme énergétique en 2000, où le laboratoire de Max Lafontan leur a découvert un puissant rôle lipolytique au niveau du tissu adipeux humain (Sengenès, Berlan et al. 2000). En parallèle de cela, plusieurs observations ont démontré une corrélation inverse entre les niveaux plasmatiques des PN et l'IMC (Wang, Larson et al. 2004, Neeland, Winders et al. 2013) ou encore avec l'insulinorésistance (Khan, Cheng et al. 2011, Magnusson, Jujic et al. 2012). *Ce premier travail a donc consisté à étudier le lien existant entre la signalisation aux PN dans le TA humain et l'obésité/DT2 ainsi que la régulation du métabolisme du glucose dans ce tissu par les PN.*

Nous avons premièrement mis en évidence une corrélation négative entre l'expression génique du *NPRA* au niveau du TA humain et l'IMC dans 2 cohortes indépendantes, dont une grande cohorte issue de l'étude DIOGenes. L'expression du *NPRC*, quant à lui, corrèle positivement avec l'IMC, ce qui va dans le sens d'une régulation réciproque du *NPRA* et du *NPRC*, au moins en ce qui concerne les organes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique (Miyashita, Itoh et al. 2009). Le fait que l'expression du *NPRA* et du *NPRC* diminue et augmente respectivement avec l'IMC pourrait très significativement réduire l'accès des PN au TA durant l'obésité vu que l'affinité de liaison de l'ANP pour ces deux récepteurs est similaire (**Tableau 3**). De plus, l'expression adipocytaire du *NPRA* est également inversement corrélée avec le degré d'insulinorésistance (stade prédiabète ou DT2 déclaré) et la glycémie à jeun, ce qui est en accord avec de précédentes observations faites chez la souris (Miyashita, Itoh et al. 2009). Des études récentes indiquent que l'expression dans le TA de *GLUT4*, un transporteur de glucose insulinodépendant, et de *ChREBP*, un régulateur transcriptionnel des gènes de la lipogenèse et de la glycolyse, sont des déterminants majeurs de la sensibilité à l'insuline au niveau de l'organisme entier (Herman, Peroni et al. 2012, Eissing, Scherer et al. 2013). Dans cette étude, nous démontrons une relation vraiment très robuste entre l'expression du *NPRA* adipocytaire, *GLUT4* et *ChREBP* dans deux cohortes indépendantes. Le fait que ces corrélations restent très significatives

après ajustement pour l'IMC indique que l'expression du NPRA adipocytaire est très étroitement liée à la sensibilité à l'insuline.

Ces observations nous ont donc amenés à étudier le rôle des PN dans la régulation du métabolisme glucidique adipocytaire. Nous observons tout d'abord que l'ANP augmente de façon dose dépendante le transport de glucose dans des adipocytes isolés humains issus de dermolipectomies abdominales et que cela est additif avec un traitement à l'insuline à faibles doses. Nous reproduisons ensuite ces effets concernant le transport de glucose dans des hMADS, un modèle de cellules souches humaines pouvant se différencier en adipocytes et utilisé en routine dans notre laboratoire (Bezaire, Mairal et al. 2009, Girousse, Tavernier et al. 2013). Ce modèle possède les éléments de la voie de signalisation aux NPR (données personnelles) et montre une activité lipolytique en réponse à une stimulation aux PN (Rodriguez, Elabd et al. 2004). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de PKG inhibe le transport de glucose induit par les PN. Jusqu'à présent, les effets adipocytaires du GMPc/PKG avaient été mis en parallèle de ceux de l'AMPc/PKA puisqu'ils activent tous deux les mêmes cibles moléculaires lors de la lipolyse (LHS et Périlipine 1) (Sengenès, Bouloumie et al. 2003) ou lors du brunissement (p38 MAPK) (Bordicchia, Liu et al. 2012). Cependant, nos expériences rapportent un découplage des effets de PKG et de PKA sur le transport de glucose dans l'adipocyte. Et pour cause, il a été démontré que l'inhibition du transport de glucose par les catécholamines nécessite l'activation de la lipolyse, ce qui entraîne la dissociation du complexe mTORC1/2 (Mullins, Wang et al. 2014). Si l'activation du GMPc par le NO avait déjà été décrite pour augmenter le transport de glucose dans le muscle squelettique humain (Deshmukh, Long et al. 2010), c'est la première étude à mettre en évidence l'activation du transport de glucose par les PN dans l'adipocyte humain.

Etant donné que nous avons observé une forte corrélation positive entre l'expression du NPRA et de GLUT4 dans le tissu adipeux humain, nous avons posé l'hypothèse que les PN activent le transport de glucose en ciblant des molécules communes avec la voie de l'insuline. Cette hormone active le transport de glucose dans l'adipocyte et la cellule musculaire via la voie PI3K/Akt dans le but d'induire la translocation des vésicules de GLUT4 à la membrane (Klip, Sun et al. 2014). Nous démontrons dans les hMADS que le BNP active de façon PKG dépendante la phosphorylation activatrice de la Serine 473 d'Akt et que cela est plus fort à 60 minutes

qu'à 20 minutes de stimulation. De la même façon, le BNP phosphoryle également AS160 (TBC1D4) qui facilite la translocation des vésicules de GLUT4 à la membrane plasmique (Lansey, Walker et al. 2012, Tan, Ng et al. 2012). Nous confirmons que la signalisation au BNP/GMPc dans les hMADS implique l'activation de p38 MAPK et de ATF2 comme précédemment décrit (Bordicchia, Liu et al. 2012). En revanche, le BNP ne modifie pas l'état de phosphorylation d'IRS1, confirmant ainsi que les effets du BNP sur le transport de glucose sont indépendants de ceux de l'insuline, en dépit du fait qu'ils utilisent des cibles communes finales dans la transduction du signal. Bien que l'inhibiteur pharmacologique que nous utilisons bloque à la fois PKG I et PKG II, les effets des PN impliquent PKG I considérant que PKG II est absent de l'adipocyte humain (Sengenès, Bouloumie et al. 2003).

Après avoir démontré une stimulation de l'entrée de glucose par les PN dans l'adipocyte, nous nous sommes intéressés à son devenir. Nos résultats mettent en évidence que 30% de ce glucose est oxydé et que 70% est incorporé dans le squelette carboné du glycérol pour la synthèse de TAG, processus autrement appelé la lipogenèse *de novo* (LDN). Notre étude ne nous a pas permis de mettre en évidence de modification dans l'expression des gènes de le LDN (*Fatty Acid Synthase, Acetyl CoA Carboxylase1, Long-Chain Fatty Acid Elongase 6*) après traitement aux PN, indiquant que les PN exercent leurs effets indépendamment de changement de l'activité transcriptionnelle du régulateur ChREBP, au moins à court terme.

Le fait que les PN favorisent le transport de glucose et la LDN peut paraître peu intuitif avec leur rôle lipolytique dans le tissu adipeux. Nous pensons que les PN promeuvent une sorte de cycle futile en augmentant tout d'abord le transport de glucose dans l'adipocyte, puis son stockage sous forme de lipides pour, dans un second temps, hydrolyser les TAG. Cela pourrait également permettre d'alimenter le cycle de Krebs et ainsi la production d'ATP pour maintenir une activité suffisante de la lipolyse. Ce qui serait tout à fait consistant avec leur rôle démontré sur le brunissement de l'adipocyte blanc (Bordicchia, Liu et al. 2012). La formation d'un tel cycle futile pourrait participer au processus de dissipation d'énergie observé dans l'adipocyte beige/brun. Un tel effet sur le couple transport de glucose/lipolyse a déjà été décrit dans des adipocytes de rats traités au β -sitosterol, un nutraceutique (Chai, Lim et al. 2011).

En résumé, ce travail pointe du doigt un rôle insoupçonné de la signalisation du NPRA dans le transport du glucose et de son métabolisme dans le tissu adipeux humain (**Figure 16**). La transduction du signal implique le GMPc/PKG mais est indépendante de la voie insulinique. L'expression de ce récepteur est étroitement associée à l'insulinosensibilité systémique et il semblerait que cette signalisation soit altérée chez le sujet obèse/DT2. De plus, sachant que chez le patient obèse, le tissu adipeux peut représenter plus de 25% de sa masse corporelle, une augmentation du transport et de l'oxydation du glucose par ce tissu pourrait grandement participer à améliorer le contrôle glycémique de la personne. D'autres études sont nécessaires pour savoir si une activation du NPRA au niveau du tissu adipeux peut améliorer la sensibilité à l'insuline et ainsi être une cible thérapeutique potentielle du DT2.

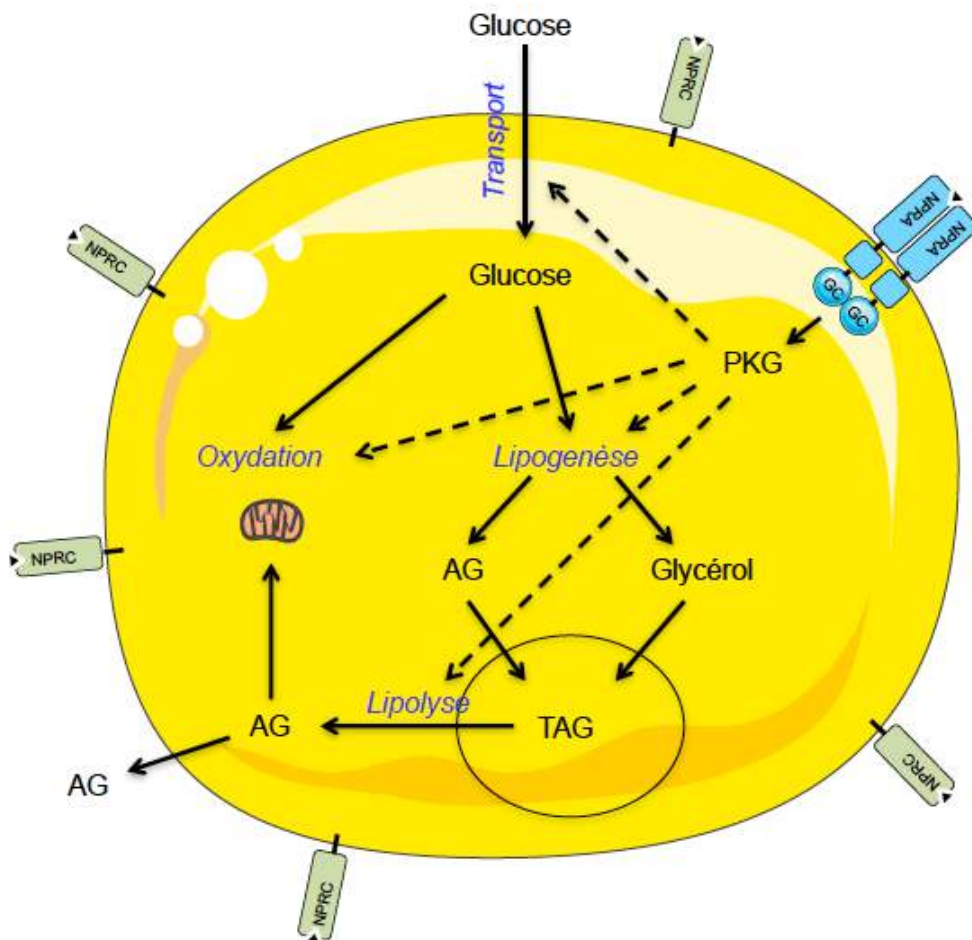


Figure 16 : Modèle du transport de glucose et de son devenir stimulé par les PN dans l'adipocyte humain. AG : acide gras ; PKG : protéine kinase dépendante du GMPc ; TAG : Triacylglycérol.

DEUXIEME PARTIE

**Une altération de la signalisation musculaire aux récepteurs aux peptides
natriurétiques relie le diabète de type 2 à l'obésité**

**Defective natriuretic peptide receptor signaling in skeletal muscle links obesity to
type 2 diabetes**

Marine Coué, Pierre-Marie Badin, Isabelle K. Vila, Claire Laurens, Katie Louche, Marie-
Adeline Marquès, Virginie Bourlier, Etienne Mouisel, Geneviève Tavernier, Arild C.
Rustan, Jose E. Galgani, Denis R. Joannisse, Steven R. Smith, Dominique Langin,
and Cedric Moro

Diabetes

Marine Coué,^{1,2} Pierre-Marie Badin,^{1,2} Isabelle K. Vila,^{1,2} Claire Laurens,^{1,2}
 Katie Louche,^{1,2} Marie-Adeline Marquès,^{1,2} Virginie Bourlier,^{1,2} Etienne Mouisel,^{1,2}
 Geneviève Tavernier,^{1,2} Arild C. Rustan,³ Jose E. Galgani,⁴ Denis R. Joannise,⁵
 Steven R. Smith,⁶ Dominique Langin,^{1,2,7} and Cedric Moro^{1,2}



Defective Natriuretic Peptide Receptor Signaling in Skeletal Muscle Links Obesity to Type 2 Diabetes



Diabetes 2015;64:4033–4045 | DOI: 10.2337/db15-0305

Circulating natriuretic peptide (NP) levels are reduced in obesity and predict the risk of type 2 diabetes (T2D). Since skeletal muscle was recently shown as a key target tissue of NP, we aimed to investigate muscle NP receptor (NPR) expression in the context of obesity and T2D. Muscle NPRA correlated positively with whole-body insulin sensitivity in humans and was strikingly downregulated in obese subjects and recovered in response to diet-induced weight loss. In addition, muscle NP clearance receptor (NPRC) increased in individuals with impaired glucose tolerance and T2D. Similar results were found in obese diabetic mice. Although no acute effect of brain NP (BNP) on insulin sensitivity was observed in lean mice, chronic BNP infusion improved blood glucose control and insulin sensitivity in skeletal muscle of obese and diabetic mice. This occurred in parallel with a reduced lipotoxic pressure in skeletal muscle due to an upregulation of lipid oxidative capacity. In addition, chronic NP treatment in human primary myotubes increased lipid oxidation in a PGC1 α -dependent manner and reduced palmitate-induced lipotoxicity. Collectively, our data show that activation of NPRA signaling in skeletal muscle is important for the maintenance of long-term insulin sensitivity and has the potential to treat obesity-related metabolic disorders.

Obesity is a major risk factor of type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases (1,2). Although multiple hypotheses

have been proposed, the link between obesity and the risk of T2D is still poorly understood. Over the last decade, several large cohort studies reported an inverse association between plasma natriuretic peptide (NP) levels and BMI (3,4), and the risk of T2D (5,6). Therefore, dysregulation of the NP system, referred to as the “NP handicap,” might be an important factor in the initiation and progression of metabolic dysfunction, making NPs potential candidates linking obesity and T2D (7–10).

NPs, including atrial NP (ANP) and brain NP (BNP), are mainly known as heart hormones secreted in response to cardiac overload and mechanical stretch in order to regulate blood volume and pressure (11,12). ANP and BNP classically bind to a biologically active receptor A (NP receptor A [NPRA]) that promotes cGMP signaling (13). They are also quickly cleared from the circulation and degraded through NP clearance receptor (NPRC). The NPRA-to-NPRC ratio therefore controls the biological activity of NP at the target tissue level (14).

Besides their well-documented role in the cardiovascular system, several studies revealed a metabolic role of NP (15,16). Pioneering studies demonstrated a potent lipolytic role of these peptides in human adipose tissue (17,18), and more recent studies indicated they may play a role in the “browning” of human white fat cells (19) as well as in favoring fat oxidative capacity in human skeletal muscle cells (20). The underlying mechanism involves activation of cGMP signaling, induction of PGC1 α (peroxisome

¹Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, INSERM, UMR1048, Toulouse, France

²University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France

³Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, Oslo, Norway

⁴School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

⁵Department of Kinesiology, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Laval, Canada

⁶Translational Research Institute for Metabolism and Diabetes, Florida Hospital, Sanford-Burnham Medical Research Institute, Orlando, FL

⁷Department of Clinical Biochemistry, Toulouse University Hospitals, Toulouse, France

Corresponding author: Cedric Moro, cedric.moro@inserm.fr.

Received 6 March 2015 and accepted 31 July 2015.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db15-0305/-/DC1>.

© 2015 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered.

See accompanying article, p. 3978.

proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α), and enhancement of mitochondrial respiration. Together these studies argue for an important role of NP in the regulation of whole-body energy metabolism. The lipolytic effect of NP is absent in mice naturally expressing high levels of NPRC in adipose tissue (19,21). However mice overexpressing BNP are protected from diet-induced obesity and insulin resistance, which suggests that the protective effect of NP is achieved by targeting other metabolic tissues such as skeletal muscles (22). We therefore hypothesized that a downregulation of NPRA and/or an upregulation of NPRC in skeletal muscle could contribute to the “NP handicap” and provide a novel pathophysiological and mechanistic link between obesity and T2D.

In the current study, through a comprehensive set of experiments in humans, mouse models of obesity and T2D, and human primary skeletal muscle cells, we demonstrated a pathophysiological link between obesity-induced insulin resistance and T2D and defective skeletal muscle NPR signaling. In addition, increasing circulating BNP levels in diabetic and high-fat diet (HFD)-fed mice improved blood glucose control and insulin sensitivity. These effects were accompanied by improved muscle insulin signaling resulting from reduced lipotoxic lipid pressure and elevated lipid oxidative capacity.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Clinical Studies and Human Subjects

Muscle biopsy samples from lean, obese with normal glucose tolerance, obese with impaired glucose tolerance (IGT), and obese subjects with T2D were obtained from three independent clinical studies. Study 1 included nine young lean and nine young obese subjects (Fig. 1A–D) (23). Study 2 included four middle-aged obese subjects with T2D and six with IGT at baseline and in response to 12 weeks of calorie restriction to induce weight loss and improve metabolic health (Fig. 1E and F) (24). Study 3 included 21 subjects with normal glucose tolerance but a wide range of body fat (Supplementary Fig. 1) (25). The clinical characteristics of the subjects are summarized in Supplementary Table 1. All volunteers gave written informed consent and the protocol was approved by an institutional review board. Studies were performed according to the latest version of the Declaration of Helsinki and the Current International Conference on Harmonization guidelines. Samples of vastus lateralis weighing 60–100 mg were obtained by muscle biopsy using the Bergström technique, blotted, cleaned, and snap frozen in liquid nitrogen (26). Insulin sensitivity was measured by hyperinsulinemic-euglycemic clamp after an overnight fast (27). An intravenous catheter was placed in an antecubital vein for infusion

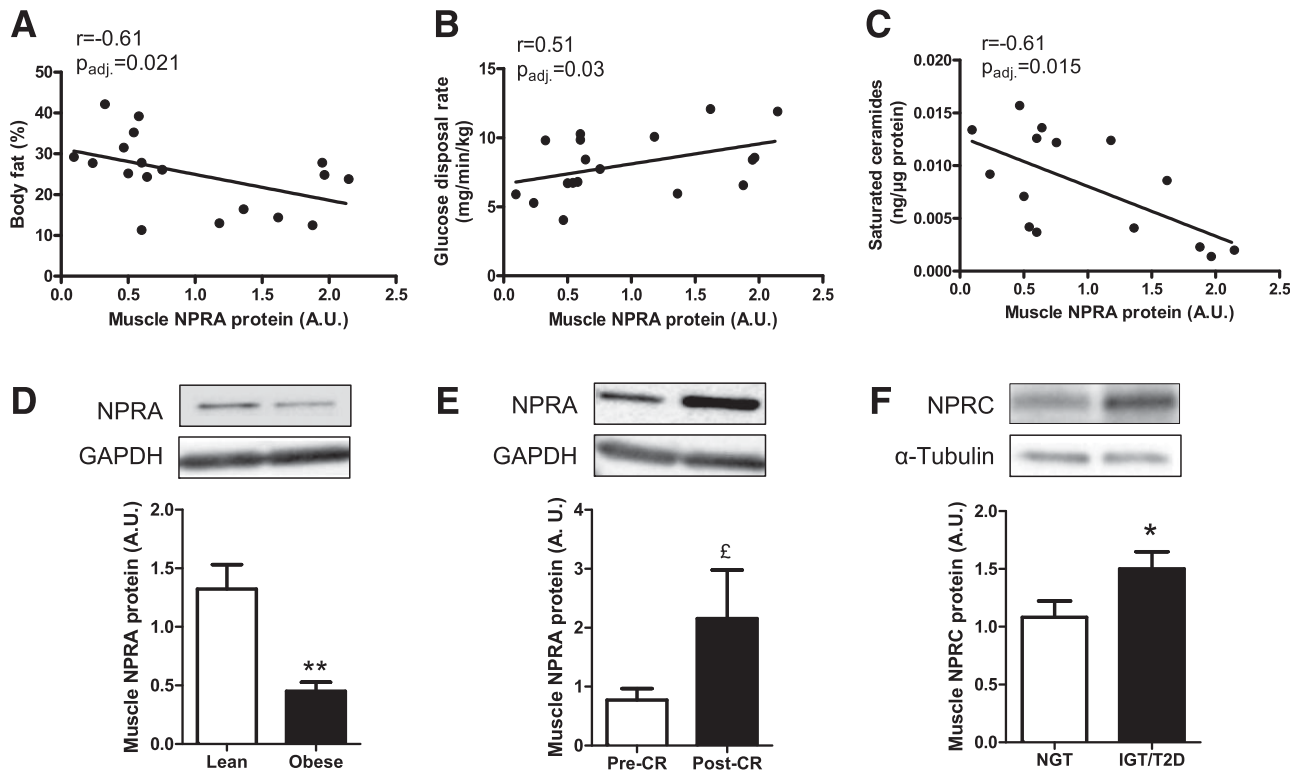


Figure 1—Skeletal muscle NPR expression relates to insulin sensitivity in humans. Correlation between vastus lateralis NPRA protein expression and percent body fat (A), glucose disposal rate measured by euglycemic-hyperinsulinemic clamp (B), and muscle-saturated ceramide content (C) ($n = 15$ –20). D: NPRA protein levels in skeletal muscle of lean and obese subjects (D) and in obese subjects pre- and postcalorie restriction (pre-CR and post-CR) (E). F: NPRC protein levels in skeletal muscle of obese subjects with normal glucose tolerance (NGT) and with IGT and T2D. ** $P < 0.01$ vs. lean; £ $P = 0.06$ vs. pre-CR; * $P < 0.05$ vs. NGT ($n = 6$ –10 per group).

of glucose and insulin during the clamp. A second catheter was placed retrograde in a dorsal vein of the contralateral hand for blood withdrawal. The hand was placed in a plastic heated box at $\sim 60^{\circ}\text{C}$ for arterialization of venous blood. Three blood samples were drawn before the initiation of insulin and glucose for the clamp and during the last 30 min of the clamp. A primed infusion of regular insulin ($80 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) was initiated and continued for 2 h. Plasma glucose was clamped at 90 mg/dL in all participants. Arterialized plasma glucose was measured at 5-min intervals and a variable infusion of exogenous glucose (20% solution) was given to maintain plasma glucose concentration. Plasma glucose was analyzed with a YSI 2300 STAT glucose analyzer (YSI Inc., Yellow Springs, OH), and plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit (ALPCO Diagnostics, Salem, NH). Glucose disposal rate was adjusted by kilograms of fat-free mass. Body composition (considering a three-compartment model) was determined using a total-body dual-energy X-ray absorptiometer (DPX, Software 3.6; Lunar Radiation Corp., Madison, WI).

Mice and Diets

Five-week-old male diabetes-prone, obese *db/db* mice of the C57BL/KsJ-lept^{db}-lept^{db} strain with their nondiabetic lean littermate control *db/+* were used. For HFD studies, we used regular C57BL/6J male mice (JANVIER LABS). The mice were housed in a pathogen-free barrier facility (12-h light/dark cycle) with ad libitum access to water and food. After weaning, *db/db* and *db/+* mice were fed a normal chow diet (A04; SAFE Diets) for 4 weeks. C57BL/6J mice were fed for 16 weeks either a normal chow diet (10% energy as fat, D12450J; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) or HFD containing 60% kcal from fat (D12492; Research Diets, Inc.). All experimental procedures were approved by a local institutional animal care and use committee and performed according to INSERM guidelines for the care and use of laboratory animals.

BNP Infusion Studies

Mice were randomly assigned to receive a saline vehicle (NaCl 0.9%) and/or chronic rat/mouse BNP1-32 (B9901; Sigma-Aldrich) at a rate of 5 or 10 ng/kg/min. Treatments were chronically administered intraperitoneally with miniosmotic pumps (model 1004; Alzet, Cupertino, CA) (28). Mini-pumps were placed after 12 weeks of HFD and treatment was administered for 4 weeks in C57BL/6J mice and at 6 weeks of age in *db/db* mice. Body weight was measured weekly and body composition was assessed by quantitative nuclear magnetic resonance imaging (EchoMRI 3-in-1 system; Echo Medical Systems).

Glucose and Insulin Tolerance Tests

Six hour-fasted mice were injected intraperitoneally with a bolus of D-glucose at 2 g/kg (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and insulin 0.5 units/kg (Insuman Rapid; Sanofi, Paris, France) for glucose and insulin tolerance tests (GTT and ITT), respectively (29). Blood glucose levels were monitored from the tip of the tail with a glucometer

(Accucheck; Roche, Meylan, France) at 0, 15, 30, 45, 60, and 90 min after injection. Radiolabeled GTTs were performed as previously described (29).

Blood Analyses and Tissue Collection

After an overnight fast, mice were decapitated and blood was collected into tubes containing EDTA and protease inhibitors. Organs and tissues were rapidly excised and snap frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C . Blood glucose was assayed using the glucose oxidase technique (Biomérieux, Paris, France), and plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit (ALPCO Diagnostics). Plasma BNP was measured using the RayBio BNP Enzyme Immunoassay Kit (RayBiotech, Inc., Norcross, GA). HbA_{1c} and fructosamines were determined using a PENTRA 400 multianalyzer.

Human Skeletal Muscle Cell Culture

Satellite cells from rectus abdominis biopsies of healthy subjects with normal glucose tolerance (age 34.3 ± 2.5 years, BMI $26.0 \pm 1.4 \text{ kg/m}^2$, fasting glucose $5.0 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and growth factors (human epidermal growth factor, BSA, dexamethasone, gentamycin, fungizone, and fetuin) as previously described (23,30). Myotubes were differentiated up to 5 days and were treated with 100 nmol/L human ANP (A1663; Sigma-Aldrich) or BNP (B5900; Sigma-Aldrich) every day for the last 3 days.

Determination of Fatty Acid Metabolism

Pulse-chase experiments to determine lipolytic flux and oleate incorporation into total lipids, triacylglycerols (TAGs), and diacylglycerols (DAGs) by thin-layer chromatography were performed as previously described (31). Incorporation rates were normalized to total protein content in each well. Palmitate oxidation rates were measured as described previously (25).

Lipid Intermediate Determination

TAG and DAG content were measured by gas chromatography and ceramide and sphingomyelin species by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry after total lipid extraction as previously described for mouse and human muscle tissues (25,29).

Western Blot Analysis

Soleus and gastrocnemius skeletal muscles, white and brown adipose tissues, and myotubes were homogenized in a buffer containing 50 mmol/L HEPES, pH 7.4, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 30 mmol/L NaPO₄, 10 mmol/L NaF, 1% Triton X-100, 10 $\mu\text{L/mL}$ protease inhibitor (Sigma-Aldrich), 10 $\mu\text{L/mL}$ phosphatase I inhibitor (Sigma-Aldrich), 10 $\mu\text{L/mL}$ phosphatase II inhibitor (Sigma-Aldrich), and 1.5 mg/mL benzamidine HCl. Tissue homogenates were centrifuged for 25 min at 15,000g, and supernatants were stored at -80°C . Solubilized proteins (30–40 μg) were run on a 4–20% SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA), transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham Biosciences), and blotted with the following primary antibodies: NPRA (Abcam), NPRC (Sigma-Aldrich), Akt, phospho-Akt

Ser473, p-Thr180/Tyr182-p38 MAPK, p38 MAPK, HSL, phospho-HSL Ser660, and phospho-HSL Ser565 (all Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Subsequently, immunoreactive proteins were blotted with secondary horseradish peroxidase-coupled antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Dura or SuperSignal West Femto; Thermo Scientific), visualized using the ChemiDoc MP Imaging System, and data analyzed using the Image Laboratory 4.1 version software (Bio-Rad). GAPDH (Cell Signaling Technology) and α -tubulin (Sigma-Aldrich) were used as internal controls for skeletal muscle and myotubes, and β -actin (Cell Signaling Technology) was used as internal control for adipose tissues.

Real-Time qRT-PCR

Total from tissues and primary myotubes were processed for RNA extraction using the RNeasy RNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). After reverse transcription of total RNA (1 μ g), samples were analyzed on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). All primers were obtained from Applied Biosystems and presented in Supplementary Table 5. All expression data were normalized by the $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ method using 18S as internal control.

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software Inc.). Normal distribution and homogeneity of variance of the data were tested using Shapiro-Wilk and F tests, respectively. One-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests and Student *t* tests were performed to determine differences between groups, interventions, and treatments. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests were applied when appropriate. Linear regression was performed after log transformation of nonparametric data. The false discovery rate for multiple testing was controlled by the Benjamini-Hochberg procedure with P_{adj} values ≤ 0.05 as threshold. All values in figures and tables are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Muscle NPRA and NPRC Proteins Relate to Insulin Sensitivity in Humans

Muscle NPRA protein expression was investigated in human vastus lateralis biopsies of healthy volunteers with varying degrees of body fat and insulin sensitivity. We observed that muscle NPRA protein was inversely related to body fat (Fig. 1A and Supplementary Fig. 1A), BMI, fasting insulin, and indices of insulin resistance (Supplementary Table 2). In addition, muscle NPRA correlated positively with whole-body insulin sensitivity measured by euglycemic-hyperinsulinemic clamp (Fig. 1B) and the insulin sensitivity index (Supplementary Fig. 1B) and negatively with total muscle saturated ceramide content (Fig. 1C). Importantly, muscle NPRA protein content was significantly reduced (-65%) in obese subjects when compared with age-matched lean subjects (Fig. 1D). Conversely,

muscle NPRA protein was upregulated (1.8-fold) together with insulin sensitivity ($+37\%$, 5.4 ± 0.6 vs. 7.4 ± 1.1 mg/min/kg for pre- and postcalorie restriction, respectively, $P = 0.03$) in obese subjects with IGT in response to diet-induced weight loss (Fig. 1E). Finally, muscle NPRC protein content was unchanged in obese versus lean individuals with normal glucose tolerance (0.41 ± 0.08 vs. 0.29 ± 0.07 arbitrary units [A.U.], not significant) but increased significantly in obese individuals with IGT and T2D (Fig. 1F). The ratio of NPRA to NPRC protein was significantly reduced in obese versus lean subjects (2.1 ± 0.3 vs. 3.6 ± 0.2 A.U., respectively, $P = 0.0005$) and increased in obese subjects in response to calorie restriction (0.38 ± 0.16 vs. 0.14 ± 0.04 A.U., respectively, $P = 0.08$). Together this suggests that skeletal muscle NPR expression relates to insulin sensitivity in humans and is altered in obesity and T2D.

Impaired NPRA Expression in Skeletal Muscle and Fat of Diet-Induced Obese Mice

Since both skeletal muscle and adipose tissue are known as key target tissues of NP, both in humans and mice, we further examined NPR expression in metabolic tissues of chow-fed versus HFD-fed mice. In line with human data, we found a significant downregulation of NPRA protein in skeletal muscle (Fig. 2A and D), as well as in white (Fig. 2B and D) and brown fat (Fig. 2C and D) of HFD-fed mice. No significant change in NPRC protein content was found in skeletal muscle and brown fat, whereas NPRC protein decreased significantly in white fat (0.48 ± 0.08 vs. 0.14 ± 0.04 A.U. for chow and HFD, respectively, $P < 0.05$). Plasma BNP levels were unchanged in HFD-fed mice compared with chow-fed mice (Fig. 2E). Collectively, as in humans, our data indicate a reduced NPRA expression in skeletal muscle of obese mice.

Chronic BNP Infusion Protects Against HFD-Mediated Obesity and Glucose Intolerance

Since muscle NPRA is associated with insulin sensitivity in humans, we assessed the effect of acute and chronic BNP infusions on glucose tolerance and insulin sensitivity in chow-fed and HFD-fed mice. Acute intraperitoneal BNP injection did not affect fasting blood glucose levels over a time course of 30 min (Supplementary Fig. 2A) and had no effect on glucose excursion during an intraperitoneal GTT (Supplementary Fig. 2B). No effect of acute BNP injection was also seen on glucose disposal in skeletal muscle (Supplementary Fig. 2C). We further assessed the influence of acute NP treatment on basal and insulin-stimulated glucose uptake in human primary skeletal muscle cells. No effect of increasing doses of ANP and BNP on glucose uptake was observed (Supplementary Fig. 3). From these data we concluded that NPRA signaling does not acutely modulate glucose uptake in skeletal muscle.

Based on a previous study (32), we next infused BNP at a dose of 5 ng/kg/min, which raised plasma BNP levels by $\sim 40\%$ (data not shown). BNP-treated mice had a similar body weight (Fig. 3A) and body composition (Fig. 3B) after

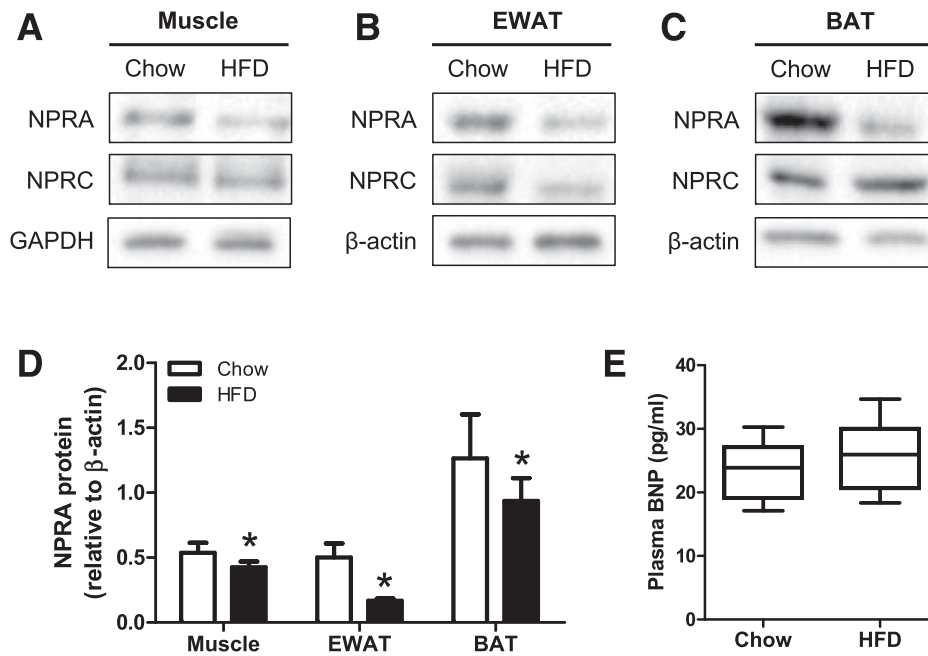


Figure 2—Defective NPR expression in metabolic tissues of diet-induced obese mice. Representative blots of NPRA and NPRC proteins in skeletal muscle (A), epididymal white adipose tissue (EWAT) (B), and brown adipose tissue (BAT) (C) of chow-fed and HFD-fed mice. Quantitative bar graph of NPRA protein (D) and overnight fasting plasma BNP (E) levels in chow and HFD-fed mice. * $P < 0.05$ vs. chow-fed mice ($n = 8$ –10 per group).

saline and BNP treatment. Chronic BNP treatment significantly reduced fasting blood glucose levels in mice fed an HFD for 8 or 12 weeks (Fig. 3C). Lower blood glucose in the fasting state was also accompanied by improved glucose tolerance (Fig. 3D) despite no change in fasting and peak insulin at 15 min during the intraperitoneal GTT (Fig. 3E). In conclusion, whereas acute BNP treatment has no effect on insulin sensitivity, chronic BNP treatment improves glucose tolerance in HFD-fed mice.

Impaired NPR Signaling in Skeletal Muscle of Obese Diabetic Mice Contributes to the “NP Handicap”

We next examined NPR expression in metabolic tissues from leptin receptor-deficient mice (*db/db*) that become spontaneously obese and T2D by the age of 8 weeks. In line with data in human skeletal muscle and HFD-fed mice, NPRA protein was downregulated in white (Fig. 4B–D) and brown fat (Fig. 4C and D) of *db/db* mice compared with control *db/+* mice. In agreement with data in individuals with IGT/T2D (Fig. 1E), we noted a remarkable upregulation of NPRC in skeletal muscle (Fig. 4A–E), as well as in white (Fig. 4B–E) and brown (Fig. 4C–E) fat of *db/db* mice. Overall the NPRA-to-NPRC protein ratio was markedly downregulated in muscle and fat of *db/db* mice (Fig. 4F) and was associated with dramatically lower levels of plasma BNP in *db/db* mice (–80%, $P < 0.05$) (Fig. 4G). This was also associated with a remarkable downregulation of p38 MAPK phosphorylation in skeletal muscle of *db/db* mice (–55%, $P < 0.001$) (Supplementary Fig. 4). Importantly, muscle NPRC was negatively correlated with plasma BNP levels (Supplementary Table 3). These

changes in NPR signaling and plasma NP characterized an “NP handicap” of *db/db* mice. No association was found between white and brown fat NPRC protein and plasma BNP levels (data not shown). However, muscle NPRC was positively related to fasting blood glucose, insulin, and HbA_{1c} (Supplementary Table 4), again suggesting a link between defective skeletal muscle NPR signaling and impaired glucose control. Collectively, these data suggest that obesity and T2D are accompanied by profound changes in NPR expression and signaling in skeletal muscle, which may contribute to reduced plasma BNP levels.

Chronic BNP Infusion Improves Blood Glucose Control in Obese Diabetic Mice

We next studied the influence of chronic (4 weeks) BNP infusion on blood glucose control in *db/db* mice. BNP was infused at a dose of 10 ng/kg/min to induce a nearly two-fold increase in plasma BNP levels with the goal of rescuing the “NP handicap.” Despite no change in body weight (Fig. 5A) and composition (Fig. 5B), BNP-treated *db/db* mice displayed significantly improved blood glucose control, with reduced fasting plasma glucose (–21%) (Fig. 5C) and HbA_{1c} (–17%) (Fig. 5D). This improved blood glucose control occurred in the absence of noticeable changes in fasting insulin (Fig. 5E). In addition, insulin tolerance (Fig. 5F) and insulin responsiveness (area above the curve during the ITT, +36%, $P = 0.08$) were improved in BNP-treated mice. In summary, chronic BNP treatment improves blood glucose control and peripheral insulin sensitivity in obese diabetic mice independently of changes in body weight, thus suggesting a direct effect of NP on metabolic organs.

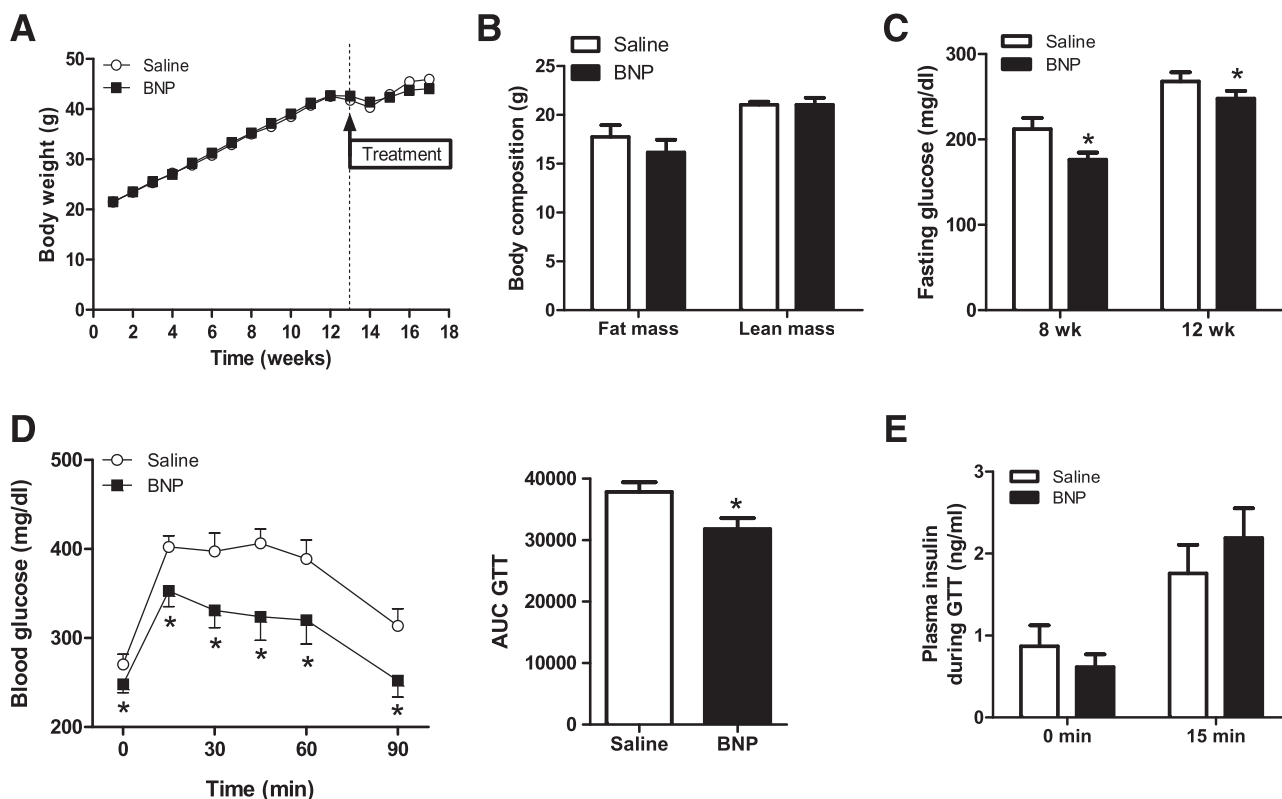


Figure 3—Chronic BNP infusion protects from HFD-induced obesity and glucose intolerance. C57BL/6J mice were treated for 4 weeks with saline (0.9% NaCl) or with BNP (5 ng/kg/min) via mini-osmotic pumps after 12 weeks of HFD. *A*: Follow-up of body weight during HFD and after mini-pump was placed. *B*: Body composition at the end of treatment in saline- and BNP-treated obese mice. *C*: Overnight fasting blood glucose in BNP-treated mice after 8 and 12 weeks of HFD. *D*: Time course of blood glucose levels during an intraperitoneal GTT and corresponding area under the curve (AUC). *E*: Plasma insulin after a 6-h fast (0 min) and 15 min after glucose bolus injection. * $P < 0.05$ vs. saline ($n = 8-10$).

Enhanced Insulin Signaling, Reduced Lipotoxicity, and Increased Lipid Oxidative Capacity in Skeletal Muscle of BNP-Treated Mice

We next studied the mechanism by which chronic BNP treatment improved blood glucose control and muscle insulin sensitivity in both HFD-fed and *db/db* mice. Insulin sensitivity is inhibited by the accumulation of toxic lipids such as DAGs and ceramides in skeletal muscle and liver (33,34). No significant change in total DAG and ceramides was found in the liver of BNP-treated *db/db* (Supplementary Fig. 5A and B) and HFD-fed mice (Supplementary Fig. 6A and B). No change as well in mRNA levels of genes involved in fat oxidation and glucose metabolism was observed after BNP infusion in the liver of *db/db* (Supplementary Fig. 5C) and HFD-fed mice (Supplementary Fig. 6C). Similarly, no change in the expression level of classical thermogenic genes in brown and white fat depots was observed in BNP-treated *db/db* (Supplementary Fig. 7) and HFD-fed mice (Supplementary Fig. 8). No change in *Ucp1* mRNA levels was noted as well in inguinal white adipose tissue (data not shown). However, we observed a muscle-autonomous improvement of insulin-mediated Akt (46%, $P = 0.02$) and p38MAPK phosphorylation (278%, $P = 0.06$) (Fig. 6A), which was paralleled by a

reduced content of total and main species (data not shown) of ceramides (−17%) (Fig. 6B) as well as total and main species (data not shown) of sphingomyelin (−19%) (Fig. 6C) in skeletal muscle of BNP-treated HFD-fed mice, as well as a reduced content of total ceramides in *db/db* mice (52.4 ± 4.4 vs. 40.0 ± 5.1 ng/ μ g protein for *db/+* and *db/db* mice, respectively, $P < 0.05$). The content of total and subspecies of DAGs was also reduced in BNP-treated HFD-fed mice (ANOVA $P < 0.05$) (Fig. 6D). This lower lipotoxic pressure was paralleled by an upregulation of muscle palmitate oxidation rate (+46%) (Fig. 6E) and of *PGC1 α* mRNA levels in HFD-fed mice (Fig. 6F) and in *db/db* mice (+32%, $P = 0.08$). Collectively, the data indicate that chronic BNP treatment improves insulin sensitivity in skeletal muscle by reducing lipotoxicity and upregulating fat oxidative capacity in a *PGC1 α* -dependent manner in obese and diabetic mice.

Chronic NP Treatment Reduces Lipotoxicity and Enhances Lipid Oxidative Capacity in Human Primary Myotubes

We previously demonstrated a functional NPR signaling in human primary myotubes (20). Because NP are known to activate lipolysis in human adipocytes (35,36), we

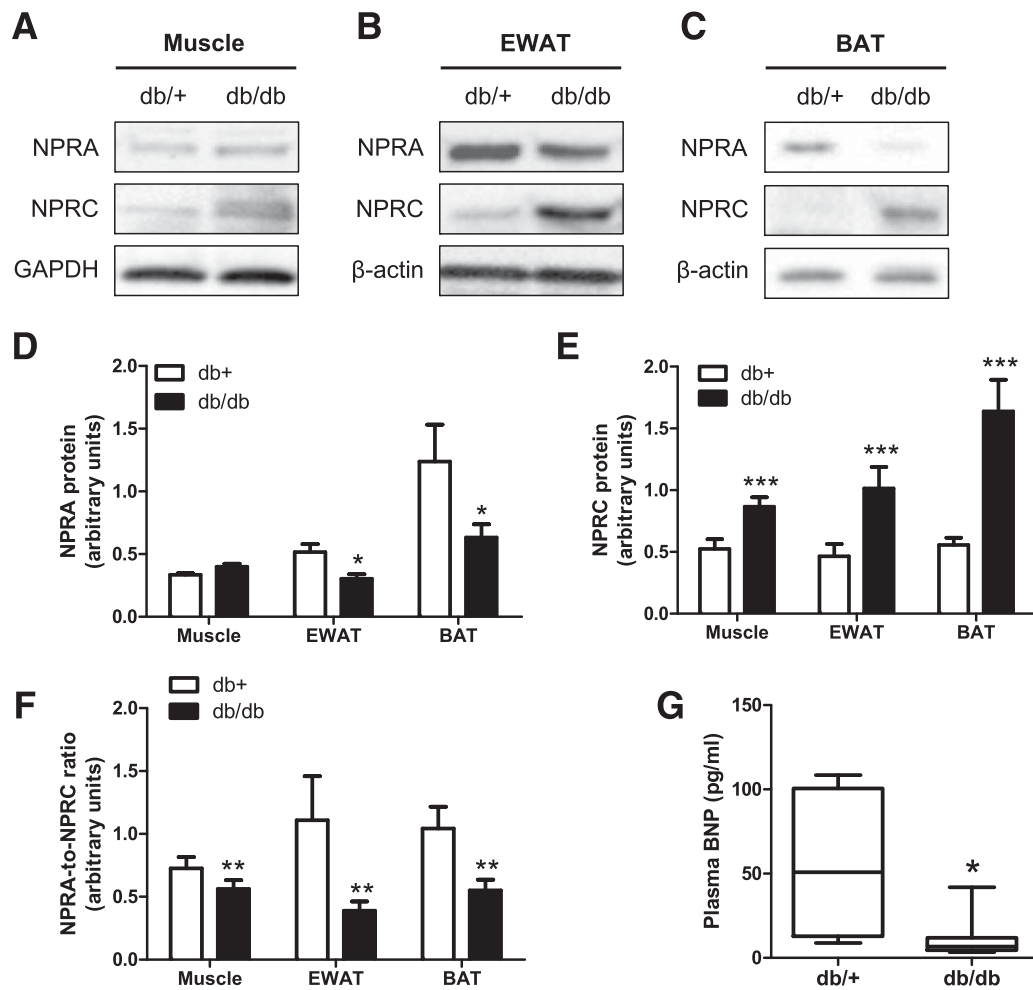


Figure 4—Defective NPR signaling in metabolic tissues of obese diabetic mice. Representative blots of NPRA and NPRC proteins in skeletal muscle (A), epididymal white adipose tissue (EWAT) (B), and brown adipose tissue (BAT) (C) of *db/db* and *db/+* mice. Quantitative bar graph of NPRA (D), NPRC protein (E), NPRA-to-NPRC protein ratio (F), and overnight fasting plasma BNP levels in *db/db* and *db/+* mice (G). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. *db/+* mice ($n = 8$ – 10 per group).

studied here the acute effect of NP treatment on lipid metabolism. Acute treatment of myotubes with BNP did not influence lipid storage, endogenous TAG-derived fatty acid (FA) release (i.e., lipolysis) (Supplementary Fig. 9A), and endogenous TAG-derived FA oxidation (Supplementary Fig. 9B). We further tested whether NP could activate one of the rate-limiting enzymes of lipolysis. Acute BNP treatment of human myotubes did not influence hormone-sensitive lipase phosphorylation either on the activating Ser660 residue (Supplementary Fig. 9C) or on the inhibitory Ser565 residue (Supplementary Fig. 9D). In contrast, chronic treatment with NP for 3 days robustly reduced total lipid accumulation and total TAG and DAG content (one-way ANOVA $P < 0.001$) (Fig. 7A–C). In line with ex vivo muscle data in mice (Fig. 6), reduced lipid accumulation was concomitant with an upregulation of palmitate oxidation rate (+27 and +19%, respectively, for ANP and BNP treatment) (Fig. 7D), and a significant induction of *PGC1 α* gene expression (Fig. 7E), which was independent of PPAR δ activation (Fig. 7F). No change in

myogenic gene expression and differentiation of myoblasts into myotubes was observed in response to chronic NP treatment (data not shown). Based on the findings that muscle NPRA protein relates inversely to saturated ceramide content in human skeletal muscle (Fig. 1C) and that chronic BNP treatment reduces ceramide content in skeletal muscle of HFD-fed mice (Fig. 6B), we assessed the influence of chronic NP treatment on ceramide content in human primary myotubes. No significant effect of NP treatment on the content of total ceramides and various ceramide species (Supplementary Fig. 10) was noticed in the basal condition with FA-free BSA treatment. When myotubes were challenged overnight with 500 $\mu\text{mol/L}$ of palmitate/BSA to induce ceramide production (2.7-fold, $P = 0.001$), we observed a significant decrease of $\sim 30\%$ in total and various ceramide species analyzed in response to chronic ANP and BNP treatment (Fig. 7G). In summary, chronic NP treatment protects against lipotoxicity by upregulating lipid oxidative capacity in human primary myotubes.

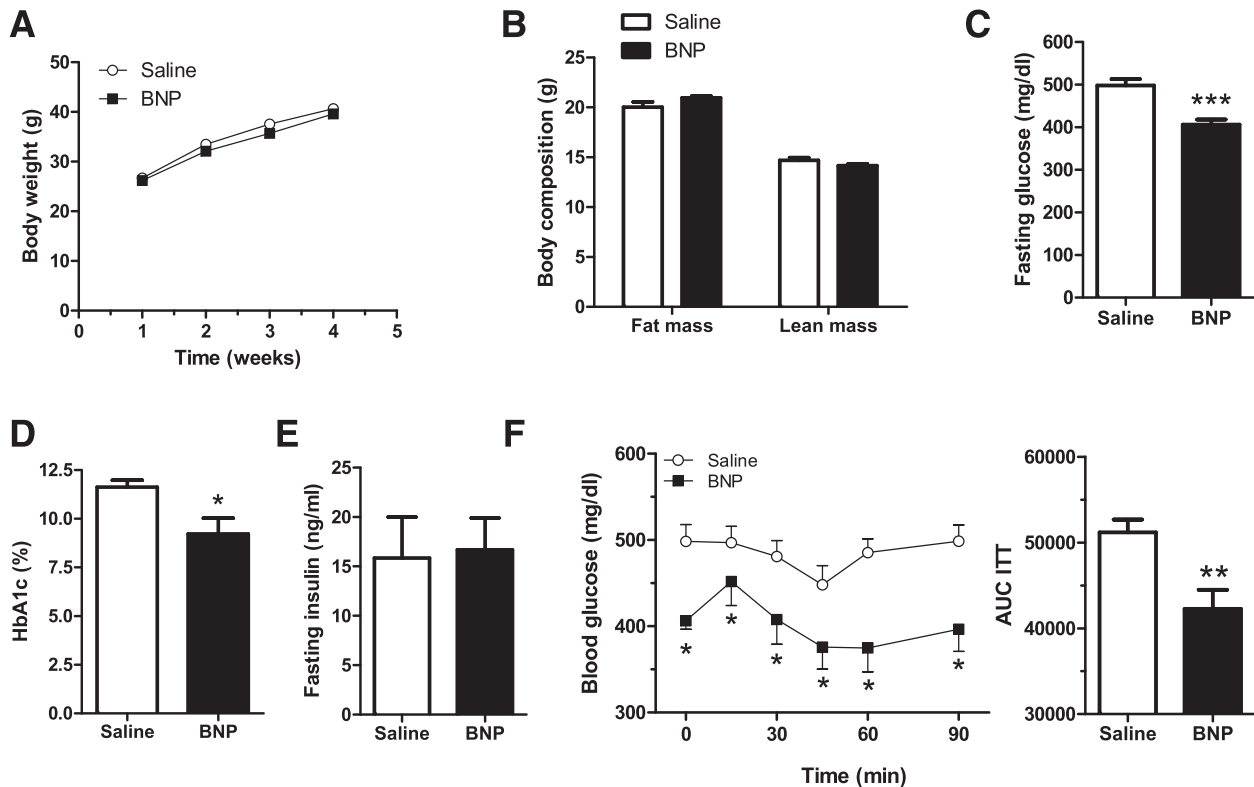


Figure 5—Chronic BNP infusion improves blood glucose control in obese diabetic mice. Five-week-old *db/db* mice were chronically treated for 4 weeks with saline (0.9% NaCl) or with BNP (10 ng/kg/min) via mini-osmotic pump. *A*: Follow-up of body weight over 4 weeks of treatment with saline or BNP. *B*: Body composition at the end of treatment. Overnight fasting blood glucose (*C*), HbA_{1c} (*D*), and overnight fasting insulin (*E*) were measured after 4 weeks of BNP treatment. *F*: Time course of blood glucose levels during an intraperitoneal ITT and corresponding area under the curve (AUC) after 4 weeks of treatment. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 vs. saline-treated *db/db* mice (*n* = 8–10).

DISCUSSION

Although longitudinal prospective studies indicated that high baseline levels of plasma NP confer a reduced risk of developing T2D (5,6), no study so far had demonstrated a mechanistic link between NP biological activity and T2D. We believe our data provide the first evidence that NPRA signaling in skeletal muscle is necessary for the maintenance of long-term insulin sensitivity by regulating lipid oxidative capacity and metabolism (Fig. 8). Our data show for the first time that muscle NPRA signaling is impaired in the context of obesity and glucose intolerance in humans and mice. We also provide evidence that upregulation of NPRC in muscle tissue can contribute to the “NP handicap” observed in T2D. Last but not least, increasing NP levels in obese and diabetic mice, with the goal of rescuing the “NP handicap” and so a normal NPRA signaling tissue response, markedly improves blood glucose control and insulin sensitivity in skeletal muscle.

We first observed a significant positive association between muscle NPRA protein and insulin sensitivity measured by clamp in humans, at a dose that mainly reflects skeletal muscle insulin sensitivity. This observation is consistent with the negative association that we

found between muscle NPRA and body fat, and between muscle NPRA and muscle total saturated ceramide content, two factors negatively influencing whole-body and muscle insulin sensitivity (33,34). To our knowledge, this is the first study reporting an association between skeletal muscle NPRA signaling and insulin sensitivity. This indicates that besides plasma NP levels, NPR signaling in skeletal muscle may influence insulin sensitivity. Additionally, muscle NPRA protein was dramatically downregulated in obese individuals while increased in response to diet-induced weight loss and related improvement in insulin sensitivity. Although the biological factors modulating muscle NPRA protein content were not investigated in the current study, the data suggest that muscle NPRA behaves as a determinant of insulin sensitivity. Moreover, upregulation of muscle NPRC as glucose tolerance deteriorates in obese subjects with IGT and T2D can further repress biological activation of muscle NPRA and contribute to the “NP handicap” in the long-term. Considering that muscle mass represents up to 40% of total body weight, even a moderate increase in muscle NPRC expression could largely reduce plasma NP levels by an increased rate of clearance. Muscle NPRC might be induced by high blood insulin levels in obese subjects as

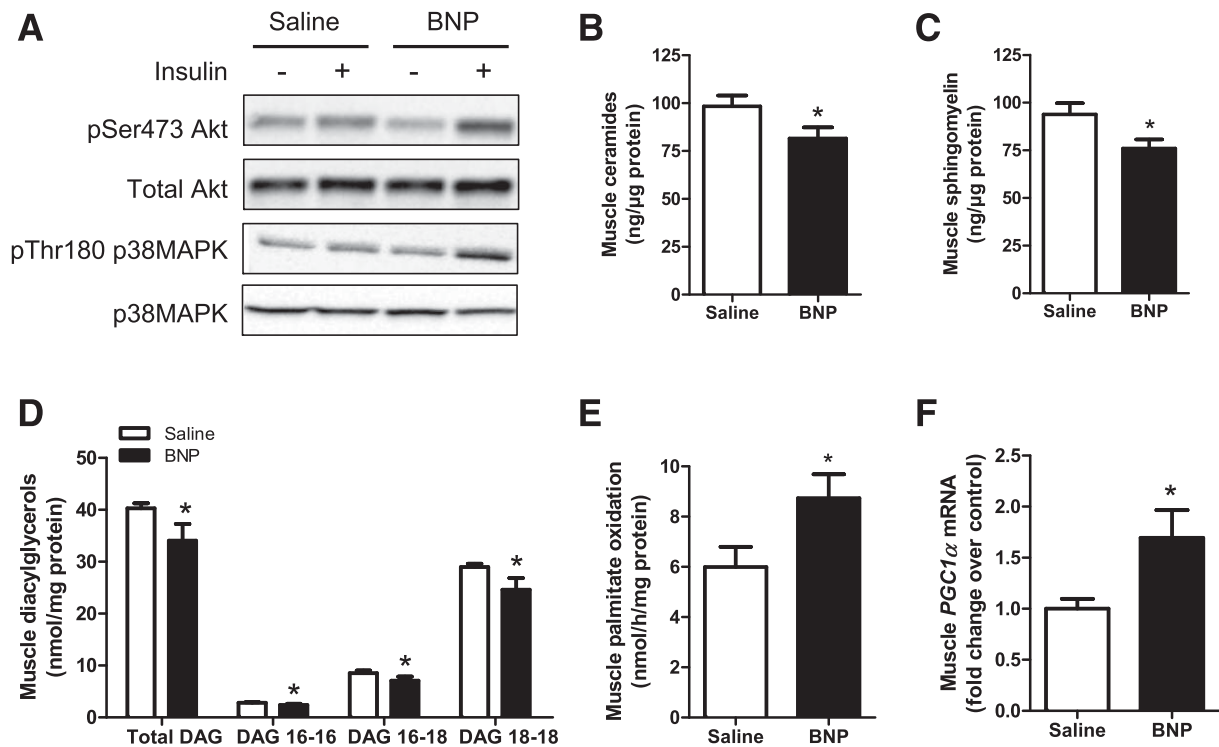


Figure 6—Muscle-autonomous improvement of insulin signaling and reduced lipotoxicity in skeletal muscle of BNP-treated obese mice. A: Extensor digitorum longus muscles were incubated ex vivo in absence (–) or presence of 100 nmol/L of insulin (+), and phosphorylated and total Akt and p38 MAPK were measured by Western blot. Total ceramides (B), total sphingomyelin (C), total and DAG subspecies content (D), ex vivo palmitate oxidation rate (E), and *PGC1α* gene expression (F) in skeletal muscle of HFD-fed mice treated with saline and BNP 5 ng/kg/min. * $P < 0.05$ vs. saline ($n = 8–10$).

glucose tolerance worsens independently of blood glucose concentrations as previously shown in adipose tissue (37). Although obese control and IGT/T2D were not age matched, increased expression of NPRC in skeletal muscle appeared independent of age since no correlation between age and muscle NPRC protein was found. Importantly, these findings in human muscle were largely replicated in obese diabetic mice. NPRC protein content was increased in skeletal muscle, white fat, and brown fat of obese diabetic mice, but only muscle NPRC protein negatively correlated with plasma BNP levels, reflecting that an increased plasma BNP clearance by the muscle can contribute to the “NP handicap” observed in these mice. Our data are in line with other studies demonstrating that elevated *NPRC* mRNA levels in white fat relate to metabolic dysfunction in mice and humans (22,38,39). Our data also provide a mechanistic understanding of the tight link observed between the NP handicap and insulin resistance independently of obesity in humans (40). The “NP handicap” concept is supported by the fact that the half-life of NP in the blood circulation is substantially increased in NPRC knockout mice and the biological activity of NP significantly increased in target tissues (41). Importantly, the altered NPRA-to-NPRC protein ratio in skeletal muscle was accompanied by a marked alteration of p38 MAPK phosphorylation in *db/db* vs. *db/+* mice,

thus indicating a potential signaling defect, considering that p38 MAPK is recognized as a canonical downstream molecular effector of the NPR signaling pathway (19).

Despite the observed link between muscle NPRA and insulin sensitivity, acute injection of BNP had no impact on fasting blood glucose, glucose tolerance, and muscle insulin sensitivity in mice. Furthermore, no acute effect of NP on glucose uptake was observed in human primary myotubes. These findings are in agreement with at least one human study reporting no acute effect of BNP on insulin sensitivity and insulin secretion (42). Altogether these data indicate that NP signaling does not acutely modulate skeletal muscle glucose uptake in vivo. We therefore performed chronic BNP infusion studies in HFD-fed and obese diabetic *db/db* mice to assess the long-term influence of BNP treatment on blood glucose control and insulin sensitivity. BNP was preferred for infusion studies as it has a higher half-life than ANP (14). Strikingly, chronic BNP infusion, at doses mimicking a physiological increase of the peptide and targeted to rescue the “BNP handicap” and/or a normal tissue NPRA signaling response, very significantly improved blood glucose control in both mouse models of obesity-induced glucose intolerance and T2D. We observed >20% reduction in fasting blood glucose levels as well as >15% decrease in HbA_{1c}, which is clinically meaningful and

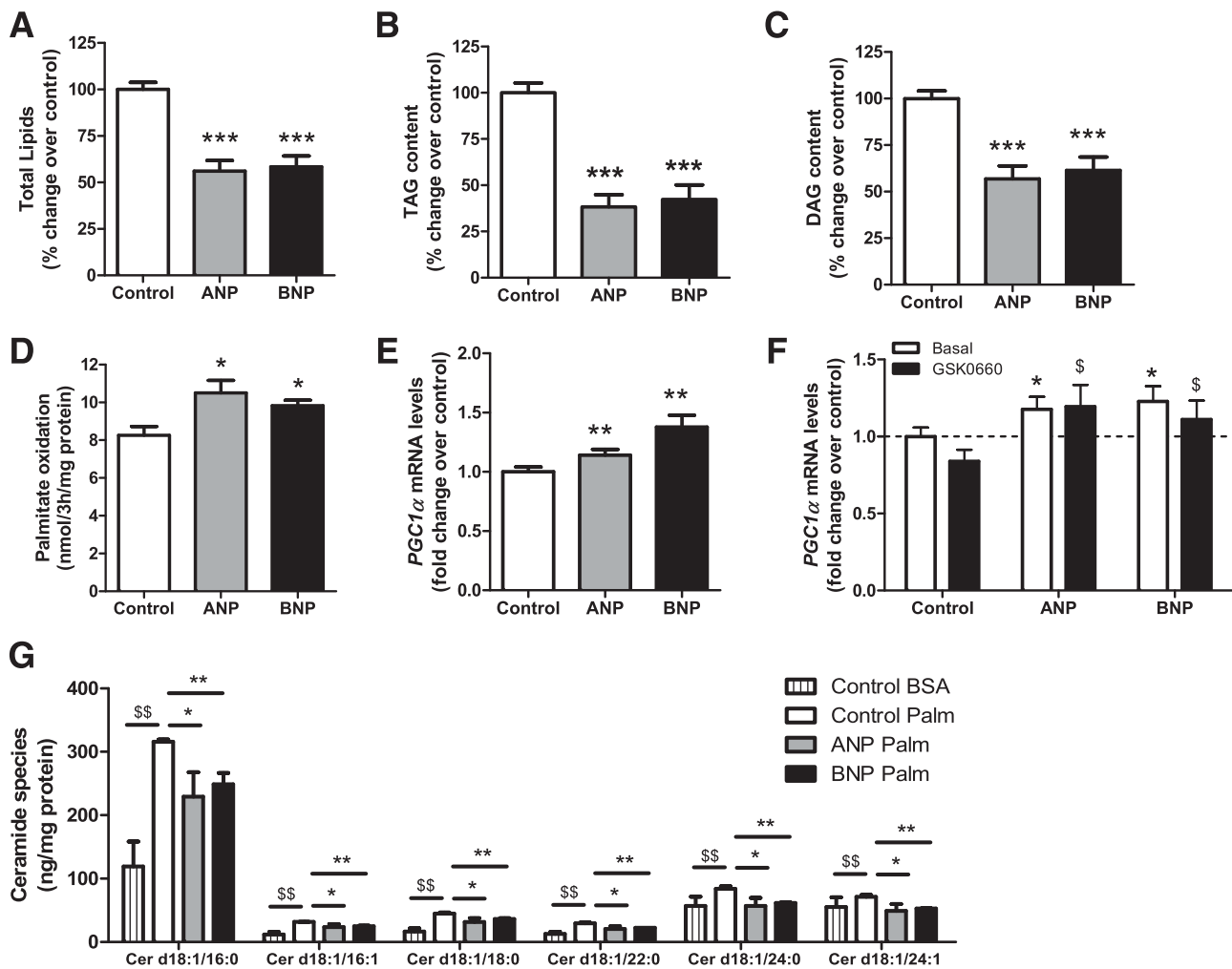


Figure 7—Chronic NP treatment reduces lipotoxicity and increases lipid oxidative capacity in human primary myotubes. Total lipid accumulation (A), TAG (B), and DAG (C) content were determined with [^{14}C]oleate after 3-day chronic treatment with 100 nmol/L of ANP and BNP in human differentiated myotubes. D: Total palmitate oxidation rate was also measured in response to chronic ANP and BNP treatment. PGC1 α gene expression in response to 3-day treatment with ANP and BNP (E) and in presence or absence of 500 nmol/L of the selective PPAR δ antagonist GSK0660 (F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. control (A–E); * $P < 0.05$ vs. basal; \$ $P < 0.05$ vs. GSK0660 ($n = 4$ –10). G: Ceramide species content in human primary myotubes in basal condition (BSA), and in response to overnight treatment with 500 $\mu\text{mol/L}$ of palmitate/BSA (Palm) in control myotubes and in response to 3-day treatment with ANP or BNP. \$\$ $P < 0.01$ vs. control BSA; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. control palm ($n = 4$).

strongly reduces the risk of T2D complications (43). Reduced blood glucose levels during fasting and upon oral glucose challenge occurred in the absence of changes in blood insulin levels, indicating an improved metabolic clearance of glucose and insulin sensitivity. These findings are in agreement with other studies showing that increasing plasma BNP levels either pharmacologically (32) and/or genetically (22) improves glucose tolerance in obese mice. Preliminary evidence from our laboratory indicates that ANP-knockout mice are insulin resistant under normal chow diet compared with their wild-type littermates (data not shown), again arguing for a direct physiological link between NP signaling and insulin sensitivity.

Improved blood glucose control and insulin sensitivity were independent of significant changes in total DAGs

and ceramides in liver, neither with noticeable changes in expression level of key metabolic genes in liver and thermogenic genes in white and brown fat of BNP-treated *db/db* and HFD-fed mice. However BNP-treated obese mice had an increased insulin-mediated Akt activation in skeletal muscle. Because Akt activation and phosphorylation are inhibited by lipotoxic lipids such as ceramides and DAGs (33,34), we measured ceramides and DAGs in skeletal muscle. In agreement with the negative correlation found in humans between muscle NPRA and ceramide content, we found a reduced level of total and main species of ceramides as well as main species of sphingomyelin in muscle of both HFD-fed and *db/db* mice chronically treated with BNP. Ceramides inhibit Akt activation and are produced de novo from saturated FAs and from sphingomyelin degradation (33). We also observed reduced

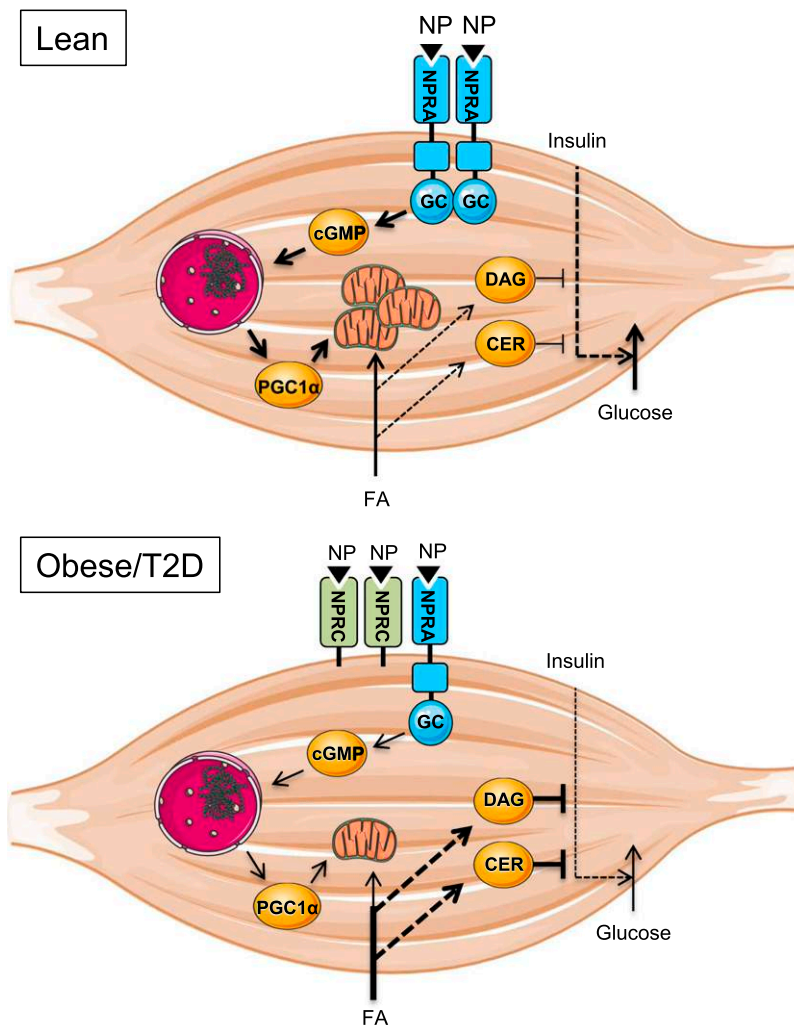


Figure 8—Model linking natriuretic peptide signaling in skeletal muscle and insulin sensitivity. In lean individuals, NPRA activation (bearing an intrinsic guanylyl cyclase activity [GC]) by circulating NP induces PGC1 α expression in a cGMP-dependent manner that leads to increased fat oxidation rates and low levels of lipotoxic DAGs and ceramides (CER), which maintain a normal insulin responsiveness in skeletal muscle. Defective NPR signaling in skeletal muscle during obesity contributes to reduced fat oxidative capacity, increased lipotoxicity, and insulin resistance. Upregulation of NPRC in skeletal muscle as glucose tolerance deteriorates with obesity further inhibits the biological activation of NPRA by circulating NP and reduces NP circulating levels. Solid arrow line, direct effect; dashed arrow line, indirect effect.

muscle total DAG levels in BNP-treated mice. Interestingly, the reduced muscle lipotoxic lipid level was accompanied by a significant upregulation of muscle fat oxidative capacity and *PGC1 α* gene expression. To demonstrate that elevated lipid oxidative capacity can reduce lipid accumulation, we chronically treated human primary myotubes with NP and showed increased palmitate oxidation rates and robustly reduced total lipid, TAG, and DAG accumulation. Chronic NP treatment also prevented palmitate-induced ceramide production in human primary myotubes. Although the precise mechanism was not investigated, it is likely that NP treatment reduces de novo ceramide production by increasing palmitate oxidation. We also show that NP-mediated elevated lipid oxidation involved the induction of PGC1 α , which was independent of PPAR δ activation. We and others

previously described a cGMP-dependent induction of PGC1 α gene expression by NP in white fat and skeletal muscle cells (19,20). PPAR δ can be activated by lipid ligands derived from endogenous TAG lipolysis (31,44). In contrast to what has been shown in human fat cells (35,36), acute NP treatment of human primary myotubes did not influence the rate of lipolysis and TAG-derived FA oxidation or HSL phosphorylation at key regulatory sites.

Our findings provide the first evidence that NPRA signaling in skeletal muscle is pivotal for the maintenance of long-term insulin sensitivity by regulating lipid oxidative capacity through a PGC1 α -dependent pathway. We also provide strong evidence that NPR signaling in skeletal muscle relates to insulin sensitivity and is disrupted in humans and mice with obesity and diabetes. Increasing plasma BNP

levels in obese diabetic mice remarkably improves blood glucose control and could prove a novel therapeutic avenue to alleviate obesity-related insulin resistance.

Acknowledgments. The authors are very grateful to Max Lafontan (I2MC, Toulouse, France) for helpful discussions and critical reading of the manuscript. The authors thank Justine Bertrand-Michel and Aude Dupuy (Lipidomic Core Facility, INSERM, UMR1048 [part of Toulouse Metatoul Platform]) for lipidomic analysis, advice, and technical assistance, and the Anexplo Mouse Phenotyping and Animal Care Facility cores.

Funding. This study was supported by grants from the National Research Agency (ANR-12-JSV1-0010-01) and Société Francophone du Diabète (C.M.) and Fondecyt 11090007-Chile (J.E.G.). D.L. is a member of Institut Universitaire de France.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. M.C. and C.M. researched data and edited and wrote the manuscript. P.-M.B., I.K.V., C.L., K.L., M.-A.M., V.B., E.M., G.T., A.C.R., J.E.G., D.R.J., S.R.S., and D.L. researched data and edited the manuscript. C.M. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Arnlöv J, Ingelsson E, Sundström J, Lind L. Impact of body mass index and the metabolic syndrome on the risk of cardiovascular disease and death in middle-aged men. *Circulation* 2010;121:230–236
- Arnlöv J, Sundström J, Ingelsson E, Lind L. Impact of BMI and the metabolic syndrome on the risk of diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care* 2011;34:61–65
- Wang TJ, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS. Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals. *Circulation* 2007;115:1345–1353
- Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004;109:594–600
- Magnusson M, Jujic A, Hedblad B, et al. Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:638–645
- Lazo M, Young JH, Brancati FL, et al. NH₂-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes. *Diabetes* 2013;62:3189–3193
- Moro C. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:645–649
- Wang TJ. The natriuretic peptides and fat metabolism. *N Engl J Med* 2012;367:377–378
- Moro C, Smith SR. Natriuretic peptides: new players in energy homeostasis. *Diabetes* 2009;58:2726–2728
- Coué M, Moro C. Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. *Biochimie*. 30 May 2015 [Epub ahead of print]
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006;27:47–72
- Gardner DG. Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy? *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:411–416
- Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 2003;93:700–709
- Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J* 2011;278:1808–1817
- Moro C, Lafontan M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304:H358–H368
- Collins S. A heart-adipose tissue connection in the regulation of energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:157–163
- Moro C, Crampes F, Sengenès C, et al. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J* 2004;18:908–910
- Sengenès C, Berlan M, De Giisezinski I, Lafontan M, and Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 2000;14:1345–1351
- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 2012;122:1022–1036
- Engeli S, Birkenfeld AL, Badin PM, et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin Invest* 2012;122:4675–4679
- Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, et al. Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R257–R265
- Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, et al. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes* 2009;58:2880–2892
- Badin PM, Louche K, Mairal A, et al. Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans. *Diabetes* 2011;60:1734–1742
- Riou ME, Pigeon E, St-Onge J, et al. Predictors of cardiovascular fitness in sedentary men. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34:99–106
- Galgani JE, Vasquez K, Watkins G, et al. Enhanced skeletal muscle lipid oxidative efficiency in insulin-resistant vs insulin-sensitive nondiabetic, nonobese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E646–E653
- Bergstrom J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35:609–616
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214–E223
- Vila IK, Badin PM, Marques MA, et al. Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Reports* 2014;7:1116–1129
- Badin PM, Vila IK, Louche K, et al. High-fat diet-mediated lipotoxicity and insulin resistance is related to impaired lipase expression in mouse skeletal muscle. *Endocrinology* 2013;154:1444–1453
- Ukropcova B, McNeil M, Sereda O, et al. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *J Clin Invest* 2005;115:1934–1941
- Badin PM, Loubière C, Coonen M, et al. Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58. *J Lipid Res* 2012;53:839–848
- Plante E, Menaouar A, Danalache BA, Broderick TL, Jankowski M, Gutkowska J. Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic *db/db* mice. *Diabetologia* 2014;57:1257–1267
- Chavez JA, Summers SA. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab* 2012;15:585–594
- Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012;148:852–871
- Moro C, Galitzky J, Sengenès C, Crampes F, Lafontan M, Berlan M. Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:984–992
- Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, et al. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 2003;278:48617–48626
- Pivovarova O, Gögebakan Ö, Klötting N, et al. Insulin up-regulates natriuretic peptide clearance receptor expression in the subcutaneous fat depot in obese subjects: a missing link between CVD risk and obesity? *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E731–E739
- Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Salvi F, et al. A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial

- natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives. *J Hypertens* 1999;17:1301–1305
39. Sarzani R, Strazzullo P, Salvi F, et al. Natriuretic peptide clearance receptor alleles and susceptibility to abdominal adiposity. *Obes Res* 2004;12:351–356
40. Khan AM, Cheng S, Magnusson M, et al. Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3242–3249
41. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7403–7408
42. Heinisch BB, Vila G, Resl M, et al. B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. *Diabetologia* 2012;55:1400–1405
43. DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol* 2011;108(Suppl.):3B–24B
44. Tang T, Abbott MJ, Ahmadian M, Lopes AB, Wang Y, Sul HS. Desnutrin/ATGL activates PPAR δ to promote mitochondrial function for insulin secretion in islet β cells. *Cell Metab* 2013;18:883–895

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Information for:

Defective natriuretic peptide receptor signaling in skeletal muscle links obesity to type 2 diabetes

Marine Coue, Pierre-Marie Badin, Isabelle K. Vila, Claire Laurens, Katie Louche, Marie-Adeline Marquès, Virginie Bourlier, Etienne Mouisel, Geneviève Tavernier, Arild C. Rustan, Jose E. Galgani, Denis R. Joannisse, Steven R. Smith, Dominique Langin, and Cedric Moro

Inventory of Supplemental Information:

1. Supplemental Tables : 5
2. Supplemental Figures : 10

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of the subjects.

	Lean	Obese	IGT/T2D
Sex (male/female)	6/3	5/4	6/4
Age (yrs)	23.8±0.8	23.7±0.8	46.7±3.4 ^{c,e}
Body weight (kg)	68.3±3.3	87.7±6.3 ^b	103.3±4.1 ^{c,d}
BMI (kg/m ²)	22.5±0.5	32.9±0.5 ^c	34.3±1.2 ^c
Body fat (%)	19.7±2.5	27.9±2.1 ^a	30.1±1.4 ^c
GDR (mg.min ⁻¹ .kg ⁻¹ FFM)	9.4±0.7	7.0±0.4 ^c	5.5±0.5 ^{c,d}

Data are Mean ± SEM. BMI: body mass index; GDR: glucose disposal rate; FFM: fat-free mass. ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 versus lean; ^dp<0.05, ^ep<0.01 versus obese.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 2. Correlation between muscle NPRA protein expression and biological variables in humans.

Variables	Human muscle NPRA		
	r	p value	p adj. value
Body weight (kg)	-0.46	0.06	0.06
BMI	-0.46	0.05	0.06
HOMA-IR	-0.48	0.04	0.06
rQUICKI	0.63	0.005	0.025
Fasting Insulin	-0.52	0.03	0.07

BMI: body mass index; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; revised QUICKI. r: Spearman correlation coefficients; non adjusted p value; p_{adj.} value: Benjamini-Hochberg false discovery rate considered statistically significant if ≤ 5%.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 3. Correlation between log fasting plasma BNP and biological variables in db/+ and db/db mice.

Variables	Mouse Log [BNP]		
	r	p value	p adj. value
Body weight (g)	-0.69	0.0007	0.0008
Fat Mass (%)	-0.79	< 0.0001	0.0002
Fasting glucose	-0.76	< 0.0001	0.0002
Fasting insulin	-0.85	< 0.0001	0.0007
HbA1c	-0.70	0.0006	0.0008
Fructosamines	-0.82	< 0.0001	0.0003
Muscle NPRC	-0.59	0.02	0.02

r: Spearman correlation coefficients; non adjusted p value; $p_{adj.}$ value: Benjamini-Hochberg false discovery rate considered statistically significant if $\leq 5\%$.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 4. Correlation between muscle NPRC protein expression and biological variables in db/+ and db/db mice.

Variables	Mouse muscle NPRC		
	r	p value	p adj. value
Fasting glucose	0.64	0.011	0.014
Fasting insulin	0.61	0.016	0.016
HbA1c	0.65	0.009	0.036
Fructosamines	0.65	0.012	0.024

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. r: Spearman correlation coefficients; non adjusted p value; $p_{adj.}$ value: Benjamini-Hochberg false discovery rate considered statistically significant if $\leq 5\%$.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 5. List of mouse primer and probe sequences used for real-time qPCR
Taqman chemistry:

Gene symbol	Taqman Probe ID
UCP1	Mm01244861_m1
TFAM	Mm00447485_m1
GLUT1	Mm00441480_m1
GLUT2	Mm00446229_m1
GLUT4	Mm00436615_m1
CPT1 β	Mm00487200_m1
GYS1	Mm00472712_m1
PCK1	Mm00440636_m1
18S	Hs99999901_s1

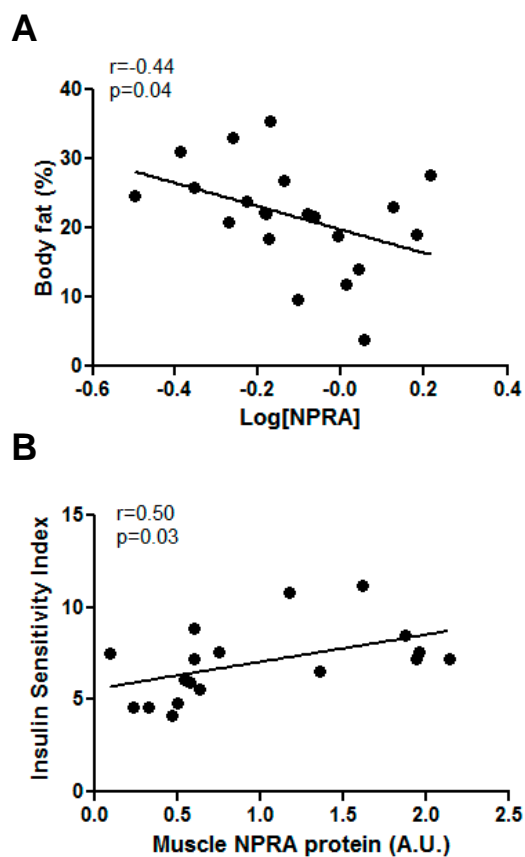
SYBR chemistry:

Gene symbol	Forward	Reverse
PPAR α	AGTTCACGCATGTGAAGGCTG	TGTTCCGGTTCTTCTTCTGAATC
G6P	ACACCGACTACTACAGCAACAG	CCTCGAAAGATAGCAAGAGTAG
PGC1 α	CTGTGTCACCACCCAAATCCTTAT	TGTGTCGAGAAAAGGACCTTGA

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure S1. Correlation between muscle NPRA protein and clinical variables in humans

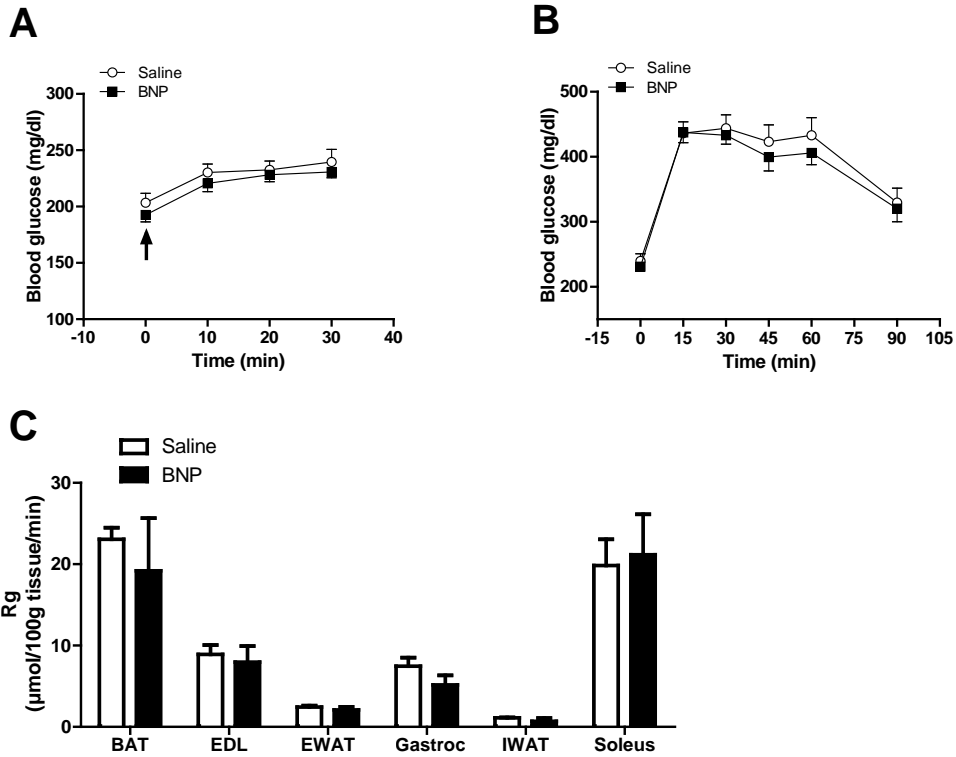
Correlation between *vastus lateralis* NPRA protein expression, and (A) percent body fat (n=21), and (B) the McAuley insulin sensitivity index measured during an oral glucose tolerance test in human subjects with normal glucose tolerance (n=18).



SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure S2. Acute effect of BNP injection on insulin sensitivity

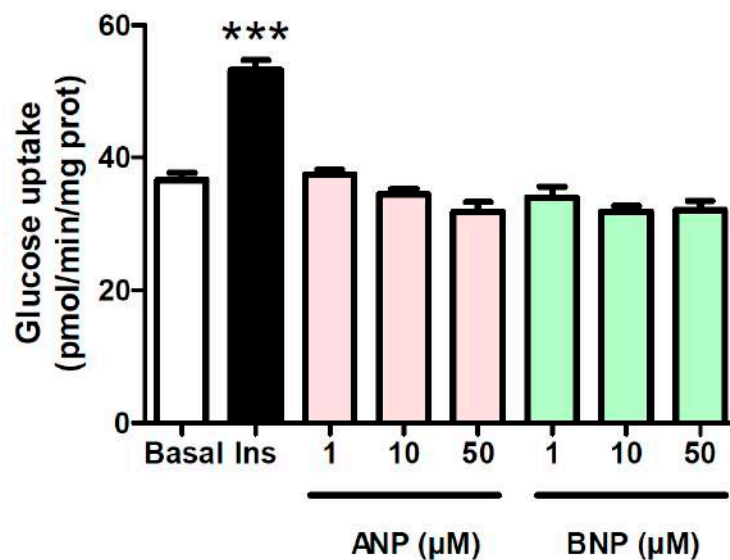
Fasted C57BL/6 mice fed standard chow diet were injected intraperitoneously with saline (0.9% NaCl) or with BNP (1 µg/kg) solution (arrow) and fasting blood glucose was measured (A) every 10 min in the basal state and (B) every 15 min during an i.p. GTT (n=11). (C) Tissue-specific glucose uptake was measured during a radiolabeled GTT with [2-³H]deoxyglucose (n=6).



SUPPLEMENTARY DATA

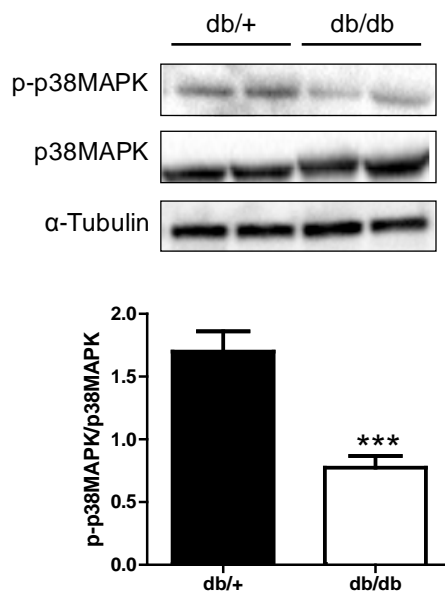
Supplementary Figure S3. Effect of acute NP treatment on glucose uptake in human primary myotubes

Glucose uptake was measured in presence of 1, 10 and 50 μM of ANP or BNP, and 1 μM of insulin in human primary myotubes. *** $p < 0.001$ vs. saline (n=6).



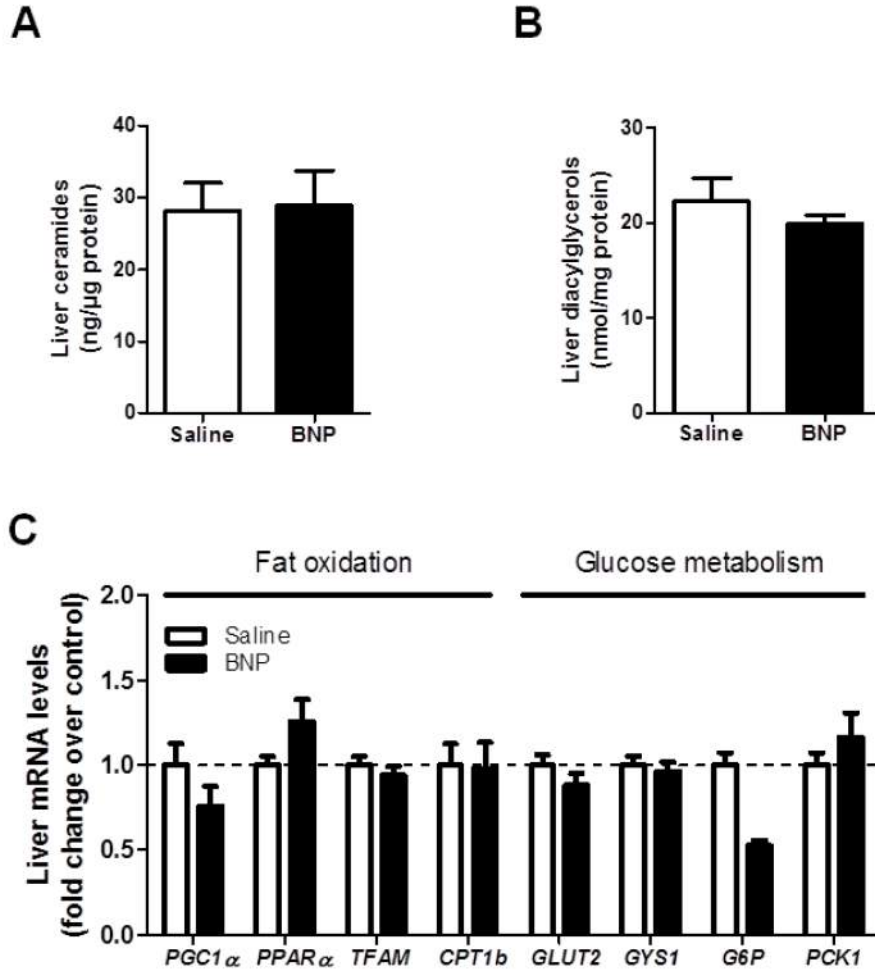
SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure S4. Representative blots and quantitative bar graph of p38MAPK phosphorylation relative to total p38MAPK and α -tubulin in *gastrocnemius* muscle of db/+ versus db/db mice. *** $p < 0.0001$ vs. db/+ (n=8).



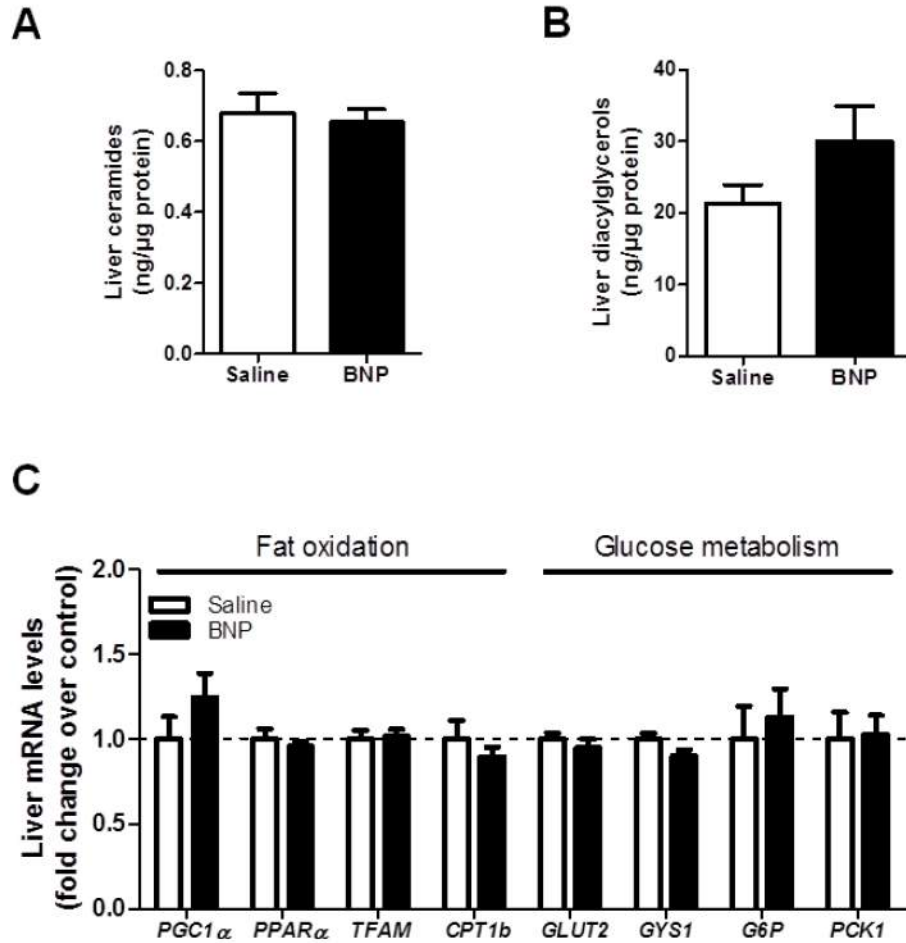
Supplementary Figure S5. Chronic BNP treatment does not change lipid levels and gene expression in liver of db/db mice

(A) Total ceramides, (B) total diacylglycerols levels, and (C) mRNA levels of genes involved in fat oxidation and glucose metabolism in liver of saline- and BNP-treated db/db mice.



Supplementary Figure S6. Chronic BNP treatment does not change lipid levels and gene expression in liver of HFD-fed mice

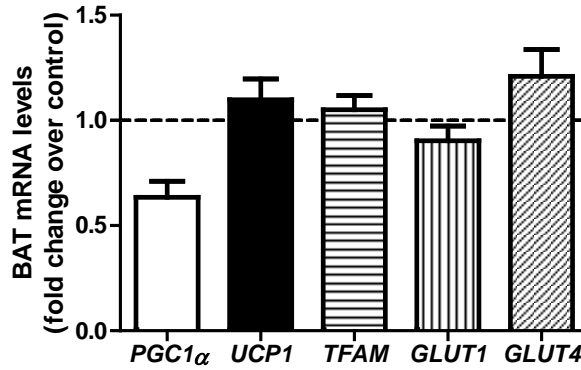
(A) Total ceramides, (B) total diacylglycerols levels, and (C) mRNA levels of genes involved in fat oxidation and glucose metabolism in liver of saline- and BNP-treated HFD-fed mice.



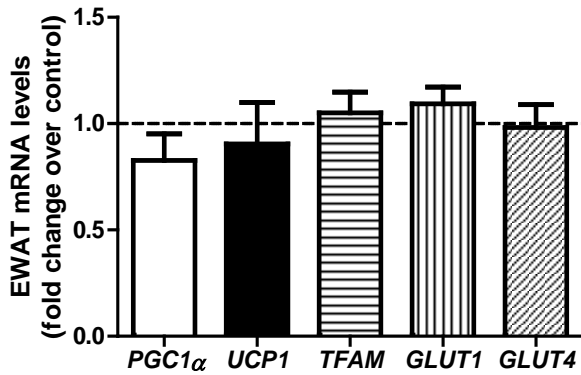
Supplementary Figure S7. Expression of thermogenic and brown/beige gene markers in adipose tissues of db/db mice

PGC1 α , *UCP1*, *TFAM*, *GLUT1* and *GLUT4* mRNA levels in (A) BAT and (B) EWAT of db/db mice treated for 4 weeks with BNP (n=8-10).

A



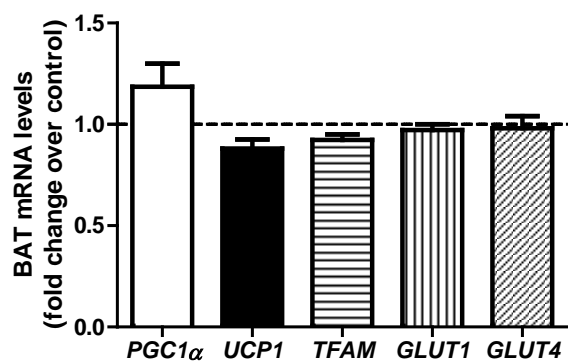
B



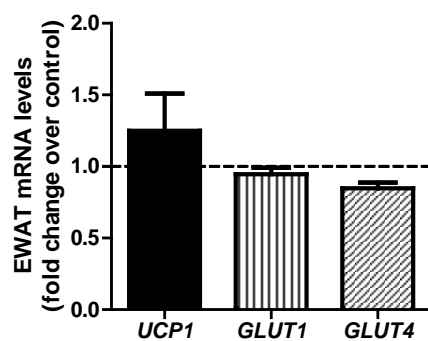
Supplementary Figure S8. Expression of thermogenic and brown/beige gene markers in adipose tissues of HFD-fed mice

(A) *PGC1 α* , *UCP1*, *TFAM*, *GLUT1* and *GLUT4* mRNA levels in BAT and (B) *UCP1*, *GLUT1* and *GLUT4* gene expression in EWAT of HFD mice treated for 4 weeks with BNP (n=8-10).

A

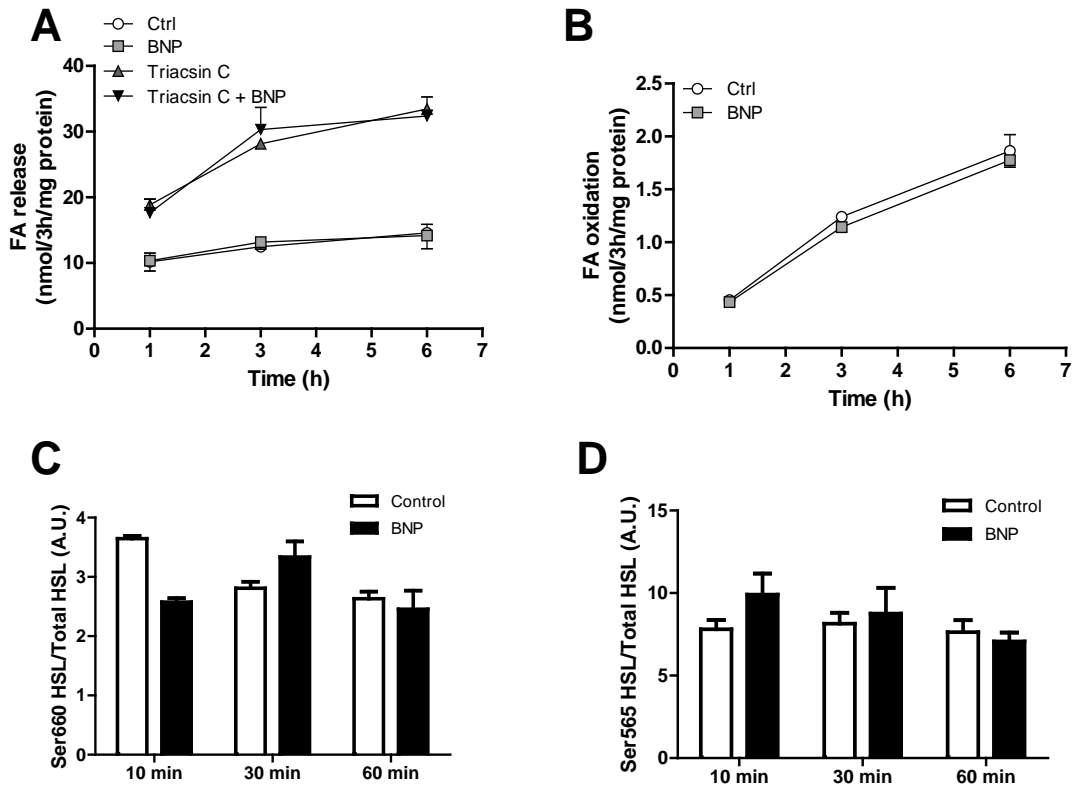


B



Supplementary Figure S9. Effect of acute BNP treatment on lipolysis in human primary myotubes

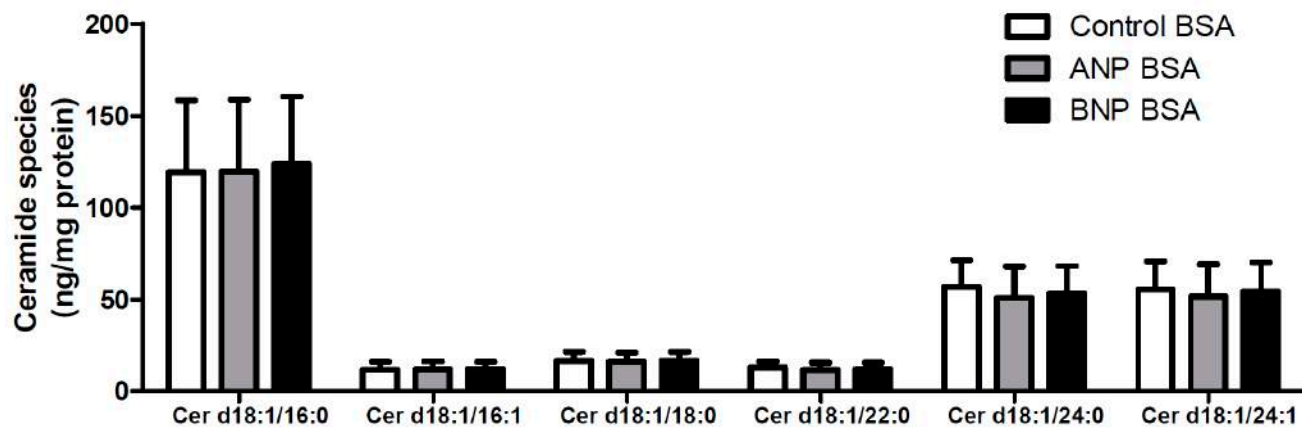
Time-course of (A) fatty acid (FA) release and (B) FA oxidation from endogenous pre-labeled TAG pools in response to 1, 3 or 6 hours BNP treatment in the presence or absence of triacsin C to block FA recycling into TAG pools. (C) HSL Ser660 and (D) HSL Ser565 phosphorylation were measured after 10, 30 and 60 min acute stimulation with 100 nM of BNP in human primary myotubes (n=3-5).



SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure S10. Effect of chronic NP treatment on basal ceramides content in human primary myotubes.

Ceramide species content in human primary myotubes in basal condition (BSA) in control myotubes and in response to 3-days treatment with 100 nM of ANP or BNP (n=4).



DISCUSSION DE LA DEUXIEME PARTIE

La lipolyse adipocytaire induite par les PN est une spécificité des primates, le faible ratio NPRA/NPRC ne permettant pas la transduction du signal dans l'adipocyte murin. Par ailleurs, une augmentation des concentrations plasmatiques de PN chez la souris améliore la tolérance au glucose, phénotype qui ne peut donc pas être expliqué par une action adipocytaire des PN et qui s'accompagne de la présence de mitochondries géantes dans le muscle squelettique (Miyashita, Itoh et al. 2009). ***Le but de ce second travail a donc été d'étudier la signalisation aux PN dans le muscle squelettique au cours de l'obésité et du DT2, ainsi que leurs potentiels rôles thérapeutiques dans des modèles murins d'obésité/DT2.***

L'analyse sur biopsies musculaires humaines nous a d'abord permis de constater que l'expression protéique du NPRA, corrèle positivement avec la sensibilité à l'insuline et négativement avec le contenu musculaire en céramides saturés et le pourcentage de masse grasse. Ces 2 derniers facteurs ont été démontré pour être impliqués dans l'insulinorésistance (Chavez and Summers 2012, Samuel and Shulman 2012). De plus, l'expression protéique du NPRA musculaire est sévèrement altérée chez les individus obèses normoglycémiques comparativement à leurs contrôles du même âge et sans changement de l'expression du NPRC. Cette répression sur le récepteur biologiquement actif aux PN semble réversible après une perte de poids à la suite d'un régime hypocalorique, elle même associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence un lien entre l'expression musculaire du NPRA et la sensibilité à l'insuline. De manière tout à fait intéressante, le NPRC est en revanche plus exprimé chez les individus obèses intolérants au glucose ou DT2 que chez leurs contrôles normoglycémiques ayant le même IMC. Cette hausse du récepteur de clairance pourrait diminuer l'accès et donc les effets des PN circulants aux muscles squelettiques. Nous n'avons malheureusement pas pu doser les niveaux circulants de PN chez ces différents individus mais il aurait été intéressant de les corrélés avec différents paramètres comme le contenu en céramides musculaires. Au vu de ces résultats chez l'homme, la signalisation musculaire aux PN semble tout à

fait importante dans la maintenance de la sensibilité à l'insuline à long terme. Nous avons ensuite étudié cette voie chez la souris rendue obèse par 16 semaines de régime où 60% des calories sont apportées par les graisses et également chez la souris db/db, rendue obèse et DT2 par une mutation génétique du récepteur à la leptine. Chez la souris nutritionnellement obèse et glucotolérante, seule la protéine NPRA est significativement diminuée dans le muscle squelettique, le TABl et le TABr. On retrouve ces résultats chez la souris DT2 auquel s'ajoute une augmentation de l'expression du NPRC dans ces tissus ainsi qu'une diminution significative des niveaux circulants de BNP. Les différences observées entre les souris nutritionnellement obèses et les db/db sont en accord avec la littérature où il a été démontré que le *natriuretic peptide handicap* du sujet obèse est attribuable à l'insulinorésistance (Khan, Cheng et al. 2011). Cela signifie que lors d'une obésité/DT2, l'action musculaire des PN est entravée par au moins 3 processus différents : 1) une diminution du récepteur biologiquement actif NPRA, 2) une augmentation du récepteur de clairance NPRC et 3) une altération des concentrations plasmatiques de PN. L'expression du NPRC pourrait être induite par une hyperinsulinémie, depuis qu'il a été mis en évidence qu'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique élève l'expression du NPRC dans le TA humain (Pivovarova, Gogebakan et al. 2012). Si l'expression du NPRC adipocytaire avait déjà été reliée à des dysfonctions métaboliques chez la souris (Miyashita, Itoh et al. 2009) et l'homme (Sarzani, Strazzullo et al. 2004), dans notre étude, seul le NPRC musculaire corrèle négativement avec les concentrations sanguines de BNP. L'implication du NPRC musculaire dans le concept de *NPH* est supportée par le fait que les PN circulants des souris n'exprimant pas de NPRC ont une demi-vie ainsi qu'une activité biologique augmentées (Matsukawa, Grzesik et al. 1999). Et sachant que le muscle squelettique représente 40% de la masse corporelle totale, même une légère modification de l'expression du NPRC, pourrait avoir un impact considérable sur l'activité biologique des PN plasmatiques. Un autre résultat important est la diminution marquée de la phosphorylation activatrice de p38 MAPK chez les souris db/db comparé aux souris db/+. Si l'on considère p38 MAPK comme un effecteur moléculaire de la transduction du signal natriurétique, comme c'est le cas dans l'adipocyte (Bordicchia, Liu et al. 2012), cette observation confirme qu'une dérégulation du ratio protéique NPRA/NPRC dans le muscle squelettique pourrait contribuer à l'obésité/DT2.

Nous avons, ensuite, voulu savoir si une perfusion de BNP peut restaurer, au moins en partie, les conséquences du *NPH* lié à l'obésité/DT2. Nous n'avons pas observé d'effet d'un traitement aigu de BNP sur le métabolisme du glucose que ce soit *in vivo* chez la souris ou *in vitro* sur des cultures primaires de myotubes humains, ce qui signifie que les actions des PN passent très certainement par d'autres modulations, au moins dans le muscle contrairement à ce qui est connu sur les rôles adipocytaires des PN chez l'homme (Sengenès, Berlan et al. 2000). Pour vérifier cela, nous avons perfusé du BNP pendant 4 semaines, via l'utilisation de mini-pompes osmotiques, aux souris rendues obèses nutritionnellement ou génétiquement (db/db). Nous avons choisi d'infuser du BNP pour permettre une distribution plus homogène du peptide dans l'organisme murin car sa demi-vie est en moyenne 4-7 fois plus longue que celle de l'ANP (Potter 2011). A des doses ne restaurant que partiellement une réponse physiologique normale du NPRA tissulaire, une infusion chronique de BNP réduit très significativement la glycémie à jeun tout comme l'hémoglobine glyquée, marqueur prédit pour corrélérer avec les futures complications liées au DT2 (DeFronzo and Abdul-Ghani 2011). Cette amélioration du contrôle glycémique dans nos deux modèles murins ne s'accompagne pas de changement de la composition corporelle, ni de la sécrétion d'insuline que ce soit à jeun ou après un challenge au glucose. Ceci indique une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la captation du glucose par les tissus périphériques. Ceci est en accord avec d'autres travaux montrant qu'une élévation des niveaux circulants de PN augmente la tolérance au glucose chez des souris obèses (Miyashita, Itoh et al. 2009, Plante, Menaouar et al. 2014).

Le reste du travail a donc consisté à caractériser les voies et les organes impliqués dans ces bénéfices métaboliques. Nous n'avons pas détecté de changement d'accumulation de DAG, ou de céramides hépatiques, ni dans l'expression des gènes métaboliques clés que ce soit dans le foie, le TABl ou le TABr dans nos deux modèles de souris traitées au BNP. Nous avons, en revanche, mis en évidence que les muscles squelettiques des animaux obèses traités au BNP avaient une augmentation de la phosphorylation activatrice d'Akt sur la Ser473 après stimulation à l'insuline. Sachant que cette phosphorylation d'Akt est inhibée par des intermédiaires lipotoxiques tels que les DAG ou les céramides (Chavez and Summers 2012, Samuel and Shulman 2012), nous avons mesuré leur présence musculaire. Nous montrons que le BNP diminue

effectivement l'accumulation des espèces majoritaires de DAG musculaires, des céramides totaux ainsi que des sphingomyélines, ces dernières pouvant servir de précurseurs à la synthèse *de novo* de céramides (Chavez and Summers 2012). Ces résultats ne sont pas sans rappeler la corrélation négative que nous avons mis en évidence entre le NPRA et l'accumulation de céramides musculaires chez l'homme, démontrant ainsi que les effets musculaires des PN sont très certainement transposables entre ces deux espèces. De plus, ces diminutions d'espèces lipotoxiques après traitement au BNP sont concomitantes avec une augmentation de la capacité oxydative des lipides musculaires et de l'expression génique de *Pgc1α*. Ces résultats sont retrouvés dans des cultures de myotubes humains après un traitement de 72h à l'ANP ou au BNP où nous démontrons également que les PN préviennent de l'accumulation des céramides induite par une forte concentration de palmitate (500 μM, 16h). Ceci est en accord avec des données récentes de la littérature démontrant une activation de PGC1α dépendante du GMPc dans des cellules musculaires humaines (Engeli, Birkenfeld et al. 2012) et dans des adipocytes humains (Bordicchia, Liu et al. 2012). Cette activation a également été rapportée après un traitement par le NO dans de nombreux tissus (Nisoli, Clementi et al. 2003). Nous avons également démontré que l'activation de PGC1α est indépendante de celle de PPARδ, ce dernier pouvant être activé par des dérivés lipidiques de la lipolyse (Badin, Loubiere et al. 2012, Tang, Abbott et al. 2013). Ceci est tout à fait concordant avec le fait que nous ne voyons pas d'effet direct des PN sur la lipolyse musculaire, et que la diminution de l'accumulation des lipides serait causée par l'augmentation de leur oxydation. Au vu de ces résultats, nous proposons donc que les PN augmentent la capacité oxydative des lipides, en activant PGC1α, ce qui va diminuer l'encombrement des espèces lipotoxiques musculaires et ainsi protéger partiellement l'insulinosensibilité de l'organisme dans un contexte d'obésité/DT2.

En conclusion, ces données fournissent pour la première fois l'évidence que la signalisation aux PN dans le muscle squelettique est une voie clé dans la maintenance de la sensibilité à l'insuline à long terme en acheminant les lipides intracellulaires vers leur oxydation (**Figure 17**). De plus, nous avons vu que le système PN/NPR musculaire est totalement perturbé en cas d'obésité/DT2 aussi bien chez la souris que chez l'homme et qu'une élévation des niveaux circulants de PN rétablit, au moins en partie, la tolérance au glucose. La stimulation de la signalisation aux PN dans le muscle squelettique dans le

but de palier aux *natriuretic peptide handicap* ouvre une nouvelle possibilité thérapeutique pour limiter le développement de l'insulinorésistance liée à l'obésité.

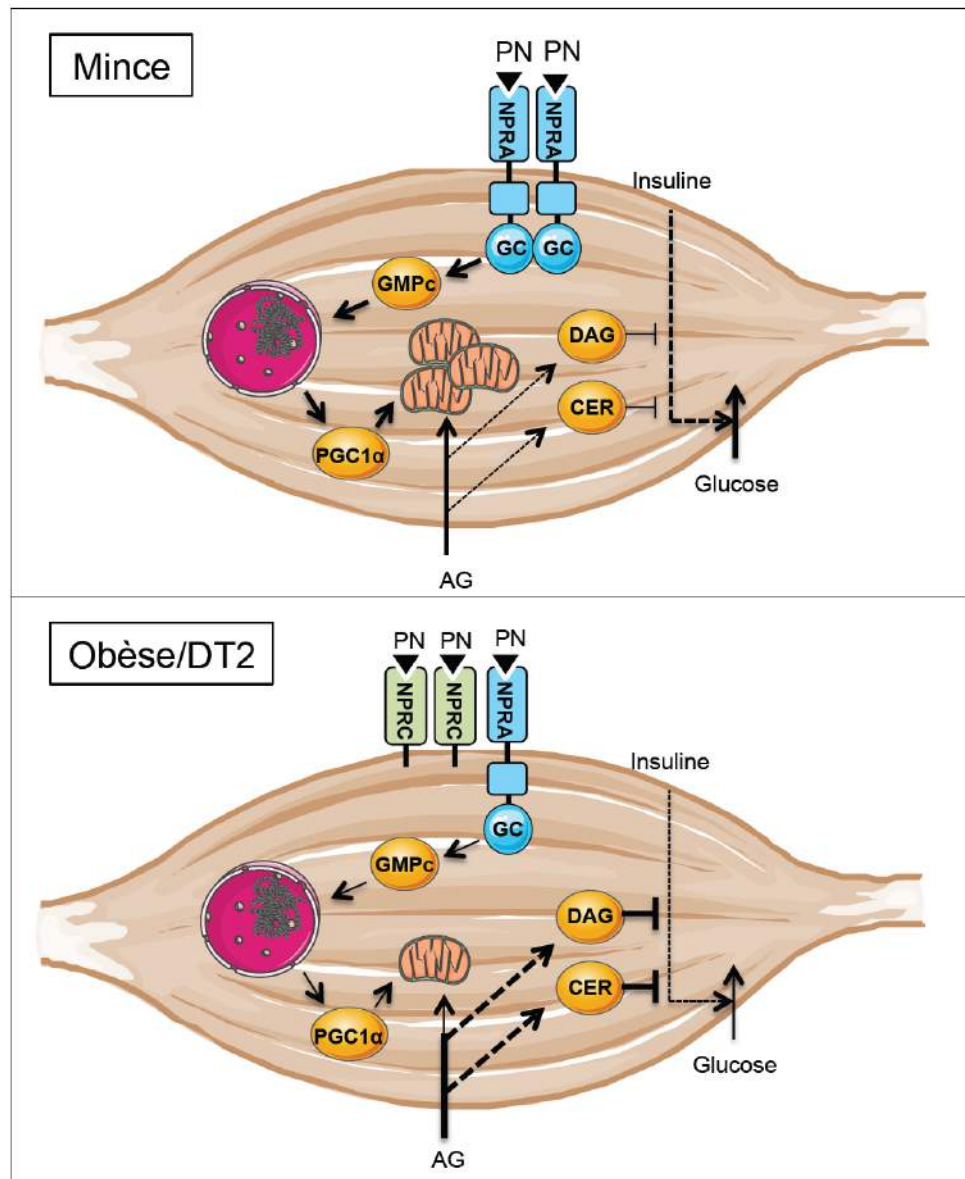


Figure 17 : Modèle illustrant la relation entre la signalisation aux PN et la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique. Chez l'individu mince, les PN circulants lie le NPRA musculaire pour induire l'expression de PGC1 α , de façon GMPc dépendante, ce qui mène à une augmentation de l'oxydation des graisses et limitent l'accumulation des espèces lipotoxiques (DAG, CER) maintenant ainsi une sensibilité à l'insuline normale. Durant l'obésité/Diabète de type 2, le *natriuretic peptide handicap*, qui s'exprime par un défaut d'activation de la signalisation aux PN, s'accompagne d'une diminution de la capacité oxydative lipidique conduisant à un amoncellement ectopique des espèces lipotoxiques et à une insulinorésistance du muscle squelettique. PN : Peptide natriurétique ; GC : Guanylyl cyclase ; DAG : Diacylglycérol ; CER : Céramides ; AG : Acides gras

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse met en évidence l'étroite relation qui existe entre l'expression des récepteurs aux PN et leur signalisation dans le TA et le muscle squelettique avec la sensibilité à l'insuline. Dans ces deux organes cibles de l'insuline et importants pour la régulation de l'homéostasie glucidique, on observe une altération de la signalisation aux PN dans un contexte d'obésité et de DT2 qui se traduit par :

- _ une diminution de l'expression du NPRA
- _ une augmentation de l'expression du NPRC
- _ une moindre concentration en PN circulants

Le premier article sur les effets adipocytaires des PN met en évidence une nouvelle voie de transport du glucose dépendante de l'activation d'une PKG. Il se pose alors la question de la pertinence physiologique de cette observation et si l'activation de cette voie peut améliorer le contrôle glycémique d'un sujet insulino-résistant/DT2. Cette question est capitale sachant qu'un traitement de cellules hMADS aux PN induit également leur brunissement aux mêmes concentrations que celles utilisées dans notre publication (Bordicchia, Liu et al. 2012). Le TABr a été démontré pour être un grand consommateur de glucose par gramme de tissu (Liu, Perusse et al. 1994) et pour réguler l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline systémique (Stanford, Middelbeek et al. 2013). Au vu de ces résultats, le système natriurétique pourrait donc exercer ces effets bénéfiques sur le métabolisme glucidique en activant le transport de glucose adipocytaire et en induisant le brunissement du TA blanc.

Une autre question que ce travail soulève est la transversalité de ce phénomène entre espèces ou si c'est une autre spécificité humaine tout comme la lipolyse induite par les PN. En effet, un traitement à 1 μ M d'ANP sur des adipocytes de rat augmente de 2,8 fois les concentrations intracellulaires de GMPc contre 258 fois dans des adipocytes humains (Sengenès, Zakaroff-Girard et al. 2002). Ce phénomène est expliqué par la différence du ratio NPRA/NPRC, qui est environ 100 fois plus faible dans les adipocytes issus de rongeurs. Ce ratio est d'une importance primordiale sachant que l'ANP a la

même affinité relative pour le NPRA que pour le NPRC (**Tableau 3**). De plus, les adipocytes provenant de souris dont le gène du NPRC ne s'exprime pas, répondent à 100 nM d'ANP par une hausse de la libération de glycérol contrairement aux adipocytes de souris contrôles (Bordicchia, Liu et al. 2012). Il semblerait donc peu probable que les PN augmentent le transport de glucose dans l'adipocyte murin. Cependant, la perfusion de BNP pendant une semaine à des souris, via l'utilisation de mini-pompes osmotiques, augmente significativement l'expression protéique d'UCP1, de PGC1 α et du cytochrome C dans le tissu adipeux brun et blanc de la souris C57Bl/6 via une signalisation PKG dépendante, parallèle à la voie PKA (Bordicchia, Liu et al. 2012). Nous n'avons détecté aucune induction des gènes du programme thermogénique dans nos souris perfusées au BNP (second article) mais nous avons perfusé une plus faible dose de BNP. Les observations du laboratoire de Sheila Collins pourraient être la conséquence d'un effet direct des PN sur le tissu adipeux, ou indirect hormonal ou neuronal via l'activation du système nerveux sympathique. Pour répondre à cette question, notre laboratoire est actuellement en train de générer des souris C57Bl/6 n'exprimant pas le NPRA (NPRA -/-) ou son ligand, l'ANP (ANP -/-), ces dernières étant déjà disponibles. La comparaison des deux phénotypes va permettre de discriminer une éventuelle compensation du système natriurétique qui pourrait avoir lieu chez les souris ANP -/- par une hausse des concentrations plasmatiques de BNP, une augmentation du ratio NPRA/NPRC, une optimisation du signal post-récepteur... Nous prévoyons de mettre ces souris au froid pour regarder le maintien de leur température corporelle ainsi que l'expression de gènes clés du brunissement dans les différents dépôts adipeux. La caractérisation des actions métaboliques des PN chez la souris et l'homme est primordiale pour l'aménagement potentiel de nouvelles voies thérapeutiques.

Après avoir démontré que l'obésité/DT2 s'accompagne d'un *NPH* au niveau adipocytaire et musculaire et qu'une élévation des niveaux circulants de PN améliore le phénotype métabolique des souris obèses et diabétiques, il reste néanmoins à démontrer s'il existe un lien causal entre le *NPH* et le développement de dysfonctions métaboliques. Nous pensons dans un premier temps à une approche *in vitro* qui consisterait à transfecter la culture primaire de myotubes humains avec un adénovirus surexprimant le gène *NPRC* et/ou un shRNA *NPRA* dans le but de se rapprocher du ratio NPRA/NPRC musculaire d'un sujet obèse/DT2. Puis nous traiterons ces cellules aux PN

et au palmitate pour analyser si nous perdons l'effet protecteur des PN que nous démontrons dans le second article (G, Figure 8).

Nous allons également caractériser métaboliquement les souris ANP $-/-$ et NPRA $-/-$ (poids, composition corporelle, test de tolérance au glucose, test de tolérance à l'insuline) en régime normal et en régime riche en graisses. Si les souris invalidées pour l'ANP ou le NPRA ont été largement décrites dans la littérature d'un point de vue cardiovasculaire (Kuhn 2005), peu de données existent sur leur phénotype métabolique. En revanche, Miyashita et coll. ont soumis des souris hétérozygotes pour le NPRA (NPRA $+/-$) à un régime où 45% des calories sont apportées par les graisses pendant 6 semaines (Miyashita, Itoh et al. 2009). Ces souris hétérozygotes ont une augmentation significative de la prise de poids, de l'intolérance au glucose et de la masse grasse pour une même prise alimentaire comparée aux souris contrôles. Si l'on en croit ces résultats, nous devrions voir un phénotype exacerbé chez nos souris NPRA $-/-$. Des données préliminaires du laboratoire indiquent que les souris ANP $-/-$ sont insulino-résistantes et intolérantes au glucose en régime standard comparé à leurs contrôles de la même fratrie (**Figure 18**). Et cela, sans modification de la prise de poids, confirmant que le *NPH* partage un lien plus étroit avec l'insulino-résistance que le poids corporel comme précédemment décrit (Khan, Cheng et al. 2011, Walford, Ma et al. 2014). Ces observations abondent dans le sens d'un lien physiologique direct entre la signalisation aux PN et la sensibilité à l'insuline.

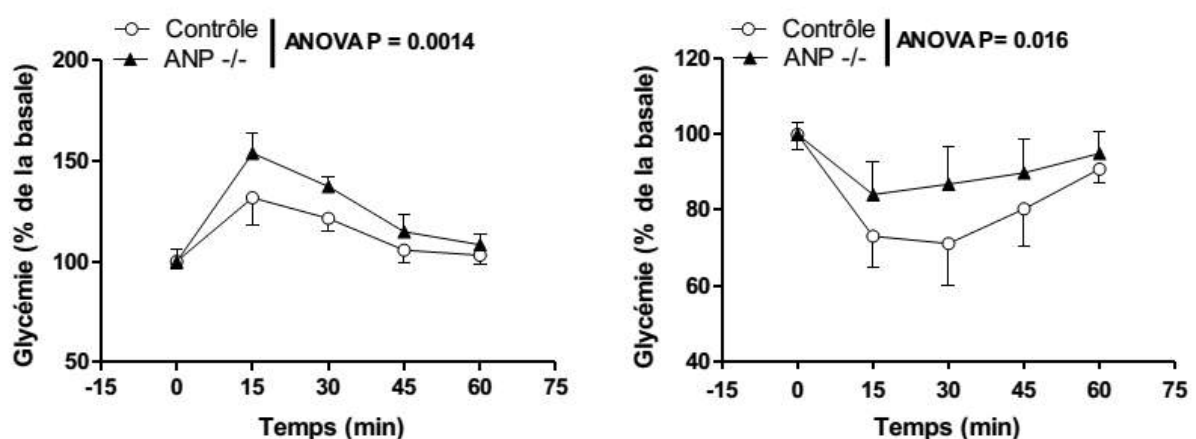


Figure 18 : Caractérisation métabolique préliminaire des souris ANP $-/-$. (A) Test de tolérance au glucose et (B) à l'insuline, chez des souris n'exprimant pas l'ANP (ANP $-/-$, triangle noir) et leurs contrôles issus de la même fratrie (Contrôle, rond blanc). (N= 8 souris/groupe).

Si ces premiers résultats indiquent qu'un déficit du système natriurétique *per se* suffit à induire le développement de l'insulinorésistance, les résultats de notre second papier chez la souris rendue obèse nutritionnellement suggèrent que l'obésité/DT2 entraîne le développement d'un *NPH*. Cela signifie que différents mécanismes peuvent être à l'origine du *NPH* et que ce dernier crée certainement un cercle vicieux avec l'apparition/développement des maladies métaboliques/cardiovasculaires. La démonstration causale de l'implication spécifique d'une altération du système PN au niveau du TA et du muscle squelettique ne pourra être pleinement démontrée que par l'utilisation de souris spécifiquement invalidées pour les récepteurs dans l'un ou l'autre de ces deux tissus. Des souris floxées pour le gène codant pour le NPRA ont été créées par la laboratoire de Michaela Kuhn dans le but de générer des souris dépourvues de NPRA spécifiquement dans les cellules musculaires lisses (Holtwick, Gotthardt et al. 2002). Ces souris floxées pourraient être croisées avec des souris exprimant la recombinaison Cre sous le promoteur de l' α -actine spécifique du muscle squelettique humain (souris HSA-Cre). Ces dernières sont disponibles au Jackson et sont utilisées dans plusieurs laboratoires tels que l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) de Strasbourg (Miniou, Tiziano et al. 1999). Une autre approche serait d'injecter un adénovirus associé (AAV) visant le *Npr1* dans les muscles d'une souris, tels que le *tibialis anterior* ou le *gastrocnemius*. Cette technique présente l'avantage que la souris soit son propre contrôle, en injectant un AAV contrôle dans l'autre patte. Nous analyserions alors des modulations métaboliques plus fines, comme l'accumulation d'espèces lipotoxiques et la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle injecté. En miroir de ces expériences, il serait également intéressant d'éteindre le NPRC chez des souris nourries en régime hyperlipidique, pour regarder les quantités de DAG/céramides ainsi que la capacité oxydative lipidique du muscle n'exprimant pas le NPRC.

En ce qui concerne le tissu adipeux, il serait intéressant d'étudier des souris invalidées pour le récepteur NPRC spécifiquement dans ce tissu. Cela permettrait de savoir si la demi-vie plasmatique des PN est modulée et si cela est associé à des améliorations métaboliques des souris placées sous régime riche en graisses. Nous regarderions également le brunissement du TABI de ces souris, ainsi que le transport de glucose sur adipocytes isolés. Pour pouvoir toujours mieux utiliser la souris comme modèle de pathologies humaines, il convient de bien caractériser les différences espèce-

spécifiques. A ma connaissance, les souris floxées pour le gène *Npr3* n'existent pas, il faudrait donc les créer. Ces souris pourraient être croisées avec des souris exprimant la recombinase CRE-ERT2 sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine, et présenteraient l'avantage de pouvoir induire l'expression de la CRE via une injection de tamoxifène.

Les PN sont donc reconnus comme de puissants effecteurs de la lipolyse. Nous démontrons ici qu'ils augmentent la capacité oxydative lipidique dans le muscle squelettique murin et humain. Il serait alors intéressant d'étudier l'importance de ce système lors de l'exercice physique. En effet, il est connu que l'exercice physique induit la sécrétion de PN, ce qui va activer la lipolyse adipocytaire pour fournir en AG, l'énergie nécessaire aux muscles squelettiques (**Figure 19**). De plus, dans ce dernier, les PN favorisent l'oxydation des graisses en augmentant l'expression de *PGC1 α* via l'activation de p38 MAPK. Dans les perspectives de mon travail de thèse, nous envisageons d'étudier la tolérance à l'exercice de souris ANP $-/-$ sur tapis roulant ainsi que l'impact de l'absence d'ANP sur la fonction musculaire en régime nutritionnel standard.

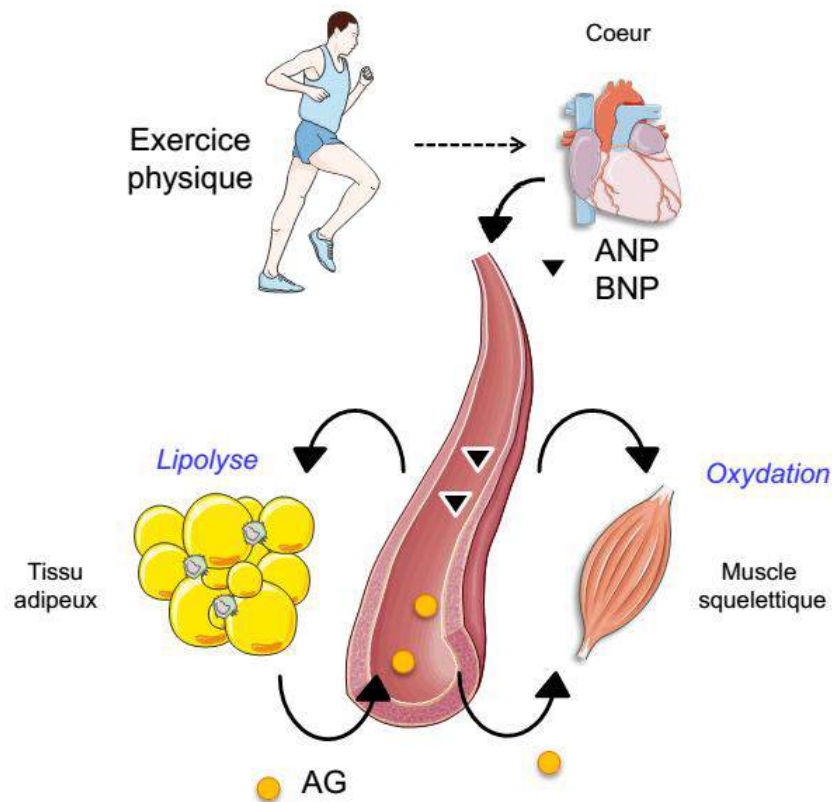


Figure 19 : Dialogue hypothétique cœur/tissu adipeux/muscle squelettique lors de l'exercice physique. AG : acides gras.

Une question plus finaliste est de se demander pourquoi le ratio NPRA/NPRC décroît avec l'augmentation de l'IMC, phénomène retrouvé dans le tissu adipeux et le muscle squelettique de sujet obèses/insulinorésistants. Cela pourrait être une sorte d'adaptation physiologique pour freiner la lipolyse du tissu adipeux chez des individus où les quantités circulantes d'AG sont déjà augmentées et ainsi limiter les dépôts de lipides ectopiques dans les organes métaboliques. De plus, les PN ont également été démontrés pour induire le brunissement de l'adipocyte blanc (Bordicchia, Liu et al. 2012), or les individus obèses possèdent déjà une importante couche de graisse thermo-isolante. Au niveau du muscle squelettique, il a été publié qu'un traitement de myotubes humains aux PN augmente l'expression des transporteurs d'AG tels que CD36, FABP3 et FATP1 (Engeli, Birkenfeld et al. 2012). Ainsi l'organisme de sujets obèses/diabétiques pourrait limiter l'entrée des lipides dans les muscles squelettiques en diminuant l'accès des PN. Même s'il a été prouvé que les PN augmentent la capacité oxydative musculaire, l'organisme pourrait privilégier de restreindre l'accès des lipides dans un tissu en contenant déjà beaucoup et où les systèmes de « désengorgement » des espèces lipidiques sont débordés. Nous pensons alors que rétablir l'accès des PN aux tissus cibles, couplés avec une hygiène de vie saine, pourrait avoir de réels effets bénéfiques chez des individus obèses et diabétiques de type 2.

ANNEXE I

Contrôle de la balance énergétique et de l'homéostasie du glucose par les peptides natriurétiques

Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis

Marine Coué and Cedric Moro

Biochimie. 2015 May 30. pii: S0300-9084(15)00163-7



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis

Marine Coué ^{a, b}, Cedric Moro ^{a, b, *}^a Inserm UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Obesity Research Laboratory, Toulouse, France^b Paul Sabatier University, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2015

Accepted 19 May 2015

Available online xxx

Keywords:

Natriuretic peptides

cGMP

Type 2 diabetes

Obesity

Lipid metabolism

Skeletal muscle

ABSTRACT

Cardiac natriuretic peptides (NP) have recently emerged as metabolic hormones. Physiological stimulation of cardiac NP release as during exercise may contribute to increase fatty acid mobilization from adipose tissue and their oxidation by skeletal muscles. Clinical studies have shown that although very high plasma NP level characterizes cardiac dysfunction and heart failure, a consistently reduced plasma NP level is observed in metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. A low circulating NP level also predicts the risk of new onset type 2 diabetes. It is unclear at this stage if the “natriuretic handicap” observed in obesity is causally associated with the incidence of type 2 diabetes. Recent work indicates that NP can activate a thermogenic program in brown and white fat, increase energy expenditure and inhibit food intake. Mouse studies also argue for a key role of NP in the regulation of energy balance and glucose homeostasis. This review will focus on recent human and mouse studies to highlight the metabolic roles of NP and their potential relevance in the context of obesity and type 2 diabetes.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Atrial natriuretic peptide (ANP) was discovered and isolated from rat atrial extracts about three decades ago as « a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties » [1]. Brain NP (BNP) and C-type NP (CNP) were later identified as other members of this family of hormones. ANP and BNP secretion by the heart illustrated for the first time the endocrine role of the heart in the control of sodium and water homeostasis.

During the last decade, NP have emerged as metabolic hormones (Fig. 1). Pioneer studies reported a potent lipolytic role in human fat cells as previously discussed [2,3]. More recent work illustrates that NP control not only fat mobilization, but also fat utilization by promoting energy dissipation as heat in brown adipose tissue (BAT) [4], facilitating the browning process of white adipose tissue (WAT) [4] as well as fat oxidation in skeletal muscle [5]. It was also shown that NP can target the liver, the pancreas, the gut and the central nervous system to influence metabolic regulation. In parallel, numerous epidemiological and cohort studies reported a negative association between plasma NP levels and obesity [6], hypertension

[7], insulin sensitivity [8,9] and type 2 diabetes (T2D) [10,11]. Prospective studies further highlight the predictive value of plasma NP levels in the development of new onset T2D [10].

Together human epidemiological and mouse studies argue for a pivotal role of cardiac NP in the regulation of energy metabolism. The purpose of this review is to give an updated overview of the various metabolic actions of NP reported in humans and mouse models, and their potential contribution to obesity and T2D.

2. Physiology of NP

2.1. Secretion

2.1.1. At rest

The NP family is characterized by a ring structure of 17 amino acids closed by an intra-molecular disulfide bridge. The ring structure allows NP to bind and activate their receptors. ANP and BNP are mainly produced in right atrial cardiomyocytes in standard physiological condition [12]. They are synthesized as prohormones, stored as prohormones in atrial secretory granules, and secreted in response to mechanical stretch of cardiomyocytes [13]. Furin and corin are two cardiac proteases responsible for the processing of proNP in mature forms and enable their release into the circulation with the N-terminal fragment [14]. In standard physiological conditions, a negligible amount of proBNP crosses atrial wall, while

* Corresponding author. Inserm UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, CHU Rangueil, BP 84225, 1 Avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 561 32 5626; fax: +33 561 32 5623.

E-mail address: Cedric.Moro@inserm.fr (C. Moro).

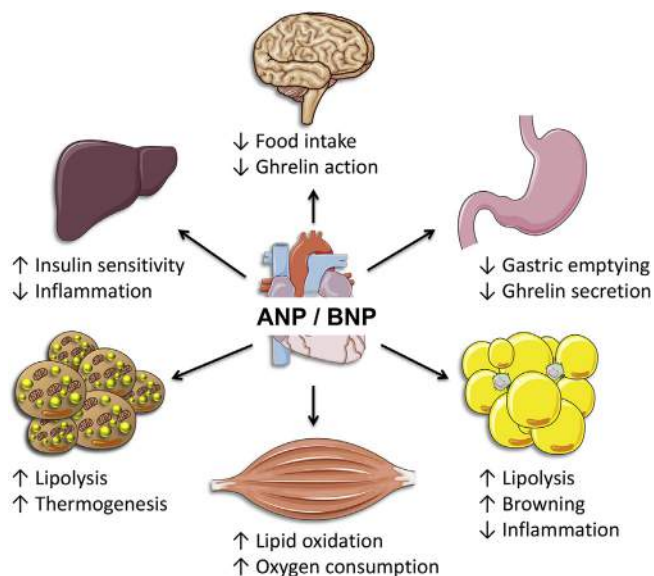


Fig. 1. Current model of the various metabolic actions of natriuretic peptides in the control of energy metabolism and glucose homeostasis.

proBNP expression and secretion is robustly induced in hypertrophied ventricles of failing hearts. This observation was at the basis of using N-terminal proBNP (NT-proBNP) as a diagnostic and prognostic factor in heart failure (HF) [15].

Besides mechanical stretch, NP secretion is regulated by circulating hormones. Recently, Kim et al. demonstrated the presence of GLP1 receptors on right atrial cardiomyocytes and that their stimulation, by a GLP1 receptor agonist liraglutide, induce a 1.8 fold increase in ANP secretion *via* an Epac2 pathway [16]. Thus at least in mice, the blood pressure lowering effect of GLP1R agonists appears mediated by ANP. Interestingly weight loss observed after 12 weeks of liraglutide treatment in T2D obese patients is significantly correlated with elevated plasma ANP and BNP levels [17]. However, recent human studies investigating the hemodynamic effects of GLP1 infusion could not reproduce mouse data and confirm the existence of a gut–heart axis in healthy males [18] and in obese T2D with hypertension [19].

2.1.2. During exercise

Acute exercise increases cardiac output and enhances ANP secretion. Acute exercise on bicycle ergometer increases plasma ANP levels by about 2-fold while plasma BNP levels are only marginally increased (30%) at the highest workload (175 W) [20]. Several studies reported an elevated ANP secretion during exercise [21,22], while this remains more controversial for BNP [23,24]. This appears mainly driven by increased venous return and cardiac filling pressure since exercise-induced ANP secretion is amplified by prior administration of a β -blocker [25]. Another study reported a positive association between plasma BNP levels and physical activity levels [26].

2.2. Receptors and biological roles

ANP and BNP exert their main biological actions through the binding to a membrane-bound specific guanylyl cyclase receptor called NP receptor-A (NPRA or GC-A). On the other hand, CNP preferentially binds with high affinity to another receptor called NPRB or GC-B. NP binding to an NPRA homodimer enables the activation of guanylyl cyclase and subsequent hydrolysis of GTP into the second messenger cGMP. Elevated levels of cGMP elicit the

various biological responses through cGMP-regulated ion-channels, cGMP-dependent protein kinases (cGK), and possibly other effectors' protein [27]. NPRA is widely distributed throughout the cardiovascular system, as well as in several metabolic organs such as adipose tissues (AT), skeletal muscle, liver, brain, pancreas, and gut. NPRA expression is negatively regulated by NP, angiotensin II, endothelin I, TGF- β while vitamin D, glucocorticoids and osmotic stimuli are thought to increase NPRA transcription [12]. Through the specific binding to NPRA, ANP and BNP mediate numerous biological responses with the aim to lower blood volume and pressure as previously reviewed in detail elsewhere [12,13,28]. This includes a shift of intravascular fluid into the interstitial space, suppression of the renin–angiotensin–aldosterone system, and inhibition of plasma renin activity, of the sympathetic nervous system, and of aldosterone secretion, to reduce extracellular volume and facilitate natriuresis.

2.3. Degradation/clearance

NP are quickly removed out of the bloodstream by different processes: they can be internalized by their specific receptor NPRC, degraded by extracellular proteases such as neprilysin (NEP), dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), and insulin degrading enzyme (IDE), or secreted into body fluids like urine and bile. ANP half-life is about 2 min in human and 10 times lower than those of BNP. This difference can be partly explained by the N-terminal BNP asymmetry that lowers its affinity for NPRA and NPRC. NP are preferentially cleared in lungs, liver and kidneys [13].

2.3.1. NPRC

NPRC has an extracellular domain that is 30% homologous to those of NPRA and enables NP binding, however it is not coupled to a GC activity so NPRC scavenges, internalizes and induces the degradation of bound NP. NPRC is the most widely expressed NPR. NPRC is largely expressed in the cardiovascular system, lungs and AT. The tissue concentration of NPRC regulates the availability of NP and so their local action at the cell membrane. The disappearance of a bolus injection of [125 I]ANP is two-third longer in mice lacking NPRC compared to WT mice, which is accompanied by a significantly lower blood pressure [29]. NPRC expression is inhibited by NP, vasopressive hormones such as angiotensin II, endothelin I, arginine vasopressine, growth factors, and salt intake. Inversely, TGF- β , vitamin D and chronic HF up-regulate NPRC expression [30,31]. NPRC sequences revealed an A/C polymorphism in a conserved promoter/enhancer region in humans. In overweight and obesity, the homozygous C/C hypertensive subjects had significantly lower plasma ANP compared with A/C patients suggesting an increased NPRC-mediated ANP clearance in homozygous C/C patients [32]. Moreover male subjects from the Olivetti Heart Study in Naples carrying the A(-55)A NPRC genotype had a significantly lower prevalence of overweight, obesity, and abdominal adiposity [33].

Interestingly NPRC and NPRA seem to be regulated in opposite directions in metabolic organs. In 1997, Sarzani and coworkers observed that fasting dramatically lowers NPRC mRNA in WAT and BAT from rats without modification in renal cortex [34], while its expression highly increases under high fat feeding in mouse skeletal muscle, WAT and BAT [35]. In contrast to NPRA, 3T3-L1 adipocytes exposed to insulin greatly increase their NPRC expression through a PI3K pathway [36]. In humans, NPRC gene expression in subcutaneous AT and visceral AT strongly correlated with fasting insulin levels. Thus NPRC mRNA levels in AT are induced upon a euglycemic hyperinsulinemic clamp [37]. Surprisingly, insulin also significantly enhances NPRC expression in

blood monocyte, making a potential site for NP clearance in systemic bloodstream.

2.3.2. Endopeptidases

2.3.2.1. Neutral endopeptidase. NEP, also known as neutral endopeptidase, enkephalinase, CD10, common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA), is widely expressed at the cell surface of numerous cell types. NEP is highly expressed in the brush border of kidney and small intestine and AT, although substantial NEP levels are also found in the brain, salivary glands, islets of Langerhans, gut wall, nasal mucosa and lung [38]. This enzyme cleaves vasoactive peptides such as neuropeptides, endothelin I, angiotensin II and mature NP by hydrolyzing bonds of hydrophobic residues [39]. NEP has also been shown to be secreted in certain physiological fluids such as plasma, cerebrospinal fluid, amniotic fluid and seminal plasma [40]. The ectodomain contains five putative N-glycosylation sites that regulate transport and activity of the enzyme to the cell surface. Exposure to high glucose concentrations (40 mM) and/or high fatty acid concentrations (40 μ M) maximally stimulates NEP activity in human endothelial cells by increasing glycation and lipid peroxidation that is reversible when these cells are treated with vitamin C or E [39]. The up-regulation of NEP activity appears independent of changes in NEP transcription or translation [41]. Moreover plasma NEP activity is associated with metabolic syndrome, insulin resistance and cardiovascular risk factors in human subjects [42].

As for NPRC, NT-proBNP and mid regional-proANP (MR-proANP) are refractory to enzymatic cleavage by NEP. Of importance, pharmacological inhibition of NEP by Candoxatril does not cause clinically meaningful reduction in blood pressure despite slightly elevated plasma ANP levels, possibly because of NEP-dependent breakdown of other vasoactive polypeptides such as angiotensin II and endothelin I [43]. In addition, a combined pharmacological inhibition of NEP and angiotensin II receptor-2 (AT2) by the dual-acting drug LCZ696, provides an additional reduction of blood pressure compared to the AT2 blocker valsartan alone [44].

2.3.2.2. Others. Circulating NP can also be inactivated by the dipeptidyl peptidase-IV (DPPIV or CD26) that cleaves the N-terminal peptide. Inhibition of this enzyme is chiefly studied to enhance the half-life of incretin hormones such as glucagon-like peptide-1 (GLP1) that improve blood glucose control. However DPPIV cleaves mature BNP (1–32) *in vitro* into BNP (3–32) which display a reduced biological activity [45]. Although DPPIV does not directly target ANP, it has been shown that cardiac ANP expression is greatly enhanced in DPPIV knockout mice [46]. This could be partly due to the higher half-life of GLP1 that can stimulate ANP secretion in the right atria of the heart [16]. Further studies are needed to better discriminate the importance of DPPIV on the systemic and/or local concentrations of NP and their biological activity in target tissues.

The insulin degrading enzyme (IDE), an ubiquitous zinc metalloprotease found in cytoplasmic and membrane fraction of several cell types, has also been shown to enzymatically cleave NP *in vitro* with a higher affinity for ANP [47]. Thus some of the beneficial effects of inhibiting IDE could involve changes in plasma NP levels [48].

2.4. Association with cardiovascular diseases

As discussed earlier, NT-proBNP is widely used in the clinic as a diagnostic tool of acute and/or congestive HF [15]. BNP expression and secretion are strongly induced as a function of left ventricular hypertrophy [49]. BNP plasma levels strongly increase in patients with HF and positively correlate with the severity of HF according to the New York Heart Association classification system [50]. Elevated

plasma BNP levels after optimized treatment in patients with congestive HF also predict a higher risk of morbidity and mortality [51,52].

Besides the sympathetic nervous and the renin–angiotensin–aldosterone systems [53], the NP system has been extensively studied to unravel the pathophysiological link between hypertension, obesity and the metabolic syndrome. It was proposed that obese individuals have an impaired NP response defined as a “natriuretic handicap”. In obese hypertensive subjects, plasma ANP levels are significantly lower than in obese normotensive subjects despite a similar left ventricular mass [7]. Interestingly, plasma NP levels remain significantly reduced in obese compared to lean individuals with heart failure [54]. Thus suggesting that the “natriuretic handicap” emerges during obesity.

2.5. Association with obesity and type 2 diabetes

The “natriuretic handicap” hypothesis was later supported by the observation of a strong inverse relationship between plasma BNP levels and body mass index (BMI) in the Framingham Heart Study [6]. This occurs despite a higher left-ventricular mass and end-diastolic pressure in obese compared to lean people [55]. In a prospective study with a 16 year follow-up, low plasma level of MR-proANP at baseline were associated with longitudinal changes in fasting blood glucose and new onset T2D [10]. A summary of main human clinical studies providing a link between metabolic diseases and NP levels is provided in Table 1.

The link between plasma NP levels and metabolic diseases was confirmed in another study, where the A/G single nucleotide polymorphism of the ANP gene was associated with elevated NT-proANP plasma levels and reduced systolic blood pressure (SBP), BMI, waist circumference, and a lower risk of metabolic syndrome compared to A/A carriers [56]. This observation was later substantiated by a 14-year follow-up study where A/G carriers had lower incident T2D even after multiple adjustments for age, sex and BMI [57].

3. Metabolic roles of NP

Over the last decade, several papers highlighted the metabolic actions of NP in mouse and human studies which include for a large part the activation of catabolic processes [58]. NP have been shown to promote lipolysis and browning in WAT, activate brown fat thermogenesis, induce mitochondrial fat oxidative capacity and fat oxidation in skeletal muscle, inhibit food intake and reduce gastric emptying as summarized in Fig. 1 and Table 2.

3.1. Lipolysis

In light of a significant expression of NPR in WAT [59], our laboratory demonstrated a potent lipolytic effect of NP on human isolated adipocytes (reviewed in detail in Refs. [2,3]). The signaling pathway has been characterized and involves activation of the cGK- α which phosphorylates hormone sensitive lipase (HSL) and perilipin-1 to initiate the process of lipolysis [60]. This effect appears independent of cross-activation of the cAMP/PKA pathway and refractory to the anti-lipolytic effect of insulin *in vitro* [61] and *in vivo* [62]. We could also show that ANP contribute to the physiological control of lipid mobilization in humans to supply fatty acids to skeletal and cardiac muscle during exercise [25]. NP-dependent lipolytic activation in AT is attenuated in a number of pathophysiological conditions including overweight/obesity [63], polycystic ovary syndrome [64], and hypothyroidism [65]. In contrast, NP-mediated lipolysis increases during hyperthyroidism [65], in HF patients [66], and in cancer cachexia [67]. Interestingly, NP-mediated lipolysis seems to be a primate fat cell specificity

Table 1
Human clinical studies linking circulating NP levels and metabolic diseases.

Study name	Sample	Main findings	References
The Framingham Heart Study	3389	Inverse correlation between plasma BNP/NT-proANP and BMI and T2D	[6]
The Olivetti Heart Study	787	Male subjects carrying the A(-55)A <i>Nprc</i> genotype have a significantly lower prevalence of overweight, obesity, and abdominal adiposity	[33]
The Dallas Heart Study	2971	Inverse relationship between plasma BNP and NT-proBNP and BMI	[100]
The FINRISK97 Study	7827	ANP, BNP and NT-proBNP belong to the 31 novel predictors of incident T2D	[101]
Meta-analysis of 11 case–control studies		Genetic variant rs198389 within the BNP locus is associated with a lower risk of developing T2D	[102]
Prevalence of left ventricular dysfunction study	1608	rs5068, a genetic variant of the ANP gene, is associated with cardiometabolic protection	[56]
Malmö Diet and Cancer study	1828	Low plasma level of ANP predicts the development of T2D	[10]
The Atherosclerosis Risk on Communities study	7822	High NT-proBNP levels are associated with reduced T2D risk	[11]
The Dallas Heart Study	2619	High NP levels are associated with a favorable adipose tissue distribution	[103]
Malmö Diet and Cancer study	27,307	Carriers of at least one copy of the G allele of rs5068 have reduced incident T2D risk over 14 years	[57]
The Diabetes Prevention Program	2411	Circulating NT-proBNP level correlates with insulin sensitivity before and during preventive interventions for T2D	[9]
Meta-analysis of 5 case–control studies		NT-proBNP is a predictor of cardiovascular diseases in T2D people	[104]
Outpatients visiting the National Center for Global Health and Medicine Kohnodai Hospital	60	Plasma BNP level is positively associated with physical activity levels	[26]

BMI: body mass index; T2D: type 2 diabetes.

because of the low NPRA-to-NPRC ratio in rodent adipocytes [68]. Adipocytes from NPRC knockout mice exhibit a normal lipolytic response to ANP [4].

Table 2
Metabolic phenotype of mouse models of NP gain- and/or loss-of-function.

Model	Phenotype	Biological effects	References
BNP-Tg	Prevention of diabetic nephropathy	<ul style="list-style-type: none"> ↘ urinary albumin excretion ↘ glomerular hypertrophy 	[105]
BNP-Tg	Resistance to DIO	<ul style="list-style-type: none"> ↘ body fat mass ↘ TAG in liver/skeletal muscle ↘ fasting insulin and glucose ↗ fat oxidation 	[35]
NPRA+/-	Susceptibility to DIO	<ul style="list-style-type: none"> ↗ body fat mass ↘ glucose tolerance 	[35]
NPRA-/-	Increased gastric emptying and absorption	<ul style="list-style-type: none"> ↗ intra gastric pressure ↗ gastric contractility ↗ gastrointestinal permeability 	[83]
NPRA-/-	Altered pancreatic β-cell function	<ul style="list-style-type: none"> ↘ GSIS ↘ islet size ↘ β-cell mass ↘ insulin content ↗ fasting blood glucose 	[81]
NPRC-/-	Increased thermogenesis	<ul style="list-style-type: none"> ↘ fat mass ↗ thermogenic gene expression in brown and white fat 	[4]
cGKI-Tg	Improved metabolic profile and resistance to DIO	<ul style="list-style-type: none"> ↘ body weight gain ↘ TAG in liver/skeletal muscle ↗ fasting insulin and glucose ↗ oxygen consumption ↘ respiratory quotient ↗ muscle mitochondrial density 	[35]
cGKI-/-	Liver inflammation and insulin resistance	<ul style="list-style-type: none"> ↗ fasting hyperglycemia ↗ hepatic IL-6 signaling ↘ hepatic Akt phosphorylation ↘ serum adiponectin 	[106]
NEP-/-	Protection against fat-induced pancreatic β-cell dysfunction	<ul style="list-style-type: none"> ↗ GSIS ↗ calcium influx 	[41]
GUCY2C -/-	Obesity and hyperphagia	<ul style="list-style-type: none"> ↗ body weight gain ↗ fasting leptin and insulin ↘ daily food intake ↘ satiety 	[91]

DIO: diet-induced obesity; GSIS: glucose-stimulated insulin secretion; TAG: triacylglycerol.

3.2. Thermogenesis

Lipolysis is also an important physiological process to fuel BAT thermogenesis. Recently, Bordicchia et al. demonstrated that acute cold exposure (6 h at 4 °C) robustly induces cardiac BNP secretion in mice [4]. This is concomitant with an induction of classical thermogenic genes such as the uncoupling protein 1 (UCP1) in inguinal WAT. Cold exposure in mice also facilitates NP signaling by increasing the ratio of NPRA-to-NPRC in white fat. In addition, NPRC knockout mice display reduced white fat pad weight and increased browning [4].

The underlying mechanism likely involves the activation of the p38 MAPK-ATF2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC1 α) pathway through cGK-I in human adipocytes [4]. cGK-I seems important for brown fat cell differentiation and thermogenesis by inducing mitochondrial biogenesis and UCP1 [69,70]. The relevance of this finding was demonstrated in human primary and hMADS adipocytes [4,71]. Activation of NP signaling in adipocyte increases oxygen consumption rate and activate mitochondrial oxidative gene expression. This process could involve AMPK [71]. Another study confirmed a significant increase of UCP1 expression reflecting a browning of white fat pads of db/+ and db/db mice chronically treated with BNP [72]. However both elevated plasma NP levels and cold exposure are known to activate the sympathetic nervous system. It is therefore unclear if NP directly control brown fat thermogenesis independently or synergistically with catecholamines. Further studies are needed to demonstrate the specific contribution of NP in the control of thermogenesis and white adipose tissue browning *in vivo* in mice.

3.3. Fat oxidation/energy expenditure

Miyashita et al. reported a few years ago that BNP-transgenic mice (overexpressing BNP plasma levels up to 100 times) were partly protected against high fat diet-induced weight gain. This was associated with an elevated rate of oxygen consumption and fat oxidation [35], possibly due to increased mitochondrial respiration in white/brown adipocytes and skeletal muscle cells. A similar phenotype was observed in cGK-I-transgenic mice (overexpressing cGK-I ubiquitously), thus confirming the link between NP signaling in metabolic organs and energy expenditure. Of interest, cGK-I-transgenic mice exhibited giant mitochondria with dense cristae in their skeletal muscles. Later, Engeli et al. demonstrated that chronic treatment of human primary myotubes with NP up-regulates PGC1 α

gene and protein expression, as well as mitochondrial oxidative genes and proteins, oxygen consumption, and fat oxidation [5]. Of note, NPRA expression positively correlates with PGC1 α expression in human skeletal muscle and both genes are up-regulated in response to endurance exercise. This suggests that NP signaling may control mitochondrial fat oxidative capacity in skeletal muscle and could mediate some of the effects of exercise on skeletal muscle. Further studies should assess the role of NP in the physiological adaptations of skeletal muscle to acute and chronic exercise.

3.4. Insulin sensitivity

Consistent with an increased rate of oxygen consumption and resistance to diet-induced obesity, both BNP- and cGK-I-transgenic mice are also partly protected against diet-induced insulin resistance and glucose intolerance [35]. This was confirmed in another study showing that 12-weeks of BNP infusion in db/db mice improves insulin and glucose tolerance [72]. Although the underlying mechanisms were not investigated, increased NP levels and/or signaling were associated with reduced lipid accumulation in liver and skeletal muscle [35]. Thus additional studies are needed to investigate the mechanisms by which NP treatment improves insulin sensitivity and whether this is a direct effect on either skeletal muscle, liver and adipose tissue.

In addition, several studies reported an inverse relationship between insulin sensitivity and plasma NP levels in humans [8,9]. Little or no data are currently available on the link between insulin sensitivity and NP signaling in metabolic organs such as AT, skeletal muscle and liver. One study reported that ANP exhibit anti-inflammatory effects by inhibiting pro-inflammatory cytokines expression and secretion from human AT explants [73]. Specifically, ANP was shown to activate NPRA on adipose tissue macrophages and inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . Considering that AT and systemic inflammation are associated with insulin resistance [74], this could be one mechanism by which ANP preserves insulin sensitivity in humans. Two studies also suggested that ANP enhances the secretion of the pro-insulin sensitizing adipokine adiponectin from adipocytes both *in vitro* and *in vivo* [75,76]. In summary, additional studies are required to assess the mechanistic link between NP signaling and insulin sensitivity in humans.

3.5. Insulin secretion

In 1986, Uehlinger and colleagues noted that a supra physiological infusion of ANP raises plasma insulin levels in human volunteers [77]. No effect was observed at a lower physiological dose [78]. Birkenfeld et al. also reported that ANP infusion at a physiological dose significantly increases plasma insulin levels during a meal test in lean healthy volunteers [79]. Studies in rodents identified the presence of NPRA in α and β pancreatic cells. Thus in mouse isolated islets, ANP apparently increases glucose-stimulated insulin secretion [80,81]. NP signaling through NPRA may be important to maintain β -cell mass since islets from NPRA knockout mice display reduced islet size, β -cell number and insulin content [81]. Together, it is unclear if NP enhance insulin secretion in a physiological setting and how they could impact on the endocrine pancreas. This area of research requires further investigations.

3.6. Nutrient absorption

Addisu et al. reported that high circulating levels of BNP in mice undergoing myocardial infarction of the left ventricle exhibit a reduced gastric emptying and intestinal absorption [82]. These effects are abolished in NPRA knockout mice. Moreover,

intravenous BNP injection dose-dependently inhibits gastric emptying in mice [83]. ANP infusion directly into antral mucosal segments of rat stomach also induces somatostatin secretion in a NPRA-dependent manner [84]. Somatostatin inhibits the synthesis and secretion of peptide hormones in a wide variety of neuroendocrine cells and is a negative regulator of ghrelin secretion [85]. Plasma ghrelin levels were significantly lower in patients with congestive HF and correlated negatively with NT-proBNP levels [86]. More recently, Vila et al. reported that intravenous BNP infusion reduces total and acylated ghrelin plasma concentrations in healthy volunteers [87]. In summary, through their action on the gastro-intestinal system, NP may also impact on whole-body energy metabolism by modulating metabolic and satiety hormone levels.

3.7. Food intake

CNP is the most abundant member of the NP family present in the brain [88]. CNP is widely expressed in discrete hypothalamic areas such as the arcuate nucleus of the hypothalamus that play a key role in the central control of energy metabolism. NPRB, which binds CNP, is also the main NPR expressed in rat hypothalamus [89]. Interestingly, intra-cerebro-ventricular administration of CNP significantly suppresses food intake. This effect is abrogated by co-administration of CNP and the melanocortin-3 receptor (MC3R)/melanocortin-4 receptor (MC4R) antagonist SHU9119 [90]. This suggests that CNP may inhibit food intake through activation of anorexigenic POMC neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. In addition, CNP antagonizes orexigenic NPY neurons as well as the effect of the orexigenic hormone ghrelin [90]. Recently, Valentino and coworkers elegantly demonstrated that uroguanylin, a distant member of NP family, binding to a transmembrane guanylyl cyclase receptor (GC-C), inhibits food intake in a cGMP-dependent manner through modulation of POMC neurons [91]. Vila et al. also reported that intravenous BNP infusion in healthy volunteers increases satiety scores and inhibit food intake [87]. Future studies should assess whether NP can directly impact on hypothalamic neurons to modulate food intake.

4. Restoring the natriuretic handicap

As discussed earlier, the natriuretic handicap is defined as a combination of reduced cardiac NP secretion and/or increased systemic and tissue clearance in obesity. The reduced plasma NP level observed in obesity seems to be reversible. Previous studies demonstrated that low calorie diet [92] and endurance exercise training [63] can improve ANP-mediated lipolysis in overweight and obese individuals. Although the molecular mechanisms have not yet been investigated in detail, it is possible that the natriuretic handicap at the tissue level includes both a reduced NPRA expression/signaling and an increased NPRC expression. In line with this, 8-week of aerobic exercise training raises NPRA mRNA levels in skeletal muscle of obese individuals [5]. However, no change in resting concentrations of ANP and BNP were noticed in this study after exercise training. Thus lifestyle interventions combining regular sessions of physical exercise and calorie restriction to favor weight loss could prove useful to increase circulating NP levels and normalize NPRC expression in white adipose tissue [93]. It was shown that the early phase of weight loss induced by calorie restriction is associated with natriuresis, reduction in blood pressure and a doubling of plasma ANP levels in overweight normotensive subjects [94]. Intense lifestyle intervention including dietary counseling, exercise, stress management and social support increases circulating BNP concentrations in subjects with coronary heart disease or at high risk [95]. Importantly, individuals who lost

most weight in response to the 3-months lifestyle intervention had the greatest increase in plasma BNP levels. In addition, obese subjects undergoing laparoscopic gastric bypass surgery display an increase in plasma BNP and NT-proBNP levels that correlate significantly with weight loss [96–98]. Changes in NP levels were not secondary to underlying cardiac changes but were attributable to the weight loss *per se* [99]. In summary, although further studies are needed to characterize the molecular defects of NP signaling in obesity, lifestyle interventions combining exercise and calorie restriction at least partly restore the natriuretic handicap in parallel of improving the metabolic status.

5. Conclusion and future directions

Over the last decade, NP have emerged as key metabolic hormones. NP target a variety of organs to regulate energy metabolism (Fig. 1). It is now well accepted that obesity and T2D are accompanied by a “natriuretic handicap” which includes a combination of lower cardiac qualitative and quantitative NP secretion and an accelerated clearance rate by peripheral organs such as AT. This concept is so far well supported in mouse studies and needs to be confirmed in humans. It could be therefore of therapeutic interest to restore circulating NP levels and tissue response in metabolic disorders. Importantly, the identification of the presence of NPRA in multiple metabolic organs such as skeletal muscle, liver, pancreas and BAT, will lead to discover novel biological roles of this family of cardiac hormones. The robust and reproducible link observed in cohort studies between plasma NP levels and incidence of T2D should foster research efforts to unravel the target organs and underlying molecular mechanisms.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pr. Max Lafontan for critical reading of the manuscript. Some of the work that is presented here was supported by grants from the National Research Agency ANR-09-JCJC-0019-01 and ANR-12-JSV1-0010-01.

References

- [1] A.J. de Bold, T.G. Flynn, Cardionatrin I – a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties, *Life Sci.* 33 (1983) 297–302.
- [2] M. Lafontan, C. Moro, M. Berlan, F. Crampes, C. Sengenès, J. Galitzky, Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP, *Trends Endocrinol. Metab.* 19 (2008) 130–137.
- [3] C. Moro, M. Lafontan, Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304 (2013) H358–H368.
- [4] M. Bordicchia, D. Liu, E.Z. Amri, G. Ailhaud, P. Dessi-Fulgheri, C. Zhang, et al., Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1022–1036.
- [5] S. Engeli, A.L. Birkenfeld, P.M. Badin, V. Bourlier, K. Louche, N. Viguerie, et al., Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 4675–4679.
- [6] T.J. Wang, M.G. Larson, D. Levy, E.J. Benjamin, E.P. Leip, P.W. Wilson, et al., Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels, *Circulation* 109 (2004) 594–600.
- [7] P. Dessi-Fulgheri, R. Sarzani, P. Tamburrini, A. Moraca, E. Espinosa, G. Cola, et al., Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients, *J. Hypertens.* 15 (1997) 1695–1699.
- [8] A.M. Khan, S. Cheng, M. Magnusson, M.G. Larson, C. Newton-Cheh, E.L. McCabe, et al., Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) 3242–3249.
- [9] G.A. Walford, Y. Ma, C.A. Christophi, R.B. Goldberg, P. Jarolim, E. Horton, et al., Circulating natriuretic peptide concentrations reflect changes in insulin sensitivity over time in the Diabetes Prevention Program, *Diabetologia* 57 (2014) 935–939.
- [10] M. Magnusson, A. Jujic, B. Hedblad, G. Engstrom, M. Persson, J. Struck, et al., Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 638–645.
- [11] M. Lazo, J.H. Young, F.L. Brancati, J. Coresh, S. Whelton, C.E. Ndumele, et al., NH₂-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes, *Diabetes* 62 (2013) 3189–3193.
- [12] D.G. Gardner, S. Chen, D.J. Glenn, C.L. Grigsby, Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension, *Hypertension* 49 (2007) 419–426.
- [13] L.R. Potter, Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation, *FEBS J.* 278 (2011) 1808–1817.
- [14] G. Gruden, A. Landi, G. Bruno, Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research, *Diabetes Care* 37 (2014) 2899–2908.
- [15] L.C. Costello-Boerrigter, H. Lapp, G. Boerrigter, A. Lerman, A. Bufe, F. Macheret, et al., Secretion of prohormone of B-type natriuretic peptide, proBNP1-108, is increased in heart failure, *JACC Heart Fail.* 1 (2013) 207–212.
- [16] M. Kim, M.J. Platt, T. Shibasaki, S.E. Quaggin, P.H. Backx, S. Seino, et al., GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure, *Nat. Med.* 19 (2013) 567–575.
- [17] C.J. Li, Q. Yu, P. Yu, T.L. Yu, Q.M. Zhang, S. Lu, et al., Changes in liraglutide-induced body composition are related to modifications in plasma cardiac natriuretic peptides levels in obese type 2 diabetic patients, *Cardiovasc. Diabetol.* 13 (2014) 36.
- [18] A. Asmar, L. Simonsen, M. Asmar, S. Madsbad, J.J. Holst, E. Frandsen, et al., Renal extraction and acute effects of glucagon-like peptide-1 on central and renal hemodynamics in healthy men, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308 (8) (2015) E641–E649. [ajpendo 00429 2014](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00429.2014).
- [19] J.A. Lovshin, A. Barnie, A. DeAlmeida, A. Logan, B. Zinman, D.J. Drucker, Liraglutide promotes natriuresis but does not increase circulating levels of atrial natriuretic peptide in hypertensive subjects with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 38 (2014) 132–139.
- [20] G. Barletta, L. Stefani, R. Del Bene, C. Fronzaroli, S. Vecchiarino, C. Lazzeri, et al., Effects of exercise on natriuretic peptides and cardiac function in man, *Int. J. Cardiol.* 65 (1998) 217–225.
- [21] A. Kjaer, J. Appel, P. Hildebrandt, C.L. Petersen, Basal and exercise-induced neuroendocrine activation in patients with heart failure and in normal subjects, *Eur. J. Heart Fail.* 6 (2004) 29–39.
- [22] A. Mandroukas, T.I. Metaxas, J. Heller, E. Vamvakoudis, K. Christoulas, C.S. Riganas, et al., The effect of different exercise-testing protocols on atrial natriuretic peptide, *Clin. Physiol. Funct. Imaging* 31 (2011) 5–10.
- [23] I.C. Steele, G. McDowell, A. Moore, N.P. Campbell, C. Shaw, K.D. Buchanan, et al., Responses of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide to exercise in patients with chronic heart failure and normal control subjects, *Eur. J. Clin. Invest.* 27 (1997) 270–276.
- [24] M. Kato, T. Kinugawa, K. Ogino, A. Endo, S. Osaki, O. Igawa, et al., Augmented response in plasma brain natriuretic peptide to dynamic exercise in patients with left ventricular dysfunction and congestive heart failure, *J. Intern. Med.* 248 (2000) 309–315.
- [25] C. Moro, F. Crampes, C. Sengenès, I. De Glisezinski, J. Galitzky, C. Thalamas, et al., Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans, *FASEB J.* 18 (2004) 908–910.
- [26] H. Hamasaki, H. Yanai, M. Kakei, M. Noda, O. Ezaki, The association between daily physical activity and plasma B-type natriuretic peptide in patients with glucose intolerance: a cross-sectional study, *BMJ Open* 5 (2015) e006276.
- [27] K.S. Misono, J.S. Philo, T. Arakawa, C.M. Ogata, Y. Qiu, H. Ogawa, et al., Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase, *FEBS J.* 278 (2011) 1818–1829.
- [28] M. Kuhn, Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice, *Peptides* 26 (2005) 1078–1085.
- [29] N. Matsukawa, W.J. Grzesik, N. Takahashi, K.N. Pandey, S. Pang, M. Yamauchi, et al., The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7403–7408.
- [30] M.B. Anand-Srivastava, Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation, *Peptides* 26 (2005) 1044–1059.
- [31] R. Garg, K.N. Pandey, Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression, *Peptides* 26 (2005) 1009–1023.
- [32] R. Sarzani, P. Dessi-Fulgheri, F. Salvi, M. Serenelli, D. Spagnolo, G. Cola, et al., A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives, *J. Hypertens.* 17 (1999) 1301–1305.
- [33] R. Sarzani, P. Strazzullo, F. Salvi, R. Iacone, F. Pietrucci, A. Siani, et al., Natriuretic peptide clearance receptor alleles and susceptibility to abdominal adiposity, *Obes. Res.* 12 (2004) 351–356.
- [34] R. Sarzani, V.M. Paci, C.M. Zingaretti, C. Pierleoni, S. Cinti, G. Cola, et al., Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue, *J. Hypertens.* 13 (1995) 1241–1246.
- [35] K. Miyashita, H. Itoh, H. Tsujimoto, N. Tamura, Y. Fukunaga, M. Sone, et al., Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity, *Diabetes* 58 (2009) 2880–2892.
- [36] H. Nakatsuji, N. Maeda, T. Hibuse, A. Hiuge, A. Hirata, Y. Kuroda, et al., Reciprocal regulation of natriuretic peptide receptors by insulin in adipose cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (2010) 100–105.

- [37] O. Pivovarova, O. Gogebakan, N. Kloting, A. Sparwasser, M.O. Weickert, I. Haddad, et al., Insulin up-regulates natriuretic peptide clearance receptor expression in the subcutaneous fat depot in obese subjects: a missing link between CVD risk and obesity? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) E731–E739.
- [38] J.E. Olerud, M.L. Usui, D. Seckin, D.S. Chiu, C.L. Haycox, I.S. Song, et al., Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds, *J. Invest. Dermatol.* 112 (1999) 873–881.
- [39] P. Muangman, M.L. Spenny, R.N. Tamura, N.S. Gibran, Fatty acids and glucose increase neutral endopeptidase activity in human microvascular endothelial cells, *Shock* 19 (2003) 508–512.
- [40] M.G. Spillantini, F. Sicuteri, S. Salmon, B. Malfroy, Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 (“enkephalinase”) activity in human plasma and cerebrospinal fluid, *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990) 1353–1356.
- [41] S. Zraika, D.S. Koh, B.M. Barrow, B. Lu, S.E. Kahn, S. Andrikopoulos, Nephilysin deficiency protects against fat-induced insulin secretory dysfunction by maintaining calcium influx, *Diabetes* 62 (2013) 1593–1601.
- [42] K.F. Standeven, K. Hess, A.M. Carter, G.I. Rice, P.A. Cordell, A.J. Balmforth, et al., Nephilysin, obesity and the metabolic syndrome, *Int. J. Obes. (Lond.)* 35 (2011) 1031–1040.
- [43] E.G. Bevan, J.M. Connell, J. Doyle, H.A. Carmichael, D.L. Davies, A.R. Lorimer, et al., Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension, *J. Hypertens.* 10 (1992) 607–613.
- [44] L.M. Ruijlope, A. Dukat, M. Bohm, Y. Lacourciere, J. Gong, M.P. Lefkowitz, Blood-pressure reduction with LCZ696, a novel dual-acting inhibitor of the angiotensin II receptor and neprilysin: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active comparator study, *Lancet* 375 (2010) 1255–1266.
- [45] I. Brandt, A.M. Lambeir, J.M. Ketelslegers, M. Vanderheyden, S. Scharpe, I. De Meester, Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form, *Clin. Chem.* 52 (2006) 82–87.
- [46] M. Sauve, K. Ban, M.A. Momen, Y.Q. Zhou, R.M. Henkelman, M. Husain, et al., Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice, *Diabetes* 59 (2010) 1063–1073.
- [47] L.A. Ralat, Q. Guo, M. Ren, T. Funke, D.M. Dickey, L.R. Potter, et al., Insulin-degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 4670–4679.
- [48] J.P. Maiani, A. McFedries, Z.H. Foda, R.E. Kleiner, X.Q. Du, M.A. Leissring, et al., Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones, *Nature* 511 (2014) 94–98.
- [49] D.G. Gardner, Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy? *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (2003) 411–416.
- [50] S.J. Wiecezorek, A.H. Wu, R. Christenson, P. Krishnaswamy, S. Gottlieb, T. Rosano, et al., A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: a multicenter evaluation, *Am. Heart J.* 144 (2002) 834–839.
- [51] K. Maeda, T. Tsutamoto, A. Wada, N. Mabuchi, M. Hayashi, T. Tsutsui, et al., High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* 36 (2000) 1587–1593.
- [52] P. Li, Y. Luo, Y.M. Chen, B-type natriuretic peptide-guided chronic heart failure therapy: a meta-analysis of 11 randomised controlled trials, *Heart Lung Circ.* 22 (2013) 852–860.
- [53] S. Engeli, Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the metabolic syndrome, *Contrib. Nephrol.* 151 (2006) 122–134.
- [54] M.R. Mehra, P.A. Uber, M.H. Park, R.L. Scott, H.O. Ventura, B.C. Harris, et al., Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 1590–1595.
- [55] J.A. Taylor, R.H. Christenson, K. Rao, M. Jorge, S.S. Gottlieb, B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures, *Am. Heart J.* 152 (2006) 1071–1076.
- [56] V. Cannone, G. Boerrigter, A. Cataliotti, L.C. Costello-Boerrigter, T.M. Olson, P.M. McKie, et al., A genetic variant of the atrial natriuretic peptide gene is associated with cardiometabolic protection in the general community, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 629–636.
- [57] A. Jujic, P.M. Nilsson, G. Engstrom, B. Hedblad, O. Melander, M. Magnusson, Atrial natriuretic peptide and type 2 diabetes development—biomarker and genotype association study, *PLoS One* 9 (2014) e89201.
- [58] C. Moro, Natriuretic peptides and fat metabolism, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16 (2013) 645–649.
- [59] R. Sarzani, P. Dessi-Fulgheri, V.M. Paci, E. Espinosa, A. Rappelli, Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues, *J. Endocrinol. Invest.* 19 (1996) 581–585.
- [60] C. Sengenès, A. Bouloumie, H. Hauner, M. Berlan, R. Busse, M. Lafontan, et al., Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 48617–48626.
- [61] C. Sengenès, M. Berlan, I. De Glisezinski, M. Lafontan, J. Galitzky, Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes, *FASEB J.* 14 (2000) 1345–1351.
- [62] C. Moro, J. Polak, B. Richterova, C. Sengenès, T. Pelikanova, J. Galitzky, et al., Differential regulation of atrial natriuretic peptide- and adrenergic receptor-dependent lipolytic pathways in human adipose tissue, *Metabolism* 54 (2005) 122–131.
- [63] C. Moro, F. Pillard, I. De Glisezinski, I. Harant, D. Riviere, V. Stich, et al., Training enhances ANP lipid-mobilizing action in adipose tissue of overweight men, *Med. Sci. Sports Exercise* 37 (2005) 1126–1132.
- [64] C. Moro, M. Pasarica, K. Elkind-Hirsch, L.M. Redman, Aerobic exercise training improves atrial natriuretic peptide and catecholamine-mediated lipolysis in obese women with polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 2579–2586.
- [65] J. Polak, C. Moro, E. Klimcakova, M. Kovacicova, M. Bajzova, M. Vitkova, et al., The atrial natriuretic peptide- and catecholamine-induced lipolysis and expression of related genes in adipose tissue in hypothyroid and hyperthyroid patients, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E246–E251.
- [66] J. Polak, M. Kotrc, Z. Wedellova, A. Jabor, I. Malek, J. Kautzner, et al., Lipolytic effects of B-type natriuretic peptide 1-32 in adipose tissue of heart failure patients compared with healthy controls, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 1119–1125.
- [67] T. Agustsson, M. Ryden, J. Hoffstedt, V. van Harmelen, A. Dicker, J. Laurencikiene, et al., Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia, *Cancer Res.* 67 (2007) 5531–5537.
- [68] C. Sengenès, A. Zakaroff-Girard, A. Moulin, M. Berlan, A. Bouloumie, M. Lafontan, et al., Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283 (2002) R257–R265.
- [69] B. Haas, P. Mayer, K. Jennissen, D. Scholz, M. Berriel Diaz, W. Bloch, et al., Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis, *Sci. Signal.* 2 (2009) ra78.
- [70] M.M. Mitschke, L.S. Hoffmann, T. Gnadt, D. Scholz, K. Kruihthoff, P. Mayer, et al., Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue, *FASEB J.* 27 (2013) 1621–1630.
- [71] S.C. Souza, M.D. Chau, Q. Yang, M.S. Gauthier, K.B. Clairmont, Z. Wu, et al., Atrial natriuretic peptide regulates lipid mobilization and oxygen consumption in human adipocytes by activating AMPK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410 (2011) 398–403.
- [72] E. Plante, A. Menaouar, B.A. Danalache, T.L. Broderick, M. Jankowski, J. Gutkowska, Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice, *Diabetologia* 57 (2014) 1257–1267.
- [73] C. Moro, E. Klimcakova, K. Lolmede, M. Berlan, M. Lafontan, V. Stich, et al., Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue, *Diabetologia* 50 (2007) 1038–1047.
- [74] J.R. Brestoff, D. Artis, Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease, *Cell* 161 (2015) 146–160.
- [75] O. Tsukamoto, M. Fujita, M. Kato, S. Yamazaki, Y. Asano, A. Ogai, et al., Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* 53 (2009) 2070–2077.
- [76] A.L. Birkenfeld, M. Boschmann, S. Engeli, C. Moro, A.M. Arafat, F.C. Luft, et al., Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man, *PLoS One* 7 (2012) e43238.
- [77] D.E. Uehlinger, P. Weidmann, M.P. Gnadinger, L. Hasler, C. Bachmann, S. Shaw, et al., Increase in circulating insulin induced by atrial natriuretic peptide in normal humans, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8 (1986) 1122–1129.
- [78] P. Ferrari, S. Shaw, W. Riesen, P. Weidmann, Plasma insulin during physiological and pathophysiological changes in atrial natriuretic factor, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 42 (1992) 453–455.
- [79] A.L. Birkenfeld, P. Budziarek, M. Boschmann, C. Moro, F. Adams, G. Franke, et al., Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans, *Diabetes* 57 (2008) 3199–3204.
- [80] H.C. Fehmann, B. Noll, R. Goke, B. Goke, M.E. Trautmann, R. Arnold, Atrial natriuretic factor has a weak insulinotropic action in the isolated perfused rat pancreas, *Res. Exp. Med. (Berl.)* 190 (1990) 253–258.
- [81] A.B. Roperio, S. Soriano, E. Tuduri, L. Marroqui, N. Tellez, B. Gassner, et al., The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function, *Endocrinology* 151 (2010) 3665–3674.
- [82] A. Addisu, W.R. Gower Jr., M. Serrano, D. Villarreal, J.R. Dietz, Heart failure mice exhibit decreased gastric emptying and intestinal absorption, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 236 (2011) 1454–1460.
- [83] A. Addisu, W.R. Gower Jr., C.S. Landon, J.R. Dietz, B-type natriuretic peptide decreases gastric emptying and absorption, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233 (2008) 475–482.
- [84] W.R. Gower Jr., R.W. McCuen, A. Arimura, D.A. Coy, J.R. Dietz, C.S. Landon, et al., Reciprocal paracrine pathways link atrial natriuretic peptide and somatostatin secretion in the antrum of the stomach, *Regul. Pept.* 110 (2003) 101–106.
- [85] M. Shimada, Y. Date, M.S. Mondal, K. Toshinai, T. Shimbara, K. Fukunaga, et al., Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 520–525.
- [86] Y. Chen, X.W. Ji, A.Y. Zhang, J.C. Lv, J.G. Zhang, C.H. Zhao, Prognostic value of plasma ghrelin in predicting the outcome of patients with chronic heart failure, *Arch. Med. Res.* 45 (2014) 263–269.
- [87] G. Vila, G. Grimm, M. Resl, B. Heinisch, E. Einwallner, H. Esterbauer, et al., B-type natriuretic peptide modulates ghrelin, hunger, and satiety in healthy men, *Diabetes* 61 (2012) 2592–2596.

- [88] J.P. Herman, M.C. Langub Jr., R.E. Watson Jr., Localization of C-type natriuretic peptide mRNA in rat hypothalamus, *Endocrinology* 133 (1993) 1903–1906.
- [89] M.C. Langub Jr., C.M. Dolgas, R.E. Watson Jr., J.P. Herman, The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus, *J. Neuroendocrinol.* 7 (1995) 305–309.
- [90] N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, et al., Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice, *Diabetes* 62 (2013) 1500–1504.
- [91] M.A. Valentino, J.E. Lin, A.E. Snook, P. Li, G.W. Kim, G. Marszalewicz, et al., A uroguanylin-GUCY2C endocrine axis regulates feeding in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2013) 3578–3588.
- [92] C. Sengenès, V. Stich, M. Berlan, J. Hejnova, M. Lafontan, Z. Pariskova, et al., Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26 (2002) 24–32.
- [93] S. Haufe, J. Kaminski, W. Utz, V. Haas, A. Mahler, M.A. Daniels, et al., Differential response of the natriuretic peptide system to weight loss and exercise in overweight or obese patients, *J. Hypertens.* (2015) (in press).
- [94] E. Maoz, A. Shamiss, E. Peleg, M. Salzberg, T. Rosenthal, The role of atrial natriuretic peptide in natriuresis of fasting, *J. Hypertens.* 10 (1992) 1041–1044.
- [95] N. Chainani-Wu, G. Weidner, D.M. Purnell, S. Frenda, T. Merritt-Worden, C. Kemp, et al., Relation of B-type natriuretic peptide levels to body mass index after comprehensive lifestyle changes, *Am. J. Cardiol.* 105 (2010) 1570–1576.
- [96] R. van Kimmenade, F. van Dielen, J. Bakker, J. Nijhuis, H. Crijns, W. Buurman, et al., Is brain natriuretic peptide production decreased in obese subjects? *J. Am. Coll. Cardiol.* 47 (2006) 886–887.
- [97] J.V. St Peter, G.G. Hartley, M.M. Murakami, F.S. Apple, B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP in obese patients without heart failure: relationship to body mass index and gastric bypass surgery, *Clin. Chem.* 52 (2006) 680–685.
- [98] E.M. Changchien, S. Ahmed, F. Betti, J. Higa, K. Kiely, T. Hernandez-Boussard, et al., B-type natriuretic peptide increases after gastric bypass surgery and correlates with weight loss, *Surg. Endosc.* 25 (2011) 2338–2343.
- [99] A. Chen-Tournoux, A.M. Khan, A.L. Baggish, V.M. Castro, M.J. Semigran, E.L. McCabe, et al., Effect of weight loss after weight loss surgery on plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels, *Am. J. Cardiol.* 106 (2010) 1450–1455.
- [100] S.R. Das, M.H. Drazner, D.L. Dries, G.L. Vega, H.G. Stanek, S.M. Abdullah, et al., Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study, *Circulation* 112 (2005) 2163–2168.
- [101] S. Blankenberg, T. Zeller, O. Saarela, A.S. Havulinna, F. Kee, H. Tunstall-Pedoe, et al., Contribution of 30 biomarkers to 10-year cardiovascular risk estimation in 2 population cohorts: the MONICA, risk, genetics, archiving, and monograph (MORGAM) biomarker project, *Circulation* 121 (2010) 2388–2397.
- [102] R. Pfister, S. Sharp, R. Luben, P. Welsh, I. Barroso, V. Salomaa, et al., Mendelian randomization study of B-type natriuretic peptide and type 2 diabetes: evidence of causal association from population studies, *PLoS Med.* 8 (2011) e1001112.
- [103] I.J. Neeland, B.R. Winders, C.R. Ayers, S.R. Das, A.Y. Chang, J.D. Berry, et al., Higher natriuretic peptide levels associate with a favorable adipose tissue distribution profile, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 752–760.
- [104] H.C. Looker, M. Colombo, F. Agakov, T. Zeller, L. Groop, B. Thorand, et al., Protein biomarkers for the prediction of cardiovascular disease in type 2 diabetes, *Diabetologia* 58 (6) (2015) 1363–1371.
- [105] H. Makino, M. Mukoyama, K. Mori, T. Suganami, M. Kasahara, K. Yahata, et al., Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice, *Diabetologia* 49 (2006) 2514–2524.
- [106] S.Z. Lutz, A.M. Hennige, S. Feil, A. Peter, A. Gerling, J. Machann, et al., Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes liver inflammation and fasting hyperglycemia, *Diabetes* 60 (2011) 1566–1576.

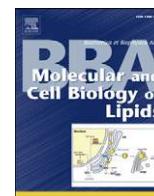
ANNEXE II

**Défauts primaires dans la lipolyse et dans l'action de l'insuline dans des
cellules musculaires issues d'individus diabétiques de type 2**

**Primary defects in lipolysis and insulin action in skeletal muscle cells from type 2
diabetic individuals**

Eili T. Kase^{*}, Yuan Zeng Feng, Pierre-Marie Badin, Siril S. Bakke, Michael Gaster, Claire
Laurens, Marine Coué, Dominique Langin, G. Hege Thoresen, Arild C. Rustan
and Cedric Moro

Biochimica Biophysica Acta (Vol. 1851(9):1194-1201 (2015))



Primary defects in lipolysis and insulin action in skeletal muscle cells from type 2 diabetic individuals



Eili T. Kase^{a,*}, Yuan Z. Feng^a, Pierre-Marie Badin^b, Siril S. Bakke^a, Claire Laurens^b, Marine Coue^b, Dominique Langin^{b,c}, Michael Gaster^d, G. Hege Thoresen^{a,e}, Arild C. Rustan^a, Cedric Moro^b

^a Department of Pharmaceutical Biosciences, University of Oslo, Oslo, Norway

^b Inserm, Paul Sabatier University, UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

^c Department of Clinical Biochemistry, Toulouse University Hospitals, Toulouse, France

^d Laboratory of Molecular Physiology, Department of Pathology, Odense University Hospital, Odense, Denmark

^e Department of Pharmacology, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo and Oslo University Hospital, Oslo, Norway

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2014

Received in revised form 17 February 2015

Accepted 16 March 2015

Available online 24 March 2015

Keywords:

Type 2 diabetes

Insulin sensitivity

Skeletal muscle cell

Lipase

Lipolysis

ABSTRACT

A decrease in skeletal muscle lipolysis and hormone sensitive-lipase (HSL) expression has been linked to insulin resistance in obesity. The purpose of this study was to identify potential intrinsic defects in lipid turnover and lipolysis in myotubes established from obese and type 2 diabetic subjects. Lipid trafficking and lipolysis were measured by pulse-chase assay with radiolabeled substrates in myotubes from non-obese/non-diabetic (lean), obese/non-diabetic (obese) and obese/diabetic (T2D) subjects. Lipolytic protein content and level of Akt phosphorylation were measured by Western blot. HSL was overexpressed by adenovirus-mediated gene delivery. Myotubes established from obese and T2D subjects had lower lipolysis (–30–40%) when compared to lean, using oleic acid as precursor. Similar observations were also seen for labelled glycerol. Incorporation of oleic acid into diacylglycerol (DAG) and free fatty acid (FFA) level was lower in T2D myotubes, and acetate incorporation into FFA and complex lipids was also lower in obese and/or T2D subjects. Both protein expression of HSL (but not ATGL) and changes in DAG during lipolysis were markedly lower in cells from obese and T2D when compared to lean subjects. Insulin-stimulated glycogen synthesis (–60%) and Akt phosphorylation (–90%) were lower in myotubes from T2D, however, overexpression of HSL in T2D myotubes did not rescue the diabetic phenotype. In conclusion, intrinsic defects in lipolysis and HSL expression co-exist with reduced insulin action in myotubes from obese T2D subjects. Despite reductions in intramyocellular lipolysis and HSL expression, overexpression of HSL did not rescue defects in insulin action in skeletal myotubes from obese T2D subjects.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder characterized with chronic hyperglycemia that affects the way the body utilizes energy. It is initiated by a combination of factors, including defects in regulation of glucose homeostasis and insulin resistance, a condition in which the body's skeletal muscle, adipose and liver tissue do not respond effectively to insulin [1]. Insulin resistance is possibly partly induced by chronic lipid overload in skeletal muscle, especially caused by long-chain acyl-CoAs, diacylglycerols (DAG) and ceramides [2–4].

Abbreviations: ACSL, acyl-CoA synthetase; ATGL, adipose triglyceride lipase; CE, cholesteryl esters; DAG, diacylglycerol; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GIR, glucose infusion rate; HSL, hormone sensitive lipase; IMTG, intramuscular triacylglycerol; MGL, monoacylglycerol (MAG) lipase; OA, oleic acid; PL, phospholipids; T2D, type 2 diabetes; TAG, triacylglycerols

* Corresponding author at: School of Pharmacy, P.O. Box 1068 Blindern, 0316 Oslo, Norway. Tel.: +47 22856545; fax: +47 22854402.

E-mail address: e.t.kase@farmasi.uio.no (E.T. Kase).

Lipids are stored as triacylglycerols (TAG) in lipid droplets within skeletal muscle, called intramuscular triacylglycerol (IMTG), and upon energy demand e.g. during exercise, IMTG is used as energy source by healthy subjects [5,6]. There are evidences that increased IMTG is associated with higher levels of lipotoxic intermediates such as DAG and ceramides that might inhibit insulin signalling [7]. However, the mechanism by which IMTGs might contribute to lipotoxicity in obese, insulin resistant, or T2D subjects, remains poorly understood. Recent data suggest that intramyocellular dynamics, like lipid influx and altered rate of lipid turnover, may play an important role in developing insulin resistance [8]. Lipid turnover has a significant impact on insulin sensitivity and glucose homeostasis. Skeletal muscle tissue lipid oxidation and fatty acid (FA) incorporation into TAG are altered in obese individuals with T2D compared to BMI-matched controls, but only the disturbances in TAG incorporation are conserved in cultured myotubes [9–11].

TAG breakdown is mediated by lipases. The first step in hydrolysis of TAGs in skeletal muscle is catalysed by adipose triglyceride lipase (ATGL) [12]. Monoacylglycerol (MAG) lipase (MGL) and hormone-

sensitive lipase (HSL) were the first lipases identified, and both are highly expressed in skeletal muscle. HSL displays a 10-fold higher specificity for DAG compared to TAG, MAG and cholesteryl esters (CE) [13–15]. Recently, we and others have observed that the expression of ATGL and HSL seems to be altered in myotubes from obese and obese type 2 diabetic individuals when compared to lean controls, however the results are inconsistent. In short, protein expression of ATGL and HSL has been reported to be unaltered or reduced in myotubes from obese and T2D subjects [12,16–21]. Of interest, a selective pharmacological inhibition of lipolysis in myotubes from lean healthy donors was sufficient to inhibit insulin action [16]. The molecular mechanism involves at least in part DAG-mediated protein kinase C (PKC) activation [16]. We therefore hypothesized that reduced muscle HSL protein content could contribute to obesity-related insulin resistance. Because primary human muscle cells retain some of the phenotypic characteristic of their donors [10,22,23], we aimed to identify potential intrinsic defects in lipolysis and HSL expression in myotubes established from obese and obese T2D compared to lean subjects. We further determined whether overexpression of HSL could rescue the insulin resistant phenotype of myotubes from T2D subjects.

2. Material and methods

2.1. Materials

Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM–Glutamax™), DMEM without phenol red, heat-inactivated foetal calf serum (FCS), α MEM, human epithelial growth factor (hEGF), fetuin, gentamycin, and penicillin–streptomycin and amphotericin B were purchased from Gibco Invitrogen (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK). Ultrosor G was purchased from PALL Life Science (Port Washington, NY, US), insulin (Actrapid®) from NovoNordisk (Bagsvaerd, Denmark), BSA (bovine serum albumin) (essentially fatty acid-free), L-carnitine, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS with Mg^{2+} and Ca^{2+}), oleic acid (OA, 18:1, n-9), glycerol, triacsin C, HEPES, extracellular matrix (ECM) gel, glycogen, dexamethasone, protease inhibitor and phosphatase I and II inhibitors, were all obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, US). [$1-^{14}C$]oleic acid (58.2 mCi/mmol), [$1-^{14}C$]acetate (56.0 mCi/mmol), [$^{14}C(U)$]glycerol (142 mCi/mmol) and D[$^{14}C(U)$]glucose (2.9 mCi/mmol) were from PerkinElmer NEN® (Boston, MA, US). Corning CellBIND® tissue culture plates (96- and 12-well plates) were obtained from Corning Life-Sciences (Schiphol-Rijk, The Netherlands). Isoplate® scintillation plates and OptiPhase Supermix, and all liquid scintillations were performed by the 1450 MicroBeta TriLux scintillation or Packard Tri-Carb 1600 counters, were obtained from PerkinElmer (Shelton, CT, US). Thin layer chromatography plates were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), nitrocellulose membrane from Hybond ECL (Amersham Biosciences, Boston, MA, US) and chemiluminescence reagent and hyperfilm ECL from GE Healthcare. Antibodies for pAkt Ser473 (#4060), Akt (#4691), ATGL (#2138), HSL (#4107) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, #2118) was purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, US). Protein assay reagent was purchased from BioRad (Copenhagen, Denmark) or Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Human HSL cDNA was cloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and obtained from Vector Biolabs (Philadelphia, PA). All other chemicals used were of standard commercial high-purity quality.

2.2. Human study subjects

Eight non-obese/non-diabetic (lean) control subjects, nine obese/non-diabetic (obese) subjects and eight obese/diabetic (T2D) subjects participated in the study (Table 1) [24]. Only sedentary subjects were recruited. The diagnosis of type 2 diabetes was based on fasting plasma glucose ≥ 7.0 mmol/L, HbA1c $\geq 6.5\%$ and/or use of one or more antidiabetic drug. Diabetic patients were treated either with diet alone or in

Table 1
Clinical characteristics of the biopsy donors.

Clinical variables	Lean	Obese	T2D
Age (years)	51 \pm 3.5	47 \pm 4.5	50 \pm 4.8
Body mass index (kg/m ²)	24 \pm 1.8	34 \pm 5.0*	33 \pm 3.8*
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.7 \pm 0.4	5.7 \pm 0.6	10 \pm 2.1**
Fasting serum insulin (pmol/L)	25 \pm 20	57 \pm 16*	97 \pm 33**
HbA1c (%)	5.6 \pm 0.2	5.4 \pm 0.3	7.6 \pm 1.5**
Glucose infusion rate (mg/min/m ²)	392 \pm 64	235 \pm 64*	121 \pm 61**

Values represent means \pm SD (n = 8–9 per group).

* p < 0.05 vs lean.

p < 0.05 vs obese, T2D, type 2 diabetes (Bonferroni adjusted).

combination with sulfonylurea, metformin or insulin, which was withdrawn 1 week before the study. The patients had no diabetic complications apart from simplex retinopathy that was self-reported based on previous diagnosis by an ophthalmologist. The control subjects had normal fasting glucose concentrations and HbA1c levels and no family history for type 2 diabetes. The groups were matched with respect to age, but differed by BMI, fasting plasma glucose concentrations, fasting serum insulin levels, HbA1c and glucose infusion rate by hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC, 40 mU/m² per min of insulin, after overnight fasting for 10 h). Muscle biopsies were obtained from *m. vastus lateralis* in the fasted state by needle biopsy under local anaesthesia. All subjects gave written informed consent, and the local ethics committee of Funen and Vejle County approved the study. Cell cultures were established from proliferated satellite cells as previously described [25].

2.3. Cell culture

Myoblasts from control, obese and T2D subjects were cultured on multi-well plates or 25 cm² flasks in DMEM–Glutamax™ (5.5 mmol/L glucose), 2% FCS, 2% Ultrosor G, 25 IU penicillin, 25 μ g/mL streptomycin, and 1.25 μ g/mL amphotericin B or in DMEM–Glutamax™ (5.5 mmol/L glucose) supplemented with 10% FCS, 10 ng/mL hEGF, 0.39 μ g/mL dexamethasone, 0.05% BSA, 0.5 mg/mL fetuin, 50 ng/mL gentamycin and 50 ng/mL amphotericin B. At 70–80% confluence, the growth medium was replaced by DMEM–Glutamax™ supplemented with 2% FCS, 25 IU penicillin, 25 μ g/mL streptomycin, 1.25 μ g/mL amphotericin B, and 25 pmol/L insulin or α MEM supplemented with 2% FCS, 0.5 mg/mL fetuin, 25 IU penicillin and 25 μ g/mL streptomycin to induce differentiation. The cells were cultured in humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C, and the media were changed every 2–3 days. Human myotubes were allowed to differentiate at a physiological concentration of insulin (25 pmol/L) and glucose (5.5 mmol/L).

2.4. Pulse–chase assay and lipid distribution from oleic acid

Myotubes were cultured on 96-well or 12-well plates. On day six of differentiation the myotubes were pulsed with [$1-^{14}C$]oleic acid (OA, 100 μ mol/L, 0.5 μ Ci/mL) or [$^{14}C(U)$]glycerol (10 μ mol/L, 0.5 μ Ci/mL) for 24 h in differentiation medium. After pre-labelling, the cells were washed twice with 0.5% fatty acid-free BSA in DPBS at 37 °C. Some of the OA-labelled cells were harvested at the end of the pulse period (T0) with two additions of 125 μ L distilled water to determine OA incorporation into TAG, DAG, FFA (free fatty acid), CE (cholesteryl esters) and PL (phospholipids). Following the pulse, myotubes were chased for 3 h with DPBS-medium containing 10 mmol/L HEPES, 100 μ mol/L glucose and 0.5% fatty acid-free BSA. After 3 h cell-associated radioactivity for [$^{14}C(U)$]glycerol was determined, and lipid distribution of [$1-^{14}C$]OA was measured. Lipolysis was measured as [$1-^{14}C$]OA and [$^{14}C(U)$]glycerol released from the cells. Re-esterification of OA was calculated as total lipolysis (w/triacsin C, 10 μ mol/L) minus basal lipolysis (wo/triacsin C) after 3 h [26]. Triacsin

C inhibits long-chain fatty acyl-CoA synthetase (ACSL) and will therefore inhibit, among other pathways, fatty acid oxidation and re-esterification of fatty acids into the TAG pool. Cellular uptake of radiolabel glycerol was estimated as sum of cell-associated glycerol plus total lipolysis, while uptake of oleic acid was calculated as sum of total lipids (TAG, DAG, FFA, CE and PL) at the end of the chase period (T3) plus total lipolysis. Fractional lipolysis was calculated as total lipolysis/uptake. For lipid distribution, cellular lipids were extracted as described earlier [11]. Briefly, homogenized cell fractions were extracted, lipids were separated by thin layer chromatography (TLC) using hexane-diethylether-acetic acid (65:35:1, v/v/v) as developing solvent. The radioactivity was quantified by liquid scintillation. Finally, the protein content of each sample was determined by use of Coomassie reagent and results standardized according to this value for each well [27].

2.5. Lipid distribution from labelled acetate

Myotubes were cultured on 12-well plates coated with ECM gel and incubated with [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetate (2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) for 4 h on day 7 of differentiation, to study lipid distribution from labelled acetate. Myotubes were placed on ice, washed three times with PBS (1 mL), harvested into a tube with two additions of 125 μL distilled water and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The cells were later assayed for protein [27], and cellular lipids were extracted [11]. Briefly, the homogenized cell fraction was extracted, lipids were separated by TLC and the radioactivity was quantified by liquid scintillation. Another non-polar solvent mixture of hexane-diethylether-acetic acid (50:50:1, v/v/v) followed by pure hexane was used to separate free cholesterol from diacylglycerol (DAG). The amount of neutral lipids was calculated by using total protein levels for standardization.

2.6. Western blot analysis

Myotubes were harvested in a buffer containing 50 mmol/L HEPES, pH 7.4, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 30 mmol/L NaPO_4 , 10 mmol/L NaF, 1% Triton X-100, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ protease inhibitor, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ phosphatase I inhibitor, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ phosphatase II inhibitor, and 1.5 mg/mL benzamidine HCl. Cell extracts were sonicated and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Solubilized proteins (30 μg) were run on a 4–20% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and incubated with the primary antibodies: ATGL, HSL, pAkt Ser473, and Akt. Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the ChemiDoc MP Imaging System and data analysed using the Image Lab 4.1 version software. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as an internal control.

2.7. Overexpression of HSL

Human HSL cDNA was cloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). DNA sequencing was performed to check correct insertion of the cDNA using an ABI3100 automatic sequencer. An adenovirus expressing in tandem green fluorescent protein (GFP) and HSL was constructed, purified, and titrated (Vector Biolabs, Philadelphia, PA, US). An adenovirus containing the GFP gene only was used as a control. Myotubes were infected with the control (GFP), and HSL adenovirus at day 4 of differentiation and remained exposed to the virus for 24 h in serum-free DMEM containing 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ of oleate complexed to BSA (ratio 4:1). No adenovirus-induced cellular toxicity was observed as determined by chemiluminescent quantification of adenylate kinase activity. For insulin signalling experiments, infected myotubes were preincubated with a glucose- and serum-free DMEM for 90 min and then incubated for 20 min in αMEM (5.5 mmol/L glucose) with or without 100 nmol/L of insulin.

2.8. Determination of glycogen synthesis

Cells were preincubated with a glucose- and serum-free DMEM for 90 min and then exposed to DMEM supplemented with $\text{D}[^{14}\text{C}(\text{U})]\text{glucose}$ (1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$, 5.5 mmol/L) in the presence or absence of 100 nmol/L insulin for 3 h. In preliminary unpublished studies from our laboratory, we have seen a defective insulin-stimulated glycogen synthesis at all concentrations of insulin ranging from 1 to 100 nM. Based on this, we decided to use 100 nM of insulin for experiment to reach maximal stimulation of glycogen synthesis in all experiments and type of donors. After incubation, glycogen synthesis was determined as described previously [28].

2.9. Presentation of data and statistics

All values are reported as means \pm SEM, except from clinical values presented in Table 1 that is reported as means \pm SD. The value n usually represents the number of different donors used, each with at least triplicate samples. Statistical analyses were performed using either GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US) or IBM® SPSS® (version 21, IBM Corporation, New York, NY, US). Two-tailed unpaired Student's t-tests were performed to determine the difference between myotubes from two donor groups. Linear mixed models (LMMs) were used to compare effects of different treatments used in accumulation and lipolysis experiments for labelled glycerol between all donor groups (IBM SPSS). The linear mixed models include all observations in the statistical analyses and at the same time take into account that not all observations are independent. Correlations are presented as Spearman's correlation coefficient (r). Clinical data were compared using ANOVA with Bonferroni adjustment for multiple comparisons (IBM SPSS). A p-value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Clinical characteristics of the biopsy donors

Fasting plasma glucose, serum insulin and HbA1c (Table 1) were significantly higher in obese/diabetic subjects (T2D) than in obese/non-diabetic subjects (obese) with similar body mass index (BMI), whereas glucose infusion rate (GIR) was lower in T2D subjects. As expected, clinical characteristics of non-obese/non-diabetic subjects (lean) were different from obese subjects with respect to BMI, fasting serum insulin and GIR. The age was not significantly different between the three donor groups.

3.2. Total lipolysis was lower in myotubes from obese and type 2 diabetic subjects, while lipid distribution was altered in myotubes from type 2 diabetic subjects

To identify intrinsic defects in lipid metabolism in myotubes from obese and T2D subjects we first assessed uptake, synthesis, and hydrolysis of fatty acids using [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oleic acid (OA). Cellular uptake of OA was unchanged (Fig. 1A), while a lowering in total lipolysis (w/triacsin C) in myotubes from obese (-30%) and T2D subjects (-40%) compared to myotubes from lean subjects (Fig. 1B). Related to uptake of labelled precursor, fractional lipolysis (total lipolysis/total uptake) was significantly lower in myotubes from T2D subjects (-25%) compared to lean subjects (Fig. 1C). Re-esterification (measured as total lipolysis minus basal lipolysis) (wo/triacsin C) of OA was not different between donor groups (data not shown). Lipid distribution was altered in myotubes from T2D subjects after 24 h incubation with radiolabelled OA; free fatty acids (FFA) and diacylglycerol (DAG) were lower in cells from the T2D group, while triacylglycerol (TAG), phospholipids (PL) and cholesteryl esters (CE) were unchanged (Fig. 1D).

To verify the reduced lipolysis of labelled OA observed in myotubes from obese and T2D subjects with another substrate in glycerolipid metabolism, [$^{14}\text{C}(\text{U})\text{glycerol}$] was used to label the lipid pool. There was a

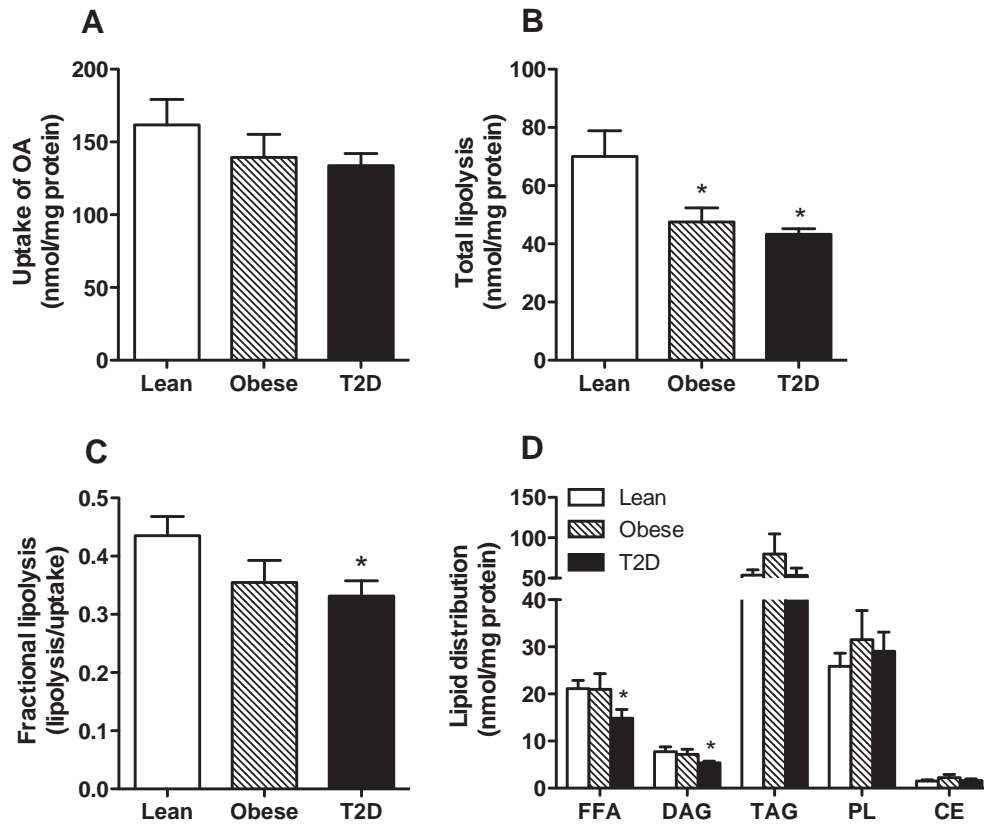


Fig. 1. Lipolysis and lipid distribution in human myotubes. Human myotubes were pretreated with [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oleic acid (OA) ($100\ \mu\text{mol/L}$, $0.5\ \mu\text{Ci/mL}$) for 24 h. After another 3 h, total lipolysis (w/triactin C, $10\ \mu\text{mol/L}$) was measured as [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA released from the cells. The figure shows uptake of OA (sum of total cellular lipids plus total lipolysis) (A), total lipolysis, (B) fractional lipolysis (C) and lipid distribution of free fatty acids (FFA), diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TAG), phospholipids (PL) and cholesteryl esters (CE) from labelled OA. Results represent means \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs lean.

50% lower cellular uptake (Fig. 2A) of glycerol and lower total lipolysis (w/triactin C) in myotubes from both obese (-60%) and T2D (-75%) subjects compared to myotubes from lean subjects (Fig. 2B). Fractional lipolysis was significantly lower in myotubes from T2D subjects (-20%) than in cells from lean subjects (Fig. 2C).

3.3. Lipogenesis and lipid synthesis from acetate was reduced in myotubes from obese and type 2 diabetic subjects

We also studied how the cells from the different donor groups managed lipogenesis and synthesis of complex lipids from [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetate and whether this process also differed between donor groups as seen

for fatty acid and glycerol uptake and lipolysis (Figs. 1 and 2). Lipogenesis was significantly lower in myotubes from obese and T2D subjects for DAG, phospholipids (PL), CE and total lipids compared to myotubes from lean subjects (Fig. 3). FFA was only significantly lower in myotubes from T2D subjects than in myotubes from lean subjects, while TAG was unchanged.

3.4. Protein expression of HSL and levels of DAG were lower in myotubes from obese subjects

Recently, it has been shown that protein expression of HSL was reduced in muscle biopsies from obese subjects [16]. We wanted to

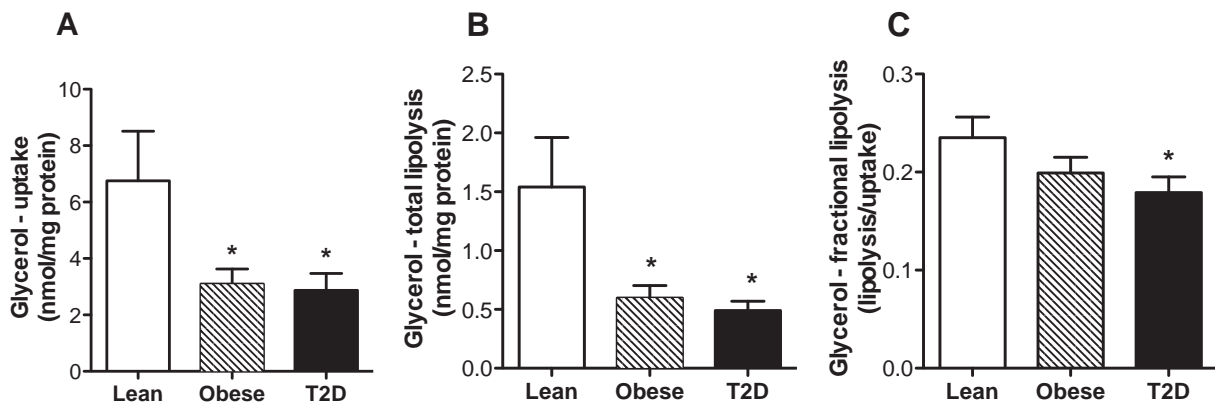


Fig. 2. Glycerol uptake and lipolysis in human myotubes. Human myotubes were pretreated with [$1\text{-}^{14}\text{C}$]glycerol ($10\ \mu\text{mol/L}$, $0.5\ \mu\text{Ci/mL}$) for 24 h. After another 3 h, total lipolysis (w/triactin C, $10\ \mu\text{mol/L}$) was measured as [$1\text{-}^{14}\text{C}$]glycerol released from the cells and cell-associated [$1\text{-}^{14}\text{C}$]glycerol was measured. The figure shows uptake (sum of cell-associated glycerol plus total lipolysis) (A), total lipolysis (B) and fractional lipolysis (C). Results represent means \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs lean (Bonferroni adjusted).

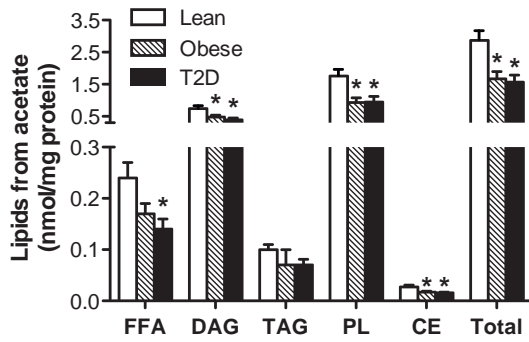


Fig. 3. Lipogenesis and lipid distribution from acetate in human myotubes. Human myotubes were incubated with [14 C]acetate (100 μ mol/L, 2 μ Ci/mL) for 4 h. Lipid distribution was measured by thin-layer chromatography. The figure shows synthesis of free fatty acid (FFA), diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TAG), phospholipids (PL), cholesteryl ester (CE) and total lipogenesis (sum of FFA, DAG, TAG and CE). Results represent means \pm SEM ($n = 7$). * $p < 0.05$ vs lean.

explore whether this reduction was conserved in myotubes from obese and T2D *in vitro*. The HSL protein expression was lower in myotubes from obese (–30%) and obese T2D (–60%) subjects, when compared to myotubes from lean subjects. The protein expression of ATGL was not different between the donor groups (Fig. 4).

Further, the concentration of OA-labelled DAG during lipolysis was markedly higher in myotubes from lean subjects compared to both obese (–75%) and T2D (–90%) (Fig. 5A). Concentration of intracellular FFA was only lower in T2D cells during lipolysis when compared to myotubes from lean (Fig. 5B). Levels of TAG were not changed during lipolysis under the experimental conditions used in this study (data not shown).

3.5. Turnover of DAG during lipolysis in myotubes correlated with BMI, insulin, plasma glucose and GIR

For all donors, there were negative correlations between turnover of DAG during lipolysis and BMI (Fig. 6A), fasted plasma insulin (Fig. 6B) and fasted plasma glucose levels (Fig. 6C), while there was a positive correlation between changes of DAG during lipolysis and glucose infusion rate (GIR) (Fig. 6D). We obtained similar results when correlating the same parameters to levels of FFA after pulse–chase treatment with labelled OA (data not shown).

3.6. Overexpression of HSL in type 2 diabetic myotubes did not rescue the cells from insulin resistance

To evaluate whether the diabetic phenotype could be altered by overexpression of HSL in myotubes, we used an adenovirus gene delivery method to overexpress HSL in myotubes from T2D subjects that resulted in a 15-fold increase in the expression of HSL (Figs. 7A and B). HSL overexpression slightly reduced TAG content (Fig. 7C) in myotubes without altering baseline DAG content (Fig. 7D). Of importance, the T2D myotubes were less insulin responsive in terms of glycogen synthesis (Fig. 7E) and Akt phosphorylation (Fig. 7F) than lean control myotubes, confirming an intrinsic insulin resistance. Further, insulin resistance persisted in T2D myotubes over-expressing HSL.

4. Discussion

This study shows for the first time a lower lipolysis rate of labelled oleic acid (OA) in myotubes established from obese and obese T2D subjects when compared to lean control cells. Protein expression of hormone-sensitive lipase (HSL) was lower in myotubes established from obese and T2D donors, and this was reflected by a lower turnover of diacylglycerol (DAG) during lipolysis for the obese groups compared

to myotubes established from lean subjects. Insulin-stimulated glycogen synthesis and Akt-phosphorylation were strongly reduced in myotubes from T2D, when compared to lean subjects, confirming an insulin resistant state in these cells [23,29,30]. Overexpression of HSL in T2D myotubes was not sufficient to rescue insulin action and the diabetic phenotype. This suggests that intrinsic defects in insulin action and glycogen synthase activation persist in cultured myotubes independently of primary defects in lipid turnover and lipolysis.

Previous studies have shown that there are differences in handling of lipids and lipase protein content in skeletal muscle from lean, obese and T2D individuals [9,12,16], but no mechanistic studies have yet demonstrated functional defects in lipolysis in skeletal muscle cells from obese and T2D individuals. Our study confirms that there is an intrinsic difference in lipid handling between myotubes from lean, obese and T2D subjects. We observed that the uptake of glycerol was different in obese and T2D cells compared to control myotubes and also incorporation of OA and acetate into free fatty acids (FFA) and complex lipids, suggesting that this difference is connected to the synthesis, uptake and esterification of fatty acids. Although *de novo* lipogenesis in myotubes seem to be quite low, this pathway has previously been shown to be functional [31,32]. Despite marginal differences in the uptake and/or esterification of lipolysis metabolites between donors, we observed that lipolysis was specifically lower in myotubes from T2D compared to lean subjects after adjusting for differences in uptake of OA and glycerol (fractional lipolysis). Altogether, our data show that primary defects in lipid handling and turnover persist *in vitro* in myotubes established from obese subjects with and without T2D.

A recent work by Sparks et al. [9] showed that incorporation of FFAs into TAG was lower in myotubes from T2D subjects, with a correlation of TAG level/incorporation between muscle tissue and primary myotubes. Further, myotubes from T2D subjects accumulated more lipids when activating lipid metabolism through LXR than control cells [33]. These studies indicate that the ability to incorporate FFAs into TAG and complex lipids is an intrinsic feature of human skeletal muscle

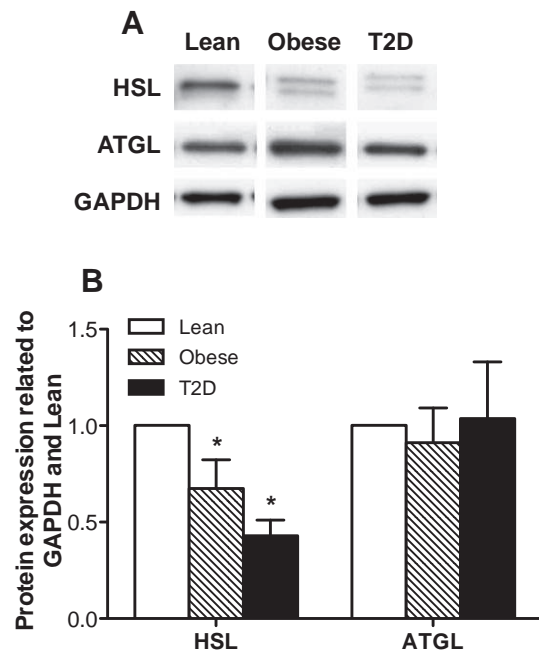


Fig. 4. Protein expressions of lipases. Protein expression of hormone-sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL) in myotubes was studied and related to GAPDH. Representative Western blots are shown in (A). Values in (B) represent fold change of proteins in myotubes from obese and T2D relative to lean, given as means \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0.05$ vs lean.

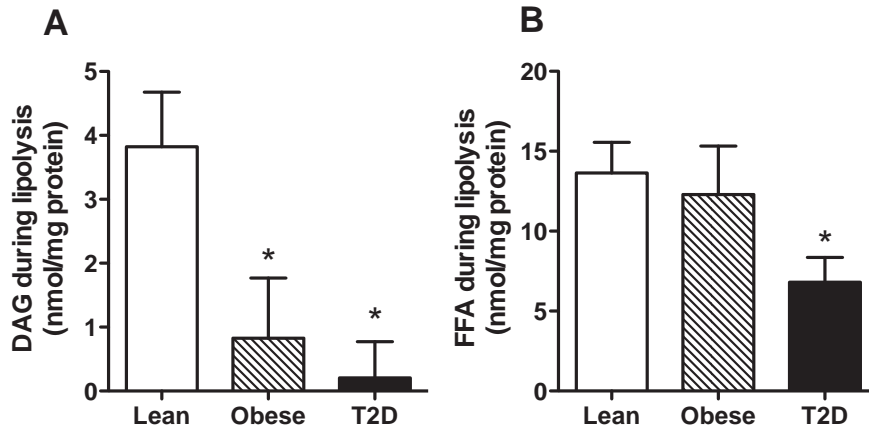


Fig. 5. Changes in diacylglycerol and free fatty acid levels during lipolysis. Human myotubes were pretreated with [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oleic acid (OA) (100 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$) for 24 h. After another 3 h, lipid distribution of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA and total lipolysis (w/triactin C) as [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA released from the cells, were determined. The figure shows change in levels of diacylglycerol (DAG) (A) and change in free fatty acids (FFA) (B) during lipolysis. Results represent means \pm SEM (n = 6). *p < 0.05 vs lean.

cells that is different in myotubes from individuals with T2D. We observed that lipolysis was lower in myotubes derived from both obese groups when compared to the lean group. Incorporation of OA into DAG was lower only in the T2D group (Fig. 1D), but the turnover of the same fatty acids during lipolysis was markedly different between lean and both obese groups (Fig. 5A). Previous studies suggested that

dysregulated lipolysis could increase toxic lipid intermediate levels in skeletal muscle, leading to the development of insulin resistance [8,14, 34]. One could speculate whether the observed changes in lipolysis found in this study, is a sign of difference in lipid turnover in the various donor groups. Also incorporation of acetate into FFAs and complex lipids (de novo lipogenesis) was lower in myotubes from both obese groups

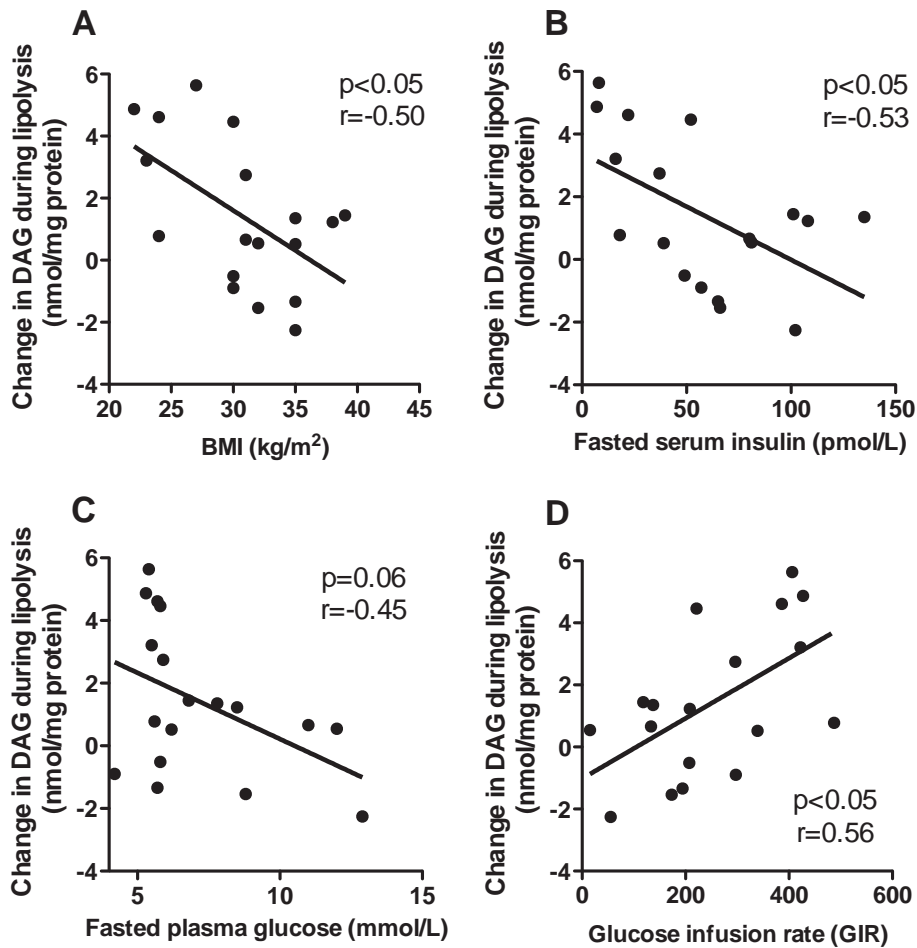


Fig. 6. Correlations of changes in diacylglycerol during lipolysis vs clinical metabolic phenotypes. The relationships between change in diacylglycerol (DAG) during lipolysis in vitro and corresponding clinical data including body mass index (BMI) (A), fasted insulin (B), fasted plasma glucose (C) and glucose infusion rate (D) were determined by non-parametric correlations (Spearman). n = 6 donors in each group.

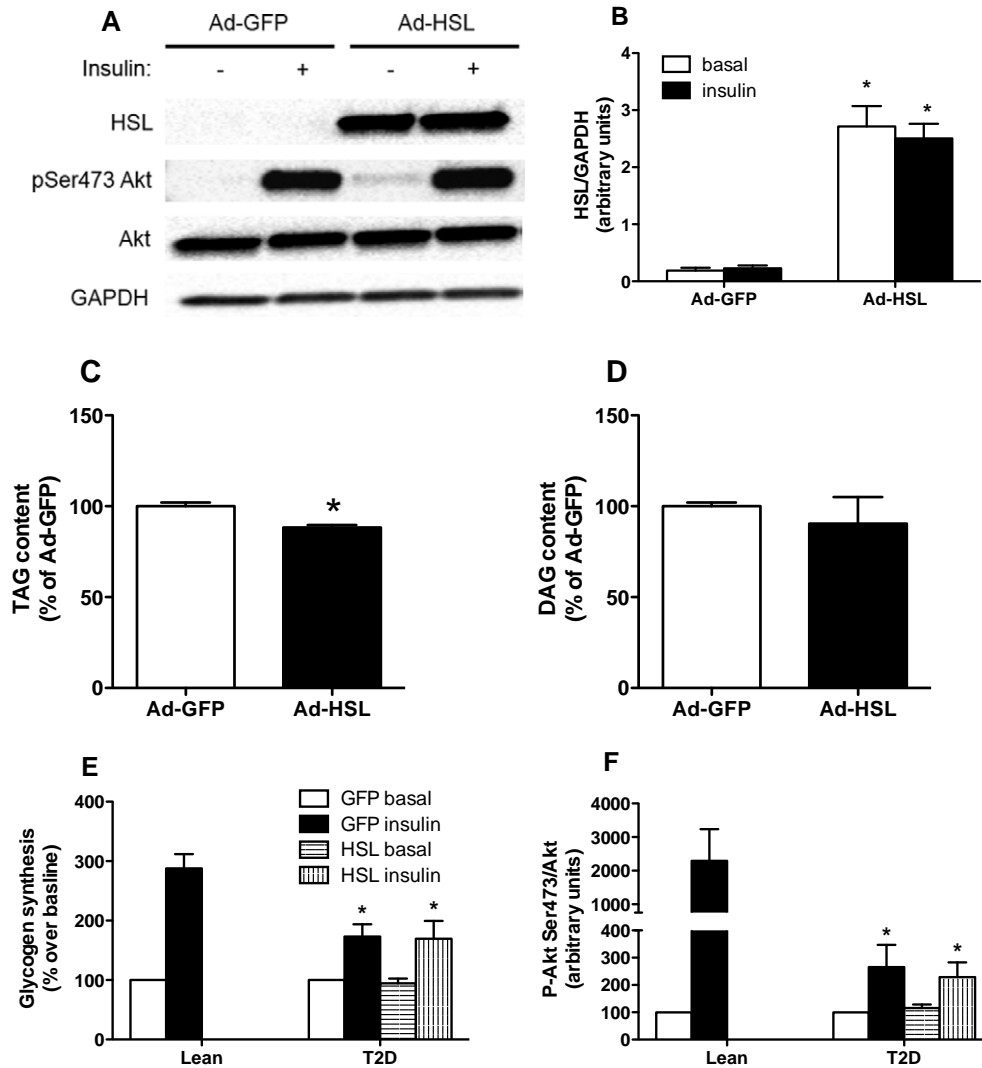


Fig. 7. The effect of HSL overexpression on insulin sensitivity markers in myotubes. An adenovirus gene delivery method was used to overexpress HSL in myotubes as shown in (A) and (B). Incorporation of [^{14}C]oleic acid (OA) (100 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$) into triacylglycerol (TAG) (C) and diacylglycerol (DAG) (D) was measured after 18 h. Glycogen synthesis (E) was measured as D[^{14}C (U)]glucose (1 $\mu\text{Ci/mL}$, 5.5 mmol/L) incorporation into glycogen in the presence or absence of 100 nmol/L insulin for 3 h, ($n = 4$ donors per group). Quantitative bar graph from Western blots of Ser473 phosphorylation of Akt (F) in the presence or absence of 100 nmol/L insulin for 20 min ($n = 6\text{--}8$). * $p < 0.05$ vs lean.

than myotubes from lean group, suggesting that the difference in handling of complex lipids may in large part affect lipid metabolism. Previous studies performed on human skeletal muscle cells failed to reveal significant differences in lipid handling between non-diabetic and diabetic myotubes [10,11]. Further, we observed a negative correlation between in vitro turnover of DAG during lipolysis and body mass index, and a positive relationship between in vitro turnover of DAG during lipolysis and whole-body insulin sensitivity (GIR), thus indicating that lower lipid turnover and lipolysis is an intrinsic characteristic of skeletal muscle cells in the context of obesity and/or insulin resistance. This is in line with the observation that low lipid turnover in skeletal muscle is related to lipotoxicity and insulin responsiveness in obesity, while high lipid turnover as observed in endurance-trained individuals may have a protective effect [3,14].

Badin et al. [16] hypothesized that an imbalance of ATGL relative to HSL (expression or activity) may contribute to DAG accumulation and insulin resistance. They found that overexpression of ATGL reduced insulin signalling in cells that muscle HSL protein was reduced in obese subjects and that HSL overexpression could restore a proper lipolytic balance in ATGL overexpressed cells. In the Badin study however, no difference in HSL protein expression in biopsies from T2D subjects was

observed likely because the T2D group was older and not well matched to the obese control group. Further, Jocken et al. [12] have shown in vivo that HSL protein content was lower in biopsies from skeletal muscle of obese men, while ATGL protein content was higher when compared to age-matched non diabetic lean controls. This difference in lipase content was accompanied by a lower ratio of DAG to TAG hydrolase activity in the obese men, reflecting functional defects in lipolysis. In this study, we observed a reduced protein level of HSL together with reduced total lipolysis and a corresponding change in levels of DAG and FFA during lipolysis in our in vitro myotube model and no alteration of ATGL protein expression, reflecting that functional defects in HSL expression and lipolysis are intrinsically retained in vitro in skeletal muscle cells in the context of obesity/T2D. Although down-regulation of HSL activity/expression has been linked to insulin resistance in human myotubes [16], overexpression of HSL in T2D cells was not sufficient to rescue insulin action and the diabetic phenotype in this study. However, we cannot rule out that increasing HSL expression may rescue insulin signalling and action in non-diabetic insulin resistant myotubes and/or exert a protective effect against lipid-induced insulin resistance. This should be examined in future studies.

In summary, this study raises a number of important questions. First, it is yet unclear how functional defects in lipolysis and insulin resistance are being intrinsically retained/imprinted in vitro in cultured skeletal muscle cells. Second, although primary defects in lipolysis, HSL protein content and insulin action co-exist in cultured primary muscle cells from obese T2D donors, these biological events appear independent from each other. Further studies are needed to unravel the molecular mechanisms underlying these defects. It would be of interest to examine in future studies how environmental changes (diet, exercise, disease progression) drive metabolic imprinting and remodels the gene expression pattern of skeletal muscle cells.

Transparency document

The Transparency document associated with these articles can be found, in the version.

Acknowledgement

We would like to thank Camilla Stensrud (Oslo), Katie Louche (I2MC Toulouse) and Irene Lynfort (Odense) for excellent technical assistance during this work. Kurt Højlund and Klaus Levin are thanked for muscle biopsies. This work was supported by grants from NBS (Norwegian biochemical society), the Norwegian Diabetes foundation and the Anders Jahres Foundation (to ACR), and from the National Research Agency ANR-12-JSV1-0010-01 and Société Francophone du Diabète (to CM). DL is a member of Institut Universitaire de France. The Danish Medical Research Council and the Novo Nordisk Foundation are also thanked for financial support.

References

- [1] W.T. Cefalu, Insulin resistance: cellular and clinical concepts, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 226 (1) (2001) 13–26.
- [2] Chow, L., A. From, and E. Seaquist, *Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction*. *Metabolism*. 59(1): p. 70–85.
- [3] P.M. Coen, B.H. Goodpaster, Role of intramyocellular lipids in human health, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (8) (2012) 391–398.
- [4] A. Golay, J. Ybarra, Link between obesity and type 2 diabetes, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19 (4) (2005) 649–663.
- [5] E.E. Blaak, Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus, *Proc. Nutr. Soc.* 62 (3) (2003) 753–760.
- [6] L.J. van Loon, B.H. Goodpaster, Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state, *Pflügers Arch.* 451 (5) (2006) 606–616.
- [7] D.E. Kelley, B.H. Goodpaster, L. Storlien, Muscle triglyceride and insulin resistance, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 325–346.
- [8] M. Bosma, et al., Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity, *Prog. Lipid Res.* 51 (1) (2012) 36–49.
- [9] L.M. Sparks, et al., Reduced incorporation of fatty acids into triacylglycerol in myotubes from obese individuals with type 2 diabetes, *Diabetes* 63 (5) (2014) 1583–1593.
- [10] E. Corpeleijn, et al., Oxidation of intramyocellular lipids is dependent on mitochondrial function and the availability of extracellular fatty acids, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299 (1) (2010) E14–E22.
- [11] M. Gaster, et al., Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes, *Diabetes* 53 (3) (2004) 542–548.
- [12] J.W. Jocken, et al., Skeletal muscle lipase content and activity in obesity and type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (12) (2010) 5449–5453.
- [13] A. Lass, et al., Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores, *Prog. Lipid Res.* 50 (1) (2011) 14–27.
- [14] P.M. Badin, D. Langin, C. Moro, Dynamics of skeletal muscle lipid pools, *Trends Endocrinol. Metab.* 24 (12) (2013) 607–615.
- [15] J. Langfort, et al., Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle, *Biochem. J.* 340 (Pt 2) (1999) 459–465.
- [16] P.M. Badin, et al., Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans, *Diabetes* 60 (6) (2011) 1734–1742.
- [17] P.M. Coen, et al., Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content, *Diabetes* 59 (1) (2010) 80–88.
- [18] J.W. Jocken, et al., Hormone-sensitive lipase serine phosphorylation and glycerol exchange across skeletal muscle in lean and obese subjects: effect of beta-adrenergic stimulation, *Diabetes* 57 (7) (2008) 1834–1841.
- [19] M. Li, et al., High muscle lipid content in obesity is not due to enhanced activation of key triglyceride esterification enzymes or the suppression of lipolytic proteins, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300 (4) (2011) E699–E707.
- [20] C. Moro, et al., Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (9) (2009) 3440–3447.
- [21] S. Bakke, et al., Myotubes from severely obese type 2 diabetic subjects accumulate less lipids and show higher lipolytic rate than myotubes from severely obese non-diabetic subjects, *PLoS ONE* 10 (3) (2015) p. e0119556.
- [22] B. Ukropcova, et al., Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor, *J. Clin. Invest.* 115 (7) (2005) 1934–1941.
- [23] M. Gaster, et al., The diabetic phenotype is conserved in myotubes established from diabetic subjects: evidence for primary defects in glucose transport and glycogen synthase activity, *Diabetes* 51 (4) (2002) 921–927.
- [24] N. Ortenblad, et al., Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect, *Biochim. Biophys. Acta* 1741 (1–2) (2005) 206–214.
- [25] M. Gaster, et al., A cellular model system of differentiated human myotubes, *Ampis* 109 (11) (2001) 735–744.
- [26] P.M. Badin, et al., Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58, *J. Lipid Res.* 53 (5) (2012) 839–848.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [28] M. Boschmann, et al., LMNA mutations, skeletal muscle lipid metabolism, and insulin resistance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (4) (2010) 1634–1643.
- [29] R.R. Henry, et al., *Glycogen synthase activity is reduced in cultured skeletal muscle cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects*. *Biochemical and molecular mechanisms*, *J. Clin. Invest.* 98 (5) (1996) 1231–1236.
- [30] A.W. Thorburn, et al., Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake, *J. Clin. Invest.* 85 (2) (1990) 522–529.
- [31] V. Aas, et al., Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells, *Diabetologia* 47 (8) (2004) 1452–1461.
- [32] E.T. Kase, et al., Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals, *Diabetologia* 50 (10) (2007) 2171–2180.
- [33] E.T. Kase, et al., Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway, *Diabetes* 54 (4) (2005) 1108–1115.
- [34] M.D. Mantzaris, E.V. Tsianos, D. Galaris, Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells, *FEBS J.* 278 (3) (2011) 519–530.

Références bibliographiques

Abdelalim, E. M., T. Takada, R. Torii and I. Tooyama (2006). "Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical localization in the hypothalamus of monkey." Peptides **27**(7): 1886-1893.

Addisu, A., W. R. Gower, Jr., C. S. Landon and J. R. Dietz (2008). "B-type natriuretic peptide decreases gastric emptying and absorption." Exp Biol Med (Maywood) **233**(4): 475-482.

Addisu, A., W. R. Gower, Jr., M. Serrano, D. Villarreal and J. R. Dietz (2011). "Heart failure mice exhibit decreased gastric emptying and intestinal absorption." Exp Biol Med (Maywood) **236**(12): 1454-1460.

Agui, T., X. Xin, Y. Cai, G. Shim, Y. Muramatsu, T. Yamada, H. Fujiwara and K. Matsumoto (1995). "Opposite actions of transforming growth factor-beta 1 on the gene expression of atrial natriuretic peptide biological and clearance receptors in a murine thymic stromal cell line." J Biochem **118**(3): 500-507.

Agustsson, T., M. Ryden, J. Hoffstedt, V. van Harmelen, A. Dicker, J. Laurencikiene, B. Isaksson, J. Permert and P. Arner (2007). "Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia." Cancer Res **67**(11): 5531-5537.

American Diabetes, A. (2015). "(2) Classification and diagnosis of diabetes." Diabetes Care **38 Suppl**: S8-S16.

Ando, K., N. Umetani, T. Kurosawa, S. Takeda, Y. Katoh and F. Marumo (1988). "Atrial natriuretic peptide in human urine." Klin Wochenschr **66**(17): 768-772.

Andreassi, M. G., S. Del Ry, C. Palmieri, A. Clerico, A. Biagini and D. Giannessi (2001). "Up-regulation of 'clearance' receptors in patients with chronic heart failure: a possible explanation for the resistance to biological effects of cardiac natriuretic hormones." Eur J Heart Fail **3**(4): 407-414.

Aoi, N., M. Soma, T. Nakayama, D. Rahmutula, K. Kosuge, Y. Izumi and K. Matsumoto (2004). "Variable number of tandem repeat of the 5'-flanking region of type-C human natriuretic peptide receptor gene influences blood pressure levels in obesity-associated hypertension." Hypertens Res **27**(10): 711-716.

Aon, M. A., N. Bhatt and S. C. Cortassa (2014). "Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess." Front Physiol **5**: 282.

Aoyagi, T., K. P. Terracina, A. Raza, H. Matsubara and K. Takabe (2015). "Cancer cachexia, mechanism and treatment." World J Gastrointest Oncol **7**(4): 17-29.

Argentin, S., Y. L. Sun, I. Lihmann, T. J. Schmidt, J. Drouin and M. Nemer (1991). "Distal cis-acting promoter sequences mediate glucocorticoid stimulation of cardiac atrial natriuretic factor gene transcription." J Biol Chem **266**(34): 23315-23322.

Arner, P. and D. Langin (2014). "Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance." Trends Endocrinol Metab **25**(5): 255-262.

Arora, P., J. Reingold, A. Baggish, D. P. Guanaga, C. Wu, A. Ghorbani, Y. Song, A. Chen-Tournaux, A. M. Khan, L. T. Tainsh, E. S. Buys, J. S. Williams, D. M. Heublein, J. C. Burnett, M. J. Semigran, K. D. Bloch, M. Scherrer-Crosbie, C. Newton-Cheh, L. M. Kaplan and T. J. Wang (2015). "Weight loss, saline loading, and the natriuretic peptide system." J Am Heart Assoc **4**(1): e001265.

Arora, P., C. Wu, A. M. Khan, D. B. Bloch, B. N. Davis-Dusenbery, A. Ghorbani, E. Spagnoli, A. Martinez, A. Ryan, L. T. Tainsh, S. Kim, J. Rong, T. Huan, J. E. Freedman, D. Levy, K. K. Miller, A. Hata, F. Del Monte, S. Vandenwijngaert, M. Swinnen, S. Janssens, T. M. Holmes, E. S. Buys, K. D. Bloch, C. Newton-Cheh and T. J. Wang (2013). "Atrial natriuretic peptide is negatively regulated by microRNA-425." J Clin Invest **123**(8): 3378-3382.

Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (2012). "Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years." Cell **148**(6): 1160-1171.

Ashman, D. F., R. Lipton, M. M. Melicow and T. D. Price (1963). "Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine." Biochem Biophys Res Commun **11**: 330-334.

Ayala, J. E., D. P. Bracy, B. M. Julien, J. N. Rottman, P. T. Fueger and D. H. Wasserman (2007). "Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice." Diabetes **56**(4): 1025-1033.

Baba, T., L. Heinemann, M. Berger and P. T. Sawicki (1995). "Effect of 4-hour hyperglycaemia and hyperinsulinaemia on plasma atrial natriuretic factor concentrations." Horm Metab Res **27**(2): 95-99.

Bacay, A. C., C. R. Mantyh, S. R. Vigna and P. W. Mantyh (1988). "Receptor binding sites for atrial natriuretic factor are expressed by brown adipose tissue." Peptides **9**(5): 1021-1026.

Badin, P. M., C. Loubiere, M. Coonen, K. Louche, G. Tavernier, V. Bourlier, A. Mairal, A. C. Rustan, S. R. Smith, D. Langin and C. Moro (2012). "Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58." J Lipid Res **53**(5): 839-848.

Barbe, P., L. Millet, J. Galitzky, M. Lafontan and M. Berlan (1996). "In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue." Br J Pharmacol **117**(5): 907-913.

Bartels, E. D., J. M. Nielsen, L. S. Bisgaard, J. P. Goetze and L. B. Nielsen (2010). "Decreased expression of natriuretic peptides associated with lipid accumulation in cardiac ventricle of obese mice." Endocrinology **151**(11): 5218-5225.

Bavishi, C., F. H. Messerli, B. Kadosh, L. M. Ruilope and K. Kario (2015). "Role of neprilysin inhibitor combinations in hypertension: insights from hypertension and heart failure trials." Eur Heart J.

Bennett, B. D., G. L. Bennett, R. V. Vitangcol, J. R. Jewett, J. Burnier, W. Henzel and D. G. Lowe (1991). "Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera." J Biol Chem **266**(34): 23060-23067.

Bevan, E. G., J. M. Connell, J. Doyle, H. A. Carmichael, D. L. Davies, A. R. Lorimer and G. T. McInnes (1992). "Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension." J Hypertens **10**(7): 607-613.

Bezair, V., A. Mairal, C. Ribet, C. Lefort, A. Girousse, J. Jocken, J. Laurencikiene, R. Anesia, A. M. Rodriguez, M. Ryden, B. M. Stenson, C. Dani, G. Ailhaud, P. Arner and D. Langin (2009). "Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes." J Biol Chem **284**(27): 18282-18291.

Biel, M. and S. Michalakis (2009). "Cyclic nucleotide-gated channels." Handb Exp Pharmacol(191): 111-136.

Birkenfeld, A. L., M. Boschmann, S. Engeli, C. Moro, A. M. Arafat, F. C. Luft and J. Jordan (2012). "Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man." PLoS One **7**(8): e43238.

Birkenfeld, A. L., M. Boschmann, C. Moro, F. Adams, K. Heusser, J. Tank, A. Diedrich, C. Schroeder, G. Franke, M. Berlan, F. C. Luft, M. Lafontan and J. Jordan (2006). "Beta-adrenergic and atrial natriuretic peptide interactions on human cardiovascular and metabolic regulation." J Clin Endocrinol Metab **91**(12): 5069-5075.

Birkenfeld, A. L., P. Budziarek, M. Boschmann, C. Moro, F. Adams, G. Franke, M. Berlan, M. A. Marques, F. C. Sweep, F. C. Luft, M. Lafontan and J. Jordan (2008). "Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans." Diabetes **57**(12): 3199-3204.

Bivalacqua, T. J., M. Kendirci, H. C. Champion, W. J. Hellstrom, K. E. Andersson and P. Hedlund (2007). "Dysregulation of cGMP-dependent protein kinase 1 (PKG-1) impairs erectile function in diabetic rats: influence of in vivo gene therapy of PKG1alpha." BJU Int **99**(6): 1488-1494.

Bloomgarden, Z. T. (2000). "American Diabetes Association Annual Meeting, 1999: diabetes and obesity." Diabetes Care **23**(1): 118-124.

Boerrigter, G., L. C. Costello-Boerrigter, G. J. Harty, B. K. Huntley, A. Cataliotti, H. Lapp and J. C. Burnett, Jr. (2009). "B-type natriuretic peptide 8-32, which is produced from mature BNP 1-32 by the metalloprotease meprin A, has reduced bioactivity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **296**(6): R1744-1750.

Boerrigter, G., L. C. Costello-Boerrigter, G. J. Harty, H. Lapp and J. C. Burnett, Jr. (2007). "Des-serine-proline brain natriuretic peptide 3-32 in cardiorenal regulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(2): R897-901.

- Bohlen, L., P. Ferrari, M. Papiri, Y. Allemann, S. Shaw and P. Wiedmann (1994). "Atrial natriuretic factor increases in response to an acute glucose load." J Hypertens **12**(7): 803-807.
- Bolinder, J., A. Lindblad, P. Engfeldt and P. Arner (1987). "Studies of acute effects of insulin-like growth factors I and II in human fat cells." J Clin Endocrinol Metab **65**(4): 732-737.
- Bonfils, P. K., M. Taskiran, M. Damgaard, J. P. Goetze, A. K. Floyd, P. Funch-Jensen, V. B. Kristiansen, M. Stockel, P. N. Bouchelouche and N. Gadsboll (2015). "Roux-en-Y gastric bypass alleviates hypertension and is associated with an increase in mid-regional pro-atrial natriuretic peptide in morbid obese patients." J Hypertens **33**(6): 1215-1225.
- Bordicchia, M., D. Liu, E. Z. Amri, G. Ailhaud, P. Dessi-Fulgheri, C. Zhang, N. Takahashi, R. Sarzani and S. Collins (2012). "Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes." J Clin Invest **122**(3): 1022-1036.
- Boumati, M., Y. Li and M. B. Anand-Srivastava (2002). "Modulation of ANP-C receptor signaling by endothelin-1 in A-10 smooth muscle cells." Arch Biochem Biophys **401**(2): 178-186.
- Bourlier, V. and A. Bouloumie (2009). "Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance." Diabetes Metab **35**(4): 251-260.
- Brandt, I., A. M. Lambeir, J. M. Ketelslegers, M. Vanderheyden, S. Scharpe and I. De Meester (2006). "Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form." Clin Chem **52**(1): 82-87.
- Brown, L. A., D. J. Nunez and M. R. Wilkins (1993). "Differential regulation of natriuretic peptide receptor messenger RNAs during the development of cardiac hypertrophy in the rat." J Clin Invest **92**(6): 2702-2712.
- Burgess, S. C., T. C. Leone, A. R. Wende, M. A. Croce, Z. Chen, A. D. Sherry, C. R. Malloy and B. N. Finck (2006). "Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid cycle flux in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha)-deficient mice." J Biol Chem **281**(28): 19000-19008.
- Cabassi, A. and S. Tedeschi (2013). "Zinc-alpha2-glycoprotein as a marker of fat catabolism in humans." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **16**(3): 267-271.
- Cannone, V., G. Boerrigter, A. Cataliotti, L. C. Costello-Boerrigter, T. M. Olson, P. M. McKie, D. M. Heublein, B. D. Lahr, K. R. Bailey, M. Averna, M. M. Redfield, R. J. Rodeheffer and J. C. Burnett, Jr. (2011). "A genetic variant of the atrial natriuretic peptide gene is associated with cardiometabolic protection in the general community." J Am Coll Cardiol **58**(6): 629-636.
- Cannone, V., A. B. Cefalu, D. Noto, C. G. Scott, K. R. Bailey, G. Cavera, M. Pagano, M. Sapienza, M. R. Averna and J. C. Burnett, Jr. (2013). "The atrial natriuretic peptide genetic variant rs5068 is associated with a favorable cardiometabolic phenotype in a Mediterranean population." Diabetes Care **36**(9): 2850-2856.

- Cao, L., J. Wu and D. G. Gardner (1995). "Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor." J Biol Chem **270**(42): 24891-24897.
- Cao, W., K. W. Daniel, J. Robidoux, P. Puigserver, A. V. Medvedev, X. Bai, L. M. Floering, B. M. Spiegelman and S. Collins (2004). "p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene." Mol Cell Biol **24**(7): 3057-3067.
- Cao, W., A. V. Medvedev, K. W. Daniel and S. Collins (2001). "beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase." J Biol Chem **276**(29): 27077-27082.
- Carvalho, E., S. E. Schellhorn, J. M. Zabolotny, S. Martin, E. Tozzo, O. D. Peroni, K. L. Houseknecht, A. Mundt, D. E. James and B. B. Kahn (2004). "GLUT4 overexpression or deficiency in adipocytes of transgenic mice alters the composition of GLUT4 vesicles and the subcellular localization of GLUT4 and insulin-responsive aminopeptidase." J Biol Chem **279**(20): 21598-21605.
- Castren, E. and J. M. Saavedra (1989). "Lack of vasopressin increases hypothalamic atrial natriuretic peptide binding sites." Am J Physiol **257**(1 Pt 2): R168-173.
- Chai, J. W., S. L. Lim, M. S. Kanthimathi and U. R. Kuppusamy (2011). "Gene regulation in beta-sitosterol-mediated stimulation of adipogenesis, glucose uptake, and lipid mobilization in rat primary adipocytes." Genes Nutr **6**(2): 181-188.
- Chainani-Wu, N., G. Weidner, D. M. Purnell, S. Frenda, T. Merritt-Worden, C. Kemp, E. Kersh and D. Ornish (2010). "Relation of B-type natriuretic peptide levels to body mass index after comprehensive lifestyle changes." Am J Cardiol **105**(11): 1570-1576.
- Chan, J. C., O. Knudson, F. Wu, J. Morser, W. P. Dole and Q. Wu (2005). "Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 785-790.
- Changchien, E. M., S. Ahmed, F. Betti, J. Higa, K. Kiely, T. Hernandez-Boussard and J. Morton (2011). "B-type natriuretic peptide increases after gastric bypass surgery and correlates with weight loss." Surg Endosc **25**(7): 2338-2343.
- Chavez, J. A. and S. A. Summers (2012). "A ceramide-centric view of insulin resistance." Cell Metab **15**(5): 585-594.
- Chen-Tournoux, A., A. M. Khan, A. L. Baggish, V. M. Castro, M. J. Semigran, E. L. McCabe, G. Moukarbel, J. Reingold, S. Durrani, G. D. Lewis, C. Newton-Cheh, M. Scherrer-Crosbie, L. M. Kaplan and T. J. Wang (2010). "Effect of weight loss after weight loss surgery on plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels." Am J Cardiol **106**(10): 1450-1455.
- Chen, S. and D. G. Gardner (2002). "Osmoregulation of natriuretic peptide receptor signaling in inner medullary collecting duct. A requirement for p38 MAPK." J Biol Chem **277**(8): 6037-6043.

- Chen, S., X. P. Ni, M. H. Humphreys and D. G. Gardner (2005). "1,25 dihydroxyvitamin d amplifies type a natriuretic peptide receptor expression and activity in target cells." J Am Soc Nephrol **16**(2): 329-339.
- Chen, Y., X. W. Ji, A. Y. Zhang, J. C. Lv, J. G. Zhang and C. H. Zhao (2014). "Prognostic value of plasma ghrelin in predicting the outcome of patients with chronic heart failure." Arch Med Res **45**(3): 263-269.
- Choi, Y. H., S. Park, S. Hockman, E. Zmuda-Trzebiatowska, F. Svennelid, M. Haluzik, O. Gavrilova, F. Ahmad, L. Pepin, M. Napolitano, M. Taira, F. Sundler, L. Stenson Holst, E. Degerman and V. C. Manganiello (2006). "Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice." J Clin Invest **116**(12): 3240-3251.
- Choquet, H., C. Cavalcanti-Proenca, C. Lecoer, C. Dina, S. Cauchi, M. Vaxillaire, S. Hadjadj, F. Horber, N. Potoczna, G. Charpentier, J. Ruiz, S. Hercberg, S. Maimaitiming, R. Roussel, M. Boenhke, A. U. Jackson, W. Patsch, F. Krempler, B. F. Voight, D. Altshuler, L. Groop, G. Thorleifsson, V. Steinthorsdottir, K. Stefansson, B. Balkau, P. Froguel and D. Meyre (2009). "The T-381C SNP in BNP gene may be modestly associated with type 2 diabetes: an updated meta-analysis in 49 279 subjects." Hum Mol Genet **18**(13): 2495-2501.
- Chun, Y. S., J. Y. Hyun, Y. G. Kwak, I. S. Kim, C. H. Kim, E. Choi, M. S. Kim and J. W. Park (2003). "Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1." Biochem J **370**(Pt 1): 149-157.
- Clark, B. A., A. Sclater, F. H. Epstein and D. Elahi (1993). "Effect of glucose, insulin, and hypertonicity on atrial natriuretic peptide levels in man." Metabolism **42**(2): 224-228.
- Clerico, A., S. Del Ry, S. Maffei, C. Prontera, M. Emdin and D. Giannessi (2002). "The circulating levels of cardiac natriuretic hormones in healthy adults: effects of age and sex." Clin Chem Lab Med **40**(4): 371-377.
- Clerico, A., F. A. Recchia, C. Passino and M. Emdin (2006). "Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H17-29.
- Cohen, D., G. Y. Koh, L. N. Nikonova, J. G. Porter and T. Maack (1996). "Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides." J Biol Chem **271**(16): 9863-9869.
- Colucci, W. S., U. Elkayam, D. P. Horton, W. T. Abraham, R. C. Bourge, A. D. Johnson, L. E. Wagoner, M. M. Givertz, C. S. Liang, M. Neibaur, W. H. Haught and T. H. LeJemtel (2000). "Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group." N Engl J Med **343**(4): 246-253.
- Corbin, J. D., S. H. Francis and D. J. Webb (2002). "Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction." Urology **60**(2 Suppl 2): 4-11.
- Corbin, J. D., I. V. Turko, A. Beasley and S. H. Francis (2000). "Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities." Eur J Biochem **267**(9): 2760-2767.

- Costello-Boerrigter, L. C. (2012). "Cardiac natriuretic peptides: contributors to cardiac cachexia or possible anti-obesity agents or both?" Diabetes **61**(10): 2403-2404.
- Costello-Boerrigter, L. C., H. Lapp, G. Boerrigter, A. Lerman, A. Bufe, F. Macheret, D. M. Heublein, C. Larue and J. C. Burnett, Jr. (2013). "Secretion of prohormone of B-type natriuretic peptide, proBNP1-108, is increased in heart failure." JACC Heart Fail **1**(3): 207-212.
- Coue, M. and C. Moro (2015). "Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis." Biochimie.
- Crandall, D. L., G. D. Ferraro and P. Cervoni (1989). "Effect of experimental obesity and subsequent weight reduction upon circulating atrial natriuretic peptide." Proc Soc Exp Biol Med **191**(4): 352-356.
- Curat, C. A., A. Miranville, C. Sengenès, M. Diehl, C. Tonus, R. Busse and A. Bouloumie (2004). "From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes." Diabetes **53**(5): 1285-1292.
- Currie, M. G., K. F. Fok, J. Kato, R. J. Moore, F. K. Hamra, K. L. Duffin and C. E. Smith (1992). "Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(3): 947-951.
- Cypess, A. M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A. B. Goldfine, F. C. Kuo, E. L. Palmer, Y. H. Tseng, A. Doria, G. M. Kolodny and C. R. Kahn (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." N Engl J Med **360**(15): 1509-1517.
- D'Souza, S. P., M. Davis and G. F. Baxter (2004). "Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart." Pharmacol Ther **101**(2): 113-129.
- Das, S. R., M. H. Drazner, D. L. Dries, G. L. Vega, H. G. Stanek, S. M. Abdullah, R. M. Canham, A. K. Chung, D. Leonard, F. H. Wians, Jr. and J. A. de Lemos (2005). "Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study." Circulation **112**(14): 2163-2168.
- Davis, K. M., L. C. Fish, K. L. Minaker and D. Elahi (1996). "Atrial natriuretic peptide levels in the elderly: differentiating normal aging changes from disease." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **51**(3): M95-101.
- de Bold, A. J. (1982). "Atrial natriuretic factor of the rat heart. Studies on isolation and properties." Proc Soc Exp Biol Med **170**(2): 133-138.
- de Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress and H. Sonnenberg (1981). "A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats." Life Sci **28**(1): 89-94.
- De Toni, L., G. Strapazzon, L. Gianesello, N. Caretta, C. Pilon, A. Bruttocao and C. Foresta (2011). "Effects of type 5-phosphodiesterase inhibition on energy metabolism and mitochondrial biogenesis in human adipose tissue ex vivo." J Endocrinol Invest **34**(10): 738-741.

DeFronzo, R. A. and M. Abdul-Ghani (2011). "Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose." Am J Cardiol **108**(3 Suppl): 3B-24B.

Degerman, E., F. Ahmad, Y. W. Chung, E. Guirguis, B. Omar, L. Stenson and V. Manganiello (2011). "From PDE3B to the regulation of energy homeostasis." Curr Opin Pharmacol **11**(6): 676-682.

Degerman, E., P. Belfrage and V. C. Manganiello (1997). "Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3)." J Biol Chem **272**(11): 6823-6826.

Deshmukh, A. S., Y. C. Long, T. de Castro Barbosa, H. K. Karlsson, S. Glund, W. J. Zavadoski, E. M. Gibbs, H. A. Koistinen, H. Wallberg-Henriksson and J. R. Zierath (2010). "Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle." Diabetologia **53**(6): 1142-1150.

Dessi-Fulgheri, P., R. Sarzani and A. Rappelli (1998). "The natriuretic peptide system in obesity-related hypertension: new pathophysiological aspects." J Nephrol **11**(6): 296-299.

Dessi-Fulgheri, P., R. Sarzani, M. Serenelli, P. Tamburrini, D. Spagnolo, L. Giantomassi, E. Espinosa and A. Rappelli (1999). "Low calorie diet enhances renal, hemodynamic, and humoral effects of exogenous atrial natriuretic peptide in obese hypertensives." Hypertension **33**(2): 658-662.

Dessi-Fulgheri, P., R. Sarzani, P. Tamburrini, A. Moraca, E. Espinosa, G. Cola, L. Giantomassi and A. Rappelli (1997). "Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients." J Hypertens **15**(12 Pt 2): 1695-1699.

Dickey, D. M., D. L. Dries, K. B. Margulies and L. R. Potter (2012). "Guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B activities in ventricles and cardiomyocytes from failed and non-failed human hearts: GC-A is inactive in the failed cardiomyocyte." J Mol Cell Cardiol **52**(3): 727-732.

Dickey, D. M., D. R. Flora and L. R. Potter (2011). "Antibody tracking demonstrates cell type-specific and ligand-independent internalization of guanylyl cyclase a and natriuretic peptide receptor C." Mol Pharmacol **80**(1): 155-162.

Dickey, D. M. and L. R. Potter (2010). "Human B-type natriuretic peptide is not degraded by meprin A." Biochem Pharmacol **80**(7): 1007-1011.

Dickey, D. M. and L. R. Potter (2011). "ProBNP(1-108) is resistant to degradation and activates guanylyl cyclase-A with reduced potency." Clin Chem **57**(9): 1272-1278.

Divertie, G. D., M. D. Jensen and J. M. Miles (1991). "Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia." Diabetes **40**(10): 1228-1232.

dos Santos, L., T. A. Salles, D. F. Arruda-Junior, L. C. Campos, A. C. Pereira, A. L. Barreto, E. L. Antonio, A. J. Mansur, P. J. Tucci, J. E. Krieger and A. C. Girardi (2013). "Circulating

dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure." Circ Heart Fail **6**(5): 1029-1038.

Dries, D. L., R. G. Victor, J. E. Rame, R. S. Cooper, X. Wu, X. Zhu, D. Leonard, S. I. Ho, Q. Wu, W. Post and M. H. Drazner (2005). "Corin gene minor allele defined by 2 missense mutations is common in blacks and associated with high blood pressure and hypertension." Circulation **112**(16): 2403-2410.

Dunn, B. R., I. Ichikawa, J. M. Pfeffer, J. L. Troy and B. M. Brenner (1986). "Renal and systemic hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic peptide in the anesthetized rat." Circ Res **59**(3): 237-246.

Eaton, S. (2002). "Control of mitochondrial beta-oxidation flux." Prog Lipid Res **41**(3): 197-239.

Egan, J. J., A. S. Greenberg, M. K. Chang, S. A. Wek, M. C. Moos, Jr. and C. Londos (1992). "Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8537-8541.

Eissing, L., T. Scherer, K. Todter, U. Knippschild, J. W. Greve, W. A. Buurman, H. O. Pinnschmidt, S. S. Rensen, A. M. Wolf, A. Bartelt, J. Heeren, C. Buettner and L. Scheja (2013). "De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health." Nat Commun **4**: 1528.

Ellis, K. L., C. Newton-Cheh, T. J. Wang, C. M. Frampton, R. N. Doughty, G. A. Whalley, C. J. Ellis, L. Skelton, N. Davis, T. G. Yandle, R. W. Troughton, A. M. Richards and V. A. Cameron (2011). "Association of genetic variation in the natriuretic peptide system with cardiovascular outcomes." J Mol Cell Cardiol **50**(4): 695-701.

Engel, A. M., J. R. Schoenfeld and D. G. Lowe (1994). "A single residue determines the distinct pharmacology of rat and human natriuretic peptide receptor-C." J Biol Chem **269**(25): 17005-17008.

Engeli, S. (2006). "Role of the renin-angiotensin- aldosterone system in the metabolic syndrome." Contrib Nephrol **151**: 122-134.

Engeli, S., A. L. Birkenfeld, P. M. Badin, V. Bourlier, K. Louche, N. Viguerie, C. Thalamas, E. Montastier, D. Larrouy, I. Harant, I. de Glisezinski, S. Lieske, J. Reinke, B. Beckmann, D. Langin, J. Jordan and C. Moro (2012). "Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle." J Clin Invest **122**(12): 4675-4679.

Fadini, G. P., M. Albiero, L. Menegazzo, S. V. de Kreutzenberg and A. Avogaro (2012). "The increased dipeptidyl peptidase-4 activity is not counteracted by optimized glucose control in type 2 diabetes, but is lower in metformin-treated patients." Diabetes Obes Metab **14**(6): 518-522.

Fain, J. N., A. Kanu, S. W. Bahouth, G. S. Cowan and M. Lloyd Hiler (2003). "Inhibition of leptin release by atrial natriuretic peptide (ANP) in human adipocytes." Biochem Pharmacol **65**(11): 1883-1888.

- Favre, G. A., V. L. Esnault and E. Van Obberghen (2015). "Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system." Am J Physiol Endocrinol Metab **308**(6): E435-449.
- Fehmann, H. C., B. Noll, R. Goke, B. Goke, M. E. Trautmann and R. Arnold (1990). "Atrial natriuretic factor has a weak insulinotropic action in the isolated perfused rat pancreas." Res Exp Med (Berl) **190**(4): 253-258.
- Ferrari, P., S. Shaw, W. Riesen and P. Weidmann (1992). "Plasma insulin during physiological and pathophysiological changes in atrial natriuretic factor." Eur J Clin Pharmacol **42**(4): 453-455.
- Field, M., L. H. Graf, Jr., W. J. Laird and P. L. Smith (1978). "Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(6): 2800-2804.
- Folgueira, C., E. Sanchez-Rebordelo, S. Barja-Fernandez, R. Leis, S. Tovar, F. F. Casanueva, C. Dieguez, R. Nogueiras and L. M. Seoane (2015). "Uroguanylin levels in intestine and plasma are regulated by nutritional status in a leptin-dependent manner." Eur J Nutr.
- Forte, L. R., S. L. Eber, X. Fan, R. M. London, Y. Wang, L. M. Rowland, D. T. Chin, R. H. Freeman and W. J. Krause (1999). "Lymphoguanlylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family." Endocrinology **140**(4): 1800-1806.
- Frajewicki, V., L. Kahana, H. Yechieli, V. Brod, R. Kohan and H. Bitterman (1997). "Effects of severe hemorrhage on plasma ANP and glomerular ANP receptors." Am J Physiol **273**(5 Pt 2): R1623-1630.
- Francis, S. H., M. A. Blount and J. D. Corbin (2011). "Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions." Physiol Rev **91**(2): 651-690.
- Francis, S. H., J. L. Busch, J. D. Corbin and D. Sibley (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." Pharmacol Rev **62**(3): 525-563.
- Fuller, F., J. G. Porter, A. E. Arfsten, J. Miller, J. W. Schilling, R. M. Scarborough, J. A. Lewicki and D. B. Schenk (1988). "Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones." J Biol Chem **263**(19): 9395-9401.
- Galitzky, J., C. Sengenès, C. Thalamas, M. A. Marques, J. M. Senard, M. Lafontan and M. Berlan (2001). "The lipid-mobilizing effect of atrial natriuretic peptide is unrelated to sympathetic nervous system activation or obesity in young men." J Lipid Res **42**(4): 536-544.
- Garcia-Villafranca, J., A. Guillen and J. Castro (2003). "Involvement of nitric oxide/cyclic GMP signaling pathway in the regulation of fatty acid metabolism in rat hepatocytes." Biochem Pharmacol **65**(5): 807-812.

- Garg, R. and K. N. Pandey (2003). "Angiotensin II-mediated negative regulation of Npr1 promoter activity and gene transcription." Hypertension **41**(3 Pt 2): 730-736.
- Garg, R. and K. N. Pandey (2005). "Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression." Peptides **26**(6): 1009-1023.
- Gerbes, A. L. and A. M. Vollmar (1990). "Degradation and clearance of atrial natriuretic factors (ANF)." Life Sci **47**(14): 1173-1180.
- Gerbes, A. L., A. M. Vollmar, A. K. Kiemer and M. Bilzer (1998). "The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver." Hepatology **28**(5): 1309-1317.
- Girousse, A., G. Tavernier, C. Valle, C. Moro, N. Mejhert, A. L. Dinel, M. Houssier, B. Roussel, A. Besse-Patin, M. Combes, L. Mir, L. Monbrun, V. Bezaire, B. Prunet-Marcassus, A. Waget, I. Vila, S. Caspar-Bauguil, K. Louche, M. A. Marques, A. Mairal, M. L. Renoud, J. Galitzky, C. Holm, E. Mouisel, C. Thalamos, N. Viguerie, T. Sulpice, R. Burcelin, P. Arner and D. Langin (2013). "Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass." PLoS Biol **11**(2): e1001485.
- Goetze, J. P. (2013). "Plasma proANP decreases after meal intake." Clin Chem **59**(8): 1270-1271.
- Goetze, J. P., C. Christoffersen, M. Perko, H. Arendrup, J. F. Rehfeld, J. Kastrup and L. B. Nielsen (2003). "Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia." FASEB J **17**(9): 1105-1107.
- Gower, W. R., Jr., R. W. McCuen, A. Arimura, D. A. Coy, J. R. Dietz, C. S. Landon and M. L. Schubert (2003). "Reciprocal paracrine pathways link atrial natriuretic peptide and somatostatin secretion in the antrum of the stomach." Regul Pept **110**(2): 101-106.
- Gower, W. R., Jr., K. F. Salhab, W. L. Foulis, N. Pillai, J. R. Bundy, D. L. Vesely, P. J. Fabri and J. R. Dietz (2000). "Regulation of atrial natriuretic peptide gene expression in gastric antrum by fasting." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(3): R770-780.
- Gradman, A. H. and F. Alfayoumi (2006). "From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease." Prog Cardiovasc Dis **48**(5): 326-341.
- Grepin, C., L. Dagnino, L. Robitaille, L. Haberstroh, T. Antakly and M. Nemer (1994). "A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription." Mol Cell Biol **14**(5): 3115-3129.
- Grutzner, U., M. Keller, M. Bach, A. K. Kiemer, H. Meissner, M. Bilzer, S. Zahler, A. L. Gerbes and A. M. Vollmar (2006). "PI 3-kinase pathway is responsible for antiapoptotic effects of atrial natriuretic peptide in rat liver transplantation." World J Gastroenterol **12**(7): 1049-1055.
- Gu, J., A. Noe, P. Chandra, S. Al-Fayoumi, M. Ligueros-Saylan, R. Sarangapani, S. Maahs, G. Ksander, D. F. Rigel, A. Y. Jeng, T. H. Lin, W. Zheng and W. P. Dole (2010).

"Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual-acting angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNi)." J Clin Pharmacol **50**(4): 401-414.

Gupta, D. K., J. A. de Lemos, C. R. Ayers, J. D. Berry and T. J. Wang (2015). "Racial Differences in Natriuretic Peptide Levels: The Dallas Heart Study." JACC Heart Fail.

Gutkowska, J., T. L. Broderick, D. Bogdan, D. Wang, J. M. Lavoie and M. Jankowski (2009). "Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: possible implications in cardiomyopathy." J Physiol **587**(Pt 19): 4725-4736.

Gutkowska, J., M. Jankowski, C. Lambert, S. Mukaddam-Daher, H. H. Zingg and S. M. McCann (1997). "Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11704-11709.

Haas, B., P. Mayer, K. Jennissen, D. Scholz, M. Berriel Diaz, W. Bloch, S. Herzig, R. Fassler and A. Pfeifer (2009). "Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis." Sci Signal **2**(99): ra78.

Halbirk, M., H. Norrelund, N. Moller, O. Schmitz, H. E. Botker and H. Wiggers (2010). "Short-term changes in circulating insulin and free fatty acids affect Nt-pro-BNP levels in heart failure patients." Int J Cardiol **144**(1): 140-142.

Hall, J. E., M. W. Brands, W. N. Dixon and M. J. Smith, Jr. (1993). "Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics." Hypertension **22**(3): 292-299.

Hamasaki, H., H. Yanai, M. Kakei, M. Noda and O. Ezaki (2015). "The association between daily physical activity and plasma B-type natriuretic peptide in patients with glucose intolerance: a cross-sectional study." BMJ Open **5**(1): e006276.

Hameed, I., S. R. Masoodi, S. A. Mir, M. Nabi, K. Ghazanfar and B. A. Ganai (2015). "Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition." World J Diabetes **6**(4): 598-612.

Hamra, F. K., L. R. Forte, S. L. Eber, N. V. Pidhorodeckyj, W. J. Krause, R. H. Freeman, D. T. Chin, J. A. Tompkins, K. F. Fok, C. E. Smith and et al. (1993). "Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10464-10468.

Haneda, M., R. Kikkawa, S. Maeda, M. Togawa, D. Koya, N. Horide, N. Kajiwara and Y. Shigeta (1991). "Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation." Kidney Int **40**(2): 188-194.

Hanford, D. S., D. J. Thuerauf, S. F. Murray and C. C. Glembotski (1994). "Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes." J Biol Chem **269**(42): 26227-26233.

Hara, Y., S. Wakino, Y. Tanabe, M. Saito, H. Tokuyama, N. Washida, S. Tatematsu, K. Yoshioka, K. Homma, K. Hasegawa, H. Minakuchi, K. Fujimura, K. Hosoya, K. Hayashi, K. Nakayama and H. Itoh (2011). "Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch." Sci Signal **4**(157): ra3.

- Harant, I., M. Beauville, F. Crampes, D. Riviere, M. T. Tauber, J. P. Tauber and M. Garrigues (1994). "Response of fat cells to growth hormone (GH): effect of long term treatment with recombinant human GH in GH-deficient adults." J Clin Endocrinol Metab **78**(6): 1392-1395.
- Harndahl, L., N. Wierup, S. Enerback, H. Mulder, V. C. Manganiello, F. Sundler, E. Degerman, B. Ahren and L. S. Holst (2004). "Beta-cell-targeted overexpression of phosphodiesterase 3B in mice causes impaired insulin secretion, glucose intolerance, and deranged islet morphology." J Biol Chem **279**(15): 15214-15222.
- Harris, P. J., D. Thomas and T. O. Morgan (1987). "Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption." Nature **326**(6114): 697-698.
- Hata, N., Y. Seino, T. Tsutamoto, S. Hiramitsu, N. Kaneko, T. Yoshikawa, H. Yokoyama, K. Tanaka, K. Mizuno, J. Nejima and M. Kinoshita (2008). "Effects of carperitide on the long-term prognosis of patients with acute decompensated chronic heart failure: the PROTECT multicenter randomized controlled study." Circ J **72**(11): 1787-1793.
- Haufe, S., J. Kaminski, W. Utz, V. Haas, A. Mahler, M. A. Daniels, A. L. Birkenfeld, R. Lichtinghagen, F. C. Luft, J. Schulz-Menger, S. Engeli and J. Jordan (2015). "Differential response of the natriuretic peptide system to weight loss and exercise in overweight or obese patients." J Hypertens **33**(7): 1458-1464.
- Hawkrige, A. M., D. M. Heublein, H. R. Bergen, 3rd, A. Cataliotti, J. C. Burnett, Jr. and D. C. Muddiman (2005). "Quantitative mass spectral evidence for the absence of circulating brain natriuretic peptide (BNP-32) in severe human heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(48): 17442-17447.
- He, Q. and M. C. LaPointe (1999). "Interleukin-1beta regulation of the human brain natriuretic peptide promoter involves Ras-, Rac-, and p38 kinase-dependent pathways in cardiac myocytes." Hypertension **33**(1 Pt 2): 283-289.
- He, X. L., A. Dukkipati and K. C. Garcia (2006). "Structural determinants of natriuretic peptide receptor specificity and degeneracy." J Mol Biol **361**(4): 698-714.
- Hebden, R. A., M. E. Todd and J. H. McNeill (1989). "Relationship between atrial granularity and release of atrial natriuretic factor in rats with diabetes mellitus." Am J Physiol **257**(4 Pt 2): R932-938.
- Hellmer, J., C. Marcus, T. Sonnenfeld and P. Arner (1992). "Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells." J Clin Endocrinol Metab **75**(1): 15-20.
- Henesy, M. B., A. L. Britain, B. Zhu, L. Amable, R. E. Honkanen, J. D. Corbin, S. H. Francis and T. C. Rich (2012). "Calcineurin regulates homologous desensitization of natriuretic peptide receptor-A and inhibits ANP-induced testosterone production in MA-10 cells." PLoS One **7**(8): e41711.
- Henry, J. P., O. H. Gauer and H. O. Sieker (1956). "The effect of moderate changes in blood volume on left and right atrial pressures." Circ Res **4**(1): 91-94.

- Herman, J. P., M. C. Langub, Jr. and R. E. Watson, Jr. (1993). "Localization of C-type natriuretic peptide mRNA in rat hypothalamus." Endocrinology **133**(4): 1903-1906.
- Herman, M. A., O. D. Peroni, J. Villoria, M. R. Schon, N. A. Abumrad, M. Bluher, S. Klein and B. B. Kahn (2012). "A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism." Nature **484**(7394): 333-338.
- Hill, K. D., A. W. Eckhauser, A. Marney and N. J. Brown (2009). "Phosphodiesterase 5 inhibition improves beta-cell function in metabolic syndrome." Diabetes Care **32**(5): 857-859.
- Ho, J. E., P. Arora, G. A. Walford, A. Ghorbani, D. P. Guanaga, B. P. Dhakal, D. I. Nathan, E. S. Buys, J. C. Florez, C. Newton-Cheh, G. D. Lewis and T. J. Wang (2014). "Effect of phosphodiesterase inhibition on insulin resistance in obese individuals." J Am Heart Assoc **3**(5): e001001.
- Hodes, A. and D. Lichtstein (2014). "Natriuretic hormones in brain function." Front Endocrinol (Lausanne) **5**: 201.
- Hollister, A. S., I. Tanaka, T. Imada, J. Onrot, I. Biaggioni, D. Robertson and T. Inagami (1986). "Sodium loading and posture modulate human atrial natriuretic factor plasma levels." Hypertension **8**(6 Pt 2): II106-111.
- Holtwick, R., M. Gotthardt, B. Skryabin, M. Steinmetz, R. Potthast, B. Zetsche, R. E. Hammer, J. Herz and M. Kuhn (2002). "Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7142-7147.
- Holz, G. G. (2004). "Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell." Diabetes **53**(1): 5-13.
- Horwich, T. B., M. A. Hamilton and G. C. Fonarow (2006). "B-type natriuretic peptide levels in obese patients with advanced heart failure." J Am Coll Cardiol **47**(1): 85-90.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Houweling, A. C., M. M. van Borren, A. F. Moorman and V. M. Christoffels (2005). "Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease." Cardiovasc Res **67**(4): 583-593.
- Iida, H. and Y. Shibata (1994). "Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture." Circ Res **74**(4): 659-668.
- Itoh, H., I. M. Bird, K. Nakao and R. R. Magness (1998). "Pregnancy increases soluble and particulate guanylate cyclases and decreases the clearance receptor of natriuretic peptides in ovine uterine, but not systemic, arteries." Endocrinology **139**(7): 3329-3341.

- Jaubert, J., F. Jaubert, N. Martin, L. L. Washburn, B. K. Lee, E. M. Eicher and J. L. Guenet (1999). "Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3)." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10278-10283.
- Jeandel, L., H. Okamura, M. Belles-Isles, J. G. Chabot, F. Dihl, G. Morel, P. A. Kelly and S. Heisler (1989). "Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes." Mol Cell Endocrinol **62**(1): 69-78.
- Jensen, M. D., M. Caruso, V. Heiling and J. M. Miles (1989). "Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects." Diabetes **38**(12): 1595-1601.
- Jewett, J. R., K. J. Koller, D. V. Goeddel and D. G. Lowe (1993). "Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase." EMBO J **12**(2): 769-777.
- Jiang, J., S. Wu, W. Wang, S. Chen, J. Peng, X. Zhang and Q. Wu (2011). "Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin." J Biol Chem **286**(12): 10066-10072.
- John, S. W., A. T. Veress, U. Honrath, C. K. Chong, L. Peng, O. Smithies and H. Sonnenberg (1996). "Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP." Am J Physiol **271**(1 Pt 2): R109-114.
- Joubert, S., N. McNicoll and A. De Lean (2007). "Biochemical and pharmacological characterization of P-site inhibitors on homodimeric guanylyl cyclase domain from natriuretic peptide receptor-A." Biochem Pharmacol **73**(7): 954-963.
- Jujic, A., P. M. Nilsson, G. Engstrom, B. Hedblad, O. Melander and M. Magnusson (2014). "Atrial natriuretic peptide and type 2 diabetes development--biomarker and genotype association study." PLoS One **9**(2): e89201.
- Kalra, P. R. and S. Tigas (2002). "Regulation of lipolysis: natriuretic peptides and the development of cachexia." Int J Cardiol **85**(1): 125-132.
- Kamanna, V. S. and M. L. Kashyap (2007). "Nicotinic acid (niacin) receptor agonists: will they be useful therapeutic agents?" Am J Cardiol **100**(11 A): S53-61.
- Karan, S., J. M. Frederick and W. Baehr (2010). "Novel functions of photoreceptor guanylate cyclases revealed by targeted deletion." Mol Cell Biochem **334**(1-2): 141-155.
- Kather, H. (1982). "Inhibition of hormone-stimulated human fat cell-lipolysis by prostaglandin E2 and its synthetic analogue sulprostrone." Prostaglandins Leukot Med **8**(5): 525-529.
- Kato, J., K. L. Lanier-Smith and M. G. Currie (1991). "Cyclic GMP down-regulates atrial natriuretic peptide receptors on cultured vascular endothelial cells." J Biol Chem **266**(22): 14681-14685.
- Keilbach, A., P. Ruth and F. Hofmann (1992). "Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies." Eur J Biochem **208**(2): 467-473.

Kenny, A. J., A. Bourne and J. Ingram (1993). "Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11." Biochem J **291 (Pt 1)**: 83-88.

Khan, A. M., S. Cheng, M. Magnusson, M. G. Larson, C. Newton-Cheh, E. L. McCabe, A. D. Coviello, J. C. Florez, C. S. Fox, D. Levy, S. J. Robins, P. Arora, S. Bhasin, C. S. Lam, R. S. Vasan, O. Melander and T. J. Wang (2011). "Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies." J Clin Endocrinol Metab **96(10)**: 3242-3249.

Kiemer, A. K., A. Baron, A. L. Gerbes, M. Bilzer and A. M. Vollmar (2002). "The atrial natriuretic peptide as a regulator of Kupffer cell functions." Shock **17(5)**: 365-371.

Kiemer, A. K., A. L. Gerbes, M. Bilzer and A. M. Vollmar (2002). "The atrial natriuretic peptide and cGMP: novel activators of the heat shock response in rat livers." Hepatology **35(1)**: 88-94.

Kiemer, A. K., T. Hartung and A. M. Vollmar (2000). "cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages." J Immunol **165(1)**: 175-181.

Kiemer, A. K., S. Kulhanek-Heinze, T. Gerwig, A. L. Gerbes and A. M. Vollmar (2002). "Stimulation of p38 MAPK by hormonal preconditioning with atrial natriuretic peptide." World J Gastroenterol **8(4)**: 707-711.

Kiemer, A. K., A. M. Vollmar, M. Bilzer, T. Gerwig and A. L. Gerbes (2000). "Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF-alpha mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF-kappaB and AP-1." J Hepatol **33(2)**: 236-246.

Kikkawa, F., K. Shibata, T. Suzuki, H. Kajiyama, K. Ino, S. Nomura and S. Mizutani (2004). "Signal pathway involved in increased expression of neutral endopeptidase 24.11 by gonadotropin releasing hormone in choriocarcinoma cells." Placenta **25(2-3)**: 176-183.

Kim, M., M. J. Platt, T. Shibasaki, S. E. Quaggin, P. H. Backx, S. Seino, J. A. Simpson and D. J. Drucker (2013). "GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure." Nat Med **19(5)**: 567-575.

Kisch, B. (1956). "Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig." Exp Med Surg **14(2-3)**: 99-112.

Kishimoto, I., K. Rossi and D. L. Garbers (2001). "A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **98(5)**: 2703-2706.

Kishimoto, I., T. Yoshimasa, S. Suga, Y. Ogawa, Y. Komatsu, O. Nakagawa, H. Itoh and K. Nakao (1994). "Natriuretic peptide clearance receptor is transcriptionally down-regulated by beta 2-adrenergic stimulation in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **269(45)**: 28300-28308.

Kleppisch, T. (2009). "Phosphodiesterases in the central nervous system." Handb Exp Pharmacol(191): 71-92.

- Klip, A., Y. Sun, T. T. Chiu and K. P. Foley (2014). "Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation." Am J Physiol Cell Physiol **306**(10): C879-886.
- Knowles, J. W., L. M. Erickson, V. K. Guy, C. S. Sigel, J. C. Wilder and N. Maeda (2003). "Common variations in noncoding regions of the human natriuretic peptide receptor A gene have quantitative effects." Hum Genet **112**(1): 62-70.
- Knowles, J. W., G. Esposito, L. Mao, J. R. Hagaman, J. E. Fox, O. Smithies, H. A. Rockman and N. Maeda (2001). "Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice." J Clin Invest **107**(8): 975-984.
- Knowlton, K. U., E. Baracchini, R. S. Ross, A. N. Harris, S. A. Henderson, S. M. Evans, C. C. Glembotski and K. R. Chien (1991). "Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression." J Biol Chem **266**(12): 7759-7768.
- Knowlton, K. U., H. A. Rockman, M. Itani, A. Vovan, C. E. Seidman and K. R. Chien (1995). "Divergent pathways mediate the induction of ANF transgenes in neonatal and hypertrophic ventricular myocardium." J Clin Invest **96**(3): 1311-1318.
- Kobayashi, K., K. Oshima, M. Muraoka, T. Akao, O. Totsuka, H. Shimizu, H. Sato, K. Tanaka, K. Konno, K. Matsumoto and I. Takeyoshi (2007). "Effect of atrial natriuretic peptide on ischemia-reperfusion injury in a porcine total hepatic vascular exclusion model." World J Gastroenterol **13**(25): 3487-3492.
- Koh, G. Y., D. R. Nussenzveig, J. Okolicany, D. A. Price and T. Maack (1992). "Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells." J Biol Chem **267**(17): 11987-11994.
- Koller, K. J. and D. V. Goeddel (1992). "Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors." Circulation **86**(4): 1081-1088.
- Koyama, K., G. Chen, M. Y. Wang, Y. Lee, M. Shimabukuro, C. B. Newgard and R. H. Unger (1997). "beta-cell function in normal rats made chronically hyperleptinemic by adenovirus-leptin gene therapy." Diabetes **46**(8): 1276-1280.
- Krack, A., R. Sharma, H. R. Figulla and S. D. Anker (2005). "The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure." Eur Heart J **26**(22): 2368-2374.
- Kuhn, M. (2003). "Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A." Circ Res **93**(8): 700-709.
- Kuhn, M. (2005). "Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice." Peptides **26**(6): 1078-1085.

- Kumar, P., K. K. Arise and K. N. Pandey (2006). "Transcriptional regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene." *Peptides* **27**(7): 1762-1769.
- Kumar, R., W. A. Cartledge, T. M. Lincoln and K. N. Pandey (1997). "Expression of guanylyl cyclase-A/atrial natriuretic peptide receptor blocks the activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase." *Hypertension* **29**(1 Pt 2): 414-421.
- Kumar, V. A., D. Viau and P. Levy (2015). "New Drugs You Are Going to Read About: Serelaxin, Ularitide, TRV027." *Curr Emerg Hosp Med Rep* **3**(2): 66-73.
- Lafontan, M. and M. Berlan (1993). "Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function." *J Lipid Res* **34**(7): 1057-1091.
- Lafontan, M. and M. Berlan (1995). "Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis." *Endocr Rev* **16**(6): 716-738.
- Lafontan, M., M. Berlan and C. Carpene (1985). "Fat cell adrenoceptors: inter- and intraspecific differences and hormone regulation." *Int J Obes* **9 Suppl 1**: 117-127.
- Lafontan, M., A. Bousquet-Melou, J. Galitzky, P. Barbe, C. Carpene, D. Langin, M. Berlan, P. Valet, I. Castan, A. Bouloumie and et al. (1995). "Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation." *Obes Res* **3 Suppl 4**: 507S-514S.
- Lafontan, M., C. Moro, M. Berlan, F. Crampes, C. Sengenès and J. Galitzky (2008). "Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP." *Trends Endocrinol Metab* **19**(4): 130-137.
- Lam, C. S., J. C. Burnett, Jr., L. Costello-Boerrigter, R. J. Rodeheffer and M. M. Redfield (2007). "Alternate circulating pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide forms in the general population." *J Am Coll Cardiol* **49**(11): 1193-1202.
- Lamers, D., S. Famulla, N. Wronkowitz, S. Hartwig, S. Lehr, D. M. Ouwens, K. Eckardt, J. M. Kaufman, M. Ryden, S. Muller, F. G. Hanisch, J. Ruige, P. Arner, H. Sell and J. Eckel (2011). "Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome." *Diabetes* **60**(7): 1917-1925.
- Langin, D. and P. Arner (2006). "Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis." *Trends Endocrinol Metab* **17**(8): 314-320.
- Langin, D., A. Dicker, G. Tavernier, J. Hoffstedt, A. Mairal, M. Ryden, E. Arner, A. Sicard, C. M. Jenkins, N. Viguerie, V. van Harmelen, R. W. Gross, C. Holm and P. Arner (2005). "Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity." *Diabetes* **54**(11): 3190-3197.
- Langub, M. C., Jr., C. M. Dolgas, R. E. Watson, Jr. and J. P. Herman (1995). "The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus." *J Neuroendocrinol* **7**(4): 305-309.

- Lansey, M. N., N. N. Walker, S. R. Hargett, J. R. Stevens and S. R. Keller (2012). "Deletion of Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(10): E1273-1286.
- Large, V., S. Reynisdottir, D. Langin, K. Fredby, M. Klannemark, C. Holm and P. Arner (1999). "Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects." J Lipid Res **40**(11): 2059-2066.
- Larrouy, D., J. Galitzky and M. Lafontan (1991). "A1 adenosine receptors in the human fat cell: tissue distribution and regulation of radioligand binding." Eur J Pharmacol **206**(2): 139-147.
- Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J. G. Strauss, G. Gorkiewicz and R. Zechner (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome." Cell Metab **3**(5): 309-319.
- Laurencikiene, J., T. Skurk, A. Kulyte, P. Heden, G. Astrom, E. Sjolín, M. Ryden, H. Hauner and P. Arner (2011). "Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject." J Clin Endocrinol Metab **96**(12): E2045-2049.
- Laychock, S. G. (1981). "Evidence for guanosine 3',5'-monophosphate as a putative mediator of insulin secretion from isolated rat islets." Endocrinology **108**(4): 1197-1205.
- Lazo, M., J. H. Young, F. L. Brancati, J. Coresh, S. Whelton, C. E. Ndumele, R. Hoogeveen, C. M. Ballantyne and E. Selvin (2013). "NH₂-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes." Diabetes **62**(9): 3189-3193.
- Lee, C. Y. and J. C. Burnett, Jr. (2007). "Natriuretic peptides and therapeutic applications." Heart Fail Rev **12**(2): 131-142.
- Leitman, D. C., J. W. Andresen, T. Kuno, Y. Kamisaki, J. K. Chang and F. Murad (1986). "Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells." J Biol Chem **261**(25): 11650-11655.
- Li, C. J., Q. Yu, P. Yu, T. L. Yu, Q. M. Zhang, S. Lu and D. M. Yu (2014). "Changes in liraglutide-induced body composition are related to modifications in plasma cardiac natriuretic peptides levels in obese type 2 diabetic patients." Cardiovasc Diabetol **13**: 36.
- Liang, F., J. O'Rear, U. Schellenberger, L. Tai, M. Lasecki, G. F. Schreiner, F. S. Apple, A. S. Maisel, N. S. Pollitt and A. A. Protter (2007). "Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide." J Am Coll Cardiol **49**(10): 1071-1078.
- Liang, F., F. Schaufele and D. G. Gardner (1999). "Sp1 dependence of natriuretic peptide receptor A gene transcription in rat aortic smooth muscle cells." Endocrinology **140**(4): 1695-1701.
- Liang, H. and W. F. Ward (2006). "PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism." Adv Physiol Educ **30**(4): 145-151.

- Licata, G., M. Volpe, R. Scaglione and S. Rubattu (1994). "Salt-regulating hormones in young normotensive obese subjects. Effects of saline load." Hypertension **23**(1 Suppl): 120-24.
- Liu, X., F. Perusse and L. J. Bukowiecki (1994). "Chronic norepinephrine infusion stimulates glucose uptake in white and brown adipose tissues." Am J Physiol **266**(3 Pt 2): R914-920.
- Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter and H. R. De Jonge (1997). "Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases." Trends Biochem Sci **22**(8): 307-312.
- Looker, H. C., M. Colombo, F. Agakov, T. Zeller, L. Groop, B. Thorand, C. N. Palmer, A. Hamsten, U. de Faire, E. Nogoceke, S. J. Livingstone, V. Salomaa, K. Leander, N. Barbarini, R. Bellazzi, N. van Zuydam, P. M. McKeigue, H. M. Colhoun and S. Investigators (2015). "Protein biomarkers for the prediction of cardiovascular disease in type 2 diabetes." Diabetologia **58**(6): 1363-1371.
- Lovshin, J. A., A. Barnie, A. DeAlmeida, A. Logan, B. Zinman and D. J. Drucker (2015). "Liraglutide promotes natriuresis but does not increase circulating levels of atrial natriuretic peptide in hypertensive subjects with type 2 diabetes." Diabetes Care **38**(1): 132-139.
- Lu, B., N. P. Gerard, L. F. Kolakowski, Jr., M. Bozza, D. Zurakowski, O. Finco, M. C. Carroll and C. Gerard (1995). "Neutral endopeptidase modulation of septic shock." J Exp Med **181**(6): 2271-2275.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K. P. Chepenik and S. A. Waldman (2000). "Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP." Pharmacol Rev **52**(3): 375-414.
- Ludwig, A., X. Zong, J. Stieber, R. Hullin, F. Hofmann and M. Biel (1999). "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." EMBO J **18**(9): 2323-2329.
- Luglio, H. F. (2014). "Estrogen and body weight regulation in women: the role of estrogen receptor alpha (ER-alpha) on adipocyte lipolysis." Acta Med Indones **46**(4): 333-338.
- Lumeng, C. N. and A. R. Saltiel (2011). "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." J Clin Invest **121**(6): 2111-2117.
- Lutz, S. Z., A. M. Hennige, S. Feil, A. Peter, A. Gerling, J. Machann, S. M. Krober, M. Rath, A. Schurmann, C. Weigert, H. U. Haring and R. Feil (2011). "Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes liver inflammation and fasting hyperglycemia." Diabetes **60**(5): 1566-1576.
- Maack, T., J. Okolicany, G. Y. Koh and D. A. Price (1993). "Functional properties of atrial natriuretic factor receptors." Semin Nephrol **13**(1): 50-60.

Maack, T., M. Suzuki, F. A. Almeida, D. Nussenzveig, R. M. Scarborough, G. A. McEnroe and J. A. Lewicki (1987). "Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor." Science **238**(4827): 675-678.

MacMahon, S., J. Cutler, E. Brittain and M. Higgins (1987). "Obesity and hypertension: epidemiological and clinical issues." Eur Heart J **8 Suppl B**: 57-70.

Magnusson, M., A. Jujic, B. Hedblad, G. Engstrom, M. Persson, J. Struck, N. G. Morgenthaler, P. Nilsson, C. Newton-Cheh, T. J. Wang and O. Melander (2012). "Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study." J Clin Endocrinol Metab **97**(2): 638-645.

Maianti, J. P., A. McFedries, Z. H. Foda, R. E. Kleiner, X. Q. Du, M. A. Leissring, W. J. Tang, M. J. Charron, M. A. Seeliger, A. Saghatelian and D. R. Liu (2014). "Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones." Nature **511**(7507): 94-98.

Makino, H., M. Mukoyama, K. Mori, T. Suganami, M. Kasahara, K. Yahata, T. Nagae, H. Yokoi, K. Sawai, Y. Ogawa, S. Suga, Y. Yoshimasa, A. Sugawara, I. Tanaka and K. Nakao (2006). "Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice." Diabetologia **49**(10): 2514-2524.

Makino, H., M. Osegawa, A. Kanatsuka and T. Suzuki (1983). "Increased sensitivity of insulin-sensitive phosphodiesterase to insulin in fat cells from streptozotocin diabetic rats." Endocrinology **113**(2): 646-650.

Mantyh, C. R., L. Kruger, N. C. Brecha and P. W. Mantyh (1987). "Localization of specific binding sites for atrial natriuretic factor in the central nervous system of rat, guinea pig, cat and human." Brain Res **412**(2): 329-342.

Mantymaa, P., O. Vuolteenaho, M. Marttila and H. Ruskoaho (1993). "Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro." Endocrinology **133**(3): 1470-1473.

Maoz, E., A. Shamiss, E. Peleg, M. Salzberg and T. Rosenthal (1992). "The role of atrial natriuretic peptide in natriuresis of fasting." J Hypertens **10**(9): 1041-1044.

Marker, J. C., I. B. Hirsch, L. J. Smith, C. A. Parvin, J. O. Holloszy and P. E. Cryer (1991). "Catecholamines in prevention of hypoglycemia during exercise in humans." Am J Physiol **260**(5 Pt 1): E705-712.

Marney, A. M., N. J. Brown, R. Tamboli and N. Abumrad (2014). "Changes in B-type natriuretic peptide and BMI following Roux-en-Y gastric bypass surgery." Diabetes Care **37**(4): e70-71.

Martin, S., J. E. Rice, G. W. Gould, S. R. Keller, J. W. Slot and D. E. James (1997). "The glucose transporter GLUT4 and the aminopeptidase vp165 colocalise in tubulo-vesicular elements in adipocytes and cardiomyocytes." J Cell Sci **110 (Pt 18)**: 2281-2291.

Martinez-Rumayor, A., A. M. Richards, J. C. Burnett and J. L. Januzzi, Jr. (2008). "Biology of the natriuretic peptides." Am J Cardiol **101**(3A): 3-8.

- Marumo, F., H. Sakamoto, K. Ando and T. Ishigami (1990). "Concentrations of atrial natriuretic peptide in plasma and urine of kidney disease patients." Clin Chem **36**(9): 1650-1653.
- Marumo, F., H. Sakamoto, K. Ando, T. Ishigami and M. Kawakami (1986). "A highly sensitive radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide (ANP) in human plasma and urine." Biochem Biophys Res Commun **137**(1): 231-236.
- Matsukawa, N., W. J. Grzesik, N. Takahashi, K. N. Pandey, S. Pang, M. Yamauchi and O. Smithies (1999). "The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7403-7408.
- Mauriege, P., G. De Pergola, M. Berlan and M. Lafontan (1988). "Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta-agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell membranes with highly selective beta 1-antagonists." J Lipid Res **29**(5): 587-601.
- Mauriege, P., J. P. Despres, D. Prud'homme, M. C. Pouliot, M. Marcotte, A. Tremblay and C. Bouchard (1991). "Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men." J Lipid Res **32**(10): 1625-1633.
- Mauriege, P., J. Galitzky, M. Berlan and M. Lafontan (1987). "Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences." Eur J Clin Invest **17**(2): 156-165.
- McCoy, D. E., S. E. Guggino and B. A. Stanton (1995). "The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role." Kidney Int **48**(4): 1125-1133.
- McDonough, P. M., D. Maciejewski-Lenoir, S. M. Hartig, R. A. Hanna, R. Whittaker, A. Heisel, J. B. Nicoll, B. M. Buehrer, K. Christensen, M. G. Mancini, M. A. Mancini, D. P. Edwards and J. H. Price (2013). "Differential phosphorylation of perilipin 1A at the initiation of lipolysis revealed by novel monoclonal antibodies and high content analysis." PLoS One **8**(2): e55511.
- McKay, M. K. and V. H. Huxley (1995). "ANP increases capillary permeability to protein independent of perfusate protein composition." Am J Physiol **268**(3 Pt 2): H1139-1148.
- Mehra, M. R., P. A. Uber, M. H. Park, R. L. Scott, H. O. Ventura, B. C. Harris and E. D. Frohlich (2004). "Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure." J Am Coll Cardiol **43**(9): 1590-1595.
- Meirhaeghe, A., M. S. Sandhu, M. I. McCarthy, P. de Groote, D. Cottel, D. Arveiler, J. Ferrieres, C. J. Groves, A. T. Hattersley, G. A. Hitman, M. Walker, N. J. Wareham and P. Amouyel (2007). "Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations." Hum Mol Genet **16**(11): 1343-1350.
- Messerli, F. H. and J. Nussberger (2000). "Vasopeptidase inhibition and angio-oedema." Lancet **356**(9230): 608-609.

- Mills, R. M., T. H. LeJemtel, D. P. Horton, C. Liang, R. Lang, M. A. Silver, C. Lui and K. Chatterjee (1999). "Sustained hemodynamic effects of an infusion of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) in heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Natreacor Study Group." J Am Coll Cardiol **34**(1): 155-162.
- Minguet, J., G. Sutton, C. Ferrero, T. Gomez and P. Bramlage (2015). "LCZ696 : a new paradigm for the treatment of heart failure?" Expert Opin Pharmacother **16**(3): 435-446.
- Miniou, P., D. Tiziano, T. Frugier, N. Roblot, M. Le Meur and J. Melki (1999). "Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage." Nucleic Acids Res **27**(19): e27.
- Mitschke, M. M., L. S. Hoffmann, T. Gnad, D. Scholz, K. Kruithoff, P. Mayer, B. Haas, A. Sassmann, A. Pfeifer and A. Kilic (2013). "Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue." FASEB J **27**(4): 1621-1630.
- Miyashita, K., H. Itoh, H. Tsujimoto, N. Tamura, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama and K. Nakao (2009). "Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity." Diabetes **58**(12): 2880-2892.
- Morabito, D., M. B. Vallotton and U. Lang (2001). "Obesity is associated with impaired ventricular protein kinase C-MAP kinase signaling and altered ANP mRNA expression in the heart of adult Zucker rats." J Invest Med **49**(4): 310-318.
- Morin, S., P. Paradis, A. Aries and M. Nemer (2001). "Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor." Mol Cell Biol **21**(4): 1036-1044.
- Moro, C., S. Bajpeyi and S. R. Smith (2008). "Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(2): E203-213.
- Moro, C. and M. Berlan (2006). "Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides." Fundam Clin Pharmacol **20**(1): 41-49.
- Moro, C., F. Crampes, C. Sengenès, I. De Glisezinski, J. Galitzky, C. Thalamas, M. Lafontan and M. Berlan (2004). "Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans." FASEB J **18**(7): 908-910.
- Moro, C., J. Galitzky, C. Sengenès, F. Crampes, M. Lafontan and M. Berlan (2004). "Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells." J Pharmacol Exp Ther **308**(3): 984-992.
- Moro, C., E. Klimcakova, M. Lafontan, M. Berlan and J. Galitzky (2007). "Phosphodiesterase-5A and neutral endopeptidase activities in human adipocytes do not control atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis." Br J Pharmacol **152**(7): 1102-1110.
- Moro, C., E. Klimcakova, K. Lolmede, M. Berlan, M. Lafontan, V. Stich, A. Bouloumie, J. Galitzky, P. Arner and D. Langin (2007). "Atrial natriuretic peptide inhibits the

production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue." Diabetologia **50**(5): 1038-1047.

Moro, C. and M. Lafontan (2013). "Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(3): H358-368.

Moro, C., M. Pasarica, K. Elkind-Hirsch and L. M. Redman (2009). "Aerobic exercise training improves atrial natriuretic peptide and catecholamine-mediated lipolysis in obese women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **94**(7): 2579-2586.

Moro, C., F. Pillard, I. de Glisezinski, F. Crampes, C. Thalamas, I. Harant, M. A. Marques, M. Lafontan and M. Berlan (2007). "Sex differences in lipolysis-regulating mechanisms in overweight subjects: effect of exercise intensity." Obesity (Silver Spring) **15**(9): 2245-2255.

Moro, C., F. Pillard, I. De Glisezinski, I. Harant, D. Riviere, V. Stich, M. Lafontan, F. Crampes and M. Berlan (2005). "Training enhances ANP lipid-mobilizing action in adipose tissue of overweight men." Med Sci Sports Exerc **37**(7): 1126-1132.

Moro, C., F. Pillard, I. de Glisezinski, E. Klimcakova, F. Crampes, C. Thalamas, I. Harant, M. A. Marques, M. Lafontan and M. Berlan (2008). "Exercise-induced lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue is mainly related to natriuretic peptides in overweight men." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(2): E505-513.

Moro, C., J. Polak, B. Richterova, C. Sengenese, T. Pelikanova, J. Galitzky, V. Stich, M. Lafontan and M. Berlan (2005). "Differential regulation of atrial natriuretic peptide- and adrenergic receptor-dependent lipolytic pathways in human adipose tissue." Metabolism **54**(1): 122-131.

Mowers, J., M. Uhm, S. M. Reilly, J. Simon, D. Leto, S. H. Chiang, L. Chang and A. R. Saltiel (2013). "Inflammation produces catecholamine resistance in obesity via activation of PDE3B by the protein kinases IKKepsilon and TBK1." Elife **2**: e01119.

Muangman, P., M. L. Spenny, R. N. Tamura and N. S. Gibran (2003). "Fatty acids and glucose increase neutral endopeptidase activity in human microvascular endothelial cells." Shock **19**(6): 508-512.

Mukoyama, M., K. Nakao, K. Hosoda, S. Suga, Y. Saito, Y. Ogawa, G. Shirakami, M. Jougasaki, K. Obata, H. Yasue and et al. (1991). "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide." J Clin Invest **87**(4): 1402-1412.

Mukoyama, M., K. Nakao, Y. Saito, Y. Ogawa, K. Hosoda, S. Suga, G. Shirakami, M. Jougasaki and H. Imura (1990). "Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone." Lancet **335**(8692): 801-802.

Mullins, G. R., L. Wang, V. Raje, S. G. Sherwood, R. C. Grande, S. Boroda, J. M. Eaton, S. Blancquaert, P. P. Roger, N. Leitinger and T. E. Harris (2014). "Catecholamine-induced lipolysis causes mTOR complex dissociation and inhibits glucose uptake in adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(49): 17450-17455.

- Nakajima, K., K. Onishi, K. Dohi, M. Tanabe, T. Kurita, T. Yamanaka, M. Ito, N. Isaka, T. Nobori and T. Nakano (2005). "Effects of human atrial natriuretic peptide on cardiac function and hemodynamics in patients with high plasma BNP levels." Int J Cardiol **104**(3): 332-337.
- Nakamura, S., M. Naruse, K. Naruse, M. Kawana, T. Nishikawa, S. Hosoda, I. Tanaka, T. Yoshimi, I. Yoshihara, T. Inagami and et al. (1991). "Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide coexist in the secretory granules of human cardiac myocytes." Am J Hypertens **4**(11): 909-912.
- Nakatsuji, H., N. Maeda, T. Hibuse, A. Hiuge, A. Hirata, Y. Kuroda, K. Kishida, S. Kihara, T. Funahashi and I. Shimomura (2010). "Reciprocal regulation of natriuretic peptide receptors by insulin in adipose cells." Biochem Biophys Res Commun **392**(1): 100-105.
- Nakayama, T., M. Soma, Y. Takahashi, D. Rehemudula, K. Kanmatsuse and K. Furuya (2000). "Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese." Circ Res **86**(8): 841-845.
- Naruse, K., Y. Yamasaki, T. Tsunemi, A. Onogi, T. Noguchi, T. Sado, H. Oi and H. Kobayashi (2011). "Increase of high molecular weight adiponectin in hypertensive pregnancy was correlated with brain-type natriuretic peptide stimulation on adipocyte." Pregnancy Hypertens **1**(3-4): 200-205.
- Nawrocki, A. R., C. G. Rodriguez, D. M. Toolan, O. Price, M. Henry, G. Forrest, D. Szeto, C. A. Keohane, Y. Pan, K. M. Smith, I. T. Raheem, C. D. Cox, J. Hwa, J. J. Renger and S. M. Smith (2014). "Genetic deletion and pharmacological inhibition of phosphodiesterase 10A protects mice from diet-induced obesity and insulin resistance." Diabetes **63**(1): 300-311.
- Neeland, I. J., B. R. Winders, C. R. Ayers, S. R. Das, A. Y. Chang, J. D. Berry, A. Khera, D. K. McGuire, G. L. Vega, J. A. de Lemos and A. T. Turer (2013). "Higher natriuretic peptide levels associate with a favorable adipose tissue distribution profile." J Am Coll Cardiol **62**(8): 752-760.
- Neinast, M. D., A. P. Frank, J. F. Zechner, Q. Li, L. Vishvanath, B. F. Palmer, V. Aguirre, R. K. Gupta and D. J. Clegg (2015). "Activation of natriuretic peptides and the sympathetic nervous system following Roux-en-Y gastric bypass is associated with gonadal adipose tissues browning." Mol Metab **4**(5): 427-436.
- Newton-Cheh, C., M. G. Larson, R. S. Vasan, D. Levy, K. D. Bloch, A. Surti, C. Guiducci, S. Kathiresan, E. J. Benjamin, J. Struck, N. G. Morgenthaler, A. Bergmann, S. Blankenberg, F. Kee, P. Nilsson, X. Yin, L. Peltonen, E. Vartiainen, V. Salomaa, J. N. Hirschhorn, O. Melander and T. J. Wang (2009). "Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure." Nat Genet **41**(3): 348-353.
- Ng, L. L., S. Geeranavar, S. C. Jennings, I. Loke and R. J. O'Brien (2004). "Diagnosis of heart failure using urinary natriuretic peptides." Clin Sci (Lond) **106**(2): 129-133.

- Niederkofler, E. E., U. A. Kiernan, J. O'Rear, S. Menon, S. Saghir, A. A. Protter, R. W. Nelson and U. Schellenberger (2008). "Detection of endogenous B-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure." Circ Heart Fail **1**(4): 258-264.
- Nielsen, T. S., N. Jessen, J. O. Jorgensen, N. Moller and S. Lund (2014). "Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease." J Mol Endocrinol **52**(3): R199-222.
- Nieto-Vazquez, I., S. Fernandez-Veledo, D. K. Kramer, R. Vila-Bedmar, L. Garcia-Guerra and M. Lorenzo (2008). "Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha." Arch Physiol Biochem **114**(3): 183-194.
- Nisoli, E., E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, R. Bracale, A. Valerio, M. Francolini, S. Moncada and M. O. Carruba (2003). "Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide." Science **299**(5608): 896-899.
- Nonoguchi, H., K. Tomita and F. Marumo (1992). "Effects of atrial natriuretic peptide and vasopressin on chloride transport in long- and short-looped medullary thick ascending limbs." J Clin Invest **90**(2): 349-357.
- Nussenzveig, D. R., J. A. Lewicki and T. Maack (1990). "Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor." J Biol Chem **265**(34): 20952-20958.
- O'Connell, J. E., A. G. Jardine, G. Davidson and J. M. Connell (1992). "Candoxatril, an orally active neutral endopeptidase inhibitor, raises plasma atrial natriuretic factor and is natriuretic in essential hypertension." J Hypertens **10**(3): 271-277.
- O'Reilly, M. W., P. J. House and J. W. Tomlinson (2014). "Understanding androgen action in adipose tissue." J Steroid Biochem Mol Biol **143**: 277-284.
- Obara, T., H. Yamada, J. Nakada and H. Endou (1985). "Atrial natriuretic peptides stimulate renal gluconeogenesis." Biochem Biophys Res Commun **129**(3): 833-839.
- Ogawa, Y., H. Itoh, N. Tamura, S. Suga, T. Yoshimasa, M. Uehira, S. Matsuda, S. Shiono, H. Nishimoto and K. Nakao (1994). "Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene." J Clin Invest **93**(5): 1911-1921.
- Oh, S. H., K. W. Cho, S. H. Kim, G. B. Jeong, C. W. Kang, Y. H. Hwang, K. H. Seul and B. H. Cho (1994). "Identification of immunoreactive atrial natriuretic peptide in the gallbladder and bile juice of rabbit, pig and human." Regul Pept **49**(3): 217-223.
- Ohta, Y., K. Watanabe, M. Nakazawa, T. Yamamoto, M. Ma, K. Fuse, M. Ito, S. Hirono, T. Tanabe, H. Hanawa, K. Kato, M. Kodama and Y. Aizawa (2000). "Carvedilol enhances atrial and brain natriuretic peptide mRNA expression and release in rat heart." J Cardiovasc Pharmacol **36 Suppl 2**: S19-23.
- Okamura, H., P. A. Kelly, J. G. Chabot, G. Morel, M. Belles-Isles and S. Heisler (1988). "Atrial natriuretic peptide receptors are present in brown adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun **156**(2): 1000-1006.

- Okolicany, J., G. A. McEnroe, G. Y. Koh, J. A. Lewicki and T. Maack (1992). "Clearance receptor and neutral endopeptidase-mediated metabolism of atrial natriuretic factor." Am J Physiol **263**(3 Pt 2): F546-553.
- Olerud, J. E., M. L. Usui, D. Seckin, D. S. Chiu, C. L. Haycox, I. S. Song, J. C. Ansel and N. W. Bunnett (1999). "Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds." J Invest Dermatol **112**(6): 873-881.
- Oliver, P. M., J. E. Fox, R. Kim, H. A. Rockman, H. S. Kim, R. L. Reddick, K. N. Pandey, S. L. Milgram, O. Smithies and N. Maeda (1997). "Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14730-14735.
- Oliver, P. M., S. W. John, K. E. Purdy, R. Kim, N. Maeda, M. F. Goy and O. Smithies (1998). "Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2547-2551.
- Olivo-Marston, S. E., S. D. Hursting, S. N. Perkins, A. Schetter, M. Khan, C. Croce, C. C. Harris and J. Lavigne (2014). "Effects of calorie restriction and diet-induced obesity on murine colon carcinogenesis, growth and inflammatory factors, and microRNA expression." PLoS One **9**(4): e94765.
- Olsen, M. H., T. W. Hansen, M. K. Christensen, F. Gustafsson, S. Rasmussen, K. Wachtell, K. Borch-Johnsen, H. Ibsen, T. Jorgensen and P. Hildebrandt (2005). "N-terminal pro brain natriuretic peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome." Hypertension **46**(4): 660-666.
- Omar, B., E. Banke, M. Ekelund, S. Frederiksen and E. Degerman (2011). "Alterations in cyclic nucleotide phosphodiesterase activities in omental and subcutaneous adipose tissues in human obesity." Nutr Diabetes **1**: e13.
- Pagano, M. and M. B. Anand-Srivastava (2001). "Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity." J Biol Chem **276**(25): 22064-22070.
- Pandey, K. N. (1992). "Kinetic analysis of internalization, recycling and redistribution of atrial natriuretic factor-receptor complex in cultured vascular smooth-muscle cells. Ligand-dependent receptor down-regulation." Biochem J **288 (Pt 1)**: 55-61.
- Pandey, K. N. (2005). "Biology of natriuretic peptides and their receptors." Peptides **26**(6): 901-932.
- Pandey, K. N. (2015). "Endocytosis and Trafficking of Natriuretic Peptide Receptor-A: Potential Role of Short Sequence Motifs." Membranes (Basel) **5**(3): 253-287.
- Pankow, K., Y. Wang, F. Gembardt, E. Krause, X. Sun, G. Krause, H. P. Schultheiss, W. E. Siems and T. Walther (2007). "Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide." Circ Res **101**(9): 875-882.

- Pfeifer, A., A. Aszodi, U. Seidler, P. Ruth, F. Hofmann and R. Fassler (1996). "Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II." Science **274**(5295): 2082-2086.
- Pfeifer, A., P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G. X. Wang, M. Korth, A. Aszodi, K. E. Andersson, F. Krombach, A. Mayerhofer, P. Ruth, R. Fassler and F. Hofmann (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." EMBO J **17**(11): 3045-3051.
- Pfister, R., S. Sharp, R. Luben, P. Welsh, I. Barroso, V. Salomaa, A. Meirhaeghe, K. T. Khaw, N. Sattar, C. Langenberg and N. J. Wareham (2011). "Mendelian randomization study of B-type natriuretic peptide and type 2 diabetes: evidence of causal association from population studies." PLoS Med **8**(10): e1001112.
- Pikkarainen, S., H. Tokola, T. Majalahti-Palviainen, R. Kerkela, N. Hautala, S. S. Bhalla, F. Charron, M. Nemer, O. Vuolteenaho and H. Ruskoaho (2003). "GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program." J Biol Chem **278**(26): 23807-23816.
- Pilz, R. B. and K. E. Broderick (2005). "Role of cyclic GMP in gene regulation." Front Biosci **10**: 1239-1268.
- Pivovarova, O., O. Gogebakan, N. Kloting, A. Sparwasser, M. O. Weickert, I. Haddad, V. J. Nikiforova, A. Bergmann, M. Kruse, A. C. Seltsmann, M. Bluher, A. F. Pfeiffer and N. Rudovich (2012). "Insulin up-regulates natriuretic peptide clearance receptor expression in the subcutaneous fat depot in obese subjects: a missing link between CVD risk and obesity?" J Clin Endocrinol Metab **97**(5): E731-739.
- Plante, E., A. Menaouar, B. A. Danalache, T. L. Broderick, M. Jankowski and J. Gutkowska (2014). "Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice." Diabetologia **57**(6): 1257-1267.
- Podda, M. V. and C. Grassi (2014). "New perspectives in cyclic nucleotide-mediated functions in the CNS: the emerging role of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels." Pflugers Arch **466**(7): 1241-1257.
- Polak, J., M. Kotrc, Z. Wedellova, A. Jabor, I. Malek, J. Kautzner, L. Kazdova and V. Melenovsky (2011). "Lipolytic effects of B-type natriuretic peptide 1-32 in adipose tissue of heart failure patients compared with healthy controls." J Am Coll Cardiol **58**(11): 1119-1125.
- Polak, J., C. Moro, E. Klimcakova, M. Kovacikova, M. Bajzova, M. Vitkova, Z. Kovacova, R. Sotornik, M. Berlan, N. Viguerie, D. Langin and V. Stich (2007). "The atrial natriuretic peptide- and catecholamine-induced lipolysis and expression of related genes in adipose tissue in hypothyroid and hyperthyroid patients." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(1): E246-251.
- Potter, L. R. (2011). "Guanylyl cyclase structure, function and regulation." Cell Signal **23**(12): 1921-1926.

- Potter, L. R. (2011). "Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation." FEBS J **278**(11): 1808-1817.
- Potter, L. R. and D. L. Garbers (1992). "Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization." J Biol Chem **267**(21): 14531-14534.
- Potter, L. R. and D. L. Garbers (1994). "Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation." J Biol Chem **269**(20): 14636-14642.
- Potter, L. R. and T. Hunter (1998). "Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor." Mol Cell Biol **18**(4): 2164-2172.
- Potter, L. R. and T. Hunter (2001). "Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation." J Biol Chem **276**(9): 6057-6060.
- Potter, L. R., A. R. Yoder, D. R. Flora, L. K. Antos and D. M. Dickey (2009). "Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications." Handb Exp Pharmacol(191): 341-366.
- Powell, D. J., E. Hajdich, G. Kular and H. S. Hundal (2003). "Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism." Mol Cell Biol **23**(21): 7794-7808.
- Qi, W., J. Kjekshus and C. Hall (2000). "Differential responses of plasma atrial and brain natriuretic peptides to acute alteration in atrial pressure in pigs." Scand J Clin Lab Invest **60**(1): 55-63.
- Quesada, I., E. Tuduri, C. Ripoll and A. Nadal (2008). "Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes." J Endocrinol **199**(1): 5-19.
- Ralat, L. A., Q. Guo, M. Ren, T. Funke, D. M. Dickey, L. R. Potter and W. J. Tang (2011). "Insulin-degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response." J Biol Chem **286**(6): 4670-4679.
- Rashed, H. M., B. G. Nair and T. B. Patel (1992). "Regulation of hepatic glycolysis and gluconeogenesis by atrial natriuretic peptide." Arch Biochem Biophys **298**(2): 640-645.
- Redfield, M. M., R. J. Rodeheffer, S. J. Jacobsen, D. W. Mahoney, K. R. Bailey and J. C. Burnett, Jr. (2002). "Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender." J Am Coll Cardiol **40**(5): 976-982.
- Robidoux, J., T. L. Martin and S. Collins (2004). "Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 297-323.
- Robinson, J. W. and L. R. Potter (2012). "Guanylyl cyclases A and B are asymmetric dimers that are allosterically activated by ATP binding to the catalytic domain." Sci Signal **5**(240): ra65.

Rocchini, A. P., C. P. Moorehead, S. DeRemer and D. Bondie (1989). "Pathogenesis of weight-related changes in blood pressure in dogs." Hypertension **13**(6 Pt 2): 922-928.

Rodriguez, A. M., C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E. Z. Amri, C. Dani and G. Ailhaud (2004). "Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun **315**(2): 255-263.

Ropero, A. B., S. Soriano, E. Tuduri, L. Marroqui, N. Tellez, B. Gassner, P. Juan-Pico, E. Montanya, I. Quesada, M. Kuhn and A. Nadal (2010). "The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function." Endocrinology **151**(8): 3665-3674.

Rosenzweig, A., T. D. Halazonetis, J. G. Seidman and C. E. Seidman (1991). "Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene." Circulation **84**(3): 1256-1265.

Roust, L. R. and M. D. Jensen (1993). "Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity." Diabetes **42**(11): 1567-1573.

Rudovich, N., O. Pivovarova, A. Traberth, A. Sparwasser, M. O. Weickert, W. Bernigau, A. L. Birkenfeld, A. M. Arafat, A. Bergmann and A. F. Pfeiffer (2012). "Acarbose treatment enhances mid-regional pro-atrial natriuretic peptide concentrations in non-diabetic individuals: further evidence for a common cardiometabolic pathway?" Diabetologia **55**(12): 3392-3395.

Ruilope, L. M., A. Dukat, M. Bohm, Y. Lacourciere, J. Gong and M. P. Lefkowitz (2010). "Blood-pressure reduction with LCZ696, a novel dual-acting inhibitor of the angiotensin II receptor and neprilysin: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active comparator study." Lancet **375**(9722): 1255-1266.

Sabrane, K., M. N. Kruse, L. Fabritz, B. Zetsche, D. Mitko, B. V. Skryabin, M. Zwiener, H. A. Baba, M. Yanagisawa and M. Kuhn (2005). "Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide." J Clin Invest **115**(6): 1666-1674.

Saiki, A., M. Ohira, K. Endo, N. Koide, T. Oyama, T. Murano, H. Watanabe, Y. Miyashita and K. Shirai (2009). "Circulating angiotensin II is associated with body fat accumulation and insulin resistance in obese subjects with type 2 diabetes mellitus." Metabolism **58**(5): 708-713.

Salomaa, V., A. Havulinna, O. Saarela, T. Zeller, P. Jousilahti, A. Jula, T. Muenzel, A. Aromaa, A. Evans, K. Kuulasmaa and S. Blankenberg (2010). "Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes." PLoS One **5**(4): e10100.

Saltiel, A. R. (2001). "New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes." Cell **104**(4): 517-529.

Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell **148**(5): 852-871.

Sarzani, R., P. Dessi-Fulgheri, V. M. Paci, E. Espinosa and A. Rappelli (1996). "Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues." J Endocrinol Invest **19**(9): 581-585.

Sarzani, R., P. Dessi-Fulgheri, F. Salvi, M. Serenelli, D. Spagnolo, G. Cola, M. Pupita, L. Giantomassi and A. Rappelli (1999). "A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives." J Hypertens **17**(9): 1301-1305.

Sarzani, R., P. Marcucci, F. Salvi, M. Bordicchia, E. Espinosa, L. Mucci, B. Lorenzetti, D. Minardi, G. Muzzonigro, P. Dessi-Fulgheri and A. Rappelli (2008). "Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth." Int J Obes (Lond) **32**(2): 259-267.

Sarzani, R., V. M. Paci, C. M. Zingaretti, C. Pierleoni, S. Cinti, G. Cola, A. Rappelli and P. Dessi-Fulgheri (1995). "Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue." J Hypertens **13**(11): 1241-1246.

Sarzani, R., P. Strazzullo, F. Salvi, R. Iacone, F. Pietrucci, A. Siani, G. Barba, M. C. Gerardi, P. Dessi-Fulgheri and A. Rappelli (2004). "Natriuretic peptide clearance receptor alleles and susceptibility to abdominal adiposity." Obes Res **12**(2): 351-356.

Saulnier, P. J., R. Roussel, J. M. Halimi, J. Lebrech, D. Dardari, S. Maimaitiming, G. Guilloteau, X. Prugnard, R. Marechaud, S. Ragot, M. Marre, S. Hadjadj, D. N. Surdiagene and D. s. groups (2011). "Impact of natriuretic peptide clearance receptor (NPR3) gene variants on blood pressure in type 2 diabetes." Diabetes Care **34**(5): 1199-1204.

Sauve, M., K. Ban, M. A. Momen, Y. Q. Zhou, R. M. Henkelman, M. Husain and D. J. Drucker (2010). "Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice." Diabetes **59**(4): 1063-1073.

Sawada, Y., M. Suda, H. Yokoyama, T. Kanda, T. Sakamaki, S. Tanaka, R. Nagai, S. Abe and T. Takeuchi (1997). "Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin." J Biol Chem **272**(33): 20545-20554.

Schiebinger, R. J., M. Z. Baker and J. Linden (1987). "Effect of adrenergic and muscarinic cholinergic agonists on atrial natriuretic peptide secretion by isolated rat atria. Potential role of the autonomic nervous system in modulating atrial natriuretic peptide secretion." J Clin Invest **80**(6): 1687-1691.

Schmitz-Peiffer, C. and T. J. Biden (2008). "Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes." Diabetes **57**(7): 1774-1783.

Schulz-Knappe, P., K. Forssmann, F. Herbst, D. Hock, R. Pipkorn and W. G. Forssmann (1988). "Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine." Klin Wochenschr **66**(17): 752-759.

Schweitz, H., P. Vigne, D. Moinier, C. Frelin and M. Lazdunski (1992). "A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*)." J Biol Chem **267**(20): 13928-13932.

Seale, P., B. Bjork, W. Yang, S. Kajimura, S. Chin, S. Kuang, A. Scime, S. Devarakonda, H. M. Conroe, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. A. Rudnicki, D. R. Beier and B. M. Spiegelman (2008). "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." Nature **454**(7207): 961-967.

Seale, P., S. Kajimura and B. M. Spiegelman (2009). "Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men." Genes Dev **23**(7): 788-797.

Sears, I. B., M. A. MacGinnitie, L. G. Kovacs and R. A. Graves (1996). "Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Mol Cell Biol **16**(7): 3410-3419.

Sechi, L. A., J. P. Valentin, C. A. Griffin, E. Lee, E. Bartoli, M. H. Humphreys and M. Schambelan (1995). "Receptors for atrial natriuretic peptide are decreased in the kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus." J Clin Invest **95**(6): 2451-2457.

Seferian, K. R., N. N. Tamm, A. G. Semenov, K. S. Mukharyamova, A. A. Tolstaya, E. V. Koshkina, A. N. Kara, M. I. Krasnoselsky, F. S. Apple, T. V. Esakova, V. L. Filatov and A. G. Katrukha (2007). "The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure." Clin Chem **53**(5): 866-873.

Semenov, A. G., A. B. Postnikov, N. N. Tamm, K. R. Seferian, N. S. Karpova, M. N. Bloschitsyna, E. V. Koshkina, M. I. Krasnoselsky, D. V. Serebryanaya and A. G. Katrukha (2009). "Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site." Clin Chem **55**(3): 489-498.

Sengenès, C., M. Berlan, I. De Glisezinski, M. Lafontan and J. Galitzky (2000). "Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes." FASEB J **14**(10): 1345-1351.

Sengenès, C., A. Bouloumie, H. Hauner, M. Berlan, R. Busse, M. Lafontan and J. Galitzky (2003). "Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes." J Biol Chem **278**(49): 48617-48626.

Sengenès, C., V. Stich, M. Berlan, J. Hejnova, M. Lafontan, Z. Pariskova and J. Galitzky (2002). "Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(1): 24-32.

Sengenès, C., A. Zakaroff-Girard, A. Moulin, M. Berlan, A. Bouloumie, M. Lafontan and J. Galitzky (2002). "Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(1): R257-265.

Serradeil-Le Gal, C., M. Lafontan, D. Raufaste, J. Marchand, B. Pouzet, P. Casellas, M. Pascal, J. P. Maffrand and G. Le Fur (2000). "Characterization of NPY receptors

controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes." FEBS Lett **475**(2): 150-156.

Shimada, M., Y. Date, M. S. Mondal, K. Toshinai, T. Shimbara, K. Fukunaga, N. Murakami, M. Miyazato, K. Kangawa, H. Yoshimatsu, H. Matsuo and M. Nakazato (2003). "Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach." Biochem Biophys Res Commun **302**(3): 520-525.

Sigler, M. H. (1975). "The mechanism of the natriuresis of fasting." J Clin Invest **55**(2): 377-387.

Sinha, T. K., P. Thajchayapong, S. F. Queener, D. O. Allen and N. H. Bell (1976). "On the lipolytic action of parathyroid hormone in man." Metabolism **25**(3): 251-260.

Skov, J., J. J. Holst, J. P. Gotze, J. Frokiaer and J. S. Christiansen (2013). "Glucagon-like peptide-1: effect on pro-atrial natriuretic peptide in healthy males." Endocr Connect **3**(1): 11-16.

Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder and H. Hauner (2007). "Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1023-1033.

Slot, J. W., G. Garruti, S. Martin, V. Oorschot, G. Posthuma, E. W. Kraegen, R. Laybutt, G. Thibault and D. E. James (1997). "Glucose transporter (GLUT-4) is targeted to secretory granules in rat atrial cardiomyocytes." J Cell Biol **137**(6): 1243-1254.

Small, E. M. and P. A. Krieg (2003). "Transgenic analysis of the atrial natriuretic factor (ANF) promoter: Nkx2-5 and GATA-4 binding sites are required for atrial specific expression of ANF." Dev Biol **261**(1): 116-131.

Smith, M. W., E. A. Espiner, T. G. Yandle, C. J. Charles and A. M. Richards (2000). "Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase." J Endocrinol **167**(2): 239-246.

Soualmia, H., C. Barthelemy, F. Masson, G. Maistre, J. Eurin and A. Carayon (1997). "Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue." J Cardiovasc Pharmacol **29**(5): 605-611.

Souza, S. C., M. D. Chau, Q. Yang, M. S. Gauthier, K. B. Clairmont, Z. Wu, J. Gromada and W. P. Dole (2011). "Atrial natriuretic peptide regulates lipid mobilization and oxygen consumption in human adipocytes by activating AMPK." Biochem Biophys Res Commun **410**(3): 398-403.

Spillantini, M. G., F. Sicuteri, S. Salmon and B. Malfroy (1990). "Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 ("enkephalinase") activity in human plasma and cerebrospinal fluid." Biochem Pharmacol **39**(8): 1353-1356.

St Peter, J. V., G. G. Hartley, M. M. Murakami and F. S. Apple (2006). "B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP in obese patients without heart failure: relationship to body mass index and gastric bypass surgery." Clin Chem **52**(4): 680-685.

- Stahl, A., R. E. Gimeno, L. A. Tartaglia and H. F. Lodish (2001). "Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family." Trends Endocrinol Metab **12**(6): 266-273.
- Stamler, R., J. Stamler, W. F. Riedlinger, G. Algera and R. H. Roberts (1978). "Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans." JAMA **240**(15): 1607-1610.
- Standaert, D. G., P. Needleman and C. B. Saper (1986). "Organization of atriopeptin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat." J Comp Neurol **253**(3): 315-341.
- Standeven, K. F., K. Hess, A. M. Carter, G. I. Rice, P. A. Cordell, A. J. Balmforth, B. Lu, D. J. Scott, A. J. Turner, N. M. Hooper and P. J. Grant (2011). "Nepriylisin, obesity and the metabolic syndrome." Int J Obes (Lond) **35**(8): 1031-1040.
- Stanford, K. I., R. J. Middelbeek, K. L. Townsend, D. An, E. B. Nygaard, K. M. Hitchcox, K. R. Markan, K. Nakano, M. F. Hirshman, Y. H. Tseng and L. J. Goodyear (2013). "Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity." J Clin Invest **123**(1): 215-223.
- Stapelfeldt, W., V. Schusdziarra, N. Weigert, H. D. Allescher and M. Classen (1988). "Effect of atrial peptide on gastric acid secretion in rats." Clin Physiol Biochem **6**(5): 262-267.
- Stasch, J. P., C. Hirth-Dietrich, S. Kazda and D. Neuser (1989). "Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo." Life Sci **45**(10): 869-875.
- Steinhilber, M. E., K. L. Cochrane and L. J. Field (1990). "Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes." Hypertension **16**(3): 301-307.
- Stich, V., T. Pelikanova, P. Wohl, C. Sengenès, A. Zakaroff-Girard, M. Lafontan and M. Berlan (2003). "Activation of alpha2-adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(3): E599-607.
- Suda, M., Y. Ogawa, K. Tanaka, N. Tamura, A. Yasoda, T. Takigawa, M. Uehira, H. Nishimoto, H. Itoh, Y. Saito, K. Shiota and K. Nakao (1998). "Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2337-2342.
- Sudoh, T., K. Kangawa, N. Minamino and H. Matsuo (1988). "A new natriuretic peptide in porcine brain." Nature **332**(6159): 78-81.
- Sudoh, T., N. Minamino, K. Kangawa and H. Matsuo (1990). "C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain." Biochem Biophys Res Commun **168**(2): 863-870.
- Sun, J. Z., S. J. Chen, E. Majid-Hasan, S. Oparil and Y. F. Chen (2002). "Dietary salt supplementation selectively downregulates NPR-C receptor expression in kidney independently of ANP." Am J Physiol Renal Physiol **282**(2): F220-227.

- Sun, J. Z., S. Oparil, P. Lucchesi, J. A. Thompson and Y. F. Chen (2001). "Tyrosine kinase receptor activation inhibits NPR-C in lung arterial smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(1): L155-163.
- Suzuki, T., K. Ino, F. Kikkawa, C. Uehara, H. Kajiyama, K. Shibata and S. Mizutani (2002). "Neutral endopeptidase/CD10 expression during phorbol ester-induced differentiation of choriocarcinoma cells through the protein kinase C- and extracellular signal-regulated kinase-dependent signalling pathway." Placenta **23**(6): 475-482.
- Takagi, G., K. Kiuchi, T. Endo, T. Yamamoto, N. Sato, J. Nejima and T. Takano (2000). "Alpha-human atrial natriuretic peptide, carperitide, reduces infarct size but not arrhythmias after coronary occlusion/reperfusion in dogs." J Cardiovasc Pharmacol **36**(1): 22-30.
- Takei, Y., A. Takahashi, T. X. Watanabe, K. Nakajima and S. Sakakibara (1991). "A novel natriuretic peptide isolated from eel cardiac ventricles." FEBS Lett **282**(2): 317-320.
- Tamura, N., H. Itoh, Y. Ogawa, O. Nakagawa, M. Harada, T. H. Chun, S. Suga, T. Yoshimasa and K. Nakao (1996). "cDNA cloning and gene expression of human type I alpha cGMP-dependent protein kinase." Hypertension **27**(3 Pt 2): 552-557.
- Tamura, N., Y. Ogawa, H. Chusho, K. Nakamura, K. Nakao, M. Suda, M. Kasahara, R. Hashimoto, G. Katsuura, M. Mukoyama, H. Itoh, Y. Saito, I. Tanaka, H. Otani and M. Katsuki (2000). "Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4239-4244.
- Tan, S. X., Y. Ng, J. G. Burchfield, G. Ramm, D. G. Lambright, J. Stockli and D. E. James (2012). "The Rab GTPase-activating protein TBC1D4/AS160 contains an atypical phosphotyrosine-binding domain that interacts with plasma membrane phospholipids to facilitate GLUT4 trafficking in adipocytes." Mol Cell Biol **32**(24): 4946-4959.
- Tanabe, A., M. Naruse, T. Wasada, K. Naruse, T. Yoshimoto, Y. Omori and H. Demura (1995). "Effects of acute hyperinsulinemia on plasma atrial and brain natriuretic peptide concentrations." Eur J Endocrinol **132**(6): 693-698.
- Tang, T., M. J. Abbott, M. Ahmadian, A. B. Lopes, Y. Wang and H. S. Sul (2013). "Desnutrin/ATGL activates PPARdelta to promote mitochondrial function for insulin secretion in islet beta cells." Cell Metab **18**(6): 883-895.
- Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiol Rev **84**(1): 137-167.
- Taylor, J. A., R. H. Christenson, K. Rao, M. Jorge and S. S. Gottlieb (2006). "B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures." Am Heart J **152**(6): 1071-1076.
- Teruel, T., R. Hernandez and M. Lorenzo (2001). "Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state." Diabetes **50**(11): 2563-2571.

- Theilig, F. and Q. Wu (2015). "ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology." Am J Physiol Renal Physiol **308**(10): F1047-1055.
- Thomas, G., P. Moffatt, P. Salois, M. H. Gaumont, R. Gingras, E. Godin, D. Miao, D. Goltzman and C. Lanctot (2003). "Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype." J Biol Chem **278**(50): 50563-50571.
- Tota, B., M. C. Cerra and A. Gattuso (2010). "Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a 'whip-brake' system of the endocrine heart." J Exp Biol **213**(Pt 18): 3081-3103.
- Tsuchimochi, H., F. Kurimoto, K. Ieki, H. Koyama, F. Takaku, M. Kawana, S. Kimata and Y. Yazaki (1988). "Atrial natriuretic peptide distribution in fetal and failed adult human hearts." Circulation **78**(4): 920-927.
- Tsukagoshi, H., Y. Shimizu, T. Kawata, T. Hisada, Y. Shimizu, S. Iwamae, T. Ishizuka, K. Iizuka, K. Dobashi and M. Mori (2001). "Atrial natriuretic peptide inhibits tumor necrosis factor-alpha production by interferon-gamma-activated macrophages via suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B activation." Regul Pept **99**(1): 21-29.
- Tsukamoto, O., M. Fujita, M. Kato, S. Yamazaki, Y. Asano, A. Ogai, H. Okazaki, M. Asai, Y. Nagamachi, N. Maeda, Y. Shintani, T. Minamino, M. Asakura, I. Kishimoto, T. Funahashi, H. Tomoike and M. Kitakaze (2009). "Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure." J Am Coll Cardiol **53**(22): 2070-2077.
- Uehlinger, D. E., P. Weidmann, M. P. Gnadinger, L. Hasler, C. Bachmann, S. Shaw, B. Hellmuller and R. E. Lang (1986). "Increase in circulating insulin induced by atrial natriuretic peptide in normal humans." J Cardiovasc Pharmacol **8**(6): 1122-1129.
- Vaandrager, A. B., B. C. Tilly, A. Smolenski, S. Schneider-Rasp, A. G. Bot, M. Edixhoven, B. J. Scholte, T. Jarchau, U. Walter, S. M. Lohmann, W. C. Poller and H. R. de Jonge (1997). "cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ibeta." J Biol Chem **272**(7): 4195-4200.
- Valentino, M. A., J. E. Lin, A. E. Snook, P. Li, G. W. Kim, G. Marszalowicz, M. S. Magee, T. Hyslop, S. Schulz and S. A. Waldman (2011). "A uroguanylin-GUCY2C endocrine axis regulates feeding in mice." J Clin Invest **121**(9): 3578-3588.
- van den Akker, F., X. Zhang, M. Miyagi, X. Huo, K. S. Misono and V. C. Yee (2000). "Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor." Nature **406**(6791): 101-104.
- van Kimmenade, R., F. van Dielen, J. Bakker, J. Nijhuis, H. Crijns, W. Buurman, M. van Dieijen-Visser, J. W. Greve and Y. Pinto (2006). "Is brain natriuretic peptide production decreased in obese subjects?" J Am Coll Cardiol **47**(4): 886-887.

- Varma, A., A. Das, N. N. Hoke, D. E. Durrant, F. N. Salloum and R. C. Kukreja (2012). "Anti-inflammatory and cardioprotective effects of tadalafil in diabetic mice." PLoS One **7**(9): e45243.
- Vega, R. B., J. M. Huss and D. P. Kelly (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." Mol Cell Biol **20**(5): 1868-1876.
- Vesely, D. L. (2007). "Urodilatin: a better natriuretic peptide?" Curr Heart Fail Rep **4**(3): 147-152.
- Viguerie, N., L. Millet, S. Avizou, H. Vidal, D. Larrouy and D. Langin (2002). "Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone." J Clin Endocrinol Metab **87**(2): 630-634.
- Vila, G., G. Grimm, M. Resl, B. Heinisch, E. Einwallner, H. Esterbauer, B. Dieplinger, T. Mueller, A. Luger and M. Clodi (2012). "B-type natriuretic peptide modulates ghrelin, hunger, and satiety in healthy men." Diabetes **61**(10): 2592-2596.
- Voisin, S., D. Rognan, C. Gros and T. Ouimet (2004). "A three-dimensional model of the neprilysin 2 active site based on the X-ray structure of neprilysin. Identification of residues involved in substrate hydrolysis and inhibitor binding of neprilysin 2." J Biol Chem **279**(44): 46172-46181.
- Vollmar, A. M. and R. Schulz (1994). "Gene expression and secretion of atrial natriuretic peptide by murine macrophages." J Clin Invest **94**(2): 539-545.
- Vollmar, A. M. and R. Schulz (1995). "Expression and differential regulation of natriuretic peptides in mouse macrophages." J Clin Invest **95**(6): 2442-2450.
- Volpe, M., S. Rubattu and J. Burnett, Jr. (2014). "Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives." Eur Heart J **35**(7): 419-425.
- Walford, G. A., Y. Ma, C. A. Christophi, R. B. Goldberg, P. Jarolim, E. Horton, K. J. Mather, E. Barrett-Connor, J. Davis, J. C. Florez, T. J. Wang and G. Diabetes Prevention Program Research (2014). "Circulating natriuretic peptide concentrations reflect changes in insulin sensitivity over time in the Diabetes Prevention Program." Diabetologia **57**(5): 935-939.
- Walther, T., H. Stepan, K. Pankow, M. Becker, H. P. Schultheiss and W. E. Siems (2004). "Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide." Biol Chem **385**(2): 179-184.
- Walz, H. A., L. Harndahl, N. Wierup, E. Zmuda-Trzebiatowska, F. Svennelid, V. C. Manganiello, T. Ploug, F. Sundler, E. Degerman, B. Ahren and L. S. Holst (2006). "Early and rapid development of insulin resistance, islet dysfunction and glucose intolerance after high-fat feeding in mice overexpressing phosphodiesterase 3B." J Endocrinol **189**(3): 629-641.

- Wang, S., T. M. Lincoln and J. E. Murphy-Ullrich (2010). "Glucose downregulation of PKG-I protein mediates increased thrombospondin1-dependent TGF- β activity in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **298**(5): C1188-1197.
- Wang, T. J., M. G. Larson, D. Levy, E. J. Benjamin, E. P. Leip, P. W. Wilson and R. S. Vasan (2004). "Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels." Circulation **109**(5): 594-600.
- Watt, M. J., A. G. Holmes, S. K. Pinnamaneni, A. P. Garnham, G. R. Steinberg, B. E. Kemp and M. A. Febbraio (2006). "Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E500-508.
- Weber, S., D. Bernhard, R. Lukowski, P. Weinmeister, R. Worner, J. W. Wegener, N. Valtcheva, S. Feil, J. Schlossmann, F. Hofmann and R. Feil (2007). "Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme." Circ Res **101**(11): 1096-1103.
- Wieczorek, S. J., A. H. Wu, R. Christenson, P. Krishnaswamy, S. Gottlieb, T. Rosano, D. Hager, N. Gardetto, A. Chiu, K. R. Bailly and A. Maisel (2002). "A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: a multicenter evaluation." Am Heart J **144**(5): 834-839.
- Wiese, S., T. Breyer, A. Dragu, R. Wakili, T. Burkard, S. Schmidt-Schweda, E. M. Fuchtbauer, U. Dohrmann, F. Beyersdorf, D. Radicke and C. J. Holubarsch (2000). "Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length." Circulation **102**(25): 3074-3079.
- Winaver, J., J. C. Burnett, G. M. Tyce and T. P. Dousa (1990). "ANP inhibits Na(+)-H+ antiport in proximal tubular brush border membrane: role of dopamine." Kidney Int **38**(6): 1133-1140.
- Yamada-Goto, N., G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Satoh-Asahara, H. Ariyasu, K. Hosoda and K. Nakao (2013). "Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice." Diabetes **62**(5): 1500-1504.
- Yamada, T., Y. Kotake, H. Nagata and J. Takeda (2013). "Atrial natriuretic peptide reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rabbits." J Anesth **27**(6): 901-908.
- Yan, W., F. Wu, J. Morser and Q. Wu (2000). "Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8525-8529.
- Yanaka, N., H. Akatsuka, E. Kawai and K. Omori (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates natriuretic peptide receptor-C expression in mouse osteoblasts." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): E965-973.
- Yang, Y., D. Ju, M. Zhang and G. Yang (2008). "Interleukin-6 stimulates lipolysis in porcine adipocytes." Endocrine **33**(3): 261-269.

- Yano, S., K. Tanigawa, S. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Shimada, S. Morioka, Y. Kato and K. Moriyama (1991). "Effect of diabetes mellitus on levels of atrial natriuretic hormone in plasma and the right atrium in the non-obese diabetic mouse." Acta Endocrinol (Copenh) **124**(5): 595-601.
- Ye, Q., S. Chen and D. G. Gardner (2003). "Endothelin inhibits NPR-A and stimulates eNOS gene expression in rat IMCD cells." Hypertension **41**(3 Pt 2): 675-681.
- Yoshimoto, T., M. Naruse, K. Naruse, K. Shionoya, M. Tanaka, A. Tanabe, H. Hagiwara, S. Hirose, T. Muraki and H. Demura (1996). "Angiotensin II-dependent down-regulation of vascular natriuretic peptide type C receptor gene expression in hypertensive rats." Endocrinology **137**(3): 1102-1107.
- You, H. and S. G. Laychock (2009). "Atrial natriuretic peptide promotes pancreatic islet beta-cell growth and Akt/Foxo1a/cyclin D2 signaling." Endocrinology **150**(12): 5455-5465.
- You, H. and S. G. Laychock (2011). "Long-term treatment with atrial natriuretic peptide inhibits ATP production and insulin secretion in rat pancreatic islets." Am J Physiol Endocrinol Metab **300**(3): E435-444.
- Yu, J., H. C. Yu, K. A. Kim, K. B. Kwon, J. W. Park, S. Z. Kim, S. H. Kim and B. H. Park (2008). "Differences in the amount of lipolysis induced by atrial natriuretic peptide in small and large adipocytes." J Pept Sci **14**(8): 972-977.
- Yuge, S., K. Inoue, S. Hyodo and Y. Takei (2003). "A novel guanylin family (guanylin, uroguanylin, and renoguanylin) in eels: possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney." J Biol Chem **278**(25): 22726-22733.
- Zhao, D., K. N. Pandey and L. G. Navar (2010). "ANP-mediated inhibition of distal nephron fractional sodium reabsorption in wild-type and mice overexpressing natriuretic peptide receptor." Am J Physiol Renal Physiol **298**(1): F103-108.
- Zhou, H. and K. S. Murthy (2003). "Identification of the G protein-activating sequence of the single-transmembrane natriuretic peptide receptor C (NPR-C)." Am J Physiol Cell Physiol **284**(5): C1255-1261.
- Zhou, Y. P. and V. E. Grill (1994). "Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle." J Clin Invest **93**(2): 870-876.
- Zraika, S., D. S. Koh, B. M. Barrow, B. Lu, S. E. Kahn and S. Andrikopoulos (2013). "Neprilysin deficiency protects against fat-induced insulin secretory dysfunction by maintaining calcium influx." Diabetes **62**(5): 1593-1601.

Titre et résumé en anglais

ROLE OF NATRIURETIC PEPTIDES IN THE CONTROL OF GLUCOSE HOMEOSTASIS

Natriuretic peptides (NP) levels are reduced in obesity and predict the risk of type 2 diabetes (T2D). Since skeletal muscle was recently shown as a key target tissue of NP, we aimed to investigate adipose and muscle NP receptor (NPR) signaling in the context of obesity and T2D. So, we studied control of glucose metabolism in adipocyte. We firstly demonstrated that NPRA expression is positively correlated with *de novo* lipogenesis gene expression in human adipose tissue. Then, we showed acute NP treatment in human adipocyte increase glucose uptake and oxidation in a p38 MAPK dependent manner.

In parallel to this work, we found that muscle NPRA correlated positively with whole-body insulin sensitivity in humans, and was strikingly down-regulated in obese subjects and recovered in response to diet-induced weight loss. In addition, muscle NP clearance receptor (NPRC) increased in individuals with impaired glucose tolerance and T2D. Similar results were found in obese diabetic mice. Although no acute effect of BNP on insulin sensitivity was observed in lean mice, chronic BNP infusion improved blood glucose control and insulin sensitivity in skeletal muscle of obese and diabetic mice. This occurred in parallel of a reduced lipotoxic pressure in skeletal muscle due to an up-regulation of lipid oxidative capacity. In addition, chronic NP treatment in human primary myotubes increased lipid oxidation and reduced palmitate-induced lipotoxicity.

Collectively, our data show that activation of NPRA signaling in skeletal muscle is important for the maintenance of long-term insulin sensitivity by decreasing lipotoxic pressure in skeletal muscle and by increasing glucose utilization in adipocytes.

Auteur : Marine COUE

Titre : ROLE DES PEPTIDES NATRIURETIQUES DANS LA REGULATION DE L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE

Directeur de thèse : Dr Cédric MORO et Pr Dominique LANGIN

Lieu et date de soutenance : Toulouse, le 25 septembre 2015.

Résumé

Il est maintenant bien établi que les niveaux circulants de peptides natriurétiques (PN) sont diminués lors de l'obésité et qu'une faible quantité est associée avec le développement futur d'un diabète de type 2 (DT2). Cependant aucune étude n'a à ce jour démontré un lien causal et mécanistique entre l'activité biologique des PN et le développement du DT2. Le but de cette thèse est d'étudier le rôle des PN au niveau du tissu adipeux et du muscle squelettique dans un contexte d'obésité et de DT2. Nous avons étudié dans un premier volet le lien entre expression et signalisation du système PN dans le tissu adipeux humain et l'insulinosensibilité. Nous avons pu montrer que l'expression du NPRA dans le tissu adipeux humain corrèle négativement avec l'insulinosensibilité et positivement avec l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique adipocytaire. L'expression du NPRA diminue avec le grade d'obésité, le prédiabète et le diabète de type 2. Nous avons également mis en évidence un nouveau rôle biologique des PN en montrant qu'ils stimulent spécifiquement le transport de glucose dans l'adipocyte humain. Le mécanisme moléculaire implique l'activation de la signalisation d'Akt de manière GMPc-dépendante.

Nous avons dans un deuxième volet mis en évidence que l'expression protéique du NPRA musculaire humain corrèle positivement avec la sensibilité à l'insuline systémique et est très diminuée chez les individus obèses. L'expression du récepteur de clairance aux PN (NPRC) est quant à lui plus élevé dans les muscles de sujets DT2. Ces résultats sont retrouvés chez la souris obèse/diabétique. De plus, nous avons montré qu'une perfusion chronique de BNP chez ces souris améliore leur contrôle glycémique ainsi que leur sensibilité à l'insuline. L'amélioration du métabolisme glucidique chez la souris DT2 s'accompagne d'une diminution de l'accumulation d'espèces lipotoxiques et d'une augmentation de la capacité oxydative lipidique musculaire. Ces résultats sont également reproduits sur des cellules musculaires humaines où un traitement chronique aux PN protège partiellement de la lipotoxicité induite par le palmitate.

En résumé, cette thèse révèle que l'expression et l'activation du NPRA au niveau des muscles squelettiques et des adipocytes humains déterminent en partie la sensibilité à l'insuline et jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie glucidique.

Mots-clés Peptides natriurétiques • obésité • diabète de type 2 • muscle squelettique • céramides • insulinosensibilité

Intitulé et adresse du laboratoire, Laboratoire de recherche sur les obésités, Equipe 4, Inserm/UPS UMR 1048 - I2MC, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4