Rôle des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris

Tania Muller

▶ **To cite this version:**

Tania Muller. Rôle des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI008 . tel-02094504

HAL Id: tel-02094504
https://theses.hal.science/tel-02094504

Submitted on 9 Apr 2019

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

Préparée à l'UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement/
INSERM UMR1231 « Lipides, Nutrition, Cancer »

Ecole doctorale n°554
Environnements-Santé

Doctorat de Physiologie

Par

Mme Muller Tania

Rôle des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 08 décembre 2017

B. Vergès	**Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU François Mitterrand, Dijon** Physiopathologie des Dyslipidémies, INSERM U1231, Dijon	**Président du jury**
J.F. Tanti	**Directeur de Recherche CNRS, Université Nice-Sophia-Antipolis** Physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'obésité et du diabète, INSERM U1065 Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice	**Rapporteur**
D. Cota	**Chargée de Recherche INSERM, Université de Bordeaux** Physiopathologie de l'équilibre énergétique et obésité, INSERM U1215, Neurocentre Magendie, Bordeaux	**Rapporteur**
I. Dugail	**Directrice de Recherche INSERM, Université Pierre & Marie Curie** NutriOmics, INSERM U1166, Faculté de médecine Pitié Salpêtrière, Paris	**Examinateur**
P. Degrace	**Professeur des Universités, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon** Physiopathologie des Dyslipidémies, INSERM U1231, Dijon	**Directeur de thèse**
L. Demizieux	**Maître de Conférences, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon** Physiopathologie des Dyslipidémies, INSERM U1231, Dijon	**Co-directeur de thèse**

Courez quand vous le pouvez, marchez quand vous devez, rampez s'il le faut, mais n'abandonnez jamais.

Dean Karnazes

Dans la course à la qualité, il n'y a pas de ligne d'arrivée.

David Kearns

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Une attention toute particulière aux docteurs **Daniela Cota** et **Jean-François Tanti** qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour le temps consacré à examiner ces travaux et pour vos remarques constructives. Je remercie également le docteur **Isabelle Dugail** en qualité d'examinatrice mais également en tant que membre de mon comité de suivi de thèse avec le docteur **Jacques Grober**. Merci pour vos conseils, vos remarques et votre expertise au cours de ces trois années.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le professeur **Pascal Degrace**, pour m'avoir encadrée dès mon stage de master et jusqu'à la fin de cette thèse. Merci Pascal de m'avoir formée et de m'avoir donné l'envie de faire de la recherche et de réaliser cette thèse. Je salue également ton expertise, tes conseils, ton soutien et ta grande disponibilité malgré tes charges administratives. Merci pour tes remarques et corrections sur l'ensemble des présentations et rapports que j'ai réalisé et qui n'ont fait qu'augmenter leur qualité. Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordée et enfin merci pour les nombreuses discussions scientifiques et diverses que nous avons pu avoir.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe PADYS et tout particulièrement au professeur **Bruno Vergès**, qui m'a accueillie au sein de son équipe. Merci pour vos conseils et pour m'avoir donné l'opportunité de participer à la diabète académie. Au docteur **Laurent Demizieux**, mon co-encadrant de thèse. Merci Laurent de m'avoir formée aux différentes techniques et surtout aux joies du western-blot et merci pour tes conseils, tes remarques pertinentes et ton implication dans mon projet. Au docteur **Stéphanie Troy-Fioramonti** qui m'a initiée à l'expérimentation animale. Merci pour ta disponibilité et ton aide lors de mes différentes « manips ». A **Joseph Gresti**, qui m'a accompagné dans mes débuts. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton aide, tes conseils techniques et surtout ton expertise sur les lipides et la chromatographie. Au docteur **Patricia Degrace**, pour m'avoir formée à la culture cellulaire, pour sa disponibilité et sa générosité et enfin au docteur **Hélène Berger**, qui, malgré un court passage au laboratoire a toujours été très disponible et serviable.

Mes remerciements vont ensuite à tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyé durant ces trois années. A **Mickaêl**, **Michel**, **Jérôme**, **Lyne**, **Jean-Marc**, **Sandrine et Julia**. Merci pour leur sympathie, leur aide et leur disponibilité. Et merci également à **Aziz**, **Charles** et **Laurent** de m'avoir formée à l'enseignement.

Une thèse sans le soutien de mes collègues de bureau n'aurait pu être possible alors un grand merci à tous ceux qui sont passés dans le bureau R07 pour une durée plus ou moins longue mais plus particulièrement à

Célia et **Aurélie**, qui nous ont accueillies, Adélie et moi, dès notre stage de M2 et qui ont toujours été là pour nous. Merci pour leur sympathie et leurs conseils. A **Adélie** (Dumont !!) justement, avec qui nous avons commencé l'aventure ensemble. Que de choses à dire sur toi mais je vais être brève. Merci pour ta présence, ta gentillesse, ta générosité débordante et ta joie de vivre que tu exprimes quotidiennement et surtout VOCALEMENT !! A **Charlotte** (Lolotte) qui nous a rejoints peu de temps après, le bébé de l'aventure. Merci pour ta sympathie et ta bonne humeur. Et merci à toutes les deux pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble que ce soit au labo ou en dehors. A **Danish** (Patoli) avec qui la communication a été quelque peu difficile au départ (l'accent pakistanais…). Et enfin, à **Quentin** (Escool), le dernier venu, « The last but not the least » comme on dirait…
Je n'oublierai pas tous les bons moments qu'on a passé tous ensemble que ce soit au labo, au resto, à la fête foraine, dans les bars, au ski…. et qui ont rendus cette thèse très agréable.

Je ne pourrai terminer ces remerciements sans adresser une pensée toute particulière à tous mes proches et à ma famille qui ont suivi de près ou de loin ces travaux.
A mes amies, « **les meufs** » qui m'ont permis de me détendre autour d'un verre ou d'un repas lors de mes retours en Alsace.
Bien évidemment, à **mes parents** qui n'ont jamais compris grand-chose à ce que je faisais concrètement mais sans qui tout cela n'aurait pu être possible. Merci de m'avoir soutenue, d'avoir cru en moi, de m'avoir donné la possibilité de réaliser les études que je souhaitais pour en arriver jusque-là aujourd'hui.
A ma grande sœur, **Maryline**, qui, à son grand désespoir ne comprends pas comment je fais pour travailler avec des souris et des rats. Merci ma sœur d'avoir toujours été présente pour me réconforter et me soutenir malgré la distance et merci de m'avoir donné l'immense joie de devenir la marraine de **Lena**, mon loulou qui me remplit de bonheur (même si elle me fait passer pour une tueuse de souris auprès de sa maîtresse).
A ma **grand-mère**, mon **parrain, Martine** et une pensée toute particulière pour mon **grand-père** qui je pense, aurait été fière de moi aujourd'hui.
Et enfin à **Thomas**, Tom, Toto (pour les intimes) à qui j'ai dû expliquer une bonne dizaine de fois comment l'insuline régulait le métabolisme glucido-lipidique. Tu dois me haïr pour ça ! Merci de m'avoir accompagnée durant ces années, d'avoir supporté les nombreuses répétitions pour mes présentations, d'avoir le don de toujours tout positiver, de croire en moi et de m'avoir redonné le sourire dans les périodes de doute.

Enfin je remercie également les collaborateurs qui ont participé à ces travaux. A la plateforme lipidomique et plus particulièrement à **Jean-Paul Pais de Barros** et **Hélène Choubley** pour la réalisation des dosages des endocannabinoïdes. A **Anne-Marie Lebon** et **Christine Belloir** de l'équipe Perception de la flaveur du CSGA pour avoir réalisé les dosages d'AMPc par GloSensor. Et enfin, à toute l'équipe du bloc DTU (digestif thoracique urinaire) du CHU François Mitterrand à Dijon et notamment au professeur **Pablo**

Ortega-Deballon, chirurgien et à **Amélie Berthiot**, attaché de recherche clinique, qui ont tout mis en œuvre pour me permettre d'obtenir des prélèvements de tissu adipeux. Merci également au docteur **Isabelle Simoneau** qui a permis la communication entre le bloc et le labo.

Résumé

L'obésité s'accompagne d'une dérégulation de la lipolyse responsable d'une libération excessive d'Acides Gras Libres (AGL) qui sont des acteurs majeurs dans la mise en place de la résistance périphérique à l'insuline. En parallèle, il est maintenant bien établi qu'au cours de l'obésité, une altération de l'activité du Système EndoCannabinoïde (SEC) dans plusieurs tissus métaboliques est observée. S'il est bien décrit que l'hyperactivation de ce système au sein du Tissu Adipeux (TA) favorise son expansion, les conséquences sur la lipolyse adipocytaire restent à déterminer.

Ces travaux de thèse ont pour objectif principal de préciser le rôle du SEC dans la régulation de la lipolyse. Pour cela, l'AEA, un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) et le JZL195, un inhibiteur des enzymes de dégradation des endocannabinoïdes, ont été utilisés *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur un modèle d'explants pour augmenter le tonus endocannabinoïde dans le TA et en mesurer les conséquences sur l'activité lipolytique. Ensuite, les effets du blocage du SEC sur la lipolyse ont été étudiés chez la souris obèse par l'utilisation d'un antagoniste spécifique des CB1R, le Rimonabant.

Ces travaux montrent que l'activation du SEC adipocytaire dans des conditions d'insulinémie élevée (période postprandiale) conduit à une altération du signal insulinique et à une perte de son effet antilipolytique favorisant le relargage d'AGL et pouvant, à terme, conduire à des effets délétères sur les tissus périphériques. A l'inverse, lorsque les voies de signalisation à l'insuline sont peu actives comme c'est le cas au cours du jeûne, la stimulation du SEC s'accompagne d'une activation de la voie PI3K/Akt freinant la lipolyse induite par le jeûne et favorisant ainsi le stockage des lipides et l'expansion du TA. Cette situation expérimentale est comparable à celle rencontrée au cours de l'obésité qui est associée à la fois, à une faible activité de la voie PI3K/Akt (résistance à l'insuline) et à une hyperactivation du SEC. Le blocage des CB1R par le Rimonabant chez la souris obèse, conduit à une stimulation importante de la lipolyse qui semble dépendre d'une activation de l'adénylate cyclase. Etant donné qu'un traitement par le Rimonabant s'accompagne également d'une augmentation du catabolisme des acides gras, il est raisonnable de penser que dans ces conditions, les AGL libérés n'exercent pas leurs effets délétères.

En conclusion, ces travaux suggèrent que l'activation du SEC participe à l'installation d'une résistance à l'insuline dans le TA qui pourrait, à plus long terme, s'étendre aux tissus périphériques *via* les effets lipotoxiques des AGL issus de la lipolyse. Au cours de l'obésité, l'association d'une insulinorésistance et d'un tonus endocannabinoïde élevé favoriserait le stockage des lipides et l'expansion de la masse grasse. Au final, le blocage ciblé des CB1R du TA pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante pour lutter contre les dérégulations métaboliques associées à l'obésité.

Mots clés : Obésité, Insulinorésistance, Système Endocannabinoïde, Tissu Adipeux, Lipolyse, Métabolisme glucido-lipidique

Abstract

Obesity is accompanied with lipolysis deregulation responsible for excessive Free Fatty Acid (FFA) release, which are key actors in the implementation of peripheral insulin resistance. In parallel, it is now well established that obesity is associated with EndoCannabinoid System (ECS) activity dysfunction in several metabolic tissues. If it is well described that overactivation of this system in the Adipose Tissue (AT) is favourable to its expansion, the consequences on lipolysis remain to be elucidated.

The main objective of this thesis work was to precise the role of ECS on lipolysis regulation. To achieve this, AEA, a cannabinoid receptor 1 (CB1R) agonist and JZL195, an inhibitor of the enzymes responsible for the degradation of endocannabinoids, were used, *in vivo* in mice and *in vitro* on an explant model, to increase the endocannabinoid tone in the AT and analyse the consequences on lipolytic activity. Then, ECS blockade effect on lipolysis was studied in obese mice by using a specific CB1R antagonist, Rimonabant.

This work demonstrates that activation of ECS under high insulinemia condition (postprandial state) alters insulin signalling limiting its antilipolytic effect and increasing FFA release which can ultimately be deleterious for peripheral tissues. Conversely, when insulin signalling pathways are weakly activated, as it is the case during fasting, ECS activation comes with PI3K/Akt activation impeding fasting induced lipolysis and promoting lipid storage and AT expansion. This experimental situation resembles that encountered in obesity which is associated, both with low activity of PI3K/Akt pathway (insulin resistance) and ECS overactivation. CB1R blockade by Rimonabant in obese mice lead to a strong stimulation of lipolysis which seems to be dependent on adenylate cyclase activation. Considering that Rimonabant treatment was also reported to be associated with improved fatty acid catabolism, it can be advanced that FFA released in excess in these conditions, do not have deleterious effects.

In conclusion, this work suggests that ECS activation is involved in the onset of AT insulin resistance which ultimately could indirectly affect peripheral tissues *via* lipolysis derived FFA lipotoxicity. During obesity, the association of insulin resistance and ECS tone elevation would promote lipid storage and AT expansion. Finally, AT CB1R specific blockade could constitute an interesting therapeutic target limiting metabolic deregulations linked to obesity.

Key words: Obesity, Insulin Resistance, Endocannabinoid System, Adipose Tissue, Lipolysis, Lipid and carbohydrate metabolism

Table des matières

Liste des abréviations 5
Liste des figures 8
Liste des tableaux 11
Introduction 12
I. De l'obésité au diabète de type 2 13
A. Définition 13
B. Prévalence 14
1) En France 14
2) Dans le monde 14
C. Etiologie 14
1) Facteurs environnementaux et comportementaux 15
2) Facteurs génétiques 15
D. Obésité, insulinorésistance et diabète de type 2 16
1) Obésité et syndrome métabolique 16
2) Obésité et diabètes 17
3) Etiologie du diabète de type 2 18
4) Rappels sur le rôle de l'insuline dans la régulation de la glycémie 18
5) De l'insulinorésistance au diabète de type 2 22
6) Insulinorésistance : la conséquence d'un dysfonctionnement du tissu adipeux ? 24
II. Le tissu adipeux blanc : de la physiologie à la pathologie 25
A. Le tissu adipeux blanc, un tissu hétérogène 26
1) Les adipocytes blancs 26
2) La fraction stroma-vasculaire 26
B. La lipolyse adipocytaire 27
1) Hydrolyse des triglycérides par les lipases 27
2) Devenir des AGL et du glycérol 31
3) Régulation physiologique/nutritionnelle de la lipolyse 31
C. Remodelage du tissu adipeux au cours de l'obésité 34
1) Expansion du tissu adipeux 34
2) Inflammation du tissu adipeux 35
D. Dérégulation de la lipolyse au cours de l'obésité 39
1) Dérégulation de la lipolyse stimulée 40
2) Dérégulation de la lipolyse basale 40
E. Rôle des AGL dans l'installation de la résistance périphérique à l'insuline 42
1) Mécanismes d'altération des voies de signalisation insulinique 42

2) Conséquences métaboliques de la résistance à l'insuline 44
III. Le système endocannabinoïde et ses effets métaboliques 48
A. Histoire et définition 48
B. Récepteurs et canaux activés par les ECs 49
C. Endocannabinoïdes et dérivés endogènes 50
1) Synthèse des principaux ECs, l'AEA et le 2-AG 51
2) Autres endocannabinoïdes et dérivés endogènes 52
3) Dégradation des ECs 53
D. Voies de signalisation régulées par les CBR 54
1) Principales voies de signalisation intracellulaires régulées par les protéines G 55
2) Signalisation dépendante des β-arrestines 56
E. Modulation de la transmission synaptique 57
F. SEC central et prise alimentaire 57
1) Modulation du tonus endocannabinoïde central en fonction de l'état nutritionnel 58
2) Contrôle hédonique et homéostatique de la prise alimentaire 58
G. SEC et obésité 59
1) Hyperactivation du SEC au cours de l'obésité 59
2) Origines de l'augmentation du tonus endocannabinoïde au cours de l'obésité 60
3) Le Rimonabant, premier antagoniste CB1R anti-obésité 61
4) Le SEC périphérique comme nouvelle cible thérapeutique 63
5) SEC et pancréas 64
6) SEC et tractus GI 66
7) SEC et muscle 67
8) SEC et foie 68
9) SEC et tissu adipeux 71
Hypothèses et objectifs du projet 79
Résultats et discussion 82
I. Conséquences de l'activation du SEC sur la lipolyse adipocytaire 83
A. Validation des approches expérimentales utilisées pour activer le SEC 83
1) Activation du SEC par injection i.p. d'AEA 84
2) Activation du SEC endogène par injection i.p. de JZL195 85
3) Activation du SEC par le JZL195 in vitro 87
4) Mise en évidence d'une dérégulation du SEC au cours de l'obésité 89
B. L'activation du SEC stimule la lipolyse chez la souris à l'état nourri 93
1) Article de thèse : l'hyperactivation du SEC altère l'action antilipolytique de l'insuline dans le TAV de souris (Muller et al., 2017) 94
2) Conclusion 105
C. Conséquences de la stimulation de la lipolyse induite par la suractivation du SEC sur le métabolisme hépatique 106

1) L'injection d'AEA induit une augmentation de la triglycéridémie 106
2) L'activation du SEC par le JZL195 conduit à des variations de la triglycéridémie 109
3) L'activation du SEC par le JZL195 modifie l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique 111
4) L'effet du JZL195 est-il dépendant des CB1R ? 114
5) L'effet du JZL195 sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique est-il direct ? 115
6) La boucle de régulation dépendante du FGF21 est-elle fonctionnelle au cours de l'obésité ? 117
7) Conclusion 118
D. L'activation du SEC inhibe la lipolyse et favorise le stockage lipidique chez la souris à jeun.120
1) L'AEA exerce un effet inhibiteur sur l'activité lipolytique d'explants TAV en absence d'insuline.....120
2) La lipolyse est plus élevée dans le TAV de souris $CB1R^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages ... .123
3) La lipolyse est diminuée dans des explants de TAV prélevés sur des souris traitées par le JZL195 124
4) La lipolyse est diminuée dans des explants de TAV traités ex vivo avec le JZL195.....125
5) La lipolyse est diminuée in vivo chez des souris traitées par le JZL195.....125
6) L'activation du SEC par l'AEA stimule la production d'adiponectine in vitro 126
7) Conclusion 127
E. L'activation du SEC modifie également l'activité lipolytique dans le TA humain 128
1) Mise au point des traitements 129
2) L'activation du SEC dans le TAV et le TASC humain conduit à une dérégulation de la lipolyse adipocytaire 130
F. Conclusion : l'activation des CB1R du TA conduit à une dérégulation de la lipolyse 131
II. Etude des conséquences de l'inactivation du SEC sur la lipolyse adipocytaire 133
A. Effets du blocage des CB1R par le Rimonabant sur la lipolyse chez la souris obèse 134
B. Effets du blocage des CB1R par le Rimonabant sur la lipolyse sur le modèle d'explants de TAV de rat 139
C. Conclusion : le blocage des CB1R du TA conduit à une stimulation de la lipolyse favorable à une amélioration du métabolisme glucido-lipidique 140
Conclusion et perspectives 142
Matériel & Méthodes.....146
I. Animaux et régimes.....147
II. Réactifs 147
III. Expérimentations *in vitro* 148
A. Explants de TAV de rat 148
1) Traitement des explants de TAV par l'AEA 148
2) Traitement des explants de TAV par le JZL195.....149
3) Traitement des explants de TAV par le Rimonabant.....149

B. Explants de TAV de souris 150
C. Explants de TAV et TASC humain 150
D. Explants de foie de souris 150
E. Culture cellulaire sur HepG2 151
F. Cellules HEK293T/17 – GloSensor™ cAMP Assay 152
1) Transfection de plasmide 153
2) Traitement des cellules 153
IV. Expérimentations animales *in vivo* 154
A. Activation aigüe du SEC par injection i.p. d'AEA 154
1) Activation aigüe du SEC et tonus endocannabinoïde 154
2) Activation aigüe du SEC en présence d'une stimulation β-adrénergique 154
3) Activation aigüe du SEC au cours de différentes situations nutritionnelles 155
B. Activation prolongée du SEC par injection i.p. de JZL195 158
1) Activation prolongée du SEC et tonus endocannabinoïde 158
2) Activation prolongée du SEC pendant 3h 158
3) Activation prolongée du SEC pendant 6h 160
C. Inactivation du SEC chez la souris contrôle ou obèse 161
1) Test de tolérance à l'insuline 161
2) Régime hyperlipidique et hyperactivité du SEC 161
3) Blocage des CB1R par le Rimonabant ou l'AM6545 chez la souris obèse 161
4) Blocage des CB1R par le Rimonabant chez la souris contrôle et obèse 162
V. Dosages colorimétriques 163
A. Dosages sur plasma 163
B. Dosages sur surnageant d'explants de TA 163
C. Dosages sur tissus 163
VI. Dosages par test ELISA 164
A. Dosage de l'AMPc dans des homogénats de TA 164
B. Dosage de l'adiponectine dans le surnageant d'explants de TA 164
C. Dosage de l'insuline et du FGF21 plasmatique 164
VII. Dosage des ECs par spectrométrie de masse 165
VIII. Extraction de protéines et Western-blotting 166
IX. Analyse de l'expression génique 167
X. Analyse statistique 169
Bibliographie 170
Annexes 200
Liste des publications et présentations 234

Liste des abréviations

A

2-AG : 2 –ArachidonoylGlycerol

2-AGE : 2-ArachidonylGlycerylEther

5'AMP : 5'-Adenosine MonoPhosphate

α-MSH : α-Melanocyte Stimulating Hormone

ABHD : α/β Hydrolase Domain

ACC : Acetyl-CoA Carboxylase

AEA : ArachidonoylEthanolamine

AGL : Acides Gras Libres

AGMI : Acides Gras MonoInsaturés

AMPc : Adenosine MonoPhosphate cyclique

AMPK : Adenosine MonoPhosphate Kinase

AMT : Anandamide Membrane Transporter

ANP : Atrial Natriuretic Peptide

ATGL : Adipose TriGlyceride Lipase

ATP : Adenosine TriPhosphate

ARF-1 : ADP Ribosylation Factor-1

B

BIP : Binding Immunoglobulin Protein

BNP : Brain Natriuretic Peptide

BSA : Bovine Serum Albumin

C

CBR : CannaBinoid Receptor

CCR2 : C-C Chemokine Receptor 2

CGI-58 : Comparative Gene Identification-58

CLS : Crown Like Structure

COX IV : Cytochrome C Oxydase IV

CPP : Comité de Protection des Personnes

CPT1 : Carnitine PalmitoylTransferase 1

D

Δ9-THC : Δ9-Tetrahydrocannabinol

DAG : DiAcylGlycérol

DAGL : DiAcylGlycerol Lipase

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DHA : Acide DocosaHexaènoïque

DHEA : *N*-DocosaHexaenoyl EthanolAmide

DIO : Diet Induced Obesity

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : DiMéthylSulOxide

DT2 : Diabète de Type 2

E

ECs : EndoCannabinoïdes

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

eiF2α : Eukaryotic Initiation Factor 2α

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMA : European Medicines Agency

ENNS : Etude National Nutrition Santé

eNOS : endothelial Nitric Oxyde Synthase

EPA : Acide EicosaPentaènoïque

EPEA : *N*-Eicosapentaenoyl EthanolAmide

ESTEBAN : Etude de SanTé sur l'Environnement, la Biosurveillance, l'Activité physique et la Nutrition

F

FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase

FABP : Fatty Acid Binding Protein

FAS : Fatty Acid Synthase

FAT/CD36 : Fatty Acid Translocase/Cluster of Differenciation 36

FATP : Fatty Acid Transporter Protein

FDA : Food and Drug Administration

FID : Fédération Internationale du Diabète

FSV : Fraction Stroma-Vasculaire

G

G6P : Glucose-6-Phosphatase

GABA : γ-AminoButyric Acid

GIP : Gastric Inhibitory Peptide

GLP-1 : Glucagon Like Peptide 1

GLUT : GLUcose Transporter

GPR : G coupled-Protein Receptor

GS : Glycogene Synthase

GSK-3 : Glycogene Synthase Kinase 3

H

HBSS : Hank's Balanced Sodium Salt

HDL : High Density Lipoprotein

HFD : High Fat Diet

HIF-1α : Hypoxia Inductible Factor 1α

I

IgG : ImmunoGlobulines G (IgG)

IKK : IκB Kinase

IL : InterLeukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

INFγ : INterFeron γ

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

IRS : Insulin Receptor Substrate

i.p.: IntraPéritonéale

J

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

L

LHS : Lipase Hormono Sensible

LPL : LipoProtein Lipase

LPS : LipoPolySaccharide

Lyso-PLC : Lyso-PhosphoLipase C

M

MAG : MonoAcylGlycerol

MAGL : MonoAcylGycerol Lipase

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MC4R : MelanoCortin 4 Receptor

MCP1 : Monocyte Chimoattractant Protein 1

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

MTTP : Microsomal Triglyceride Transfert Protein

N

NAAA : *N*-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase

NADA : N-ArachidonoylDopAmine

NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NAPE-PLD : N-Acyl PhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D

NAE : N-Acyl Ethanolamine

NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoolic SteatoHepatitis

NAT : N-AcylTransférase

NK : Natural Killer

NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor 1

NFkB : Nuclear Factor Kappa B

NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3

NPR-A : Natriuretic Peptide Receptor A

O

2-OG : 2-OleylGlycerol

OEA *: N*-OleoylEthanolAmine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1

PBS : Phosphate Buffer Salt

PC : Pyruvate Carboxylase

PDE-3B : PhosphoDiEstérase de type 3B

PE : PhosphatidylEthanolamine

PEA *: N*-PalmitoylEthanolAmine

PEPCK : PhosphoEnol Pyruvate CarboxKinase

PERK : protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmis Reticulum Kinase

PGC-1α : PPARγ Coactivator 1-α

PI : PhosphatidylInositol

PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase

PKA : Protein Kinase A

PKB : Protein Kinase B

PKC : Protein Kinase C

PKG : Protein Kinase G

PLA1 : PhosphoLipase A1

PLC : PhosphoLipase C

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

POMC : ProOpioMelanoCortine

PTX : Pertussis Toxin X

R

RE : Réticulum Endoplasmique

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SCD 1 : Stearoyl-CoA Desaturase 1

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c

STD : Standard Diet

SVF : Sérum de Vœu Foetal

T

TA : Tissu Adipeux

TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané

TAV : Tissu Adipeux Viscéral

Tfam : Transcription Factor A, Mitochondrial

TG : TriGlycérides

TGF-β : Tumor Growth Factor β

TLR4 : Toll Like Receptor 4

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloide 1

U

UCP1 : Uncoupling Protein 1

V

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Liste des figures

Figure 1 : Estimations du diabète dans le monde en 2015 et 2040 (20-79 ans) selon la FID 17
Figure 2 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. 19
Figure 3 : Sécrétion biphasique de l'insuline 19
Figure 4: Effets pléiotropes de l'insuline.....20
Figure 5: Principales voies de signalisation activées par l'insuline 22
Figure 6 : Histoire naturelle du diabète de type 2 : du pré-diabète au diabète 23
Figure 7: Schéma général du métabolisme adipocytaire et devenir du glycérol et des AGL.....25
Figure 8: Hétérogénéité cellulaire du tissu adipeux. 27
Figure 9: Etapes de l'hydrolyse des TG au cours de la lipolyse.....28
Figure 10 : Voies de signalisation de la lipolyse adipocytaire et ses facteurs de régulation 32
Figure 11 : L'hypertrophie du tissu adipeux est associée à une inflammation.....35
Figure 12 : Différents acteurs à l'origine de l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité. 37
Figure 13 : Représentation histologique des structures CLS dans le tissu adipeux inflammé 38
Figure 14 : Remodelage des cellules immunitaires du tissu adipeux au cours de l'obésité 39
Figure 15 : Voies de signalisation impliquées dans l'altération de la signalisation insulinique 44
Figure 16 : Contribution des différentes sources d'AGL à l'accumulation des TG dans le foie 45
Figure 17 : Mécanismes cellulaires à l'origine de l'augmentation de la production de glucose hépatique au cours de l'insulinorésistance.....46
Figure 18 : Dysfonctionnement du tissu adipeux et résistance à l'insuline périphérique 47
Figure 19: Aperçu général des acteurs du système endocannabinoïde.....49
Figure 20: Principaux endocannabinoïdes et dérivés endogènes 50
Figure 21 : Voies de biosynthèse et de dégradation de l'anandamide.....51
Figure 22: Voies de biosynthèse et de dégradation du 2-AG 52
Figure 23: Voies de signalisation des CB1R régulées par les protéines G.....56
Figure 24: Voies de signalisation des CB1R régulées par les β-arrestines.....56
Figure 25: Modulation de la transmission synaptique par les endocannabinoïdes.....57
Figure 26: Rôle du SEC dans la différenciation adipocytaire 73
Figure 27 : Conséquences de l'activation du système endocannabinoïde central et périphérique sur la prise alimentaire et sur le métabolisme glucido-lipidique.....78
Figure 28 : Hypothèse concernant le rôle des récepteurs CB1R dans la dérégulation de la lipolyse.....81
Figure 29 : Effet de l'AEA sur la température rectale et la concentration en AEA dans le foie, le cerveau et le TAV. 84
Figure 30 : Effet d'une injection de JZL195 sur la température rectale et le tonus endocannabinoïde. 86
Figure 31 : Tonus endocannabinoïde dans des explants de TAV de rat traités par le JZL195 87
Figure 32 : Tonus endocannabinoïde dans les explants de foie traités le JZL195. 88
Figure 33 : Tonus endocannabinoïde dans les cellules hepG2 traitées par le JZL195. 88
Figure 34 : Test de tolérance à l'insuline chez des souris contrôles (STD) et obèses (HFD). 89
Figure 35 : Dosage de l'AEA et du 2-AG dans les tissus de souris contrôles (STD) ou obèses (HFD). 90
Figure 36 : Dosage des composés dits « endocannabinoid-like » (OEA et PEA) dans les tissus de souris contrôles (STD) ou obèses (HFD). 91
Figure 37 : Analyse de l'expression génique par PCR en temps réel de gènes codant pour des protéines du SEC dans le TAV de souris contrôles (STD° ou obèses (HFD). 92

Figure 38 : Analyse de l'expression génique par PCR en temps réel du gène codant pour F4/80 dans le TAV des souris contrôles (STD) ou obèses (HFD). 93
Figure 39 : Mécanisme d'action hypothétique des CB1R sur la lipolyse adipocytaire en situation postprandiale. 105
Figure 40 : La triglycéridémie est plus élevée chez les souris traitées par l'AEA au cours d'une charge en glucose. 106
Figure 41 : L'AEA induit une augmentation de la triglycéridémie chez des souris au cours d'une charge en insuline. 107
Figure 42 : L'AEA limite le captage des AG dans le foie. 108
Figure 43 : Le traitement de souris par le JZL195 pendant 3h tend à augmenter le contenu hépatique en triglycérides. 109
Figure 44 : Le traitement de souris par le JZL195 pendant 3h augmente le tonus endocannabinoïde dans le foie et le TAV. 110
Figure 45 : Le traitement de souris par le JZL195 pendant 6h diminue le contenu hépatique en triglycérides. 110
Figure 46 : La lipolyse adipocytaire n'est pas modifiée par un traitement de 6h par le JZL195. 111
Figure 47 : Un traitement de 6h par le JZL195 conduit à une modulation de l'expression de gènes codant pour des protéines du métabolisme lipidique hépatique. 112
Figure 48 : Un traitement de 6h par le JZL195 conduit à une augmentation de l'expression du gène codant pour le FGF21 et de sa sécrétion par le foie. 113
Figure 49 : Un traitement de 6h par le JZL195 conduit à une modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation des graisses par le TAV. 113
Figure 50 : Boucle de régulation négative du flux d'AGL entre le TA et le foie via la sécrétion de FGF21. 114
Figure 51 : Le blocage des CB1R par le Rimonabant rétablit le niveau d'expression des gènes induits par le traitement au JZL195 dans le foie et le TAV. 115
Figure 52 : Le JZL195 ne modifie pas l'expression du FGF21 dans des explants de foie de souris WT et $CB1R^{-/-}$. 116
Figure 53 : Le JZL195 tend à augmenter l'expression du FGF21 dans des cellules HepG2. 117
Figure 54 : La lipolyse n'est plus régulée par le FGF21 au cours de l'obésité. 118
Figure 55 : Hypothèse proposée expliquant la régulation du flux d'AGL entre le TA et le foie suite à l'augmentation du tonus endocannabinoïde par le JZL195. 119
Figure 56 : Le traitement d'explants de TAV de rat par l'AEA en absence d'insuline conduit à une inhibition de la lipolyse. 120
Figure 57 : Régulation de la concentration intracellulaire en AMPc par différents stimuli. 121
Figure 58 : L'AEA diminue le pool intracellulaire d'AMPc stimulé par la forskoline en absence d'insuline dans des explants de TAV de rat. 122
Figure 59 : L'AEA augmente la phosphorylation d'Akt et diminue celle de la LHS en absence d'insuline dans des explants de TAV de rat. 122
Figure 60 : La production de glycérol n'est pas modifiée dans des explants de TAV de souris $CB1R^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages. 123
Figure 61 : La lipolyse est plus élevée chez des souris $CB1R^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages (WT). 124
Figure 62 : La production de glycérol est diminuée dans des explants de TAV de souris soumises à une injection de JZL195. 124

Figure 63 : La lipolyse basale et stimulée est diminuée dans des explants de TAV traités par le JZL195. 125
Figure 64 : La lipolyse au cours du temps est diminuée chez des souris traitées par le JZL195. 126
Figure 65 : La sécrétion d'adiponectine est stimulée dans des explants de TAV traités par l'AEA. 127
Figure 66 : Mécanisme d'action hypothétique des CB1R sur la lipolyse adipocytaire en situation de jeûne. 128
Figure 67 : Dose réponse à la noradrénaline d'explants de TAV ou TASC humain sur la production de glycérol. 129
Figure 68 : Dose réponse à l'insuline d'explants de TAV ou TASC humain sur la production de glycérol. 130
Figure 69 : L'AEA conduit à une dérégulation de la lipolyse dans le TAV et le TASC. 131
Figure 70 : Hypothèse concernant les effets de l'activation du SEC dans différentes situations nutritionnelles et physiopathologiques. 133
Figure 71 : Le blocage des récepteurs CB1R conduit à une augmentation de la lipolyse chez la souris obèse. 134
Figure 72 : Le Rimonabant ne modifie pas l'activité de l'Akt dans le TAV de souris. 135
Figure 73 : Le Rimonabant augmente la concentration intracellulaire en AMPc et contrecarre l'effet inhibiteur de l'AEA. 136
Figure 74 : Contenu intracellulaire en AMPc dans le TAV de souris traitées par le Rimonabant. 137
Figure 75 : Le traitement d'explants de TAV de rat obèse par le Rimonabant augmente le contenu intracellulaire en AMPc. 137
Figure 76 : Le blocage des récepteurs CB1R par le Rimonabant conduit à une stimulation de la lipolyse plus importante chez les souris obèses que chez les souris contrôles. 138
Figure 77 : Le blocage des CB1R par le Rimonabant diminue l'insulinémie de manière précoce chez les souris obèses. 139
Figure 78 : Le traitement d'explants de TAV de rat par le Rimonabant contrecarre l'effet inhibiteur de l'AEA. 140
Figure 79 : Hypothèse concernant les effets de l'inactivation du SEC au cours de l'obésité. 141
Figure 80 : Hypothèses générale concernant le rôle des CB1R du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme hépatique 144
Figure 81 : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC 154
Figure 82 : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC en présence d'une stimulation β-adrénergique 154
Figure 83 : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC après un jeûne de 24h 155
Figure 84 : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC après un jeûne de 6h 156
Figure 85 : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC au cours d'une charge en glucose 157
Figure 86 : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC au cours d'une charge en insuline 157
Figure 87 : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC 158
Figure 88 : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 3h après un jeûne de 6h 159
Figure 89 : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 3h après un jeûne de 6h 159
Figure 90 : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 3h après un jeûne de 24h 160
Figure 91 : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 6h après un jeûne de 6h 160
Figure 92 : Protocole expérimental d'inactivation du SEC par le Rimonabant ou l'AM6545 162
Figure 93 : Protocole expérimental d'inactivation du SEC chez la souris contrôle ou obèse 162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition centrale du syndrome métabolique selon la FID 16
Tableau 2 : Bilan des conséquences métaboliques et effets indésirables des études cliniques RIO 63
Tableau 3 : Programme de qPCR sur ADNc murin 168
Tableau 4 : Programme de qPCR sur ADNc humain 168
Tableau 5 : Séquences des amorces sens et anti-sens murines 169

Introduction

I. De l'obésité au diabète de type 2

A. Définition

Depuis la fin des années 1990, la prévalence de l'obésité dans le monde ne cesse d'augmenter et atteint désormais des proportions épidémiques. L'obésité, reconnue comme une pathologie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1848, est devenue un réel problème de santé publique tant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, chez les adultes comme chez les enfants. Selon l'OMS, l'obésité se définit comme « *une situation au cours de laquelle l'organisme accumule de manière anormale ou excessive de la graisse et pouvant être néfaste pour la santé* ». C'est une maladie du Tissu Adipeux (TA), le tissu responsable du stockage des réserves énergétiques de l'organisme sous forme de graisses.

Cependant, la répartition de cet excès de graisses dans l'organisme, les facteurs de risque de maladies chroniques et la morbidité qui lui sont associés varient d'un sujet à un autre (Vague, 1956). C'est pour cette raison que l'on parle, non pas d'une obésité mais des obésités :

- **L'obésité gynoïde**, se caractérisant par une augmentation de la masse grasse sous-cutanée localisée principalement dans la partie basse du corps (au niveau des hanches et des fesses), est associée à un faible risque de développer un diabète de type 2 (DT2) et un syndrome métabolique.
- **L'obésité androïde**, qui se caractérise par une accumulation de masse grasse principalement au niveau abdominal dans la partie haute du corps, est associée à un risque élevé de DT2 et de syndrome métabolique

Cette maladie est la conséquence de l'évolution des modes de vie avec une augmentation de la sédentarité et une modification des habitudes alimentaires tournée vers une plus grande consommation d'aliments riches en graisses (OMS, 2003). Elle résulte ainsi d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. La dépense énergétique est la résultante de trois composantes : le métabolisme basal ou dépense énergétique de repos qui représente environ 60% de la dépense énergétique totale, la thermogenèse postprandiale (10%) et l'activité physique (30%) dont la proportion peut varier d'un individu à l'autre.

Le surpoids et l'obésité sont estimés par l'Indice de Masse Corporelle (IMC) qui se calcule en divisant la masse corporelle (kg) par la taille élevée au carré (m^2). On parlera de surpoids si l'IMC est supérieur ou égal à 25, d'obésité pour un IMC supérieur ou égal à 30 et d'obésité morbide pour un IMC supérieur ou égal à 40 (OMS, 2003).

B. Prévalence

1) En France

En France, l'industrie pharmaceutique Roche lance en 1997, l'étude épidémiologique ObEpi menée en collaboration avec l'INSERM, l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et Kantar Health. Les derniers résultats de l'étude obtenus en 2012 auprès d'une cohorte de 27 131 individus âgés de 15 ans et plus, représentatif de la population française, montrent que 32,3% des français adultes sont en surpoids et 15% présentent une obésité. Le nombre de personnes obèses en 2012 était ainsi estimé à environ 6,9 millions, soit plus de 3 millions de personnes supplémentaires par rapport au début de l'étude en 1997. Cela représente une augmentation relative de 76%. En 2012, comme depuis 2003, cette prévalence est plus élevée chez les femmes avec 15,7% que chez les hommes avec 14,3% ($p<0,001$) (Roche, 2012).

En 2016, une étude basée sur 28 895 participants issus de la cohorte épidémiologique Constances lancée en 2013 et constituée d'un échantillon de 200 000 adultes âgés de 18 à 69 ans, suggère que la prévalence du surpoids était de 41,0% chez les hommes et 25,3% chez les femmes. Selon, l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), la prévalence de l'obésité globale était de 15,8% pour les hommes et de 15,6% pour les femmes (INVS, 2016). Néanmoins, la comparaison de données anthropométriques entre l'Etude Nationale Nutrition Santé (ENNS) de 2006 et l'Etude de SanTé sur l'Environnement, la Biosurveillance, l'Activité physique et la Nutrition (ESTEBAN) de 2015, indique une stabilité du surpoids (obésité incluse) à 49% et celle spécifique de l'obésité à 17% en moyenne chez les adultes en France (INVS, 2017).

2) Dans le monde

Selon les données de l'OMS, le nombre de cas d'obésité a plus que doublé entre 1980 et 2014. En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes âgés de plus de 18 ans étaient en surpoids dont plus de 600 millions d'obèses. En pourcentage, on estime à 39% le nombre d'adultes âgés de plus de 20 ans et plus atteints de surpoids et 13% atteints d'obésité (11% d'hommes et 15% de femmes). Enfin d'ici 2030, le nombre de personnes en surpoids devrait atteindre les 3,3 milliards.

C. Etiologie

L'épidémie d'obésité est le résultat d'un ensemble de facteurs qui sont à la fois, génétiques, comportementaux, environnementaux, démographiques, économiques et socio-culturels. L'ensemble de ces facteurs étant à l'origine d'un déséquilibre de la balance énergétique favorable à l'augmentation de la masse grasse.

1) Facteurs environnementaux et comportementaux

Parmi les causes fondamentales de l'obésité, les facteurs comportementaux et environnementaux jouent un rôle prépondérant et sont considérés comme les facteurs pouvant influencer le plus la prise de poids selon l'OMS. Le concept de « transition nutritionnelle » a été mis en avant par Popkin en 2004 pour exposer le lien entre l'évolution des modes de vie observée ces dernières décennies et l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans le monde (Popkin, 2004). Parmi les changements observés dans les comportements alimentaires, on assiste de manière générale à une augmentation de la densité énergétique des régimes au quotidien avec notamment une augmentation de la consommation de produits gras, sucrés et d'origine animale au détriment de la consommation de fibres (fruits et légumes) (Popkin, 2004, 2005). En parallèle, l'augmentation de la sédentarité et la baisse de l'activité physique au quotidien sont également associés à l'épidémie d'obésité (Hill and Melanson, 1999; Rising et al., 1994). En effet, la dépense énergétique nécessaire aux déplacements a vu sa part diminuer avec l'avancée technologique.

Bien que la contribution de la baisse de la dépense énergétique d'une part et de l'augmentation des apports énergétiques d'autre part soit difficile à quantifier, il en résulte un déséquilibre de la balance énergétique favorisant l'épidémie d'obésité.

2) Facteurs génétiques

La composante génétique apparait également être un facteur majeur dans le développement de l'obésité. En effet, plusieurs études ont mis en avant la susceptibilité génétique à l'obésité et au surpoids en réponse à l'environnement. Ainsi on distingue l'obésité monogénique et l'obésité commune.

La première mutation à avoir été décrite est celle observée chez la souris ob/ob déficiente pour le gène de la leptine. Chez l'Homme, les sujets atteints de cette mutation présentent une forme très sévère d'obésité (Montague et al., 1997) associée à une hyperphagie, un hypogonadisme, une puberté retardée, une augmentation des infections et un déficit immunitaire. Ces défauts sont corrigés par l'injection de leptine (Farooqi et al., 1999). En plus du récepteur à la leptine (Clément et al., 1998) , d'autres mutations ont ensuite été identifiées dans des familles présentant des cas d'obésité monogénique comme celle concernant le gène de la ProOpioMélanoCortine (POMC) précurseur de l'hormone mélanotrope (α-Melanocyte Stimulating Hormone, α-MSH), un peptide anorexigénique (Krude et al., 1998), celui de la proconvertase impliquée dans la conversion de la pro-insuline en insuline (Jackson et al., 1997) ou encore celui codant pour le récepteur hypothalamique aux mélanocortines (MelanoCortine 4 Receptor, MC4R) (Hinney et al., 1999). La mutation sur le gène codant pour MC4R représente la forme la plus fréquente d'obésité monogénique et pourrait être responsable de 1 à 6% des obésités sévères Ces formes d'obésité monogéniques étant très rares, certains individus sont néanmoins plus susceptibles de développer la pathologie dans un environnement similaire suggérant ainsi une prédisposition génétique et une interaction

gène-environnement. En effet, des études réalisées sur des populations indiennes Pimas suggèrent que cette ethnie présente une forte susceptibilité génétique à l'obésité qui ne s'exprime que lorsqu'elle est soumise à des conditions stimulantes, représentées par la sédentarité et une alimentation très énergétique (Ravussin et al., 1994). Ainsi, un individu présentant un fond génétique « favorable », dans un contexte de sédentarité et de mauvaises habitudes alimentaires, sera plus à risque de développer la pathologie.

Finalement, l'évolution des modes de vie avec une surconsommation alimentaire et une augmentation de la sédentarité, associée à un contexte génétique « à risque » ont pour conséquence le développement de l'obésité et du surpoids. C'est pourquoi, l'obésité commune est considérée comme une maladie dite multifactorielle puisqu'elle dépend à la fois d'une composante environnementale majeure et d'une composante génétique mineure.

D. Obésité, insulinorésistance et diabète de type 2

1) Obésité et syndrome métabolique

L'obésité, en affectant directement ou indirectement un nombre important d'organes, constitue un facteur de risque majeur d'un grand nombre de maladies chroniques comme la stéatose hépatique non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), le DT2, les maladies cardio-vasculaires, les problèmes respiratoires, des complications ostéo-articulaires, ou encore certains cancers (OMS, 2003).

L'obésité est intimement associée au syndrome métabolique qui se définit comme un ensemble de dérégulations métaboliques et vasculaires prédisposant les sujets au DT2 et a des maladies cardiovasculaires. D'après la Fédération Internationale du Diabète (FID), l'obésité centrale est un critère prérequis qui doit être associé à au moins deux autres critères (**Tableau 1**) pour affirmer un syndrome métabolique (Alberti et al., 2005).

***Tableau 1** : Définition centrale du syndrome métabolique selon la FID*
(Alberti et al., 2005)

Présence d'obésité centrale (circonférence de la taille) : 94 cm (hommes) et 80 cm (femmes) (population caucasienne) et deux des paramètres parmi les suivants :	
Paramètres	**Critères**
Triglycérides élevés	> 1,7 mmol/L Ou traitement spécifique pour cette anormalité lipidique
Cholestérol HDL diminué	<0,9 mmol/L chez les hommes <1,1 mmol/L chez les femmes Ou traitement spécifique pour cette anormalité lipidique
Glycémie à jeun élevée	>5,6 mmol/L, Ou diabète de type 2 diagnostiqué précédemment
Hypertension	>130 mmHg (systolique) >85 mmHg (diastolique) Ou traitement médicamenteux pour l'hypertension

Le terme de «diabésité» est aujourd'hui utilisé pour définir l'augmentation de la prévalence du diabète au regard de celle de l'obésité.

2) *Obésité et diabètes*

D'une manière générale, le diabète se définit comme une élévation anormale de la glycémie dans le sang. On parle d'hyperglycémie chronique.

D'après la 7ème édition de l'Atlas du diabète de la FID, le diabète touche actuellement près de 415 millions de personnes dans le monde et d'ici 2040, ce chiffre devrait atteindre les 642 millions (FID, 2015) (**Figure 1**).

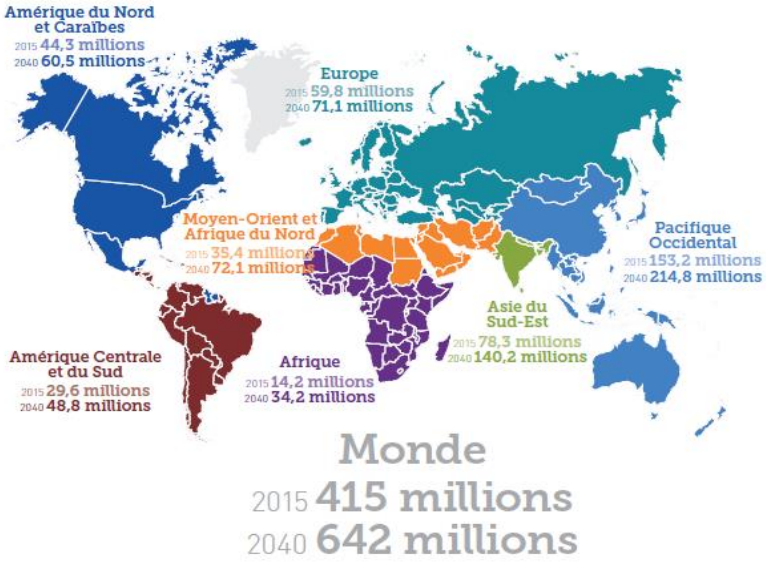


***Figure 1** : Estimations du diabète dans le monde en 2015 et 2040 (20-79 ans) selon la FID*
D'après la 7ème édition de l'Atlas du diabète de la FID

En France, d'après l'INVS, en 2015, le nombre de patients diabétiques sous traitement pharmacologique a été estimé à 3,3 millions avec environ 92 % de diabétiques de type 2. A ce chiffre s'ajoute également, les diabétiques non diagnostiqués et non traités (INVS, 2009).

La pathologie du diabète en regroupe deux principaux types : le type 1 et le type 2 anciennement dit insulinodépendant et non insulinodépendant respectivement. Le diabète de type 1, considéré comme une maladie auto-immune, est la forme la moins courante de la pathologie puisqu'elle représente moins de 10% des cas de diabète (Scully, 2012). Il est causé par une destruction des cellules β du pancréas, sécrétrices d'insuline notamment par les lymphocytes T. Il en résulte un état de déficience de sécrétion d'insuline. Le DT2, qui comptabilise plus de 90% des cas de diabète (Scully, 2012), est la forme la plus fréquente de la pathologie. Cette pathologie présente une composante génétique mais est également fortement influencée par des facteurs environnementaux comme l'âge, l'obésité, l'alimentation, l'activité sportive et la grossesse.

3) Etiologie du diabète de type 2

Le DT2 est associé à un certain nombre de dérégulations métaboliques telles qu'un défaut de sécrétion d'insuline (ou insulinopénie), un défaut d'action de l'hormone sur ses tissus cibles (ou insulinorésistance) qui s'accompagne également d'une augmentation de la production hépatique du glucose. L'ensemble participe à l'installation d'une hyperglycémie chronique. Le DT2 est ainsi défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L soit 7 mM. Il se caractérise par une détérioration progressive de la tolérance au glucose, c'est-à-dire la capacité des tissus à utiliser le glucose, en passant d'une tolérance au glucose dite « normale » à une tolérance au glucose dite « altérée ». De plus, il est également associé à une augmentation des concentrations d'Acides Gras Libres (AGL) et de TriGlycérides (TG) plasmatiques. Cependant, la chronologie de ces différents évènements ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique mais il semblerait que la phase finale commune responsable du développement du DT2 soit une défaillance des cellules β du pancréas à compenser la résistance à l'insuline (Kahn, 1998).

4) Rappels sur le rôle de l'insuline dans la régulation de la glycémie

a. L'insuline et sa sécrétion

L'insuline est une hormone qui joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique. Elle est produite au sein des cellules β du pancréas et est stockée sous forme de microcristaux co-précipités avec du zinc dans des vésicules de sécrétion (Steiner et al., 2009) pendant plusieurs jours. La libération d'insuline par les vésicules de sécrétion se fait par un mécanisme d'exocytose après translocation des vésicules du cytoplasme vers la membrane et fusion des membranes de la vésicule avec la membrane plasmique.

Lorsque la glycémie augmente, le glucose pénètre dans la cellule β par le transporteur de glucose GLUT2. Ce glucose est alors phosphorylé en glucose-6-phosphate et entre dans la voie de la glycolyse pour être métabolisé en pyruvate puis utilisé comme substrat par la mitochondrie pour la respiration oxydative. Le métabolisme du glucose va alors générer des composés indispensables à l'exocytose des granules de sécrétion. L'Adénosine TriPhosphate (ATP) produit va permettre la fermeture des canaux potassiques et l'induction d'une dépolarisation membranaire à l'origine de l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants aboutissant à l'entrée massive de calcium dans la cellule responsable de l'exocytose des granules de sécrétion (Magnan and Ktorza, 2005) (**Figure 2**)

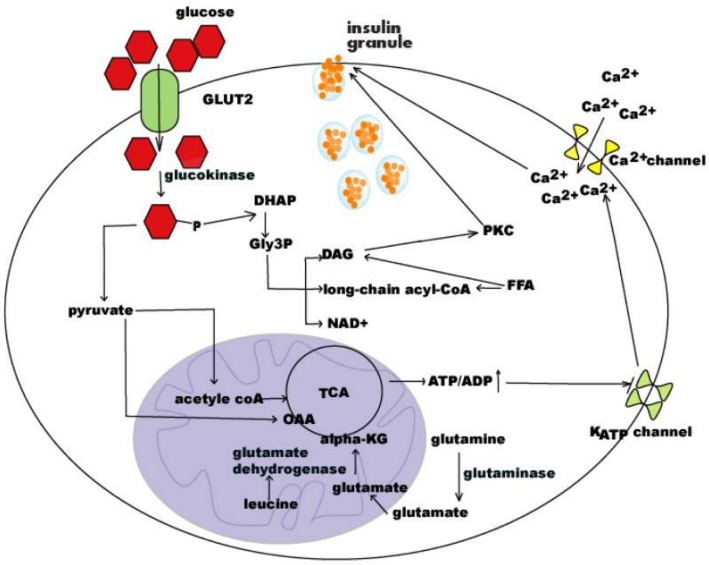


Figure 2 : ***Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose***.

Le glucose qui pénètre dans la cellule β par le transporteur spécifique GLUT2 est phosphorylé en glucose-6-phosphate puis utilisé par le voie de la glycolyse et de la respiration oxydative pour générer de l'ATP à l'origine de la fermeture des canaux potassiques et d'une dépolarisation membranaire nécessaire à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants aboutissant à l'augmentation massive de la concentration cytosolique en calcium responsable de l'exocytose des granules de sécrétion (Fu et al., 2013).

Cette sécrétion d'insuline est qualifiée de biphasique avec un premier pic de sécrétion appelé pic précoce qui a lieu très rapidement en réponse au glucose, soit 1 à 2 min après son entrée dans la cellule et qui dure quelques minutes seulement (**Figure 3**). Elle correspond à la sécrétion aigüe d'insuline stockée dans les vésicules de sécrétion et ne dépend pas du niveau d'hyperglycémie (Pfeifer et al., 1981). Le rôle de ce pic serait de sensibiliser les tissus à l'action de l'hormone. Cette première phase est suivie d'un pic de sécrétion tardif qui intervient 10 min après la stimulation, qui se maintient jusqu'à l'arrêt de la stimulation et qui est proportionnelle à la concentration en glucose plasmatique. Cette phase se caractérise par la sécrétion d'insuline nouvellement synthétisée de façon progressive et moins intense que la première phase (Pfeifer et al., 1981). Chez les sujets diabétiques, la première phase de sécrétion d'insuline disparait et la seconde phase est atténuée et retardée (Pfeifer et al., 1981).

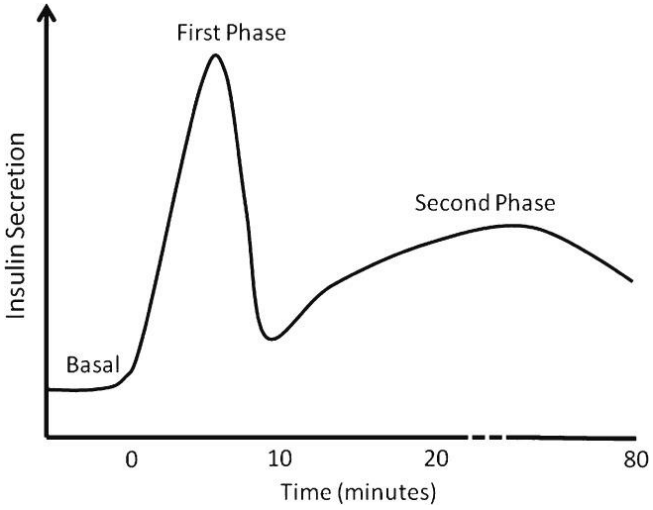


Figure 3 *: Sécrétion biphasique de l'insuline*

La production basale d'insuline est faible. En réponse à l'hyperglycémie, la sécrétion d'insuline est rapide et importante entrainant un premier pic de sécrétion ou phase précoce. Cette phase précoce est suivie d'une chute de la sécrétion en restant à un niveau supérieur à la production basale et qui se maintient de manière prolongée jusqu'à l'arrêt de la stimulation (phase tardive) (Meloni et al., 2013)

b. *Rôle de l'insuline sur ses tissus cibles*

L'insuline est une hormone anabolique qui présente des effets pléiotropes (**Figure 4**).

D'une part, elle va jouer un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme énergétique à la fois au niveau lipidique et glucidique en favorisant le stockage des nutriments principalement dans le foie, le muscle et le TA (Capeau, 2003).

Sur le métabolisme glucidique, l'insuline va être à l'origine d'une augmentation du captage du glucose par le transporteur GLUT4 et une augmentation de la glycolyse (en augmentant l'activité des enzymes hexokinase et 6-phosphofructokinase) au niveau musculaire et adipocytaire. De plus, elle stimule la synthèse de glycogène et inhibe la glycogénolyse au niveau hépatique et musculaire. Enfin, dans le foie, l'insuline inhibe également la néoglucogenèse (Dimitriadis et al., 2011). L'ensemble de ces effets étant favorable à un stockage du glucose sous forme de glycogène.

Au niveau lipidique, l'insuline va inhiber la lipolyse adipocytaire, stimuler la lipogenèse dans les trois tissus, diminuer la production de lipoprotéines de très faible densité ou VLDL par le foie, augmenter le captage des TG plasmatiques au niveau musculaire et adipocytaire et enfin diminuer la β-oxydation au niveau musculaire et hépatique (Vergès, 2015).

Enfin, l'insuline va jouer un rôle sur le métabolisme protéique en favorisant la synthèse et en inhibant la dégradation au niveau musculaire mais également sur l'apoptose en l'inhibant et sur la synthèse d'ADN en la stimulant (Dimitriadis et al., 2011).

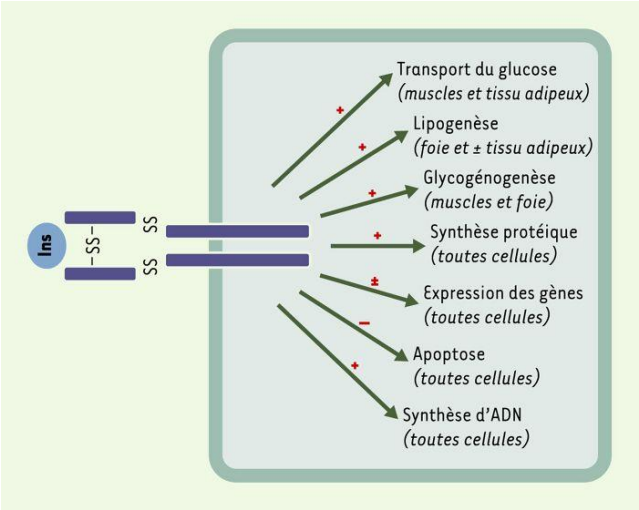


***Figure 4**: Effets pléiotropes de l'insuline*
(Capeau, 2003)

c. Voies de signalisation de l'insuline

Il existe plusieurs voies de signalisation de l'insuline (**Figure 5**) mais toutes ces voies ont en commun le récepteur à l'insuline et les substrats du récepteur à l'insuline (Insulin Receptor Substrate, IRS). La fixation de l'insuline sur son récepteur au niveau des sous-unités α extracellulaires va conduire à un changement de conformation du récepteur et à un rapprochement des sous-unités β intracellulaires. La trans-phosphorylation des résidus tyrosines d'une chaîne β à l'autre aboutit à l'activation du domaine tyrosine kinase de la chaîne. Ce domaine, une fois activé, va alors phosphoryler d'autres résidus tyrosines de la chaîne β entrainant l'autophosphorylation complète du récepteur ainsi que la phosphorylation des protéines IRS. Ces protéines vont ensuite relayer le signal dans différentes voies de signalisation dont les principales sont celles initiées par l'activation de la Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI3K) couplée à la Protéine Kinase B (PKB ou Akt) et celle initiée par l'activation de la protéine Ras couplées aux kinases MAP (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK). D'une manière générale, la voie PI3K/Akt va relayer les effets métaboliques de l'hormone tels que la synthèse protéique, la synthèse de glycogène, le transport du glucose, la lipolyse, la transcription de gènes impliqués dans les voies de la lipogenèse et de la néoglucogenèse alors que la voie Ras/MAPK participe aux effets mitogéniques de l'hormone en favorisant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire. Cependant, ces deux voies de signalisation sont interconnectées entre elles et peuvent s'activer mutuellement (Capeau, 2003; Saltiel and Kahn, 2001). Enfin, la signalisation insulinique se termine par une internalisation du complexe récepteur/insuline par endocytose. Cette internalisation a pour objectif de diminuer le signal insulinique et la réponse des cellules à l'hormone. Suite à l'internalisation du complexe, l'insuline se dissocie du récepteur pour être dégradée par le lysosome. Le récepteur, quant à lui, est soit dégradé, soit recyclé à la membrane. Puisque le récepteur à l'insuline conserve son activité tyrosine kinase une fois dissocié de l'insuline, une déphosphorylation des résidus tyrosines de la sous-unité β est réalisée par des tyrosines phosphatases afin d'atténuer le signal insulinique (Guglielmo et al., 1998). De plus, le récepteur est soumis à des phosphorylations inhibitrices par des sérines kinases telles que mTOR, p70S6 kinase ou encore PKCzeta, activées par la signalisation insulinique elle-même, qui vont également participer à la terminaison du signal insulinique (Tanti and Jager, 2009)

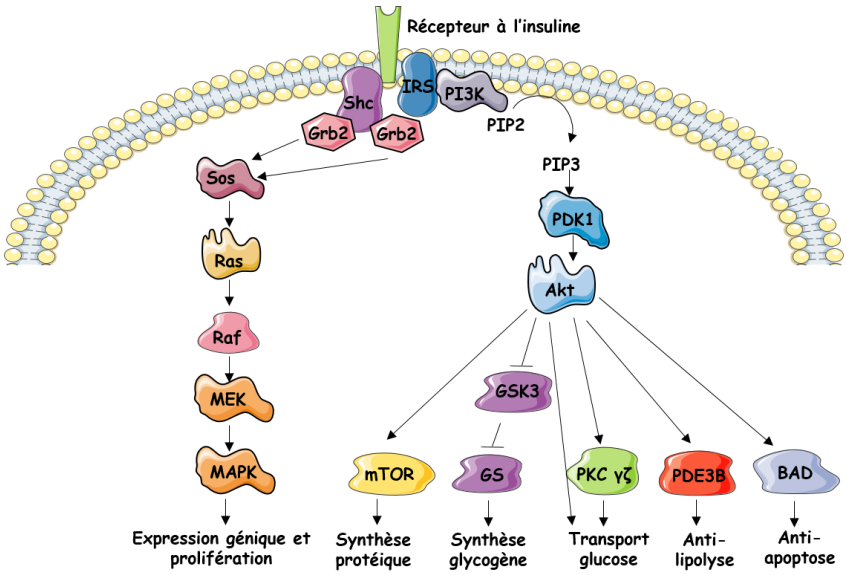


***Figure 5*: Principales voies de signalisation activées par l'insuline**

La fixation de l'insuline sur son récepteur conduit à l'activation des protéines substrats IRS qui vont relayer le signal par l'intermédiaire de deux grandes voies de signalisation : la voie PI3K/Akt (côté droit sur le schéma) à l'origine d'un ensemble d'effets métaboliques tels que la synthèse protéique, la synthèse de glycogène, le transport de glucose, l'inhibition de la lipolyse, l'inhibition de l'apoptose et la voie des MAPK (côté gauche sur le schéma) impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire

(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical Art)

Adapté de (Capeau, 2003)

5) De l'insulinorésistance au diabète de type 2

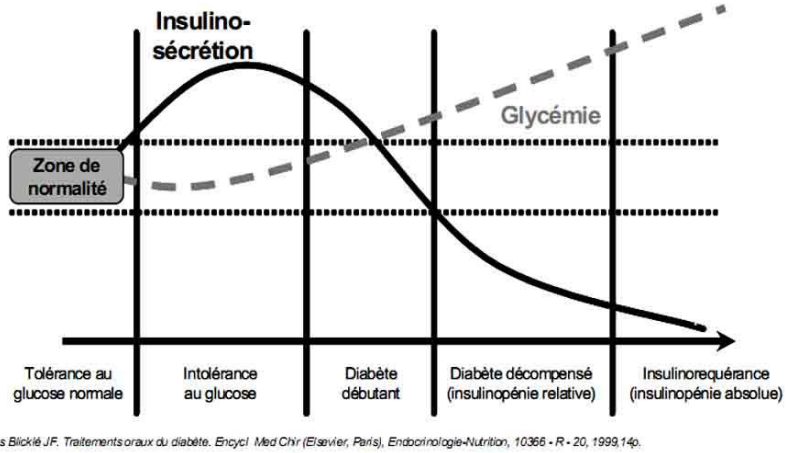
La surcharge pondérale et plus particulièrement l'expansion du TA viscéral apparait comme un facteur majeur dans le développement de la résistance à l'insuline. En effet, la majorité des individus insulinorésistants sont en surpoids ou obèses (Mokdad et al., 2000). De plus, chez 75 à 80 % des patients, le DT2 est précédé d'une résistance à l'insuline, d'une hyperinsulinémie, d'une dyslipidémie et d'une obésité (Leibowitz et al., 2007).

L'insulinorésistance se définit comme une baisse de sensibilité générale des tissus à l'action de l'insuline due à une altération de la voie de signalisation insulinique. Elle se traduit par l'incapacité des tissus cibles à utiliser convenablement les substrats énergétiques (acides gras et glucose). En effet, on assiste à la fois à une altération du métabolisme glucidique avec une diminution de transport et de l'utilisation du glucose dans le muscle et le foie, une augmentation de la néoglucogenèse dans le foie et à une altération du métabolisme lipidique qui se traduit par une diminution du stockage lipidique, du transport du glucose et de la lipogenèse *de novo* ainsi qu'une augmentation de la lipolyse dans le TA et une altération du métabolisme des lipoprotéines dans le foie.

Si le pancréas va jouer un rôle majeur dans le maintien d'une tolérance au glucose, on assiste à terme à l'incapacité de ce tissu à pallier à l'insulinorésistance qui se traduit alors par une intolérance au glucose et au développement du DT2. Selon Weir GC. *et al.*, la pathologie progresse en 5 grandes étapes au cours desquelles on assiste progressivement à un dysfonctionnement des cellules β du pancréas (**Figure 6**) :

- La première étape se caractérise par un phénomène de **compensation de la résistance à l'insuline**. Au cours de cette phase, la sécrétion d'insuline est augmentée en vue de contrer la résistance à l'insuline et de maintenir une glycémie normale. Cette phase est caractérisée par un maintien de la masse des cellules β ainsi qu'un maintien de la capacité de sécrétion aigüe d'insuline.
- La deuxième étape est une **phase stable dite d'adaptation des cellules β pancréatiques** au cours de laquelle on observe une diminution de la masse des cellules β ainsi qu'une perte de fonction des cellules soit une diminution de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose ainsi qu'une perte de la capacité de dédifférenciation. A ce stade, les cellules ne sont plus capables de compenser l'insulinorésistance, d'où l'observation d'une augmentation de la glycémie (5,0-6,5 mmol/L).
- La phase 3 est **une phase de transition instable** au cours de laquelle on observe un phénomène de décompensation précoce. Durant cette phase, les cellules β, présentes en quantité limitée, ne sont plus capables de maintenir une glycémie dans un état pré-diabétique. On observe ainsi une augmentation rapide de la glycémie (7,3 mmol/L).
- Cette **décompensation se stabilise** ensuite au cours de la phase 4 où la glucotoxicité conduit à une perte de masse sévère des cellules β qui peut atteindre 50% due à une dédifférenciation des cellules β. Ceci conduit donc à une diminution de la sécrétion d'insuline qui reste tout de même suffisante pour limiter l'acidocétose due à l'accumulation de corps cétoniques.
- Enfin, durant la phase 5, la perte massive des cellules β ne permet plus de contenir **l'acidocétose** puisque la production d'insuline est fortement altérée. Durant cette étape la glycémie peut atteindre 3,5 g/L

Cet état de résistance à l'insuline apparaîtrait 10 à 20 ans avant le début de la pathologie et représente donc un bon marqueur prédictif de la maladie (Shulman, 2000). On parle souvent d'état pré-diabétique.



D'après Blickié JF. Traitements oraux du diabète. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Endocrinologie-Nutrition, 10366 - R - 20, 1999,14p.

***Figure 6** : Histoire naturelle du diabète de type 2 : du pré-diabète au diabète (CEEDMM, 2010)*

6) ***Insulinorésistance : la conséquence d'un dysfonctionnement du tissu adipeux ?***

Le TA joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie énergétique en assurant un équilibre entre le stockage et le déstockage de l'énergie qu'il contient. L'insuline est un régulateur important de cet équilibre puisqu'elle favorise, en période postprandiale, le stockage sous forme de TG et limite le relargage de ces AGL au niveau systémique en freinant la lipolyse.

Cependant, au cours de l'obésité et notamment suite à un stress métabolique important induit par un apport alimentaire excessif, on assiste à une hypertrophie du TA qui s'accompagne d'une induction de différents stress cellulaires tels que le stress du Réticulum Endoplasmique (RE), l'hypoxie, le stress oxydant ainsi que d'une inflammation conduisant à terme à la dysfonction du TA. Il en résulte un déséquilibre de l'homéostasie du TA caractérisé entre autres par une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une altération de la voie de signalisation insulinique qui conduit à une dérégulation de la lipolyse adipocytaire et à une libération accrue d'AGL (McQuaid et al., 2011).

Or, il est maintenant bien décrit que le dysfonctionnement de la lipolyse adipocytaire joue un rôle majeur dans la mise en place de la résistance à l'insuline périphérique *via* des dépôts ectopiques de lipides et l'induction d'une lipotoxicité dans des organes périphériques tels que le foie, le muscle et le pancréas (Boden, 1997; Cusi, 2010; Shulman, 2000). Cette hypothèse est renforcée par les travaux récents de Girousse *et al*. qui montrent que l'inhibition partielle de la lipolyse par des approches génétiques ou pharmacologiques conduit à une diminution des dépôts ectopiques de lipides dans les organes périphériques et s'accompagne d'une meilleure tolérance au glucose et d'une meilleure sensibilité à l'insuline (Girousse et al., 2013).

II. Le tissu adipeux blanc : de la physiologie à la pathologie

Chez les mammifères, il existe deux grands types de TA : le TA blanc et le TA brun dont les fonctions métaboliques sont différentes. Le TA brun est principalement impliqué dans la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, la thermogenèse.

Le TA blanc, quant à lui, représente le principal réservoir d'énergie de l'organisme du fait de sa capacité à stocker de grandes quantités de TG. D'autre part, il est également capable de restituer cette énergie en cas de besoin *via* la lipolyse adipocytaire (**Figure 7**). Ce tissu peut représenter 15 à 25% du poids corporel chez une personne considérée comme "mince" et peut s'élever jusqu'à 50% dans des cas d'obésité morbide. Longtemps considéré comme un simple réservoir d'énergie, cet organe a également la capacité de synthétiser et de sécréter des hormones et cytokines appelés adipokines pouvant agir de façons autocrine et endocrine (Ailhaud, 2000).

Enfin, un troisième type de TA a été décrit plus récemment. Il se caractérise par la présence, à la fois d'adipocytes blancs et d'adipocytes bruns à forte activité thermogénique (Wu et al., 2012). Ces derniers ne dérivent pas des mêmes précurseurs que les adipocytes bruns classiques mais de précurseurs adipogéniques comme les adipocytes blancs, c'est pourquoi ils sont appelés adipocytes « beiges » ou «brites». Ces cellules émergent au sein du TA blanc dans certaines conditions (exposition au froid ou aux catécholamines) et favorisent la dépense énergétique ; c'est le phénomène de brunissement du TA blanc ou « beigeing ».

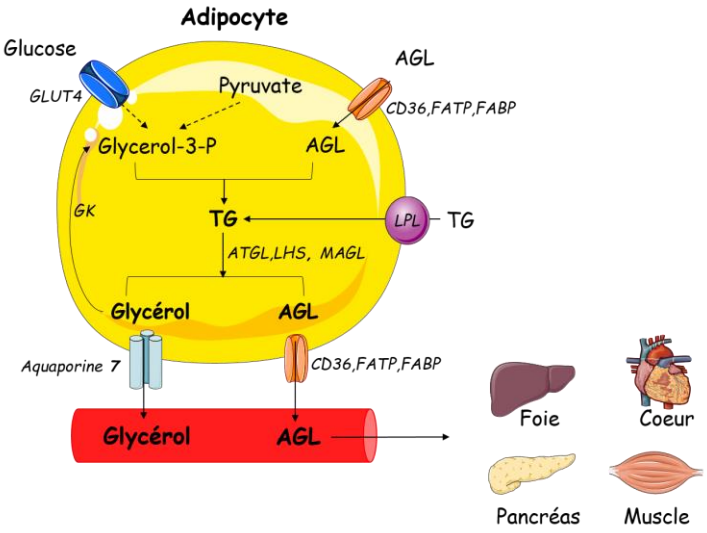


***Figure 7**: Schéma général du métabolisme adipocytaire et devenir du glycérol et des AGL*
(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical Art)
D'après (Rodríguez et al., 2006)

A. Le tissu adipeux blanc, un tissu hétérogène

Le TA blanc est un type particulier de tissu conjonctif lâche dans lequel les cellules adipeuses, appelées adipocytes, sont tassées les unes contre les autres. Ces amas de cellules sont séparés par des espaces dans lesquels se trouve un tissu présentant une grande hétérogénéité cellulaire : la Fraction Stroma-Vasculaire (FSV).

1) Les adipocytes blancs

Les adipocytes blancs se caractérisent par une grande et unique vacuole remplie de lipides (graisse uniloculaire) entrainant un refoulement du noyau vers la périphérie, un cytoplasme réduit et un nombre limité de mitochondries. Ces adipocytes se caractérisent par une grande plasticité du fait de la présence de cette vacuole pouvant représenter 95% du volume cytoplasmique.

Ce tissu joue un rôle de réservoir en accumulant l'énergie en excès de l'organisme sous forme de graisses. Les adipocytes présentent une capacité d'extensibilité importante. Un adipocyte blanc peut atteindre une taille de 100-150 µm. Ainsi, ce tissu a la particularité de pouvoir s'adapter aux apports et besoins de l'organisme en énergie.

2) La fraction stroma-vasculaire

En plus des adipocytes, qui représentent environ 50 à 75% de la totalité des cellules du tissu, on distingue également d'autres types cellulaires contenus dans la FSV (**Figure 8**). Cette fraction est composée d'un grand nombre de cellules progénitrices et notamment des cellules souches mésenchymateuses multipotentes (Rodriguez et al., 2005) qui vont devenir les futurs pré-adipocytes et adipocytes matures (Prunet-Marcassus et al., 2006). De plus, on retrouve également dans cette fraction, des cellules hématopoïétiques telles que des monocytes/macrophages et lymphocytes T, ces derniers représentant environ 30% des cellules de la FSV (Prunet-Marcassus et al., 2006). On trouve également des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des fibrilles de collagène.

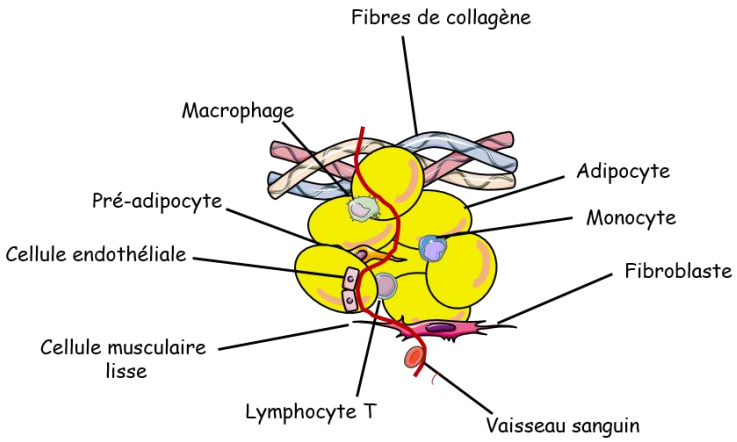


***Figure 8**: Hétérogénéité cellulaire du tissu adipeux.*
(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical Art)

B. La lipolyse adipocytaire

La lipolyse est le processus physiologique permettant la libération d'AGL dans la circulation sanguine à partir des réserves en TG contenus dans l'adipocyte. Au cours de la lipolyse, les TG sont hydrolysés successivement en DiAcylGlycérols (DAG) puis en MonoAcylGlycérols (MAG) pour libérer au final trois molécules d'AGL et une molécule de glycérol (**Figure 9**).

1) Hydrolyse des triglycérides par les lipases

La Lipase Hormono Sensible (LHS) a longtemps été considérée comme l'enzyme limitante de la lipolyse. Cependant, l'invalidation génétique de cette lipase a révélé une activité lipolytique basale résiduelle suggérant ainsi la présence et l'intervention de lipases additionnelles (Jenkins et al., 2004; Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004). Ainsi, des études ont mis en évidence l'implication de l'Adipose TriGlycéride Lipase (ATGL) qui serait responsable de 75% de l'hydrolyse des acylglycérols chez des souris déficientes en LHS (Zimmermann et al., 2004). La contribution de ces enzymes aux différentes étapes de l'hydrolyse des TG a ensuite été étudiée au cours de différents travaux. Alors que la LHS est impliquée à la fois dans l'hydrolyse des TG et des DAG avec une activité DAG hydrolase plus importante (Haemmerle et al., 2002a), l'ATGL quant à elle, est majoritairement responsable de l'hydrolyse des TG (Bezaire et al., 2009) (**Figure 9**). D'après Schweiger *et al*., la LHS et l'ATGL seraient responsables de 90% de la lipolyse adipocytaire (Schweiger et al., 2006). De plus, alors que la LHS serait principalement responsable de la lipolyse stimulée par les catécholamines, l'ATGL participerait principalement à l'hydrolyse des TG durant la lipolyse basale (Langin et al., 2005; Large et al., 1999).

Enfin, la dernière étape qui consiste en l'hydrolyse des MAG en AGL et glycérol est réalisée par la MonoAcylGlycérol Lipase (MAGL) (Taschler et al., 2011) (**Figure 9**).

L'accès des lipases aux TG contenus dans la gouttelette lipidique est régulée par des protéines appelées périlipines qui recouvrent la gouttelette lipidique et qui sont activées par phosphorylation par les kinases PKA et PKG (Langin, 2006a).

***Figure 9**: Etapes de l'hydrolyse des TG au cours de la lipolyse*
Adapté de (Nielsen et al., 2014)

a. L'Adipose Triglycéride Lipase ou ATGL

L'ATGL, encore appelée desnutrine ou PLA2ξ est majoritairement exprimée dans le TA blanc et brun. Son activité enzymatique est principalement régulée par des co-régulateurs. Parmi eux, le CGI-58 (Comparative Gene Identification-58) encore appelé ABDH5, contenant un domaine α/β hydrolase, est un régulateur important de la lipase puisqu'il permet son activation *via* une interaction directe avec le domaine patatine en N-terminal de l'ATGL. Ainsi, en situation basale, les périlipines-1 interagissent avec le CGI-58 limitant sa liaison avec le domaine patatine de l'ATGL. Suite à une stimulation, la phosphorylation de la périlipine-1 par les protéines kinases conduit au relargage du CGI-58 et par conséquent à la libération de la lipase qui pourra avoir accès à la gouttelette lipidique (Lass et al., 2006). De plus, un régulateur négatif de l'ATGL a récemment été mis en évidence : la protéine G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2) qui interagit également avec le domaine patatine de l'ATGL (Yang et al., 2010). Ce co-répresseur agit de manière non compétitive avec le CGI-58 mais avec une capacité d'inhibition de l'ATGL qui est dominante sur l'activation de la lipase par le co-activateur (Lu et al., 2010). Le niveau protéique de G0S2 dans le TA est régulé positivement par l'insuline et négativement par des agonistes β-adrénergiques (Yang et al., 2010). De plus, l'induction de la translocation de l'ATGL à la gouttelette lipidique par un agoniste β-adrénergique se traduit également par la translocation de la protéine G0S2 suggérant une interaction constitutive du co-répresseur avec la lipase (Yang et al., 2010).

D'autre part, une régulation transcriptionnelle du gène par différents facteurs a été mise en évidence par plusieurs travaux. Ainsi, le gène de l'ATGL est régulé positivement par les glucocorticoïdes et le jeûne (Nielsen et al., 2011; Villena et al., 2004) alors qu'il est régulé négativement par l'insuline, la prise alimentaire et par l'activation de la voie p42/44 MAPK induite par le facteur de nécrose tumorale α (Tumor Necrosis Factor α, TNFα) (Kim et al., 2006).

L'utilisation du modèle de souris invalidées pour le gène de l'ATGL a permis de mettre en évidence l'importance de cette enzyme dans la voie de la lipolyse. En effet, l'absence du gène de l'ATGL est associée

à une diminution de la lipolyse basale et stimulée à l'origine d'une augmentation des dépôts de graisses dans le TA mais également dans des organes périphériques tels que le foie, le muscle, le cœur favorisant l'obésité et les complications cardio-métaboliques (Haemmerle et al., 2006). Ainsi, une augmentation de l'utilisation des glucides est observée chez ces souris. En accord avec ces observations, une meilleure tolérance au glucose associée à une meilleure sensibilité à l'insuline a été rapportée malgré un défaut de sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques de ces animaux (Peyot et al., 2009). En effet, l'accumulation des lipides neutres protègerait les tissus d'une altération de la voie de signalisation insulinique médiée principalement par les dérivés lipidiques tels que les AGL ou les DAG. Ainsi, l'ATGL, en plus d'être l'enzyme limitante de l'hydrolyse des TG, joue un rôle majeur dans l'homéostasie glucido-lipidique de tous les tissus périphériques.

b. La Lipase Hormono Sensible ou LHS

L'activité catalytique de la LHS est régulée directement et rapidement par des phosphorylations réalisées par la Protéine Kinase A (PKA) ou G (PKG) suite à une stimulation adrénergique. Les principaux sites de phosphorylation activant la lipase sont les sérines S563, S659 et S660 chez le rat et les résidus S552, S649 et S650 chez l'Homme. La phosphorylation du résidu S563 (S552) favoriserait la translocation de la lipase du cytosol vers la gouttelette lipidique alors que la phosphorylation des deux autres résidus est nécessaire pour l'induction de l'activité enzymatique.

A l'inverse, une phosphorylation sur le résidu sérine S565 (554 chez l'homme) par l'AMPK est responsable de l'inhibition de la LHS par compétition allostérique avec le résidu adjacent S563 (S552 chez l'homme) (Daval et al., 2005).

Pour exercer pleinement son action, la LHS doit avoir accès à la gouttelette lipidique et interagir avec le domaine N-ter de la perilipine-1 pour permettre l'hydrolyse des DAG (Nielsen et al., 2014).

L'efficacité catalytique de l'enzyme est également dépendante d'un autre facteur, la protéine FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4) qui s'associe à la LHS phosphorylée formant ainsi un complexe transloquant du cytosol à la surface de la gouttelette lipidique et permettant le transport des AGL libérés par la lipase en dehors de l'adipocyte (Smith et al., 2007).

Contrairement aux observations faites sur le modèle de souris déficientes pour l'ATGL, l'invalidation génétique de la LHS n'est pas associée à une accumulation de TG dans le TA et les organes périphériques mais plutôt à une accumulation de DG (Haemmerle et al., 2002a). De plus, bien que la mobilisation des graisses par le jeûne ou par une stimulation β-adrénergique soit également altérée (Haemmerle et al., 2002b; Mulder et al., 2003), ces souris sont résistantes à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Harada et al., 2003). En effet, ces animaux présentent une diminution de la masse du TA blanc et une augmentation du TA brun à la fois sous régime standard ou hyperlipidique. En accord avec ces résultats, une augmentation

de la température corporelle et de la dépense énergétique a été observée (Harada et al., 2003). En parallèle d'une diminution du stockage des graisses dans le TA blanc, une altération du métabolisme adipocytaire est observée chez ces animaux avec une diminution de la différenciation adipocytaire et de la capacité lipogénique (Harada et al., 2003). La diminution de la production de ligands, *via* la lipolyse adipocytaire, nécessaire à l'activation des facteurs de transcription PPARγ, pourrait être à l'origine de l'altération de l'adipogenèse. De plus, une altération de la fonction endocrine des adipocytes a été rapportée par les travaux d'Harada *et al.* avec notamment une diminution de l'expression de l'adiponectine, de la leptine, de la résistine et une augmentation du TNFα (Harada et al., 2003). Ces défauts pouvant être responsables de l'altération de la sensibilité à l'insuline observée par plusieurs équipes (Harada et al., 2003; Mulder et al., 2003). Néanmoins, la déficience partielle de cette lipase ($HSL^{+/-}$) chez des souris soumises à un régime hyperlipidique, bien qu'elle soit associée à une diminution de la lipolyse basale et stimulée, se caractérise par un maintien de la masse du TA, de la morphologie des adipocytes, de la différenciation adipocytaire et d'une meilleure sensibilité à l'insuline. (Girousse et al., 2013). En effet, une modification du flux d'acides gras a été observée par les auteurs, qui suggèrent, qu'en réponse à la diminution de la lipolyse adipocytaire, on assiste à une diminution du captage des AG et à une augmentation du captage du glucose favorisant la lipogenèse *de novo* et permettant ainsi une amélioration du métabolisme glucidique et une restauration de la sensibilité à l'insuline.

Dans l'ensemble, ces travaux suggèrent qu'une diminution de l'activité DG hydrolase permet l'amélioration de complications métaboliques associées à l'obésité.

c. La MonoAcyl Glycerol Lipase ou MAGL

La MAGL, qui catalyse la dernière étape d'hydrolyse des TG, est ubiquitaire mais avec un niveau d'expression supérieur dans le TA (Taschler et al., 2011). Cette lipase est localisée à la fois dans le cytoplasme, dans la membrane plasmique et sur la gouttelette lipidique. A ce jour, il existe peu de données concernant la régulation de cette enzyme par des hormones suggérant que cette enzyme est constitutionnellement active. Une étude suggère néanmoins une régulation positive de l'ARNm de cette lipase par les agonistes PPARγ (Festuccia et al., 2006).

En comparaison avec des animaux déficients pour l'ATGL ou la LHS, des animaux déficients pour la MAGL présentent une altération de la lipolyse qui reste modérée. Ces animaux accumulent des MG dans le TA, le foie et le cerveau et sont résistants à l'intolérance au glucose et à l'insulinorésistance induites par un régime hyperlipidique bien que la prise de poids soit similaire à celle des animaux contrôles suggérant ainsi qu'une diminution modérée du flux d'AGL est suffisante pour améliorer la résistance à l'insuline (Taschler et al., 2011).

2) Devenir des AGL et du glycérol

L'hydrolyse des TG va aboutir à la libération d'AGL et de glycérol dans la circulation sanguine. Cet efflux s'effectue en grande partie par un transport facilité à travers la membrane plasmique (Hamilton and Kamp, 1999). Cependant, un certain nombre de protéines membranaires semble compléter ce processus telles que la translocase d'acides gras (Fatty Acid Translocase Cluster of Differenciation 36, FAT/CD36) ou encore les protéines de transport (Fatty Acid Transporter Protein, FATP) et de liaison FABP4 pour les AGL et l'aquaporine 7 pour le glycérol (**Figure 7**).

Cette hydrolyse est généralement complète, néanmoins le ratio final est très souvent différent de 3:1 puisque les AGL ont tendance à être recyclés par l'adipocyte (Forest et al., 2003). En effet, il semblerait qu'une partie des AGL produits (environ 30-40%) soit ré-estérifiée pour reformer des TG au sein des adipocytes (Reshef et al., 2003). A l'inverse, le glycérol produit n'est que faiblement ré-estérifié pour former des TG au sein du TA qui présente une activité glycérol kinase très faible (Reshef et al., 2003). Ainsi, le glycérol produit est majoritairement utilisé par le foie où il servira de substrat pour la néoglucogenèse.

Les acides gras non estérifiés libérés dans la circulation sanguine vont, liés à l'albumine, être transportés jusqu'aux organes cibles comme le muscle où ils entreront dans la voie de la β-oxydation et le foie où ils seront soit stockés sous forme de TG ou β-oxydés. Une partie de ces AGL peut également être utilisée en tant que, molécule de signalisation, précurseur d'autres lipides ou régulateur de la transcription de gènes.

3) Régulation physiologique/nutritionnelle de la lipolyse

La régulation de la lipolyse est extrêmement dépendante des changements de conditions métaboliques et de l'apport en nutriments. C'est un mécanisme qui est régulé de manière rapide afin de répondre aux besoins de l'organisme en fournissant de l'énergie aux organes périphériques en période jeûne ou suite à une activité physique. La stimulation de la lipolyse est principalement due à l'action des catécholamines, l'adrénaline et la noradrénaline, (Gjedsted et al., 2007) *via* une action sur les récepteurs β-adrénergiques et une stimulation de l'adénylate cyclase. A l'inverse, en période postprandiale, l'augmentation de l'insulinémie conduit à une inhibition de la lipolyse *via* l'activation de la voie de signalisation insulinique favorable au stockage des lipides (Roust and Jensen, 1993).

L'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc) est un métabolite clé dans la régulation de la lipolyse adipocytaire. Il se situe en aval des voies de signalisation insulinique et ß-adrénergique qui vont réguler de manière antagoniste sa concentration intracellulaire conditionnant ensuite l'activation des lipases situées en amont (**Figure 10**).

a. Inhibition de la lipolyse par l'insuline

L'insuline est le principal inhibiteur de la lipolyse (**Figure 10**). Sa fixation sur son récepteur provoque l'autophosphorylation des résidus tyrosine du récepteur, l'activation des protéines IRS par phosphorylation ainsi que leur liaison à la sous-unité p85 de la PI3K. La sous-unité catalytique de la PI3K active par phosphorylation l'Akt qui va, à son tour, phosphoryler la PhosphoDiEstérase de type 3B (PDE-3B) à l'origine de la dégradation de l'AMPc en 5'-Adénosine MonoPhosphate (5'AMP) (Langin, 2006a). Il en résulte ainsi une diminution de l'activation de la PKA et une phosphorylation réduite de la LHS et des périlipines à l'origine d'une inhibition de la lipolyse. De plus, il a été montré que l'insuline régule négativement le transcrit l'ATGL dans des cellules 3T3-L1 (Kim et al., 2006). En ce sens, une autre étude montre qu'un défaut de signalisation de l'insuline entraine une augmentation de la lipolyse associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène codant pour l'ATGL (Kershaw et al., 2006).

D'autres facteurs présentent également une action inhibitrice sur la lipolyse (**Figure 10**). Parmi eux, l'adénosine inhibe la lipolyse basale en diminuant la formation d'AMPc par le biais du récepteur à l'adénosine A1 couplé aux protéines G inhibitrices (Gi) (Liang et al., 2002; Schoelch et al., 2004). De plus, l'acide nicotinique (Karpe and Frayn, 2004), les prostaglandines E2 (Chatzipanteli et al., 1992), le neuropeptide Y et le peptide PYY (Valet et al., 1990) ont également montré une activité antilipolytique. Cependant la contribution de ces facteurs dans les processus d'inhibition de la lipolyse reste minoritaire.

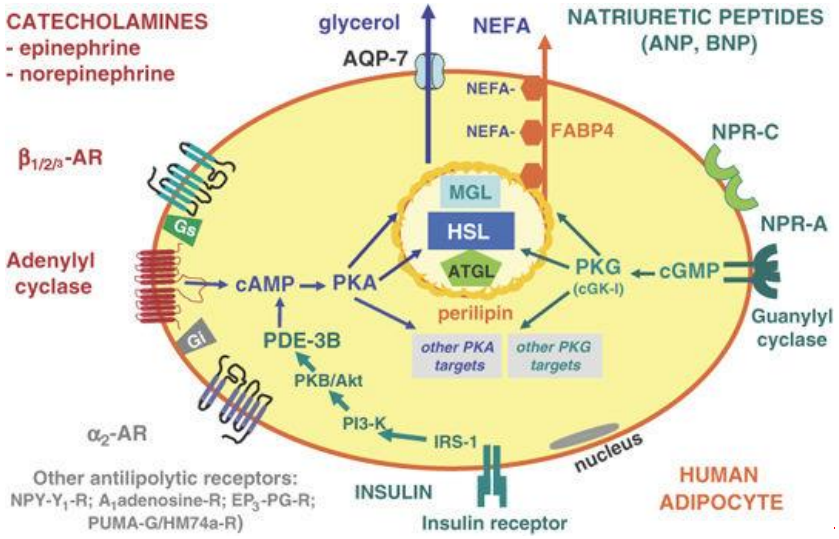


***Figure 10** : Voies de signalisation de la lipolyse adipocytaire et ses facteurs de régulation*
(Lafontan, 2008)

b. Régulation positive de la lipolyse

i. Les catécholamines : des activateurs puissants

Les catécholamines sont les premiers activateurs de la lipolyse induite par un jeûne. Le neurotransmetteur, la noradrénaline et l'hormone, l'adrénaline stimulent la lipolyse *via* les récepteurs β-adrénergiques (**Figure 10**). Il semblerait néanmoins que le principal stimulus provienne de la noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses du système sympathique (Chaves et al., 2011).

Les récepteurs β-adrénergiques, couplés à des protéines G stimulatrices (Gs) activent l'adénylate cyclase ce qui a pour conséquence une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. Ce métabolite active à son tour la PKA qui est à l'origine de la poly-phosphorylation de la LHS (Anthonsen et al., 1998) entrainant sa translocation vers la gouttelette lipidique (Holm, 2003). De plus, la PKA induit également la phosphorylation des périlipines, protéines dont l'activation provoque des changements conformationnels permettant à la LHS d'accéder aux TG stockés (Miyoshi et al., 2006).

Les récepteurs β1 et β2 sont retrouvés dans de nombreux organes et sont connus pour stimuler la lipolyse *in vivo* et *in vitro* chez l'Homme et le rongeur. On distingue également une troisième isoforme chez le rongeur, le récepteur β3, retrouvé exclusivement dans les TA blanc et brun et dont la stimulation engendre une réponse lipolytique importante (Carpéné et al., 1998). De plus, le traitement chronique de rongeurs obèses insulinorésistants par un agoniste β3 conduit à une perte de poids associée à une perte de masse grasse (de Souza and Burkey, 2001). Bien que le récepteur β3 soit présent dans le TA blanc humain (Deng et al., 1996), sa faible expression suppose un rôle physiologique modéré dans la lipolyse induite par les catécholamines (Langin, 2006b).

Enfin, les catécholamines peuvent également exercer, à faible concentration, un effet antilipolytique par l'intermédiaire des récepteurs α2-adrenergiques couplés aux protéines G inhibitrices (Gi) et qui sont également exprimés à la surface des adipocytes (Lafontan and Berlan, 1995) (**Figure 10**).

ii. Autres facteurs stimulant la lipolyse

Les catécholamines ont longtemps été considérées comme étant le seul facteur stimulant la lipolyse. Cependant, d'autres agents lipolytiques ont été découverts (**Figure 10**). Parmi eux, les peptides natriurétiques auriculaire (Atrial Natriuretic Peptide, ANP) et cérébral, (Brain Natriuretic Peptide, BNP) (Sengenès et al., 2000) qui *via* une fixation sur le récepteur aux peptides natriurétiques A (Natriuretic Peptide Receptor A, NPR-A) conduisent à l'activation de la PKG et à la phosphorylation de la LHS (Galitzky et al., 2001). Néanmoins, l'effet lipolytique de ces peptides ne concerne que les primates puisque, malgré leur présence chez les rongeurs, les récepteurs aux peptides natriurétiques présentent un profil biologiquement actif très faible (Sengenès et al., 2000). Le TNFα, sécrété à la fois par les macrophages et

les adipocytes du TA, a été recensé comme étant un stimulateur de la lipolyse. Cependant les mécanismes responsables de son action lipolytique ne sont pas clairs.

Il a été démontré que l'hormone de croissance est un agent stimulant la lipolyse dans des adipocytes humains mais le rôle physiologique de ce facteur dans le contrôle de la lipolyse adipocytaire reste peu clair (Langin, 2006b). Le glucagon, en augmentant l'activité adénylate cyclase (Duncan et al., 2007) et les glucocorticoïdes, en augmentant la réponse β-adrénergique et en diminuant l'effet antilipolytique de l'insuline (Nielsen et al., 2014), sont également reconnus pour exercer un effet stimulateur sur la lipolyse.

c. Régulation dépôt-spécifique de la lipolyse

Le Tissu Adipeux Viscéral (TAV) et Sous-Cutané (TASC) présentent des différences d'activité lipolytique principalement dues à leur sensibilité respective à l'action des catécholamines et de l'insuline.

Ainsi, les adipocytes du TAV sont plus sensibles à l'effet stimulateur des catécholamines que ceux du TASC du fait d'une plus grande quantité de récepteurs β-adrénergiques au niveau de leur membrane cellulaire (Arner et al., 1990). Le TAV est également moins sensible à l'effet antilipolytique de l'insuline (Bolinder et al., 1983; Zierath et al., 1998) du fait d'une moindre affinité pour son récepteur et d'une moindre activation de la voie de transduction PI3K/Akt sous-jacente.

Ces caractéristiques du TAV sont importantes d'un point de vue physiopathologique. En effet, la mobilisation rapide et massive des acides gras (accentuée au cours de l'obésité) peut avoir des conséquences indésirables sur certains tissus dont le foie qui est en connexion directe avec le TAV *via* la veine porte. Cependant, en situation basale, il semblerait que l'activité lipolytique soit plus importante dans le TASC que dans le TAV (Arner, 2005).

C. Remodelage du tissu adipeux au cours de l'obésité

1) Expansion du tissu adipeux

Le TA a la capacité de répondre de manière dynamique et rapide à un stress tel qu'un excès de nutriments. Ainsi, au cours de l'obésité viscérale, l'accumulation de TG dans les adipocytes va conduire à une expansion du TA du fait d'une arrivée massive de nutriments *via* un mécanisme d'hyperplasie et d'hypertrophie. Contrairement à l'hypertrophie qui est connue pour jouer un rôle majeur dans l'expansion du TA, le rôle de l'hyperplasie reste obscur. Elle semble avoir un effet plutôt bénéfique en favorisant la sécrétion d'adiponectine, en diminuant la lipolyse basale, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'hypoxie ainsi qu'en améliorant la sensibilité à l'insuline (Choe et al., 2016).

A l'inverse, l'hypertrophie du TA est associée à un stress cellulaire important et à un ensemble de dérégulations telles qu'un stress oxydatif, un stress du RE, une hypoxie, une mort cellulaire, une augmentation du flux d'acides gras et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 11**).

En effet, il est maintenant bien établi que l'hypertrophie du TAV provoque un état pro-inflammatoire favorisant l'apparition de complications métaboliques comme la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie (Després and Lemieux, 2006).

Des études réalisées chez des individus sains et obèses montrent que le nombre d'adipocytes reste globalement constant au cours de l'âge adulte. Même après une perte de poids importante, le nombre d'adipocytes reste similaire alors que leur volume est diminué. De plus, le renouvellement des adipocytes au cours de l'âge adulte serait d'environ 10% mais ce renouvellement ne serait pas altéré au cours de l'obésité ce qui suggère un rôle mineur de l'hyperplasie dans l'expansion du TA (Spalding et al., 2008).

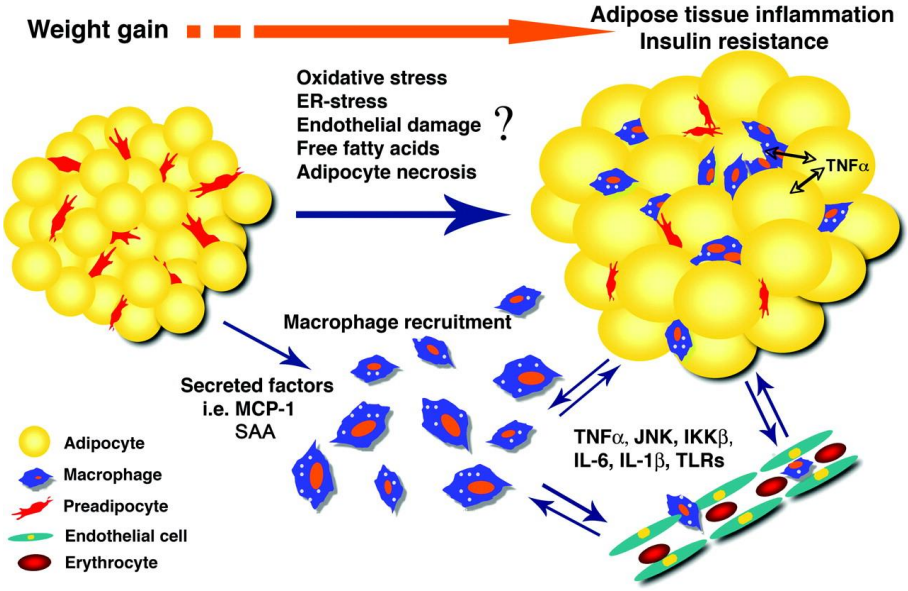


***Figure 11** : L'hypertrophie du tissu adipeux est associée à une inflammation*

L'expansion du TA au cours de l'obésité est associée à l'augmentation de différents stress cellulaires (stress oxydatif, stress du RE, hypoxie), de la production d'AGL et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires conduisant à une inflammation locale et à la résistance à l'insuline (Gustafson et al., 2007)

2) *Inflammation du tissu adipeux*

a. *Observation d'une inflammation locale dans le tissu adipeux*

Au cours de l'obésité, le TA est caractérisé par un état inflammatoire chronique avec une accumulation de macrophages (Weisberg et al., 2003). On parle d'inflammation « à bas bruit » (Trayhurn and Wood, 2005). En effet, le contenu en macrophages du TA est positivement corrélé à l'IMC et à la taille des adipocytes (Weisberg et al., 2003). Ainsi, la proportion de macrophages est estimée à moins de 10% chez une souris mince alors qu'elle peut atteindre 50% chez une souris massivement obèse (Weisberg et al., 2003). L'infiltration macrophagique est également associée à une augmentation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (**Figure 11**). Une corrélation positive entre la prise de poids et certains marqueurs de l'inflammation tels que la protéine C-réactive et le TNFα a été observée chez la souris et l'Homme (Festa et al., 2001; Yudkin et al., 1999).

Par ailleurs, l'accumulation de macrophages et d'autres cellules inflammatoires de même que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est plus importante dans le TAV que dans le TASC (Ibrahim, 2010).

Cette inflammation à bas bruit semble jouer un rôle primordial dans le développement de la résistance à l'insuline induite par l'obésité (Wellen and Hotamisligil, 2005). Alors que le foie et le muscle squelettique sont également sujets à une inflammation au cours de l'obésité, le TA semble être le principal site à l'origine du développement de l'inflammation systémique (Makki et al., 2013). En effet, des travaux récents démontrent une inflammation précoce du TA en amont de l'inflammation hépatique (van der Heijden et al., 2015; Stanton et al., 2011).

b. Origine de l'inflammation du tissu adipeux

Plusieurs hypothèses quant à l'origine de l'inflammation dans le TA ont été émises (**Figure 12**). En premier lieu, l'excès de nutriments et notamment l'arrivée massive de lipides vers le TA apparaît comme un événement majeur. En effet, les lipides conduisent à l'activation directe de certaines voies pro-inflammatoires telles que la voie du récepteur Toll Like (Toll Like Receptor 4,TLR4) (Shi et al., 2006) et de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) (Wen et al., 2011) ou encore à l'induction d'un stress du RE et/ou stress oxydatif (Sun et al., 2012). En effet, le stress du RE a été associé à une activation des cascades de signalisation inflammatoires telles que les kinases JNK (c-Jun N-terminal Kinases) et IKK (IκB kinase) (Hotamisligil, 2010) et à la résistance à l'insuline (Kawasaki et al., 2012; Özcan et al., 2004; Tanti et al., 2012).

De plus, en réponse au flux lipidique et notamment d'AGL, on assiste à une activation de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase à l'origine d'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) et à une dérégulation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Furukawa et al., 2004).

La mort des adipocytes hypertrophiés par nécrose ou apoptose au cours de l'obésité joue également un rôle important dans l'induction de l'inflammation puisqu'il a été montré que ces adipocytes sont de forts inducteurs de l'infiltration de macrophages. De plus, le relargage de leur contenu cellulaire va libérer des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires ou DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) responsables de l'activation locale d'inflammasomes (Dalmas et al., 2011).

D'autre part, l'hypoxie est un facteur très important dans l'induction de l'inflammation en entrainant le recrutement de macrophages *via* la protéine chimio-attractante de monocytes (Monocyte Chimoattractant Protein 1, MCP1), en activant les facteurs de transcription NFkB (Nuclear Factor Kappa B) et HIF-1α (Hypoxia Inductible Factor 1α) et leurs gènes cibles pro-inflammatoires (Ye, 2009), ou encore en activant le stress du RE (Cusi, 2010).

Enfin, certains facteurs inflammatoires tels que les lipopolysaccharides ainsi que les peptidoglycanes libérés au niveau systémique suite à une modification du microbiote intestinal et à une augmentation de la

perméabilité intestinale sont à l'origine de l'activation de la voie pro-inflammatoire TLR4-dépendante au sein du TA (Burcelin et al., 2011)

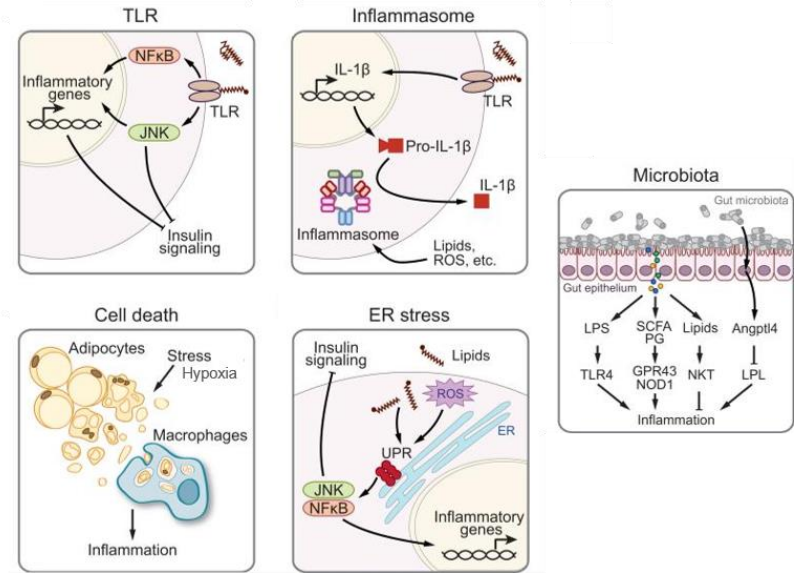


Figure 12 *: **Différents acteurs à l'origine de l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité.***
Adapté de (Sun et al., 2012)

c. Modification des populations de cellules immunitaires

Au cours de l'obésité, on assiste à un remodelage du TA principalement dû à son hypertrophie qui s'accompagne d'une augmentation de la proportion de cellules pro-inflammatoires. Ainsi, l'équilibre qui règne en situation non pathologique entre cytokines pro- et anti-inflammatoires produites par les adipocytes et par les cellules immunitaires de la FSV est dérégulé au profit des cytokines pro-inflammatoires. Tandis que le TA d'individus sains sécrète majoritairement des adipokines anti-inflammatoires telles que le facteur de croissance tumorale β (Tumor Growth Factor β, TGF β) les InterLeukines (IL) IL-10, IL-4, IL-13 et l'apeline, le TA d'individus obèses sécrète quant à lui principalement des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, IL-6, leptine, visfatine, résistine, angiotensine 2 et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1, PAI-1) (Makki et al., 2013).

i. Accumulation de macrophages pro-inflammatoires

Les macrophages sont connus pour être les premiers effecteurs de la résistance à l'insuline induite par l'obésité. En effet, leur proportion dans le TA augmente rapidement et fortement au cours de l'obésité et peut atteindre 50% de la totalité des cellules immunitaires du TA (Weisberg et al., 2003). Ces macrophages sont retrouvés dans des structures particulières et forment une couronne autour des adipocytes : on parle de structure « crown-like » (Crown Like Structure, CLS) (**Figure 13**).

Le recrutement des monocytes et donc l'accumulation de macrophages au sein du tissu est favorisée par l'augmentation de la sécrétion de la chimiokine MCP1 par les adipocytes et les macrophages résidents du

TA. L'absence de ce facteur ou de son récepteur (C-C Chemokine Receptor 2, CCR2) limite l'accumulation de macrophages, l'inflammation du TA et la résistance à l'insuline induites par un régime obésogène (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006). De plus, la déplétion des macrophages du TAV par l'utilisation de liposomes contenant du clodronate limite la prise de poids induite par un régime riche en graisses, l'accumulation de graisses, la résistance à l'insuline et l'inflammation au sein du TAV (Bu et al., 2013; Feng et al., 2011).

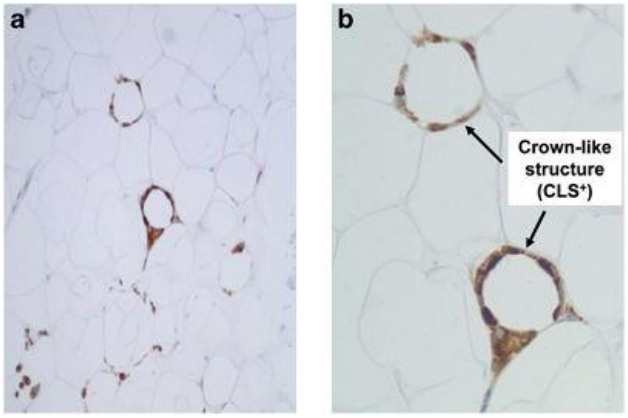


***Figure 13** : Représentation histologique des structures CLS dans le tissu adipeux inflammé*
(Bigornia et al., 2012)

Classiquement, les macrophages sont subdivisés en deux groupes : les M1 ($CD11c^+$), qui sont activés par la voie classique du complément et exerçant un rôle dit pro-inflammatoire et les macrophages M2 ($CD11^-$), activés par la voie alternative présentant un profil anti-inflammatoire. Au cours de l'obésité, une modification du phénotype des macrophages du TA a été mise en évidence par de nombreux travaux (Dalmas et al., 2011; Lumeng et al., 2007; Shaul et al., 2010) se caractérisant par une augmentation des macrophages présentant un profil pro-inflammatoire (Lumeng et al., 2007). Pendant plusieurs années, il était admis que cette modification soit la conséquence d'une dérégulation de la balance M1/M2 avec une augmentation de la proportion de macrophages M1 aux dépens des macrophages de type M2. Néanmoins, ceci a été remis en question par plusieurs travaux indiquant que les macrophages du TA présentent un phénotype différent des macrophages classiquement activés (Kratz et al., 2014; Lumeng et al., 2007).

Ainsi, les travaux de *Kratz et al.,* suggèrent une activation métabolique des macrophages de phénotype M2 du TA conduisant à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans ces cellules. On parlera ainsi de macrophages « métaboliquement activés » (Kratz et al., 2014). Il est maintenant bien établi que l'augmentation de ces macrophages métaboliquement activés dans le TA contribue au développement de la résistance à l'insuline. En effet, des souris transplantées avec une moelle osseuse déplétée en $CD11c^+$ présentent une moindre inflammation du TA et une amélioration de la résistance à l'insuline quand elles sont soumises à un régime obésogène (Patsouris et al., 2008).

Finalement, l'obésité est associée à la fois à une accumulation de macrophages dans le TA et à une activation métabolique de ces macrophages. D'autre part, le recrutement de nouveaux monocytes circulants

participerait également à augmenter la proportion de macrophages métaboliquement actifs au sein du TA (Dalmas et al., 2011; Lumeng et al., 2007; Satoh et al., 2010).

ii. Rôle des autres cellules du système immunitaire

D'autres types cellulaires voient leur proportion augmenter dans le TA au cours de l'obésité (**Figure 14**). C'est le cas des neutrophiles (Elgazar-Carmon et al., 2008), des mastocytes et de cellules Natural Killer (NK) (Liu et al., 2009; Ohmura et al., 2010) qui vont être à l'origine d'une amplification de la réponse inflammatoire *via* un recrutement de macrophages au sein du TA. De plus, on assiste à une modification des populations lymphocytaires avec une augmentation des lymphocytes $CD8^+$ et des $CD4^+$Th1 produisant l'INterFeron γ (INFγ) dans le TAV de sujets obèses (Feuerer et al., 2009).

Parmi les lymphocytes B, ceux produisant des ImmunoGlobulines G (IgG) voient leur proportion augmenter au cours de l'obésité et ont un rôle pro-inflammatoire puissant (Winer et al., 2011). Enfin, la proportion de lymphocytes T régulateurs, des cellules importantes dans le maintien de la tolérence immunitaire, est diminuée au cours de l'obésité (Feuerer et al., 2009).

L'ensemble de ces données suggère donc un remodelage des différents types cellulaires au sein du TA avec une augmentation des cellules immunitaires sécrétant des facteurs pro-inflammatoires en dépit des cellules ayant un rôle régulateur et anti-inflammatoire. Ceci conduit donc à un déséquilibre de la balance en faveur d'une inflammation chronique.

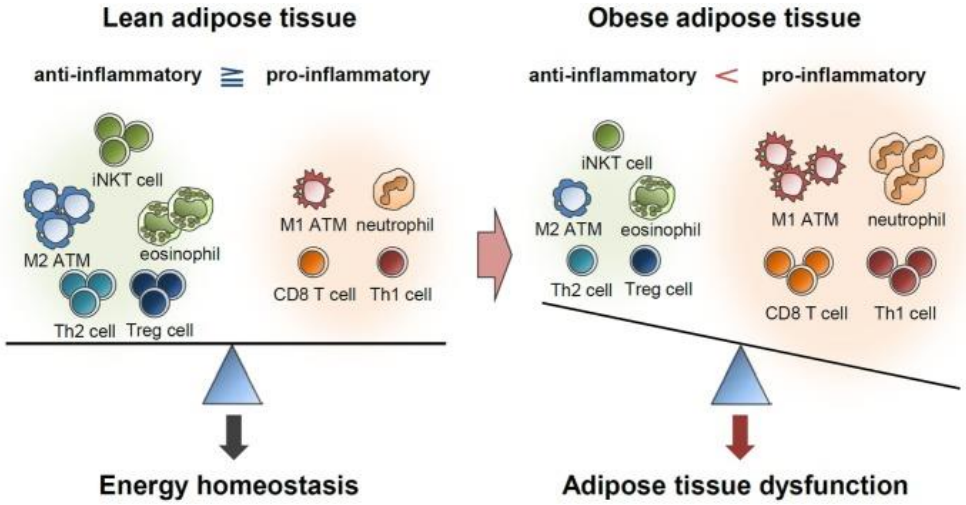


***Figure 14** : Remodelage des cellules immunitaires du tissu adipeux au cours de l'obésité*
(Choe et al., 2016)

D. Dérégulation de la lipolyse au cours de l'obésité

On sait depuis longtemps qu'une augmentation de la concentration plasmatique en AGL est présente chez les sujets obèses (Gordon, 1960; Opie and Walfish, 1963).

Cependant, les conséquences de l'obésité sur la lipolyse sont difficiles à caractériser car elles dépendent du type de dépôt adipeux (viscéral ou sous-cutané), le type d'obésité (gynoïde ou androïde) ainsi que l'état nutritionnel (lipolyse basale ou stimulée). Quoi qu'il en soit, la sensibilité des tissus aux hormones ainsi que l'état inflammatoire semblent être des facteurs clés.

Une double dérégulation de la lipolyse adipocytaire est observée au cours de l'obésité. Alors que la lipolyse stimulée par les catécholamines au cours du jeûne et de l'exercice physique est diminuée (Large et al., 1999), la lipolyse basale en périodes post et inter-prandiale est augmentée (Reynisdottir et al., 1995).

1) Dérégulation de la lipolyse stimulée

Plusieurs travaux démontrent une diminution de la capacité lipolytique induite par les catécholamines du TASC d'individus obèses par rapport à des individus sains. Cette diminution est associée à la baisse d'expression du gène, de la protéine et de l'activité de la LHS (Langin et al., 2005; Large et al., 1999).

De plus, une altération de la fonction des récepteurs α et β adrénergiques a été observée. En effet, une augmentation de la réponse α2 adrénergique (Mauriège et al., 1991) et une diminution de la sensibilité et de la densité des récepteurs β2 à la surface des adipocytes a été observée chez les sujets obèses (Reynisdottir et al., 1994).

A l'inverse, au sein du TAV, il semblerait que la lipolyse stimulée par les catécholamines soit augmentée du fait d'une réponse β-adrénergique plus importante que la réponse α-adrénergique (Lönnqvist et al., 1995). D'autre part, cette réponse aux catécholamines serait plus prononcée chez les hommes que les femmes (Lönnqvist et al., 1997).

2) Dérégulation de la lipolyse basale

a. Hypertrophie des adipocytes

Une des principales hypothèses proposée pour expliquer l'augmentation de la lipolyse basale est l'augmentation de la taille des adipocytes au cours de l'obésité.

En effet une corrélation entre taille des adipocytes et la lipolyse basale a été démontrée (Engfeldt and Arner, 1988). Lorsque l'activité lipolytique basale est ajustée à la taille des cellules, cette différence d'activité lipolytique entre les sujets sains et obèses s'annule (Tchernof et al., 2006).

b. Rôle de l'inflammation

L'inflammation locale du TA est un autre facteur de dérégulation de la lipolyse basale. Ainsi, certaines cytokines sont capables de stimuler la lipolyse et plus particulièrement le TNFα qui est un agent lipolytique puissant (Suganami et al., 2005).

En effet, nous avons vu précédemment que le TA a la capacité de sécréter du TNFα et que cette sécrétion est augmentée au cours de l'obésité. De plus, une perte de poids conduit à une diminution de la sécrétion de TNFα en parallèle d'une diminution de la lipolyse basale (Langin and Arner, 2006).

En plus de l'augmentation de sa sécrétion, les voies de signalisation activées par cette cytokine sont dérégulées et sont impliquées dans l'augmentation de la lipolyse basale au cours de l'obésité. Parmi les mécanismes proposés, une augmentation de la phosphorylation des périlipines 1, une sous régulation de la protéine G0S2 (un régulateur négatif de l'ATGL) ou encore une altération de la voie IκK ont été proposées (Arner and Langin, 2014). Les différents stress présents au sein du TA (Cf. partie origines de l'inflammation) tels que le stress du RE ou encore l'hypoxie vont également participer à l'augmentation de la lipolyse basale (Deng et al., 2012).

c. Rôle de la leptine

Un rôle de l'augmentation de la sécrétion de leptine au cours de l'obésité a également été proposé par plusieurs travaux pour expliquer l'augmentation de la lipolyse basale. En effet, la leptine entraîne une augmentation de l'activité lipolytique dans des adipocytes primaires isolés de souris minces ou ob/ob (Frühbeck et al., 1997). De même, une supplémentation en leptine chez des souris minces ou ob/ob augmente la capacité d'hydrolyse des TG par le TA (Frühbeck et al., 1998). Cette augmentation de la lipolyse serait dépendante d'une altération de la voie de signalisation insulinique par la leptine (Müller et al., 1997).

d. Rôle de l'insulinorésistance

Enfin, une autre hypothèse suggère qu'une fois l'insulinorésistance installée, le TA ne répond plus au pouvoir antilipolytique de l'insuline participant ainsi à l'augmentation de la lipolyse basale. Cependant cette hypothèse ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique. En effet, bien que certaines études suggèrent une altération de l'effet antilipolytique de l'insuline au cours de l'obésité (Stevens et al., 1981), d'autres études n'observent cependant pas de modification de l'effet inhibiteur de l'hormone sur la lipolyse (Duncan et al., 2007). Néanmoins, on assiste dans le TA à une altération de la transduction du signal insulinique notamment *via* une diminution du contenu en IRS-1 mais il semblerait que l'action de l'insuline sur la lipolyse soit moins altérée que son effet sur le métabolisme du glucose (Arner, 2005).

Finalement, une régulation différentielle de la lipolyse a lieu au sein du TA en fonction de l'état basal ou stimulé. A l'origine, l'accumulation d'acides gras dans le TA est un mécanisme protecteur empêchant le dépôt de ces molécules dans d'autres organes où elles pourraient conduire à des effets délétères (Langin, 2011). Cependant, le TA présentant une capacité limitée de stockage (van Beek et al., 2015), l'augmentation de la taille des adipocytes va conduire à une augmentation de l'activité lipolytique basale. Cet effet est d'autant plus amplifié par l'augmentation du stress cellulaire et de l'activité inflammatoire présente au sein du tissu hypertrophié. Finalement, on assiste à une libération accrue d'AGL et à terme à des dépôts ectopiques dans des organes périphériques comme le foie, le cœur, le muscle, le pancréas pouvant ainsi conduire à l'installation de la résistance à l'insuline dans ces tissus par des mécanismes de lipotoxicité (McQuaid et al., 2011).

E. Rôle des AGL dans l'installation de la résistance périphérique à l'insuline

Plusieurs études suggèrent l'existence de dysfonctionnements des adipocytes bien avant que l'obésité et le DT2 ne se développent plaçant ainsi le TA comme le premier site de résistance à l'insuline (Bergman and Mittelman, 1998; Cusi, 2010). Il a été observé, chez des sujets génétiquement prédisposés au DT2, que la résistance à l'insuline apparaît en amont du développement de l'obésité et de l'hyperglycémie (Kashyap et al., 2003; Perseghin et al., 1997). Cette résistance à l'insuline précoce associée à la libération excessive d'AGL par le TA conduit à terme à l'installation de la résistance à l'insuline périphérique dans le foie et le muscle (Boden, 1997; Shulman, 2000) ainsi qu'à un défaut de sécrétion d'insuline au niveau pancréatique (McGarry and Dobbins, 1999; Unger and Zhou, 2001).

1) Mécanismes d'altération des voies de signalisation insulinique

a. Impacts des dérivés lipidiques : DAG et céramides

Les niveaux circulants d'AGL élevés vont conduire à un afflux de ces AGL dans des tissus non adipogéniques contribuant à terme à une accumulation des lipides. De nombreuses études indiquent que le métabolisme de ces AGL favorise la génération de dérivés lipidiques toxiques, qui ont un rôle délétère sur la signalisation insulinique (**Figure 15**). Principalement deux intermédiaires du métabolisme lipidique, les DAG et les céramides, semblent être responsables des effets délétères des AGL puisqu'ils affectent tous deux la sensibilité à l'insuline hépatique et musculaire. Les DAG sont des intermédiaires du métabolisme des TG et des phospholipides qui s'accumulent aux niveaux hépatique et musculaire et qui vont activer des isoformes de la Protéine Kinase C (PKC), une famille de sérine/thréonine kinases, à l'origine d'une

diminution de la sensibilité à l'insuline *via* des phosphorylations inhibitrices d'IRS (Griffin et al., 1999; Itani et al., 2002; Yu et al., 2002).

Les céramides, des sphingolipides synthétisés à partir du palmitate suite à son activation sous forme d'acyl-CoA, s'accumulent principalement dans le muscle (Adams et al., 2004; Kotronen et al., 2009) et vont altérer la voie Akt *via* l'activation des PKC ou de sérine/thréonine phosphatases responsables de déphosphorylations (Zhang et al., 2013).

b. Rôle pro-inflammatoire des AGL

La propriété pro-inflammatoire des AGL semble également jouer un rôle dans l'installation de la résistance à l'insuline périphérique. En effet, il a été montré *in vitro* que les AGL sont capables d'activer la voie de signalisation du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB (**Figure 15**). Par exemple, une infusion lipidique de 6h conduit à une diminution significative de l'inhibiteur de NFκB, IkB-α au niveau du muscle squelettique (Itani et al., 2002). Un effet inducteur des AGL sur l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα, IL-1β, IL-6 et pour la MCP1, une chimiokine impliquée dans la migration et l'infiltration des monocytes et macrophages a également été observé dans le foie de rat (Boden et al., 2005). Cependant, le lien entre l'activation de NFκB et la résistance à l'insuline reste à préciser. L'activation de la voie de signalisation JNK par les cytokines ou l'induction des protéines SOCS pourrait être impliquée (Cai et al., 2005; Hirosumi et al., 2002; Lebrun and Van Obberghen, 2008) (**Figure 15**).

Quoi qu'il en soit, les conséquences de l'inflammation induite par les AGL et la résistance à l'insuline ne sont pas toujours évidentes *in vivo*. Par exemple, l'administration d'anticorps anti-TNFα à des patients diabétiques ne réduit par leur état de résistance à l'insuline (Dominguez et al., 2005; Ofei et al., 1996). Par ailleurs, l'infusion d'IL-6 à des patients normaux ne produit pas d'insulinorésistance (Krogh-Madsen et al., 2006) tout comme des souris déficientes en IL-6 ne sont pas résistantes à l'obésité (Matthews et al., 2010; Wallenius et al., 2002). Ainsi, il semblerait qu'une action synergique de plusieurs cytokines plutôt qu'une action unitaire soit responsable de la résistance à l'insuline induite par les AGL.

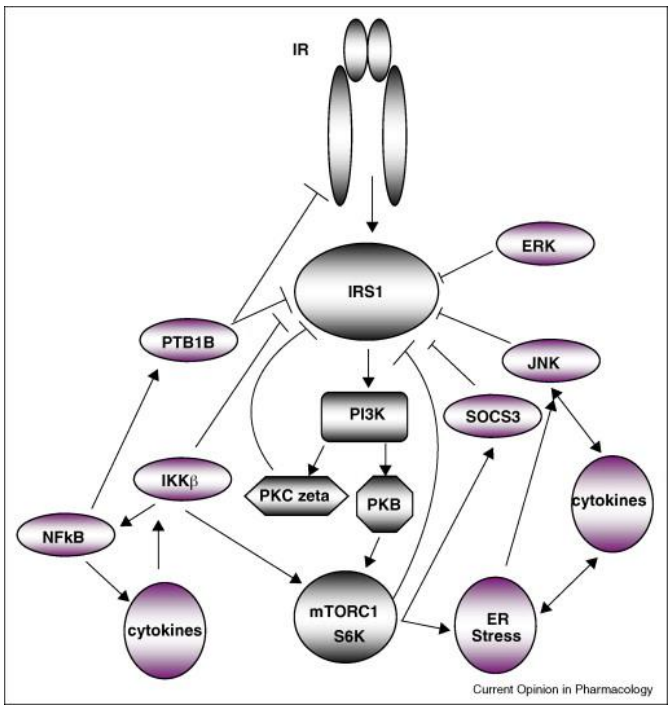


***Figure 15** : Voies de signalisation impliquées dans l'altération de la signalisation insulinique*
(Tanti and Jager, 2009)

2) Conséquences métaboliques de la résistance à l'insuline

a. Résistance à l'insuline du muscle squelettique

Le muscle squelettique est l'un des plus gros consommateurs de glucose après le foie chez les sujets sains ou tolérants au glucose. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine du défaut d'utilisation du glucose par le muscle au cours de l'obésité. Les travaux de Randle *et al*. suggèrent que les AGL entrent en compétition avec le glucose afin de servir de substrat énergétique pour l'oxydation musculaire conduisant à une altération de l'utilisation du glucose *via* une inhibition des enzymes clés de le glycolyse (Randle et al., 1963),. Néanmoins, la baisse d'oxydation du glucose observée en réponse aux AGL ne serait qu'un évènement secondaire à la baisse de captage du glucose (Roden et al., 1996).

Ainsi, d'autres travaux mettent en avant un rôle de l'accumulation intracellulaire de dérivés d'acides gras tels que les DAG et les céramides dans l'altération de la voie de signalisation insulinique (Griffin et al., 1999; Shulman, 2000). Cette altération va conduire d'une part, à un défaut de translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique en réponse à l'insuline et par conséquent à une diminution de l'entrée du glucose dans le muscle (Shulman, 2000) et d'autre part, à une diminution de la synthèse de glycogène favorisant ainsi l'hyperglycémie. En effet, l'action inhibitrice de l'insuline sur la kinase GSK3 (Glycogene Synthase Kinase 3) est altérée, ce qui entraîne une inhibition de l'activité de la Glycogene Synthase (GS) (DeFronzo and Tripathy, 2009) (**Figure 17**).

b. Résistance à l'insuline hépatique

La NAFLD se définit comme une accumulation de TG intra-hépatique. Elle se développe lors d'un déséquilibre entre les voies d'apport et de synthèse d'acides gras (lipolyse, lipogenèse *de novo* et apport alimentaire par les chylomicrons) et les voies de dégradation et d'export (β-oxydation et production de VLDL). Cette pathologie peut évoluer sous forme de stéatohépatite (Non-Alcoholic SteatoHepatitis, NASH) lorsque la stéatose est associée à une augmentation de l'inflammation hépatique

En situation d'insulinorésistance, comme l'obésité ou le DT2, l'afflux d'AGL provenant du TAV, représentant jusqu'à 60% des apports en AGL dans le foie (Donnelly et al., 2005), va favoriser le développement de la NAFLD et la résistance à l'insuline hépatique *via* des mécanismes de lipotoxicité (Listenberger et al., 2003) (**Figure 16**). En effet, le lien direct entre les AGL d'origine adipocytaire et la résistance à l'insuline hépatique a été mis en évidence (Perry et al., 2014).

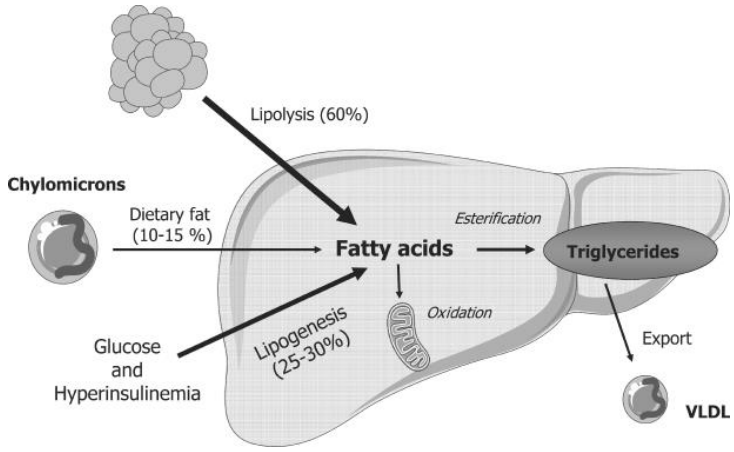


***Figure 16* : Contribution des différentes sources d'AGL à l'accumulation des TG dans le foie**
(Ferré and Foufelle, 2010)

Cette résistance à l'insuline hépatique est à l'origine d'une altération de la production hépatique de glucose et d'une altération du métabolisme lipidique

Il est maintenant bien caractérisé que la production endogène de glucose est augmentée au cours d'un état d'insulinorésistance (Jeng et al., 1994). L'augmentation des AGL et de leurs dérivés lipidiques tels que les DAG et les céramides est à l'origine d'une inhibition de l'activité de la voie PI3K/Akt (Dries et al., 2007) (**Figure 17**). Ceci est associé à une baisse de phosphorylation et de translocation nucléaire du facteur de transcription FOXO-1 (Forkhead box protein O1) et par conséquent à une augmentation de l'expression des gènes de la néoglucogenèse (Perry et al., 2014). En parallèle, de la même manière que dans la muscle squelettique, l'altération de la voie de signalisation insulinique conduit à une baisse de la synthèse de glycogène (Samuel et al., 2007). Finalement, l'augmentation de la néoglucogenèse et l'inhibition de la glycogénogenèse insulino-dépendante contribuent à l'augmentation de la production hépatique de glucose.

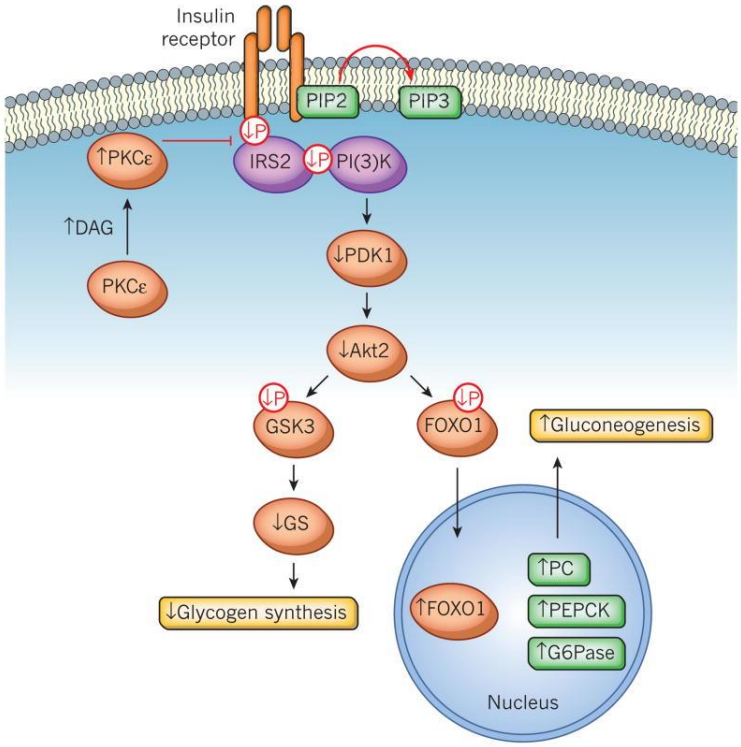


***Figure 17** : Mécanismes cellulaires à l'origine de l'augmentation de la production de glucose hépatique au cours de l'insulinorésistance*
(Perry et al., 2014)

L'insuline étant un facteur indispensable au contrôle du métabolisme des lipoprotéines dans le foie, la résistance à l'insuline hépatique est associée à une augmentation de la production de VLDL-1 riches en TG résultant d'une augmentation du pool d'ApoB disponible pour l'assemblage des VLDL (Taghibiglou et al., 2002) et d'une augmentation de l'expression de la protéine de transfert des TG (Microsomal Triglyceride Tranfert Protein, MTTP) (Kuriyama et al., 1998) sur les lipoprotéines *via* un mécanisme dépendant de FOXO-1 (Kamagate et al., 2008). Enfin, les activités de la phospholipase D1 et du facteur ARF-1 (ADP-Ribosylation Factor 1) jouant un rôle dans l'assemblage des VLDL, sont également augmentées en réponse à la résistance à l'insuline (Brown and Gibbons, 2001)

Du fait de son rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique et de son interaction avec divers tissus énergétiques notamment le foie et le muscle, l'hypertrophie, l'inflammation et l'altération du métabolisme du TA, contribuent directement à la mise en place de la résistance périphérique à l'insuline et aux désordres métaboliques comme illustré **Figure 18**. La dérégulation de la lipolyse adipocytaire conduisant à une mauvaise gestion des flux d'acides gras apparait comme un facteur majeur de la mise en place des défauts périphériques. En effet, il est maintenant clairement établi que les AGL, par leurs actions lipotoxique et pro-inflammatoire, sont responsables de l'altération des voies de signalisation insuliniques et par conséquent d'une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique et musculaire.

Les mécanismes à l'origine du dysfonctionnement du TA, la mise en place de la résistance à l'insuline périphérique et des dérégulations métaboliques observées au cours de l'obésité sont complexes et font intervenir un grand nombre de facteurs. Parmi ces facteurs, l'implication du Système EndoCannabinoïde (SEC) fait l'objet d'une attention particulière. En effet, il est communément admis que l'obésité est associée à une hyperactivation du SEC à la fois au niveau central où il stimule la prise alimentaire mais également au niveau périphérique dans des organes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique tels que le foie, le muscle et le TA.

Le chapitre suivant introduira ainsi dans un premier temps le SEC et son lien avec l'obésité puis, son rôle sur la prise alimentaire sera évoqué dans une deuxième partie et enfin, la dernière partie sera consacrée aux effets périphériques du SEC sur les organes du métabolisme énergétique.

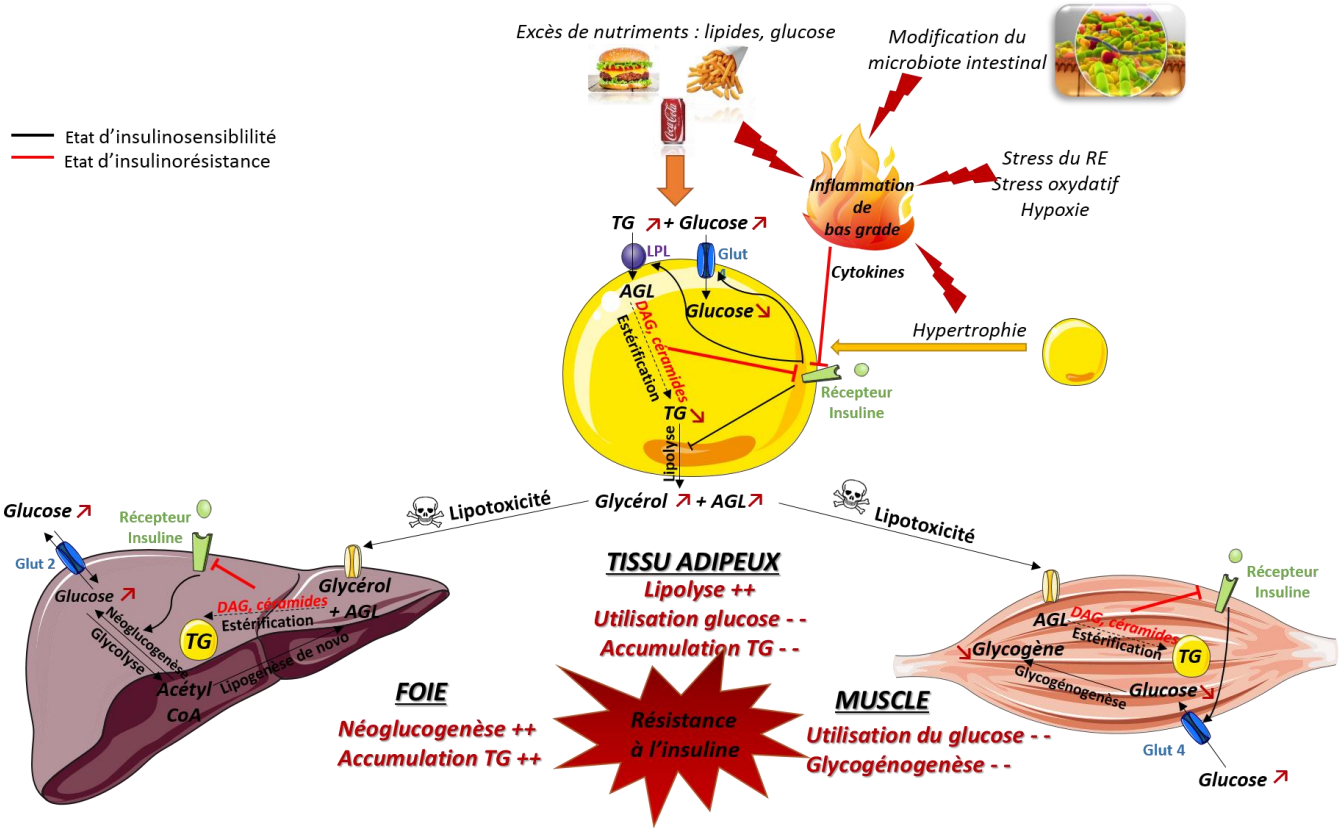


***Figure 18** : Dysfonctionnement du tissu adipeux et résistance à l'insuline périphérique*
(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical A)

III. Le système endocannabinoïde et ses effets métaboliques

A. Histoire et définition

Le Cannabis est utilisé depuis des millénaires pour ses propriétés médicinales et psychoactives mais également pour ses propriétés orexigènes. L'identification de son principe actif, le Δ9-Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC), au milieu du XXème siècle ainsi que l'étude de son mécanisme d'action (Gaoni and Mechoulam, 1964; Mechoulam et al., 1998) ont permis de caractériser le SEC et de mettre en évidence son rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques (Pacher et al., 2006). Depuis, la biochimie, la pharmacologie et le métabolisme de ce système sont étudiés de façon intensive. Tout d'abord, le développement d'analogues au Δ9-THC a permis l'identification de deux récepteurs métabotropiques aux cannabinoïdes couplés aux protéines Gi/0 (CannaBinoid Receptor, CBR) CB1R et CB2R en 1990 (Matsuda et al., 1990) et 1993 (Munro et al., 1993) respectivement. Plus tard, des ligands endogènes à ces récepteurs, alors appelés EndoCannabinoïdes (ECs), ont été mis en évidence : le ***N*-ArachidonoylEthanolAmine** (**AEA**) ou **anandamide** ainsi que le **2-ArachidonoylGlycerol** (**2-AG**). Ces deux ECs présentent les caractéristiques des neurotransmetteurs «classiques» à l'exception de leur mode de stockage et de leur libération (Bisogno et al., 2005). En effet, il ne sont pas stockés dans des vésicules et sont synthétisés « à la demande » suite à un stimulus physiologique à partir de dérivés phospholipidiques contenant de l'acide arachidonique par différentes enzymes : la N-Acyl PhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D (NAPE-PLD) pour l'AEA et la DiAcylGlycerol Lipase (DAG-L) pour le 2-AG (Bisogno et al., 2005). Leur dégradation est effectuée par d'autres enzymes suite à une internalisation préalable. La Fatty Acid Amide Hydroxylase (FAAH) est majoritairement responsable de la dégradation de l'AEA et du 2–AG alors que les MAGL sont exclusivement responsables de la dégradation du 2-AG (Bisogno et al., 2005). Ces récepteurs, leurs ligands endogènes ainsi que les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de ces ligands constituent le SEC (**Figure 19**).

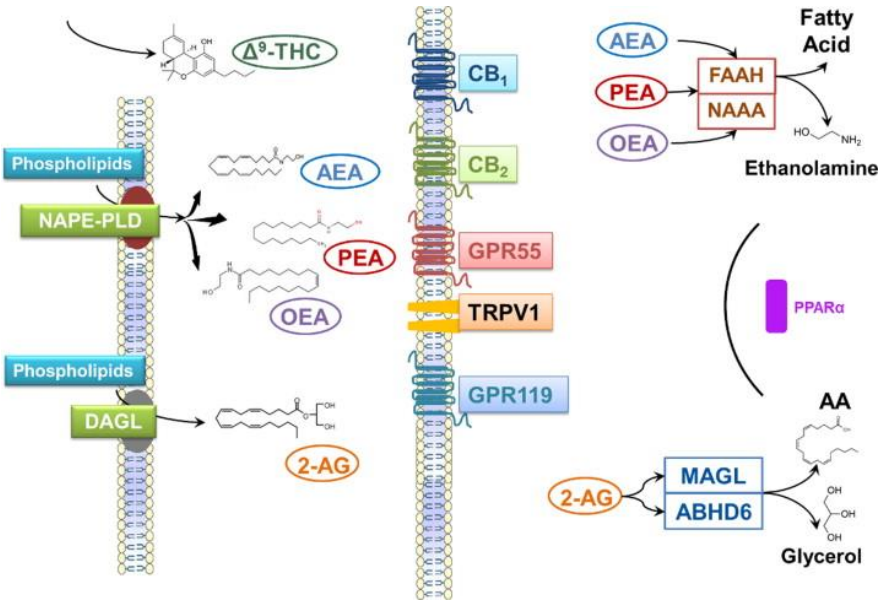


***Figure 19**: Aperçu général des acteurs du système endocannabinoïde*
(Cani et al., 2014)

B. Récepteurs et canaux activés par les ECs

Les CBR sont les récepteurs aux cannabinoïdes les plus connus et les mieux caractérisés. Les CB1R sont majoritairement et fortement exprimés dans le système nerveux central dans plusieurs régions cérébrales telles que le ganglion basal, l'hippocampe, le système limbique, le cortex, le système olfactif, le cervelet et l'hypothalamus. Aux niveaux limbique et hypothalamique, on les retrouve principalement dans des régions impliquées dans la régulation de la prise alimentaire telles que le noyau accumbens, le noyau paraventriculaire et le noyau ventromédian ainsi que l'aire latérale de l'hypothalamus (Piazza et al., 2017). Ces récepteurs sont également exprimés à des niveaux plus faibles mais à l'état fonctionnel dans certains tissus périphériques tels que le tractus gastro-intestinal, le pancréas, le foie, le rein, le muscle et le TA (Pertwee, 2005).

Les CB2R sont quant à eux majoritairement retrouvés dans des organes appartenant au système immunitaire comme la rate ou encore le thymus. En effet, des transcrits du CB2R ont été retrouvés dans des lymphocytes T et B, des cellules NK, des monocytes, des macrophages, des cellules microgliales et des mastocytes (Howlett et al., 2004).

Outre les récepteurs CB1R et CB2R, de nombreuses études suggèrent que les cannabinoïdes sont également capables d'interagir avec d'autres récepteurs couplés aux protéines G ainsi qu'à des canaux ioniques. Parmi eux, le récepteur vanilloide de type 1 (Transient Receptor Potential Vanilloide 1, TRPV1) appartenant à la famille des canaux ioniques a été caractérisé comme étant un récepteur potentiel de l'AEA et du 2-AG (Fezza et al., 2014). L'activation de ces récepteurs va conduire à l'augmentation du calcium intracellulaire pouvant ainsi produire des effets opposés à ceux produits par les CB1R et CB2R (Di Marzo and De

Petrocellis, 2010). Il a également été montré que les cannabinoïdes sont capables de se fixer sur des canaux potassiques comme les récepteurs α-7 nicotiniques et le récepteur ionotrope activé par la sérotonine, 5-HT_3 (Oz, 2006). De plus, deux récepteurs couplés aux protéines G (G coupled-Protein Receptor, GPR) ont été caractérisés comme de potentiels récepteurs aux cannabinoïdes : GPR55 et GPR 119. (Godlewski et al., 2009). Enfin, plusieurs cannabinoïdes de la famille des N-Acyl Ethanolamine (NAE) à laquelle appartient l'AEA sont capables d'agir au niveau nucléaire en fixant les facteurs de transcription PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) α et γ permettant ainsi d'activer la transcription des gènes cibles de ces facteurs de transcription (Fezza et al., 2014).

C. Endocannabinoïdes et dérivés endogènes

Par définition, les ECs sont des acides gras polyinsaturés capables de se fixer sur les récepteurs CBR. Parmi eux, l'anandamide ou AEA fut le premier cannabinoïde endogène de la famille des NAE à avoir été découvert. C'est un amide formé entre l'acide arachidonique et l'éthanolamine. C'est un agoniste partiel des CB1R et faible agoniste des CB2R (Fezza et al., 2014). Le 2-AG, qui appartient à la famille des MAG est constitué d'acide arachidonique lié au carbone 2 à un glycérol par une liaison ester. Il est à la fois agoniste des CB1R et des CB2R (Fezza et al., 2014). L'identification des deux premiers ligands endogènes, ainsi que le développement des méthodes analytiques de mesure des taux d'ECs ont permis la mise en évidence de nouveaux ligands endogènes ayant des propriétés proches à celle de l'AEA et du 2-AG (**Figure 20**).

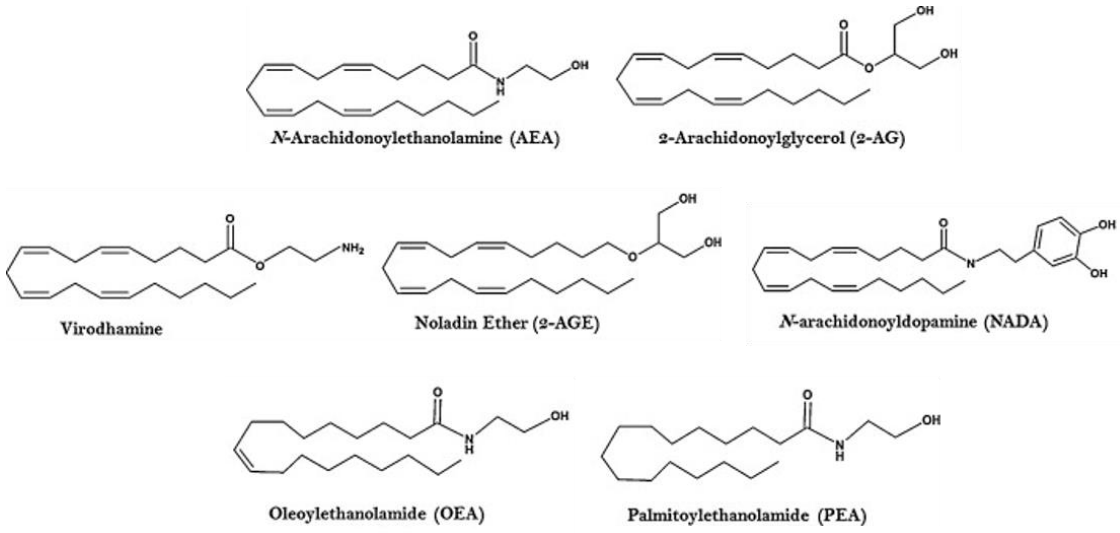


***Figure 20**: Principaux endocannabinoïdes et dérivés endogènes*
Adapté de (Fonseca et al., 2013)

1) *Synthèse des principaux ECs, l'AEA et le 2-AG*

a. *Synthèse de l'anandamide*

Sa biosynthèse se déroule en deux étapes. Tout d'abord, le précurseur phospholipidique, la PhosphatidylEthanolamine (PE) est la cible d'un transfert d'un groupement acyle sur sa position sn-1 par l'intermédiaire de la N-AcylTransférase (NAT) calcium dépendante conduisant ainsi à la formation de N-Arachidonoyl-PE qui à son tour est prise en charge par une phospholipase D (PLD) non spécifique générant 2 produits : l'anandamide et l'acide phosphatidique, un intermédiaire métabolique qui va pouvoir être utilisé par la cellule pour la synthèse de nouveaux phospholipides dérivés du glycérol (Di Marzo et al., 1994). Ainsi, on parlera de l'enzyme NAPE-PLD pour désigner l'enzyme majoritairement responsable de la synthèse de l'AEA. Néanmoins, l'utilisation d'un modèle de souris déficientes pour la NAPE-PLD a permis la mise en évidence de deux voies de synthèse alternatives : une impliquant l'α,β-hydrolase (α,β-Hydrolase Domain, ABHD) 4 et des phosphodiestérases et une autre nécessitant l'action une phospholipase C ainsi que de phosphatases (Liu et al., 2008) (**Figure 21**).

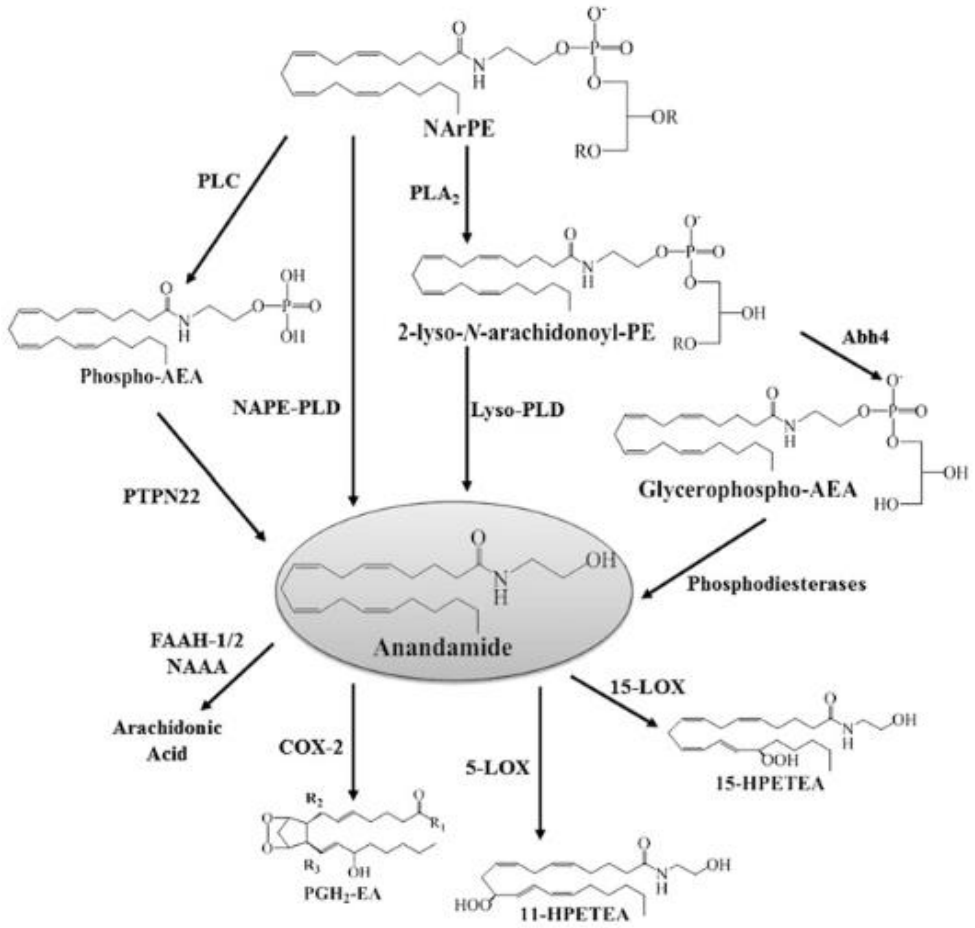


***Figure 21** : Voies de biosynthèse et de dégradation de l'anandamide*
(Cascio and Marini, 2015)

b. Synthèse du 2-AG

La synthèse du 2-AG est réalisée à partir du PhosphatidylInositol (PI) contenant de l'acide arachidonique en position sn-2. Dans la plupart des cas, le 2-AG est synthétisé à partir de l'hydrolyse du DAG par l'intermédiaire d'une DAGL qui provient de l'hydrolyse du PI sous l'action de la PhosphoLipase C (PLC) (Farooqui et al., 1989). Il existe également une voie alternative à la synthèse du 2-AG ayant pour précurseur le 2-arachidonoyl-lysophospholipide, issu de l'hydrolyse du PI par la PhosphoLipase A1 (PLA1). Le 2-arachidonoyl-lysophospholipide va ensuite subir à son tour une hydrolyse par la Lyso-PhosphoLipase C (Lyso-PLC) pour donner naissance au 2-AG (Higgs and Glomset, 1994) (**Figure 22**).

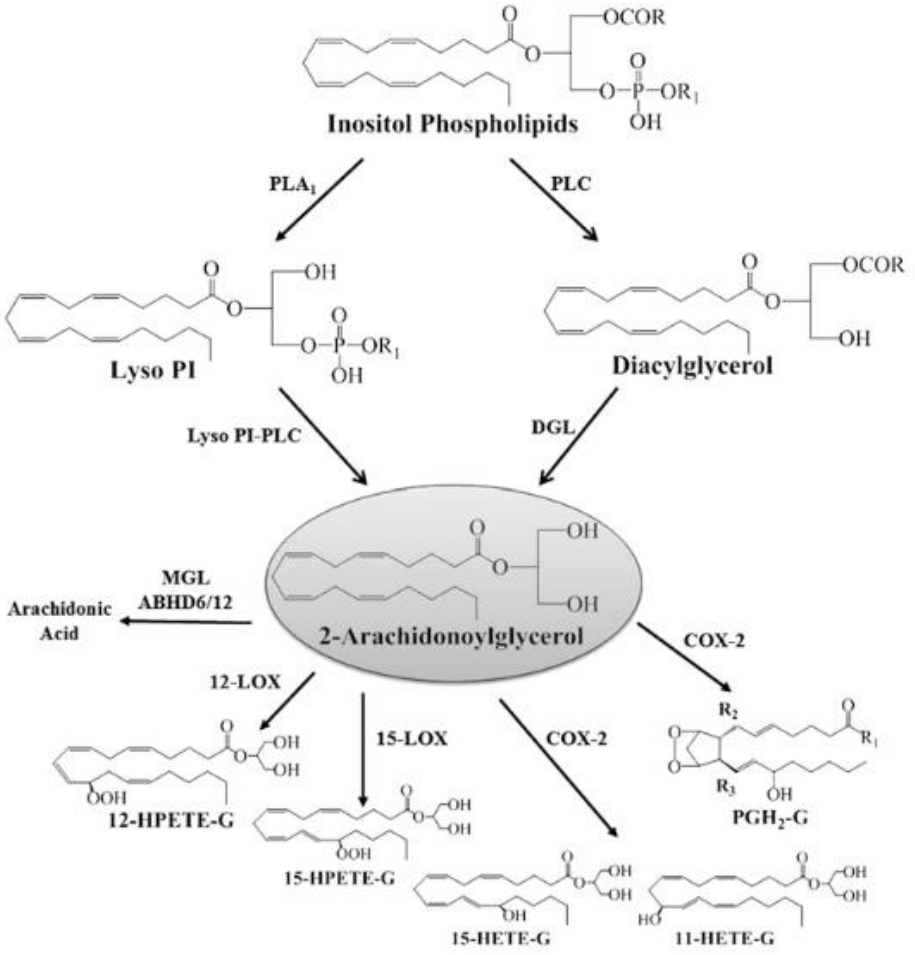


***Figure 22*: Voies de biosynthèse et de dégradation du 2-AG**
(Cascio and Marini, 2015)

2) Autres endocannabinoïdes et dérivés endogènes

a. Autres endocannabinoïdes

D'autres ECs dérivés d'acides gras polyinsaturés en n-6 ou n-3 et capables de lier les CBR ont ensuite été identifiés (**Figure 20**). Parmi eux, le ***O*-arachidonoyl-ethanolamine ou virodhamine** également appelé « AEA inversé » serait un agoniste total des CB2R et partiel des CB1R *in vitro*. Cependant, *in vivo*, il présenterait une propriété antagoniste aux CB1R et serait un faible inhibiteur du captage de l'AEA (Porter

et al., 2002). D'autre part, on distingue le **N-ArachidonoylDopAmine (NADA)** considéré comme l'« endovanilloide » puisque c'est un agoniste puissant des TRPV1 (De Petrocellis and Di Marzo, 2009).

Dans la famille des monoacylglycérols, on distingue le **2-Arachidonyl-GlycerylEther** (**2-AGE**) ou **noladin ether,** analogue du 2-AG qui se lie et qui active spécifiquement les récepteurs CB1R (Hanus et al., 2001). Le noladin ether ainsi que le virodhamine ont également la capacité, comme pour l'AEA, d'interagir avec PPARα (Fezza et al., 2014).

Enfin, dans la catégorie des n-3 et dans la famille des NAE, deux dérivés de l'Acide DocosaHexaénoïque (DocosaHexaenoic Acid, DHA) et de l'Acide EicosaPentaénoïque (EicosaPentaenoic Acid, EPA), respectivement le ***N*-DocosaHexaenoyl-EthanolAmide** (**DHEA**) et le ***N*-Eicosapentaenoyl-EthanolAmide** (**EPEA**) ont également la capacité de lier les CBR (Brown et al., 2013).

b. Composés « Endocannabinoid-like »

Ces composés dits « endocannabinoid-like », composés d'acides gras mono-insaturés ou saturés sont incapables de lier les récepteurs CBR mais ont la capacité de potentialiser les effets des ECs sur leurs récepteurs.

Dans cette famille NAE, on distingue le ***N*-PalmitoylEthanolAmine** (**PEA**) et le ***N*-OleoylEthanolAmine** (**OEA**) (**Figure 20**). Il semblerait que ces autres NAE soient présents à des niveaux plus importants que l'AEA dans le cerveau. Ces deux composés partagent avec l'AEA les mêmes voies métaboliques et cataboliques (Matias et al., 2007) et sont capables d'activer les deux récepteurs GPR55 et GPR119 (Fezza et al., 2014) ainsi que le récepteur nucléaire PPARα (Fu et al., 2003; Lo Verme et al., 2005). Plusieurs travaux suggèrent que l'OEA régule négativement la prise alimentaire et la lipogenèse (Di Marzo and Matias, 2005; Fu et al., 2003; Oveisi et al., 2004) pendant que le PEA a montré des effets anti-inflammatoires et protecteurs sur les cellules (Re et al., 2007).

Le **2-OleylGlycerol** (**2-OG**), quant à lui, est un composé dérivé de la famille des MAG qui lie également le récepteur GPR119 (Syed et al., 2012).

3) Dégradation des ECs

a. Internalisation des ECs

La signalisation par les ECs se termine par leur inactivation, un processus intracellulaire ayant lieu suite à leur internalisation. Pour cela, un transporteur membranaire, l'AMT (Anandamide Membrane Transporter) va permettre la diffusion facilitée des molécules à travers la membrane plasmatique (Di Marzo et al., 1994; Hillard and Jarrahian, 2003). Ce transporteur initialement identifié comme étant spécifique de l'anandamide serait également capable de transporter d'autres ECs comme le 2-AG, le noladin ether, le virodhamine et le NADA (Wilson and Nicoll, 2002).

Une fois à l'intérieur de la cellule, les ECs vont subir une hydrolyse dépendante de leur nature chimique.

b. Dégradation de l'AEA

La FAAH, localisée au niveau du RE, est l'enzyme majoritairement responsable de l'hydrolyse de l'AEA en acide arachidonique et éthanolamine, mais cette enzyme peut également, dans certains cas, être responsable de l'hydrolyse du 2-AG (Cravatt et al., 1996).

Une seconde FAAH, la FAAH 2 a également été identifiée chez l'Homme dans divers tissus périphériques mais pas chez la souris (Muccioli, 2010). Enfin, il existe une troisième enzyme capable d'hydrolyser l'AEA, la NAAA (*N*-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase) fortement exprimée au sein des cellules immunitaires (Muccioli, 2010) (**Figure 21**).

c. Dégradation du 2-AG

Bien que le 2-AG soit un substrat de la FAAH, la voie majoritaire de dégradation de cet EC implique les MAGLs (Dinh et al., 2002) entrainant la libération de glycérol et d'acide arachidonique (Muccioli, 2010). Ces enzymes ont été retrouvées à la fois aux niveaux membranaire et cytoplasmique. D'autre part, deux autres enzymes capables de dégrader le 2-AG ont récemment été découvertes : les hydrolases ABHD 6 et 12 (Blankman et al., 2007) (**Figure 22**).

d. Devenir des endocannabinoïdes

L'éthanolamine issue de la dégradation de l'AEA, le glycérol issu de la dégradation du 2-AG et l'acide arachidonique commun à la dégradation des deux ECs vont ensuite être recyclés au sein des phospholipides membranaires.

Une voie alternative consiste en leur conversion en médiateurs lipidiques sous l'action des lipooxygénases, des cyclooxygénases et des cytochromes P450 oxydases catalysant des réactions d'oxydation de ces composés (Kozak and Marnett, 2002; Muccioli, 2010; Rouzer and Marnett, 2008) (**Figure 21 et 22**). Ces produits issus de l'oxydation des ECs ont d'ailleurs montré des activités biologiques *via* une action sur des récepteurs différents de ceux liant les ECs (Maccarrone et al., 2015).

D. Voies de signalisation régulées par les CBR

Une fois activés par leurs ligands, les récepteurs CBR vont permettre le recrutement des protéines Gi pour moduler plusieurs voies de signalisation intracellulaires (**Figure 23**).Depuis quelques années, de nombreux travaux suggèrent également une deuxième vague de signalisation dépendante des β-arrestines

1) ***Principales voies de signalisation intracellulaires régulées par les protéines G***

a. ***Modulation de l'activité de l'adénylate cyclase***

L'une des réponses cellulaires les plus classiques à l'activation des CBR est l'inhibition de l'adénylate cyclase et par conséquent l'inhibition de la synthèse d'AMPc (Howlett and Fleming, 1984) (**Figure 23**). Toutefois, il a également été montré que l'activation des récepteurs CB1R de cellules traitées à la toxine pertussique (inhibiteur des protéines Gi) conduit à la stimulation de l'adénylate cyclase suggérant donc que dans certains cas, les récepteurs CBR pourraient être couplés à des protéines Gs lorsque les protéines Gi sont indisponibles (Abadji et al., 1999; Calandra et al., 1999; Glass and Felder, 1997; Kearn et al., 2005). Cependant la réalité physiologique de ce type de recrutement n'a pas été démontrée d'autant plus que Mukhopadhyay *et al*. n'ont pas réussi à co-immunoprécipiter d'autres types de protéines G que les Gi avec les récepteurs CB1R (Mukhopadhyay et al., 2000).

b. ***Modulation des MAP kinases***

Outre la modulation de l'activité de l'adénylate cyclase par le biais des protéines Gi, les cannabinoïdes sont également capables de moduler des voies de signalisation impliquant par exemple la famille des MAPK telle que p44/42 (Bouaboula et al., 1995), p38 et JNK (Liu et al., 2000; Rueda et al., 2000) (**Figure 23**).

c. ***Activation de la voie PI3K/Akt***

La stimulation des récepteurs CB1R pourrait également être à l'origine d'une modulation de la voie PI3K/Akt comme le suggère l'activation de la PKB, dépendante des protéines Gi, par des agonistes CB1R (Gómez del Pulgar et al., 2000) (**Figure 23**).

d. ***Modulation de l'activation des canaux ioniques***

Les récepteurs CB1R sont couplés à certains canaux ioniques dont ils peuvent moduler l'activité. Ainsi, il a été montré que les CB1R sont capables d'inhiber des canaux calciques sensibles au potentiel de type L, N et P/Q (Caulfield and Brown, 1992) et de stimuler les canaux potassiques (Henry and Chavkin, 1995) (**Figure 23**). La modification de l'activité des canaux va jouer un rôle primordial dans les propriétés neuromodulatrices des ECs.

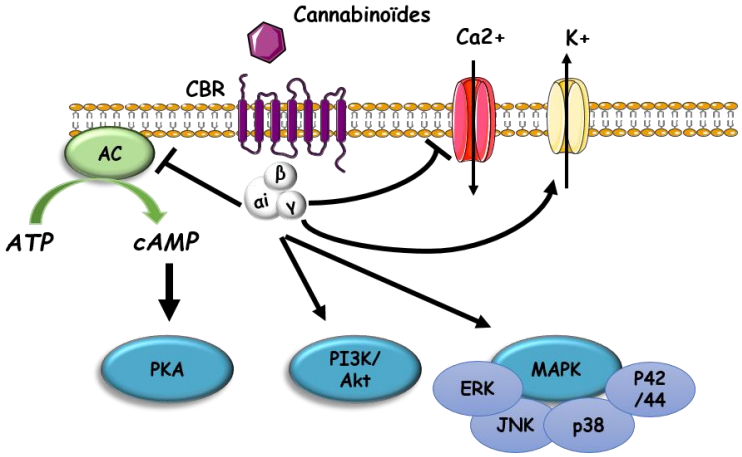


***Figure 23*: Voies de signalisation des CB1R régulées par les protéines G**
(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical Art)

2) *Signalisation dépendante des β-arrestines*

Il existe 4 isoformes des β-arrestines mais il semblerait que seuls les isoformes 1 et 2 soient impliqués dans la signalisation par les CB1R. Ainsi, la β-arrestine 2 serait majoritairement impliquée dans la désensibilisation et l'internalisation des CB1R suite à la phosphorylation du récepteur par des kinases (G protein-coupled Receptor Kinases, GRK) (**Figure 24**). Néanmoins, même la forme internalisée du CB1R serait capable d'activer la voie des MAPK (Nguyen et al., 2012; Nogueras-Ortiz and Yudowski, 2016)
La β-arrestine 1, quant à elle, conduit à une régulation de la transcription de gène et de la synthèse protéique *via* l'activation de différentes kinases (Delgado-Peraza et al., 2016; Nogueras-Ortiz and Yudowski, 2016) (**Figure 24**).

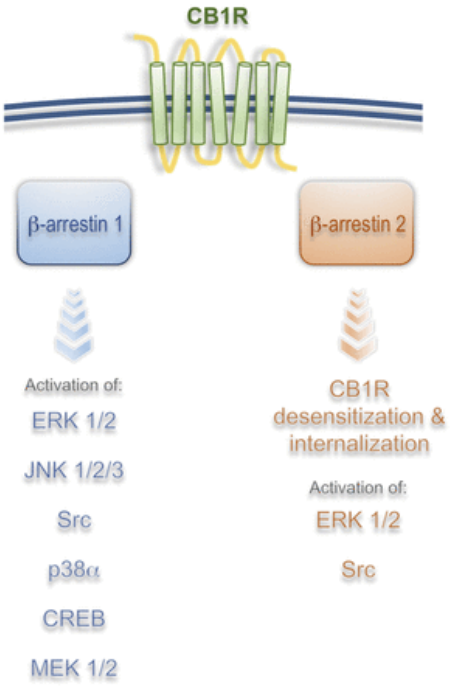


***Figure 24*: Voies de signalisation des CB1R régulées par les β-arrestines**
(Nogueras-Ortiz and Yudowski, 2016)

E. Modulation de la transmission synaptique

Les récepteurs CB1R sont parmi les récepteurs couplés aux protéines G les plus abondants dans le cerveau avec une densité comparable à celle des canaux à l'Acide γ-AminoButyrique (γ-AminoButyric Acid, GABA) et au glutamate (Howlett et al., 2004). Bien que la présence des CB1R ait été mise en évidence dans l'environnement neuronal et plus précisément sur les cellules gliales, c'est au niveau des terminaisons présynaptiques neuronales que ces récepteurs sont majoritaires et où ils sont impliqués dans les processus de neuromodulation rétrograde (Katona et al., 1999; Nyíri et al., 2005). En effet, au cours d'une activation synaptique induisant une dépolarisation postsynaptique, on assiste à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui déclenche la synthèse des ECs. Ces derniers sont alors directement libérés dans la fente synaptique pour agir sur les CB1R présents sur la membrane des terminaisons présynaptiques (action rétrograde) (Di Marzo and Deutsch, 1998; Howlett, 2002). L'activation des récepteurs CB1R par les ECs va ensuite conduire à la modulation de l'activité des canaux calciques des terminaisons présynaptiques (vu précédemment) à l'origine d'une inhibition de libération de neurotransmetteurs inhibiteurs comme le GABA ou stimulateurs comme le glutamate (Gerdeman and Lovinger, 2001; Hoffman and Lupica, 2000) et par conséquent à la modulation de l'activité synaptique (**Figure 25**). La réduction de la fréquence de décharge neuronale associée à une diminution de la durée du potentiel d'action a pour conséquence une mise sous silence transitoire des neurones exprimant les CB1R. Ainsi, l'activation des CB1R neuronaux par les cannabinoïdes, en modulant la transmission synaptique, est à l'origine de différents effets psychotropes tels que l'hypolocomotion, l'analgésie et l'hyperphagie (Costa et al., 1999).

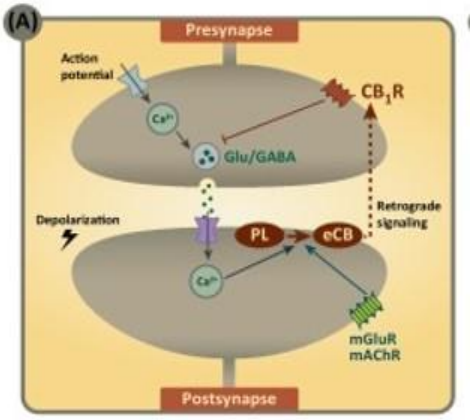


***Figure 25**: Modulation de la transmission synaptique par les endocannabinoïdes*
(Mazier et al., 2015)

F. SEC central et prise alimentaire

Des observations reportées en 1975 par Abel (Abel, 1975) ont indiqué que les consommateurs de cannabis se nourrissaient davantage que les non consommateurs suggérant ainsi l'effet orexigène du principe actif du cannabis, le Δ9-THC. Ces résultats ont ensuite été confirmés par Greenberg *et al.* qui montrent qu'en

plus de l'augmentation de la prise alimentaire, la consommation de marijuana est également associée à une prise de poids (Greenberg et al., 1976). C'est depuis cette découverte que la communauté scientifique s'intéresse à l'action centrale du SEC sur la prise alimentaire.

Une stimulation pharmacologique du SEC par administration du cannabinoïde exogène, le Δ9-THC entraine une hyperphagie à partir d'une dose de 0,5 mg/kg (Williams et al., 1998). De façon intéressante, l'anandamide, même à très faible dose, a montré des effets orexigènes similaires (Hao et al., 2000).

1) Modulation du tonus endocannabinoïde central en fonction de l'état nutritionnel

Il est maintenant clairement établi que le SEC est activé en réponse à des situations de stress ou des situations nocives pour l'organisme afin de restaurer l'homéostasie corporelle. Ainsi, il a été montré que ce système est activé suite à une période de privation alimentaire afin de rétablir l'homéostasie énergétique par un mécanisme adaptatif qui consiste en l'induction de la prise alimentaire.

En effet, le rôle spécifique des CB1R dans les mécanismes de régulation de la prise alimentaire a rapidement été mis en évidence. Suite à une période transitoire de privation alimentaire, des souris déficientes pour le récepteur CB1R se nourrissent moins que les souris sauvages (Di Marzo et al., 2001). De plus, les niveaux d'ECs sont augmentés et maximaux dans l'hypothalamus et le noyau accumbens chez des rongeurs suite à une privation alimentaire, normalisés au cours de la réalimentation et minimaux suite à la prise alimentaire (Di Marzo et al., 2001; Kirkham et al., 2002).

Le tonus endocannabinoïde cérébral semble également être régulé par certaines hormones périphériques telles que la leptine et la ghréline. En effet, une corrélation inverse entre les niveaux hypothalamiques d'ECs et les niveaux circulants de leptine a été observée (Di Marzo et al., 2001). Une étude suggère que la leptine est capable d'augmenter la dégradation de l'anandamide en stimulant l'expression de l'enzyme de dégradation, la FAAH (Maccarrone et al., 2003). En parallèle, une signalisation défectueuse de la leptine dans l'hypothalamus a été associée à l'activation des CB1R puisque le blocage périphérique de ces récepteurs conduit à une restauration la sensibilité à l'hormone (Tam et al., 2017).

Concernant la ghréline, des travaux ont mis en évidence une corrélation positive entre les niveaux hypothalamiques d'ECs et l'augmentation des niveaux circulants de ghréline après une période de privation alimentaire (Tucci et al., 2004). En réponse, il a été montré que la ghréline augmente les niveaux hypothalamiques d'ECs (Kola et al., 2008).

2) Contrôle hédonique et homéostatique de la prise alimentaire

Les ECs, en agissant *via* les CB1R centraux, seraient capables de contrôler la prise alimentaire à deux niveaux : d'une part sur la composante hédonique c'est-à-dire sur la motivation à s'alimenter en

interagissant avec la voie mésolimbique impliquant des mécanismes de récompense et d'autre part sur la composante homéostatique de la prise alimentaire *via* une action « à la demande » au niveau de l'hypothalamus impliquant la régulation de médiateurs orexigéniques et anorexigéniques en vue de répondre aux besoins énergétiques et de maintenir l'homéostasie énergétique (Di Marzo and Matias, 2005; Harrold and Williams, 2003). En effet, en plus d'avoir été détectés dans les noyaux hypothalamiques, les récepteurs CB1R ont été identifiés dans le noyau accumbens (González et al., 1999; Robbe et al., 2002). La preuve de l'implication de différentes zones cérébrales a été apportée par des études indiquant que l'injection d'ECs dans des noyaux hypothalamiques ou dans le noyau accumbens entraine une stimulation de la prise alimentaire chez des animaux en pré-satiété (Cota et al., 2003; Jamshidi and Taylor, 2001). A l'inverse, le blocage des CB1R par le Rimonabant semble limiter cet effet orexigène (Jamshidi and Taylor, 2001).

G. SEC et obésité

1) *Hyperactivation du SEC au cours de l'obésité*

La mise en évidence d'une augmentation de la prise alimentaire en réponse à une augmentation du tonus endocannabinoïde dans différentes régions du cerveau a ensuite amené la communauté scientifique à s'interroger sur les effets de ce système dans des pathologies associées à des désordres métaboliques tels que l'obésité et le syndrome métabolique. En effet, une augmentation du tonus endocannabinoïde cérébral est retrouvée au cours de l'obésité chez des souris db/db et ob/ob (Di Marzo et al., 2001).

L'hyperactivation du SEC a également été retrouvée au niveau périphérique avec une augmentation des niveaux circulants et tissulaires d'ECs, une modification de l'expression des récepteurs et une modulation de l'activité des enzymes de synthèse et de dégradation. Chez l'Homme, de nombreuses études rapportent une augmentation des niveaux circulants d'AEA et/ou 2-AG ainsi qu'une modification de l'expression des gènes codant pour les CB1R et les enzymes de synthèse/dégradation (Blüher et al., 2006; Côté et al., 2007; Engeli et al., 2005). De plus, ces études suggèrent une corrélation positive entre les niveaux circulants d'ECs et des marqueurs de l'obésité tels que l'IMC, le tour de taille, la masse grasse viscérale ainsi que la résistance à l'insuline.

Chez le rongeur, un régime riche en graisses conduit également à une modulation du tonus endocannabinoïde et de l'expression des gènes du SEC dans plusieurs tissus périphériques chez la souris (Jourdan et al., 2010; Starowicz et al., 2008; Tam et al., 2010) et le rat Zucker (Iannotti et al., 2013; Jourdan et al., 2013). De plus, l'utilisation du modèle de souris déficientes pour le récepteur CB1R a apporté une preuve supplémentaire de l'implication de ces récepteurs dans le développement de l'obésité. En effet ces souris sont résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisses par rapport aux souris sauvages et présentent un phénotype sain (Osei-Hyiaman et al., 2005, 2008; Ravinet Trillou et al., 2004).

2) *Origines de l'augmentation du tonus endocannabinoïde au cours de l'obésité*

a. *Rôle des lipides d'origine alimentaire et endogène*

Parmi les facteurs impliqués dans la dérégulation du SEC au cours de l'obésité, l'augmentation de l'apport alimentaire et notamment l'augmentation de la proportion de lipides est un facteur majoritaire. En effet, les ECs étant des lipides synthétisés à partir d'acides gras à longue chaîne et que ces acides gras sont majoritairement apportés par l'alimentation, il n'est pas improbable de penser que l'apport de précurseurs augmente la synthèse endogène des ECs.

En lien avec l'augmentation de la quantité de lipides alimentaires, la composition lipidique du régime alimentaire semble également jouer un rôle important dans l'augmentation des niveaux d'ECs. En effet, un régime riche en oméga-6 et faible en oméga-3 conduit à une augmentation des niveaux d'AEA et 2-AG dans le cerveau de souris et de porcelets (Berger et al., 2001; Watanabe et al., 2003). De la même manière un régime riche en graisses à 8% d'acide linoléique entraine une augmentation des niveaux d'ECs aux niveaux hépatique et cérébral (Alvheim et al., 2012).

A l'inverse, une supplémentation en huile de Krill riche en oméga-3 diminue les niveaux d'ECs ainsi que ceux de leur précurseurs dans de nombreux tissus périphériques (Piscitelli et al., 2011). Dans une autre étude, un régime de 10 semaines à 5% de lipides présentant un rapport n-6/n-3 égal à 52,7 administré précocement à des souris entraine une diminution du tonus endocannabinoïde hépatique en comparaison à un régime présentant un rapport n-6/n-3 égal à 1,1 (Demizieux et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs suggèrent également que la diminution du tonus endocannabinoïde induite par le régime précoce est associée à des effets métaboliques bénéfiques qui persistent après un challenge hyperlipidique.

En parallèle du rôle joué par les acides gras du régime, les acides gras endogènes semblent également être capables de réguler les taux d'endocannabinoïdes. En effet, il a été reporté que l'augmentation des niveaux d'AEA dans le foie au cours d'une obésité induite par un régime riche en graisses serait en partie due à une augmentation de la synthèse d'Acides Gras Mono-Insaturés (AGMI), des inhibiteurs puissants de la FAAH hépatique. Néanmoins, cette action serait spécifique des AGMI dérivés de la synthèse endogène par la Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) et non pas des AGMI dérivés du régime alimentaire (Liu et al., 2013).

Enfin, l'ingestion de graisses conduit à une augmentation des niveaux d'ECs dans le jéjunum de rats. Cet effet étant absent au cours d'une vagotomie suggère que la présence des lipides dans la cavité orale entraîne une réponse céphalique à l'origine de l'augmentation du tonus endocannabinoïde dans le jéjunum (DiPatrizio et al., 2011).

b. Développement de la résistance à l'insuline et à la leptine

Nous avons vu précédemment le rôle inhibiteur de la leptine sur la régulation des niveaux d'ECs cérébraux. Il est maintenant bien établi que l'obésité s'accompagne à la fois d'une augmentation des niveaux de leptine et d'une résistance à l'action de cette hormone. Ainsi, les travaux de Di Marzo *et al.* montrent qu'une signalisation défectueuse de la leptine chez des animaux obèses est associée à une augmentation du tonus endocannabinoïde cérébral. (Di Marzo et al., 2001).

De la même manière, il a été montré que l'insuline pouvait réguler négativement le tonus endocannabinoïde au niveau périphérique. Des études mettent en évidence une diminution des niveaux d'AEA en situation postprandiale chez des sujets sains (Engeli et al., 2014; Matias et al., 2006). De plus, les travaux d'Engeli et al. démontrent que des patients diabétiques présentent des taux d'AEA et 2-AG circulants supérieurs par rapport aux patients sains mettant ainsi en avant la nécessité d'une sensibilité à l'insuline dans la régulation des niveaux d'ECs. En accord avec cette observation, les travaux de Di Marzo *et al.* ont permis de mettre en évidence une diminution des niveaux d'AEA chez des patients normo-pondérés suite à une infusion d'insuline alors qu'elle n'est pas observable chez des patients diabétiques ce qui suggère une régulation des niveaux plasmatiques d'ECs par l'insuline (Di Marzo et al., 2009). Ainsi, les situations physiopathologiques conduisant à une résistance à l'insuline ou à la leptine telle que l'exposition prolongée à un régime riche en graisses semblent favoriser l'hyperactivation du SEC.

c. Polymorphisme génétique

Des polymorphismes de gènes du SEC ont été identifiés. En particulier, on distingue le polymorphisme de gène faux sens FAAH 385 A/A qui a été associé au surpoids et à l'obésité (Sipe et al., 2005) ainsi que l'existence de variants du gène CB1R associés au syndrome métabolique et à des dyslipidémies (Baye et al., 2008; Bordicchia et al., 2010).

Les données bibliographiques présentées jusqu'ici, supportent l'idée que les endocannabinoïdes, en activant principalement les CB1R, jouent un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique et dans les désordres métaboliques associés à l'obésité. Ainsi, des molécules pharmacologiques à action antagoniste visant spécifiquement les CB1R ont été développés en vue de traiter l'obésité et les pathologies associées.

3) Le Rimonabant, premier antagoniste CB1R anti-obésité

Le Rimonabant, premier antagoniste spécifique des récepteurs CB1R (Rinaldi-Carmona et al., 1995) à avoir été approuvé pour des fins thérapeutiques et commercialisé par Sanofi sous le nom d'Acomplia en Europe a montré des résultats probants chez des patients atteints d'obésité ou de surpoids.

Une grande étude (RIO, Rimonabant In Obesity) a été menée en parallèle sur plusieurs populations de patients présentant un surpoids ou une obésité traités ou non pour leur hyperlipidémie, soit plus de 6600 patients au total. Les résultats ont montré une diminution significative du poids et du tour de taille chez les patients traités par l'antagoniste à raison de 20 mg/kg/jour en association avec un régime hypocalorique par rapport aux patients traités par le placebo. En plus de la perte de poids observée, les patients ont également vu leur profil métabolique s'améliorer avec une augmentation du cholestérol HDL (High Density Lipoprotein) et des niveaux d'adiponectine circulants ainsi qu'une diminution des TG, de la glycémie à jeun et de l'hémoglobine glyquée ou HbA1c et enfin d'une amélioration de la résistance à l'insuline (Després et al., 2005; Van Gaal et al., 2005).

De la même manière, des études menées avec l'antagoniste sur des souris rendues obèses par un régime obésogène conduit à des effets similaires à ceux observés chez l'Homme. En effet, l'inactivation pharmacologique du récepteur chez des souris rendues obèses par un régime obésogène conduit à une diminution de la prise alimentaire et à une perte de poids. De plus, une amélioration des paramètres métaboliques a été observée chez ces souris telle qu'une diminution des niveaux circulants de leptine, d'insuline, du glucose, des AGL ainsi qu'une augmentation des niveaux circulants d'adiponectine et d'une amélioration de la résistance à l'insuline (Jourdan et al., 2010; Osei-Hyiaman et al., 2005, 2008; Poirier et al., 2005; Ravinet Trillou et al., 2003).

Cependant, les études cliniques chez l'Homme ont également révélé des effets secondaires psychotropes néfastes chez les patients traités par l'antagoniste comme la dépression, l'anxiété, des troubles du sommeil (Christensen et al., 2007) ainsi qu'une augmentation du risque de suicide. Ces effets néfastes ont conduit au refus de mise sur le marché aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) ainsi qu'à son retrait du marché Européen par l'EMA (European Medicines Agency) en 2008 après une autorisation de mise sur le marché en 2006.

Tableau 2 : Bilan des conséquences métaboliques et effets indésirables des études cliniques RIO
(Matias and Di Marzo, 2007)

	RIO-Europe [57]	RIO-Lipids [58]	RIO-North America [59]	RIO-Diabetes [60][b]
Obese patients	$n = 1507$	$n = 1036$	$n = 3045$	$n = 1047$
Patient characteristics	BMI ≥30 kg/m^2 or BMI >27 kg/m^2 with untreated hyperlipidemia	BMI 34 kg/m^2 with untreated hyperlipidemia	BMI ≥30 kg/m^2 or BMI >27 kg/m^2 with untreated hyperlipidemia	BMI ≥30 kg/m^2 with type 2 diabetes mellitus and treated hyperglycaemia
Weight (Δ, kg)	−4.7	−5.4	−4.7	−3.9
Waist (Δ, cm)	−4.2	−4.7	−3.6	−3.3
Triglycerides (% decrease)	15.1	12.4	13.2	16.4
HDL (% increase)	8.9	8.1	7.2	8.4
Glucose (Δ, mmol/l)	−0.11	−0.02	−0.04	−0.97
Insulin (Δ, μU/ml)	−2.8	−2.6	−2.8	−1.1
Main adverse events (Δ between the % observed in the rimonabant and placebo groups)	Dizziness: +3.8 Nausea: +8.6 Diarrhoea: +4.2 Insomnia: +2.4 Anxiety: +1.9 Depression: −0.3	Dizziness: +3.7 Nausea: +9.5 Diarrhoea: +3.1 Insomnia: +3.8 Anxiety: +4.9 Depression: +0.2	Dizziness: +1.6 Nausea: +5.4 Diarrhoea: +0.2 Insomnia: +1.4 Anxiety: +4.0 Depression: +2.1	Dizziness: +4.0 Nausea: +6.0 Diarrhoea: +0.0 Insomnia: +0.0 Anxiety: +2.0 Depression: +2.1
Adverse events leading to discontinuation (Δ between the % observed in the rimonabant and placebo groups)	Dizziness: +0.3 Nausea: +2.3 Diarrhoea: +0.5 Insomnia: +0.2 Anxiety: +0.7 Depression: +0.7	Dizziness: +0.9 Nausea: +1.2 Diarrhoea: +0.6 Insomnia: +0.0 Anxiety: +1.1 Depression: +3.5	Dizziness: +0.5 Nausea: +0.7 Diarrhoea: +0.0 Insomnia: +0.3 Anxiety: +0.7 Depression: +0.9	Dizziness: +0.9 Nausea: +1.2 Diarrhoea: +0.0 Insomnia: +0.0 Anxiety: +0.6 Depression: +2.1

[a]Summary of the main results of clinical trials performed to date on rimonabant in obesity (RIO) in different types of obese populations (results after one year of treatment with 20 mg/d) [57–60].
[b]In the RIO Diabetes study an average decrease of 0.7% of glycated haemoglobin (Hb1c), on top of that induced by treatment with metformin or sulphonylurea, was also observed [60].

4) *Le SEC périphérique comme nouvelle cible thérapeutique*

L'intérêt d'étudier les conséquences de l'activation du SEC au niveau périphérique a pris une importance considérable suite aux études menées sur le blocage pharmacologique ou génétique des récepteurs CB1R et des effets associés. En effet, en plus des effets positifs d'un blocage pharmacologique des récepteurs, plusieurs études menées sur des souris déficientes pour les récepteurs CB1R ont montré qu'elles sont résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisses et présentent un phénotype sain qui se traduit par une perte de poids, une diminution de la masse grasse, un meilleur profil glucidique, une meilleure tolérance au glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline par rapport aux souris sauvages (González-Mariscal et al., 2016; Osei-Hyiaman et al., 2008; Ravinet Trillou et al., 2004).

A l'inverse, l'activation des CB1R par divers agonistes conduit à une baisse de la tolérance au glucose chez des rats Wistar alors qu'un prétraitement par un antagoniste contrecarre l'effet de l'agoniste sur la tolérance au glucose (Bermúdez-Siva et al., 2006). Ainsi, il semblerait que l'activation des récepteurs CB1R exerce des effets négatifs sur l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline alors que le blocage de ces récepteurs permet en partie d'améliorer ces facteurs métaboliques.

L'ensemble de ces études menées en parallèle par différentes équipes a relevé que la perte de poids observée suite à l'inactivation des récepteurs CB1R de manière pharmacologique ou génétique ne pouvait être uniquement la conséquence d'une diminution de la prise alimentaire mais impliquait également des changements métaboliques permettant de potentialiser et de soutenir la perte de poids. En effet, l'observation d'une perte de poids importante associée uniquement à une réduction transitoire de la prise alimentaire suite à l'inactivation génétique ou pharmacologique des CB1R a permis d'émettre l'hypothèse d'une action périphérique du blocage des récepteurs en plus de l'action centrale sur la prise alimentaire (Poirier et al., 2005; Ravinet Trillou et al., 2003). Cette hypothèse a d'autant plus été soutenue par la mise en évidence du SEC dans de nombreux tissus périphériques comme le foie, le muscle, le TA, le pancréas, le tractus gastro-intestinal par l'identification des récepteurs (CB1R et CB2R), des enzymes de synthèse et de dégradation ainsi que des ligands (Casu et al., 2003; Crespillo et al., 2011; Demizieux et al., 2016; Duncan et al., 2008; Starowicz et al., 2008). De plus, plusieurs études démontrent une hyperactivation du SEC dans des tissus périphériques au cours de l'obésité (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2008; Starowicz et al., 2008) et le développement d'antagonistes CB1R à action périphérique a permis de confirmer ces hypothèses puisque ces composés se sont révélés au moins aussi efficaces que le Rimonabant dans des études précliniques effectuées chez des rongeurs obèses et/ou diabétiques(Cluny et al., 2010; Hsiao et al., 2015; Jourdan et al., 2013; Tam et al., 2010, 2012). Ainsi, l'activation du SEC au niveau de ces organes périphériques pourrait concourir à la dérégulation du métabolisme énergétique observée au cours de la pathologie. Parmi ces tissus, on distingue le pancréas, le tractus gastro-intestinal, le muscle, le foie et le TA.

5) SEC et pancréas

a. Identification du SEC dans les ilots

Plusieurs études menées en parallèle sur l'Homme et la souris ont permis de mettre en évidence la présence des CBR ainsi que la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse et à la dégradation des ECs au sein des îlots pancréatiques. Cependant, des divergences existent quant à la localisation des récepteurs sur les cellules α et β. Certaines suggèrent une localisation CB1R uniquement sur les cellules α (Juan-Picó et al., 2006) alors que d'autres études suggèrent une localisation à la fois sur les deux types cellulaires (Kim et al., 2011; Starowicz et al., 2008).

In vitro, l'utilisation de cellules β issues d'insulinomes (RIN-m5F ou MIN6) ont permis de mettre en évidence d'une part la présence des gènes codant pour les CB1R et CB2R ainsi que de leurs protéines mais également des gènes codant pour la machinerie enzymatique du SEC (Li et al., 2010; Matias et al., 2006).

b. SEC et activité β-pancréatique

Le pancréas joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie glucidique mais il semblerait que l'activation du SEC dans ce tissu conduise à une altération de la fonction β-pancréatique (**Figure 27**).

D'une part, la stimulation des CB1R est à l'origine d'une augmentation de l'activité apoptotique et de la mort cellulaire suite à une interaction physique entre le récepteur à l'insuline et les CB1R et une signalisation défectueuse de la voie Akt. Ceci entraine une diminution de la phosphorylation inhibitrice de Bad, et par conséquent, à une augmentation de son activité apoptotique. (Kim et al., 2012). A l'inverse, le blocage des récepteurs CB1R de manière génétique ou pharmacologique conduit à une augmentation de la prolifération et de la masse des cellules β-pancréatique *via* une augmentation du signal insulinique IRS2-Akt (Kim et al., 2011). Un rôle des macrophages environnants dans l'induction de l'apoptose des cellules β suite à l'activation du NLRP3 inflammasome par les CB1R et du relargage d'IL1-β par la caspase 1 activée a été proposé par Jourdan T. et al. (Jourdan et al., 2013).

D'autre part, une altération de la fonction sécrétrice du pancréas a été observée suite à l'activation du SEC. Cependant les données de la littérature restent controversées. En effet, certaines études suggèrent une inhibition de la sécrétion d'insuline gluco-dépendante suite à l'activation des CB1R *via* une inhibition des oscillations calciques au sein d'ilots pancréatiques murins (Juan-Picó et al., 2006; Nakata and Yada, 2008). En accord avec ces travaux, il semblerait que des souris déficientes pour les CB1R sont plus sensibles à l'action du peptide GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1) sur la sécrétion d'insuline gluco-dépendante. De plus, l'activation des CB1R dans des ilots pancréatiques humains ou murins diminue la sécrétion d'insuline induite par le GLP-1 et cet effet est prévenu par le blocage des CB1R (González-Mariscal et al., 2016).

A l'inverse, d'autres données suggèrent une stimulation de la sécrétion d'insuline suite au traitement de cellules β-pancréatiques par des agonistes CB1R en favorisant la mobilisation du calcium intracellulaire (De Petrocellis et al., 2007; Li et al., 2010; Matias et al., 2006). Des études sur des îlots humains ont également confirmé l'effet stimulateur des agonistes CB1R sur la sécrétion d'insuline basale ou induite par le glucose (Bermúdez-Silva et al., 2008). Ces résultats sont confortés par le fait qu'un blocage des CB1R conduit à une inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Getty-Kaushik et al., 2009) *via* une activation du complexe mTORC1 (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) (Bermudez-Silva et al., 2016).

Puisque qu'au cours de l'obésité, on assiste à une altération de la fonction β-pancréatique avec une perte des cellules β associée à une dérégulation de la sécrétion d'insuline (DeFronzo, 2009) et que le blocage pharmacologique (Jourdan et al., 2013; Rohrbach et al., 2012) ou génétique (Jourdan et al., 2017a) des CB1R chez des animaux obèses améliore ces paramètres, ceci suggère un rôle du SEC sur l'altération de la fonction β-pancréatique au cours de l'obésité.

6) SEC et tractus GI

a. Identification du SEC dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal

Les premières études relatives aux effets de l'activation du SEC sur la prise alimentaire avaient déjà permis de suggérer la présence du SEC dans le tractus gastro-intestinal et son implication dans la régulation de la prise alimentaire *via* une modulation de la communication intestin-cerveau. Plus tard, la présence des CB1R et CB2R a été mise en évidence dans différentes parties du tractus gastro-intestinal chez la souris et l'Homme (Casu et al., 2003; Croci et al., 1998; Storr et al., 2002; Troy-Fioramonti et al., 2015; Wright et al., 2005). Les enzymes de dégradation des ECs, la FAAH et la MAGL ont également été détectées au sein du tractus gastro-intestinal du rongeur (Capasso et al., 2005; Duncan et al., 2008; Katayama et al., 1997). Enfin, il semblerait que les niveaux d'ECs varient en fonction de la partie du tractus intestinal considérée. Alors que les niveaux de 2-AG sont plus importants dans l'intestin grêle que dans le colon de la souris, les niveaux d'AEA sont quant à eux plus élevés dans le colon que dans l'intestin grêle (Pinto et al., 2002).

b. Conséquences de l'activation du SEC sur le tractus gastro-intestinal

L'obésité est associée à une dérégulation du SEC au niveau du tractus gastro-intestinal qui se traduit par une augmentation du tonus endocannabinoïde dans l'intestin grêle de rats Zucker ou de souris rendues obèses par un régime obésogène (Diet Induced Obesity, DIO) (Izzo et al., 2009). Il semblerait que les modifications du microbiote intestinal observées au cours de l'obésité puissent être à l'origine de la dérégulation de l'activité du SEC (Cani et al., 2016). Les travaux de Muccioli *et al*. montrent qu'une modification du microbiote intestinal par différentes stratégies conduit à une modulation de l'expression des CB1R, une diminution des niveaux d'AEA et une augmentation de l'expression de son enzyme de dégradation, la FAAH au niveau du colon. Enfin, une corrélation positive entre la baisse du LPS plasmatique, les niveaux d'AEA et l'expression des CB1R a été observée chez ces animaux suggérant ainsi un rôle du SEC dans la perméabilité intestinale. En effet, ces travaux ont montré que l'activation des CB1R altère la fonction barrière de l'intestin en augmentant la perméabilité intestinale. Ces effets sont néanmoins abrogés par le blocage des récepteurs par le Rimonabant (Muccioli et al., 2010).

Dans une autre étude, l'administration de bactéries *Akkermansia muciniphila* à des souris sous régime enrichi en graisses conduit à une augmentation des niveaux intestinaux de 2-AG, une amélioration de la fonction barrière de l'intestin et une diminution de l'endotoxémie métabolique suggérant ainsi un rôle protecteur du 2-AG sur la fonction barrière de l'intestin. A l'inverse, l'AEA semblerait plutôt avoir un effet néfaste sur ce paramètre (Everard et al., 2013).

Cette dérégulation de l'activité du SEC est associée à une diminution de l'ensemble du transit gastro-intestinal (Carai et al., 2006) en commençant par la vidange gastrique (Abalo et al., 2011), le transit dans l'intestin grêle (Troy-Fioramonti et al., 2015) et la propulsion colique (Pinto et al., 2002) (**Figure 27**).

D'autre part, l'activation des CB1R est associée à une modulation des sécrétions hormonales telle qu'une augmentation de la sécrétion de ghréline par les cellules gastriques (Senin et al., 2013; Zbucki et al., 2008) et une modulation de la sécrétion d'incrétines par les cellules intestinales. Alors qu'une étude montre que l'activation des CB1R sur des cultures primaires d'intestin conduit à une diminution de la sécrétion du peptide GIP (Gastric Inhibitory Peptide) uniquement (Moss et al., 2012), une autre étude menée *in vivo* suggère que l'injection d'anandamide conduit à une diminution de la sécrétion des deux hormones GIP et GLP-1 au cours d'un test de tolérance oral au glucose (Troy-Fioramonti et al., 2015). Les travaux de González-Mariscal *et al.* montrent également une augmentation de la concentration plasmatique postprandiale en GLP-1 chez des souris $CB1R^{-/-}$ par rapport à des souris $CB1R^{+/+}$(González-Mariscal et al., 2016) (**Figure 27**).

A l'inverse, le blocage des CB1R par le Rimonabant chez des animaux obèses conduit à une augmentation du transit gastro-intestinal (Sun and Chen, 2012) et à une diminution de la sécrétion de la ghréline (Cani et al., 2004).

7) SEC et muscle

a. Identification du SEC dans le muscle squelettique

La présence du SEC dans le muscle squelettique a été confirmée par la présence des récepteurs CBR et TRPV1 ainsi que des enzymes de synthèse et de dégradation des ECs à la fois chez l'Homme et le rongeur (Cavuoto et al., 2007a; Crespillo et al., 2011).

Au cours de l'obésité induite par un régime riche en graisses, on assiste à une profonde modification de l'expression des gènes du SEC ainsi que du tonus endocannabinoïde. Cependant, les données obtenues apportent des résultats différents en fonction de l'espèce, du type de muscle ou cellule musculaire ainsi que du régime utilisé mais on assiste dans tous les cas à une dérégulation du système (Crespillo et al., 2011; Engeli et al., 2014; Lindborg et al., 2010; Matias et al., 2008).

b. Effet de l'activation du SEC sur le métabolisme musculaire

Il est maintenant bien décrit que l'activation des CB1R musculaires conduit à une diminution du captage du glucose à la fois basal et insulino-dépendant (Lindborg et al., 2010). Cet effet est reversé par l'antagoniste des CB1R, le Rimonabant (Esposito et al., 2008; Lindborg et al., 2010; Liu et al., 2005). Ces effets pourraient dépendre d'une altération de la voie de signalisation insulinique puisque les travaux d'Eckardt *et al.* montrent une diminution de la phosphorylation d'Akt (S473) ainsi qu'une augmentation de

la phosphorylation inhibitrice du résidu S307 de l'IRS suite au traitement de cellules musculaires squelettiques par l'AEA (Eckardt et al., 2009). De plus, les travaux d'Esposito *et al.* ont clairement montré que l'effet stimulateur du Rimonabant sur le captage du glucose est dépendant d'une induction de la voie PI3K/Akt (Esposito et al., 2008).

D'autre part, il a également été montré que les ECs sont capables de réguler l'oxydation dans le muscle squelettique. Ainsi, des souris ob/ob traitées pendant une semaine par le Rimonabant voient leur consommation basale d'oxygène augmenter (Liu et al., 2005). De plus, *in vitro*, le traitement de myotubes primaires humains par l'AEA contrecarre l'effet stimulateur de l'antagoniste CB1R spécifique, l'AM251 sur l'expression de l'AMPK (Adenosine MonoPhosphate Kinase). Or, il a été montré qu'une augmentation de l'expression de l'AMPK dans des myotubes est associée à une augmentation de l'oxydation des acides gras (Cavuoto et al., 2007b).

Enfin, les travaux de Tedesco L. *et al.*, montrent que le traitement par l'ACEA (un agoniste synthétique sélectif des CB1R) de souris obèses conduit à une diminution de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale tels que eNOS (Endothelial Nitric Oxyde Synthase), PGC-1α (PPARγ Coactivator 1-α), NRF-1 (Nuclear Respiratory Factor 1), Tfam (Transcription Factor A, Mitochondrial) ainsi que la quantité d'ADN mitochondrial. De plus, une diminution de l'expression de gènes relatifs à l'oxydation tels que COX IV (Cytochrome C Oxydase IV) et le Cytochrome C ainsi qu'une diminution de l'activité de la citrate synthase ont été observées (Tedesco et al., 2010).

Finalement, ces données suggèrent que le SEC est impliqué dans l'altération du métabolisme musculaire au cours de l'obésité (**Figure 27**).

8) SEC et foie

a. Hyperactivation du SEC et atteintes hépatiques

En situation non pathologique, de faibles niveaux d'expression des récepteurs CB1R ont été retrouvés chez l'Homme comme chez l'animal (Osei-Hyiaman et al., 2005). Les récepteurs CB2R n'ont quant à eux pas été détectés dans le foie murin et humain (Julien et al., 2005; Teixeira-Clerc et al., 2010). Cependant, il semblerait que le foie sain soit capable de produire des ECs puisque de l'AEA et du 2-AG ont été détectés chez le rongeur (Bátkai et al., 2007; Demizieux et al., 2016; Vähätalo et al., 2015).

Au cours de l'obésité induite par un régime riche en graisses chez des souris, on assiste à une hyperactivation du SEC avec une augmentation des CB1R, une diminution de l'activité de la FAAH, ainsi qu'une augmentation significative des niveaux d'AEA (Jourdan et al., 2010; Osei-Hyiaman et al., 2005). D'autre part, l'expression des CB1R est fortement induite dans le foie de patients présentant des atteintes hépatiques (Liu et al., 2012a; Teixeira-Clerc et al., 2006). Quant aux récepteurs CB2R, une surexpression

a été observée dans le foie de souris obèses (Deveaux et al., 2009) et au cours de la fibrogenèse hépatique chez l'Homme (Julien et al., 2005).

b. SEC et stéatose hépatique

L'accumulation de lipides hépatiques au cours de l'obésité a fortement été corrélée à l'hyperactivation du SEC au sein du foie. En effet, le traitement de souris par l'agoniste synthétique CBR, le HU-210, conduit à une augmentation de la synthèse lipidique ainsi qu'à une augmentation significative de gènes clés impliqués dans la lipogenèse *de novo*, le facteur de transcription SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) et ses gènes cibles FAS (Fatty Acid Synthase) et ACC (Acetyl-CoA Carboxylase) (Osei-Hyiaman et al., 2005). A l'inverse, le blocage des CB1R par le Rimonabant reverse la stéatose hépatique (Gary-Bobo et al., 2007; Osei-Hyiaman et al., 2005). Des souris déficientes pour le récepteur CB1R spécifiquement au niveau hépatique ($LCB1R^{-/-}$), bien qu'obèses, ne développent pas de stéatose hépatique sous régime enrichi en lipides suggérant ainsi un rôle fondamental des CB1R hépatiques dans le développement de la stéatose hépatique au cours de l'obésité (Osei-Hyiaman et al., 2008) (**Figure 27**).
Ces résultats ont également été confirmés *in vitro* puisque le traitement de cellules hépatiques murines ou humaines ou d'explants de foie par des agonistes CB1R, conduit à une augmentation de l'accumulation lipides et de l'expression des gènes de la lipogenèse (De Gottardi et al., 2010; Jourdan et al., 2012; Osei-Hyiaman et al., 2005).

c. SEC, fonction mitochondriale et β-oxydation

Le traitement aigu de souris par des agonistes CB1R conduit à une diminution de l'activité CPT1 (Carnitine PalmitoylTransferase 1) (Osei-Hyiaman et al., 2008) et à une diminution des niveaux de phosphorylation de l'AMPK (Tedesco et al., 2010). A l'inverse, l'inactivation pharmacologique ou génétique des CB1R conduit à une augmentation de l'activité de la CPT1 et de l'AMPK (Jeong et al., 2008; Jourdan et al., 2012; Osei-Hyiaman et al., 2008) ainsi qu'à une diminution du contenu hépatique en malonyl-CoA (Jourdan et al., 2012). Ainsi, il est fort probable que l'augmentation de l'activité de la CPT1 soit la conséquence d'une diminution de la synthèse de malonyl-CoA suite à l'inactivation de l'ACC *via* l'AMPK. En accord avec ces données, une augmentation de la β-oxydation et de la respiration mitochondriale a été observée suite au blocage des CB1R par le Rimonabant (Flamment et al., 2009; Jourdan et al., 2012). Enfin, Tedesco *et al.* ont montré, que l'activation des CB1R dans le foie conduit à une diminution de l'activité, de la biogenèse et de la masse mitochondriale (Tedesco et al., 2010) (**Figure 27**).

d. SEC et résistance à l'insuline

L'utilisation du modèle de souris déficientes pour le récepteur CB1R hépatique a permis de mettre en évidence l'implication de ces récepteurs dans la résistance à l'insuline (**Figure 27**). En effet, ces souris, bien qu'elles ne soient pas protégées de la prise de poids et d'une augmentation de l'adiposité sont protégées de la résistance à l'insuline induite par un régime obésogène (Osei-Hyiaman et al., 2008).

De plus, l'activation aigüe du SEC par l'anandamide ou prolongée suite à un régime riche en graisses chez des souris déficientes pour le récepteur CB1R dans lesquelles l'expression du récepteur a été rétablie uniquement au niveau hépatique (htgCB1R$^{-/-}$) conduit à une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose, ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline (Liu et al., 2012a). A l'inverse, les souris CB1R$^{-/-}$ et LCB1R$^{-/-}$ sont protégées ce qui suggère donc que les récepteurs CB1R hépatiques sont indispensables à la mise en place de la résistance à l'insuline globale et hépatique.

Cette résistance à l'insuline consécutive à l'activation des CB1R semble être dépendante de l'induction d'un stress du RE. En effet, une augmentation des niveaux protéiques de BIP (Binding Immunoglobulin Protein), phospho-PERK (protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase), phospho-eiF2α (Eukaryotic Initiation Factor 2-α), phospho-c-Jun et phospho-IRS1 (Ser 307) a été observée dans le foie des souris sauvages et htgCB1R$^{-/-}$ mais pas chez le souris CB1R$^{-/-}$ et LCB1R$^{-/-}$ sous régime riche en graisses. De la même manière l'activation aigüe des CB1R par l'anandamide conduit à l'induction d'un stress du RE. Il en résulte une diminution de l'activation de la voie Akt2 à en juger par une diminution de la phosphorylation des résidus Thr308 et Ser473 de l'Akt.

e. CB1R et production hépatique de glucose

La surexpression des CB1R hépatiques chez des souris CB1R$^{-/-}$ conduit à une augmentation de la production hépatique de glucose consécutive à une stimulation de la glycogénolyse comme le suggère l'augmentation de l'activité glycogène phosphorylase α (Liu et al., 2012a). La néoglucogenèse pourrait également participer à cette augmentation puisque les travaux de Chanda *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse dans des hépatocytes primaires humains suite au traitement par le 2-AG (Chanda et al., 2011) (**Figure 27**).

f. Rôle anti-inflammatoire de l'activation des CB2R

La stéatose hépatique associée à l'obésité s'accompagne généralement d'une inflammation qui peut conduire à terme à une fibrose. Ainsi, plusieurs travaux ayant étudié les effets du SEC sur la stéatohépatite ont montré une induction de l'expression des CB2R dans la fraction non parenchymale du foie (Deveaux et al., 2009; Julien et al., 2005; Teixeira-Clerc et al., 2010). Or, l'activation des CB2R protègerait de l'inflammation en favorisant une transition du phénotype pro-inflammatoire des macrophages vers un

phénotype anti-inflammatoire et en diminuant l'expression de l'IL1-β et du TNF-α (Louvet et al., 2011). De plus, l'activation des CB2R protège les souris des dommages hépatiques inflammatoires causés par ischémie-reperfusion alors que des souris déficientes pour ces récepteurs développent des dommages tissulaires plus importants et un phénotype pro-inflammatoire plus marqué que les souris sauvages (Bátkai et al., 2007). De la même façon, plusieurs études suggèrent un rôle fibrotique des CB1R (DeLeve et al., 2008; Teixeira-Clerc et al., 2006) et anti-fibrotique des CB2R (Julien et al., 2005; Muñoz-Luque et al., 2008).

9) SEC et tissu adipeux

a. Identification du SEC dans TAV

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence la présence du SEC au sein du TA, à la fois en détectant des ligands endogènes, l'AEA et le 2-AG (Gonthier et al., 2007), la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse et à la dégradation de ces ECs ainsi que des récepteurs CB1R et CB2R aussi bien dans le TAV que dans le TASC (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2006; Roche et al., 2006; Starowicz et al., 2008). Cependant, la présence du SEC n'a pu être démontrée que dans des adipocytes matures humains et murins et non dans les pré-adipocytes (Bensaid et al., 2003; Matias et al., 2006; Roche et al., 2006).

b. Hyperactivation SEC dans TA au cours de l'obésité

Les études s'intéressant à la dérégulation du SEC au sein du TA au cours de l'obésité ont conduit à des résultats divergents à la fois chez l'Homme et l'animal. Ainsi, plusieurs articles décrivent une augmentation des niveaux de 2-AG au sein du TAV ou péri-épididymaire chez la souris sous régime obésogène et chez des patients obèses pendant que les niveaux d'AEA restent similaires (Blüher et al., 2006; D'Eon et al., 2008; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2006). Néanmoins, au sein du TASC de souris obèses, les niveaux de 2-AG et d'AEA sont diminués (Izzo et al., 2009; Starowicz et al., 2008)

Concernant les CB1R, des études chez l'Homme suggèrent une diminution de l'expression du gène dans le TAV et TASC (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2006). Ces auteurs suggèrent une boucle de régulation négative de l'expression des CB1R suite à l'augmentation des niveaux circulants d'ECs (Engeli et al., 2005). Chez la souris DIO, de même que chez le rat Zucker, une augmentation de l'expression des CB1R dans les deux dépôts adipeux a été observée (Bensaid et al., 2003; Jourdan et al., 2010). Cependant, d'autres équipes n'ont relevé aucune différence d'expression des CB1R dans les TA de souris DIO en comparaison aux souris minces (D'Eon et al., 2008; Starowicz et al., 2008).

Des études sur l'activité des enzymes de dégradation au sein des TA montrent une augmentation de l'activité de la MAGL et de la FAAH au sein des deux dépôts chez des rats obèses par rapport aux rats minces (Cable et al., 2014). Cependant, l'analyse de l'expression des gènes suggère une diminution de

l'expression de la FAAH ainsi qu'une augmentation de l'expression de la DAGL, enzyme de synthèse du 2-AG, dans le TA péri-épididymaire de souris DIO (D'Eon et al., 2008). Ces résultats pourraient donc expliquer la régulation différentielle des niveaux d'ECs dans le TA au cours de l'obésité avec un métabolisme accéléré pour le 2-AG et relativement stable pour l'AEA. Ainsi, l'augmentation de la synthèse du 2-AG et donc son accumulation pourrait conditionner sa dégradation en activant la MAGL.

Dans le TA d'individus obèses, les études suggèrent l'absence de modification d'expression des gènes codant pour les enzymes du métabolisme du 2-AG : MAGL et DAGL et une baisse d'expression de la FAAH. (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2006). Ces résultats suggérent ainsi que l'augmentation des niveaux de 2-AG observés provienne plutôt d'une différence de biodisponibilité du précurseur.

Il se pourrait que l'hyperactivation du SEC dans le TA soit la conséquence d'un défaut de régulation hormonale. En effet, des études sur le TA ont permis de mettre en évidence un rôle majeur de l'insuline dans la régulation du métabolisme des ECs au sein du tissu (D'Eon et al., 2008). Alors que le traitement d'adipocytes insulinosensibles par l'insuline conduit à une diminution des niveaux d'ECs *via* une augmentation des enzymes de la dégradation (MAGL et FAAH) et une diminution de l'enzyme de synthèse NAPE-PLD, les adipocytes insulinorésistants sont insensibles à l'action de l'insuline sur l'expression de la FAAH et MAGL (D'Eon et al., 2008). Quoi qu'il en soit, au cours de l'obésité, on assiste à une dérégulation de l'activité du SEC du TA avec des conséquences directes sur le métabolisme adipocytaire mais également indirectes sur d'autres organes impliqués dans le métabolisme énergétique.

c. Rôles du SEC sur le métabolisme adipocytaire

i. SEC et différenciation adipocytaire

Plusieurs études suggèrent que le SEC est capable de réguler la différenciation adipocytaire. Alors que les CB1R ne sont pas détectables et les niveaux d'ECs sont faibles dans des pré-adipocytes, on assiste au début de la différenciation adipocytaire à une forte induction du tonus endocannabinoïde puis à une diminution des niveaux d'ECs et de l'expression des CB1R dans les adipocytes matures (Bensaid et al., 2003; Matias et al., 2008; Pagano et al., 2007). Le rôle de ces récepteurs dans la différenciation adipocytaire a d'ailleurs été précisé par une récente étude montrant que l'invalidation spécifique des CB1R dans les adipocytes se traduit par une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation dans le TA péri-épididymaire et par une diminution de la taille des adipocytes (Azua et al., 2017). En accord avec ces résultats, la capacité de l'AEA à stimuler la différenciation adipocytaire et à augmenter leur capacité à accumuler des lipides a été mise en évidence par plusieurs études (Bouaboula et al., 2005; Karaliota et al., 2009).

Cet effet serait consécutif à l'activation du facteur de transcription PPARγ (Bouaboula et al., 2005; Karaliota et al., 2009; Matias et al., 2006).

Ainsi, lorsque des pré-adipocytes sont traités par des antagonistes PPARγ, l'effet prolifératif de l'AEA est perdu (Bouaboula et al., 2005). De plus, il a été montré que l'activation de PPARγ conduit à une diminution de l'expression des CB1R et à une augmentation de la FAAH qui pourrait expliquer la réduction de l'activité du SEC observée en fin de différenciation (Matias et al., 2006). Il a également été suggéré que la leptine produite par les adipocytes différenciés était à l'origine de la diminution des niveaux d'ECs par rétrocontrôle négatif (Matias et al., 2006).

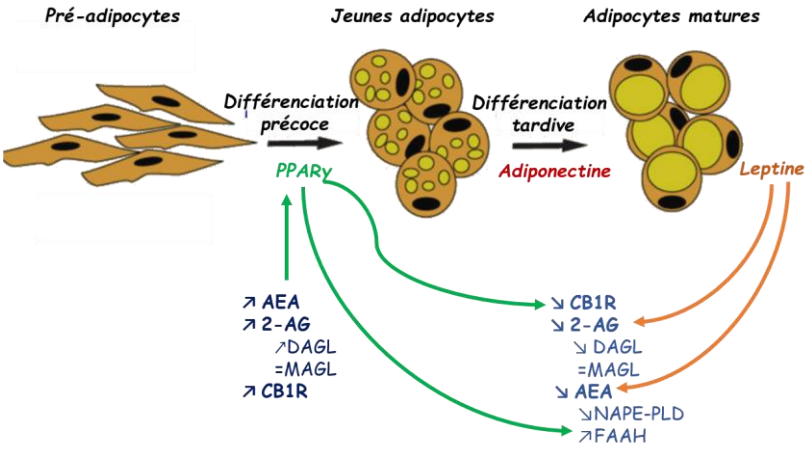


***Figure 26**: Rôle du SEC dans la différenciation adipocytaire*
D'après(Matias et al., 2006)

Finalement, ces données suggèrent que le SEC est suractivé juste avant la différenciation pour permettre l'induction de la différenciation et la lipogenèse probablement *via* l'activation du facteur de transcription PPARγ. A la fin de leur différenciation, les adipocytes matures par le biais de la production de leptine mais également l'activation précoce de PPARγ exerceraient un rétrocontrôle négatif à l'origine de la diminution de l'activité du SEC (**Figure 26**).

ii. SEC et lipogenèse

En plus de favoriser la différenciation adipocytaire, de nombreuses études démontrent un rôle lipogénique du SEC. Ainsi, l'activation des CB1R conduit à une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques et à une accumulation de lipides (Matias et al., 2006; Teixeira et al., 2010) ainsi qu'à une induction de l'expression de gènes codant pour des protéines de la lipogenèse tels que SREBP1c, FAS et ACC (Osei-Hyiaman et al., 2005). En accord avec ces résultats, l'invalidation pharmacologique ou génétique des CB1R conduit à une diminution de l'expression des enzymes clés de la lipogenèse, FAS et ACC dans le TAV de souris obèses (Azua et al., 2017; Jourdan et al., 2010).

L'accumulation de lipides consécutive à l'activation du SEC semble résulter de l'augmentation du captage des acides gras et du glucose. En effet, le traitement d'adipocytes par l'agoniste CBR, le WIN 55,212 augmente l'activité de la Lipoprotéine Lipase (LPL) de manière dose dépendante. L'effet étant contrecarré par le Rimonabant, ceci suggère un effet CB1R dépendant (Cota et al., 2003). De plus, l'activation du SEC par le WIN 55,212 dans des adipocytes humains augmente le captage du glucose en favorisant la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane plasmique *via* une augmentation de la PI3K et de la concentration intracellulaire en calcium (Pagano et al., 2007).

iii. SEC et thermogenèse

Le rôle du SEC sur le TA brun et la thermogenèse a été étudié par plusieurs équipes. Le blocage pharmacologique ou génétique des CB1R conduit à une augmentation de l'expression des gènes codant pour la protéine découplante (Uncoupling Protein 1, UCP1) et PGC-1α, une augmentation de la température corporelle et du tissu, une augmentation du captage des TG ainsi que d'une diminution de la taille des gouttelettes lipidiques du TA suggérant donc une activation du TA brun et de la thermogenèse (Boon et al., 2014; Perwitz et al., 2010; Wagner et al., 2011). L'utilisation d'un nouvel antagoniste périphérique des CB1R, le BPR0912, a également permis de mettre en évidence l'effet thermogénique du blocage des CB1R *via* une augmentation de l'expression d'UCP1 et de la température corporelle (Hsiao et al., 2015). Dans les travaux de Ruiz de Azua *et al.*, l'absence de CB1R spécifiquement dans les adipocytes est également associée à une augmentation de la brunisation du TA blanc et à une augmentation de la thermogenèse dans le TA brun. Les auteurs mettent également en évidence une augmentation de la proportion de macrophages M2 résidents du TA ainsi qu'une induction de leur capacité à produire de la noradrénaline. Ceci suggère que ces macrophages pourraient participer à la brunisation et à la mise en place du programme thermogénique dans le TA de ces souris. Néanmoins, l'implication du système nerveux sympathique dans les effets observés n'est pas à exclure puisque les travaux de de Verty *et al.* montrent que les effets du blocage des CB1R par le Rimonabant sur l'induction de la thermogenèse dans le TA brun sont atténués suite à une dénervation du tissu (Verty et al., 2009).

L'ensemble de ces travaux suggèrent donc, qu'à l'inverse, l'activation des CB1R du TA serait à l'origine d'une inhibition de la thermogenèse et de la dépense énergétique.

De plus, l'interaction entre CB1R et thermogenèse a également été mise en évidence par les travaux de Krott *et al.* qui montrent que la stimulation de l'activité thermogénique *via* une exposition au froid ou l'administration d'un agoniste β3 à des souris conduit à une augmentation du tonus endocannabinoïde dans le TA blanc et brun suggérant que cette hyperactivité du SEC pourrait participer à une boucle de régulation négative contrôlant l'activité thermogénique du TA brun et le brunissement du TA blanc (Krott et al., 2016).

iv. SEC, activité mitochondriale et β-oxydation

Comme pour le muscle et le foie, les travaux de Tedesco *et al.*, montrent que le traitement d'adipocytes isolés par l'ACEA diminue l'expression des marqueurs de la biogenèse mitochondriale (PGC-1α, NRF1 et Tfam), la quantité d'ADN mitochondrial et la masse mitochondriale. Il semblerait que cet effet soit la conséquence d'une régulation négative de l'expression eNOS et d'une activation de p38 MAPK. Ces résultats ont également été confirmés dans des adipocytes humains (Tedesco et al., 2010). De plus, il semblerait que cet effet soit CB1R dépendant puisque l'invalidation pharmacologique ou génétique du récepteur augmente la biogenèse mitochondriale ainsi que l'expression d'eNOS (Tedesco et al., 2010). Ces résultats sont en accord avec l'observation d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale dans le TA inguinal de souris $CB1R^{-/-}$ (Wagner et al., 2011). Associée à une altération de la fonction mitochondriale, l'activation du SEC est également à l'origine d'une dérégulation de la β-oxydation dans le TA. En effet, une diminution des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative telles que COX IV et Cytochrome C ainsi qu'une diminution de la consommation d'oxygène suite à la stimulation des CB1R a été observée (Tedesco et al., 2010). A l'inverse, le blocage des CB1R par le Rimonabant conduit à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK, de l'activité de la COX IV et de la consommation en oxygène (Perwitz et al., 2010).

Ainsi le blocage du SEC pourrait favoriser la dépense énergétique du TA par le biais d'une augmentation de la biogenèse et de l'activité mitochondriale, d'une stimulation de la β-oxydation mais également d'une activation du TA brun et de la thermogenèse.

d. Implication du SEC dans la fonction sécrétrice du TA

La leptine et l'adiponectine sont les adipokines produites par le TA dont les effets sur la prise alimentaire et le métabolisme énergétique sont les mieux décrits.

Comme mentionné précédemment, la leptine est capable de réguler les niveaux d'ECs dans le cerveau et en périphérie. En parallèle, les ECs sont également capables de réguler l'expression et la sécrétion de l'adiponectine et de la leptine.

Les études de Pagano C. *et al.* montrent que le traitement d'adipocytes primaires humains par l'agoniste WIN 55,212, l'antagoniste le Rimonabant ou un co-traitement ne module pas l'expression génique de la leptine (Pagano et al., 2007). Ces études ayant été réalisées sur des adipocytes de sujets sains, il n'est pas à exclure une éventuelle régulation de cette hormone par les ECs au cours de l'obésité comme l'ont suggéré les travaux de Poirier *et al.* qui montrent que l'inactivation pharmacologique des récepteurs CB1R chez des souris obèses conduit à une diminution de l'expression et de la sécrétion de la leptine anormalement élevée (Poirier et al., 2005). Les travaux de Tam *et al.*, ayant montré que cette diminution a lieu avant la perte de

poids, suggèrent que l'effet observé n'est pas uniquement la conséquence d'une perte de masse grasse (Tam et al., 2012)

Les données concernant les effets du SEC sur la production d'adiponectine sont divergentes. Plusieurs travaux sur l'Homme et l'animal ne suggèrent aucune modification du niveau d'expression du gène de l'adiponectine dans le TA suite au traitement par un agoniste CB1R, un antagoniste ou par le co-traitement (Pagano et al., 2007; Thornton-Jones et al., 2006). De la même manière, aucune corrélation entre le niveau d'expression des CB1R du TA et les niveaux circulants ou l'expression de l'adiponectine n'a été mise en évidence (Löfgren et al., 2007).

A l'inverse, d'autres études suggèrent une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'adiponectine dans le TA humain et animal suite au traitement par le Rimonabant (Bensaid et al., 2003; Ge et al., 2013; Jourdan et al., 2010). De plus, le traitement d'adipocytes différenciés de souris par le HU-210, un agoniste CB1R et CB2R, inhibe l'expression de l'adiponectine (Matias et al., 2006).

Les divergences observées entre les différentes études pourraient provenir d'une part de l'origine du TA utilisé (sain ou pathologique) mais également de la durée des traitements. En effet, de même que pour la leptine, la perte de poids consécutive à un traitement par le Rimonabant pourrait augmenter l'expression de l'adiponectine par des mécanismes indirects. Cependant, l'utilisation d'un modèle de souris déficientes pour le gène de l'adiponectine montre que ces souris ne présentent pas d'amélioration de la sensibilité à l'insuline suite au traitement par l'antagoniste en comparaison aux souris sauvages ce qui suggère que la modulation de l'expression de l'adiponectine suite au traitement par le Rimonabant constitue une étape importante dans l'amélioration du métabolisme glucido-lipidique (Migrenne et al., 2009).

Enfin, il semblerait que le TA soit un acteur majeur dans la génération du tonus endocannabinoïde circulant. En effet, la capacité sécrétrice du TA a été mise en évidence *in vitro* sur des adipocytes en culture (Eckardt et al., 2009; Gonthier et al., 2007). De plus, une corrélation positive entre les niveaux circulants d'ECs et la masse de TAV a été observée (Blüher et al., 2006). Ainsi, il peut être suggéré que le TA, étant la réserve principale d'AG et dont les stocks sont augmentés au cours de l'obésité, a la capacité de fournir une quantité importante de précurseurs et ainsi de générer le pool d'ECs.

e. SEC et lipolyse

Les études concernant le rôle du SEC sur la régulation de la lipolyse dans le TA sont plutôt rares et font pour la plupart référence à des approches basées sur les effets du blocage des CB1R essentiellement par le Rimonabant. Les conclusions de ces études apparaissent souvent contradictoires.

Ainsi, deux études ont montré une diminution de l'expression de la LHS chez des souris obèses traités par des antagonistes CB1R suggérant ainsi une réduction de l'activité lipolytique après blocage des CB1R (Jourdan et al., 2010; Tam et al., 2010). A l'inverse, des travaux récents utilisant un nouvel antagoniste CB1R, le BPR0912, indiquent une augmentation de l'activité de la LHS et de l'expression des récepteurs β-adrénergiques suggérant un effet stimulateur du blocage sur la lipolyse adipocytaire (Hsiao et al., 2015). D'autres travaux ont démontré qu'un traitement aigu par le Rimonabant conduit à une augmentation des AGL et du glycérol (Herling et al., 2008; Mølhøj et al., 2010) alors qu'un traitement chronique de trois semaines n'entraine aucune différence. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'effet du Rimonabant observé suite au traitement aigu est dû à une augmentation de l'activité du système sympathique plutôt qu'à un effet direct sur la lipolyse (Mølhøj et al., 2010).

Parmi les études utilisant des agonistes CBR, certaines suggèrent une diminution de la lipolyse basale et stimulée suite à l'activation du SEC. Ces effets seraient bien CBR dépendant puisqu'ils sont en partie abolis par l'utilisation d'antagonistes spécifiques CB1R et CB2R (Teixeira et al., 2010). Cependant, les auteurs n'ont pas relevé d'effet du SEC sur la lipolyse en présence d'insuline. A l'inverse, les travaux d'O'Hare *et al.* suggèrent une altération de l'action antilipolytique de l'insuline. En effet, l'injection intra-cérébroventriculaire de l'agoniste CB1R, WIN 55-212,2 conduit à une augmentation de la production de glycérol au cours d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique alors qu'ils n'observent aucun effet de l'agoniste en situation basale suggérant une altération de l'action antilipolytique de l'insuline (O'Hare et al., 2011). Les travaux de Nieri *et al*. montrent également un effet stimulateur du WIN 55,212-2 sur la lipolyse dans des adipocytes primaires. Cependant, d'après leurs études, cet effet serait indépendant d'une action de l'agoniste sur les récepteurs CB1R et CB2R (Nieri et al., 2003).

Finalement, l'ensemble de ces données ne permet pas de conclure quant à un effet stimulateur ou inhibiteur de l'activation du SEC sur la lipolyse adipocytaire. Il semble que la réponse dépende de la situation physiologique ou des conditions expérimentales : lipolyse basale, stimulée par des agonistes β-adrénergiques, en présence ou non d'insuline. Quoi qu'il en soit, même si les résultats sont souvent contradictoires, ces études renforcent l'hypothèse selon laquelle le SEC et les voies de régulation de la lipolyse sont liés.

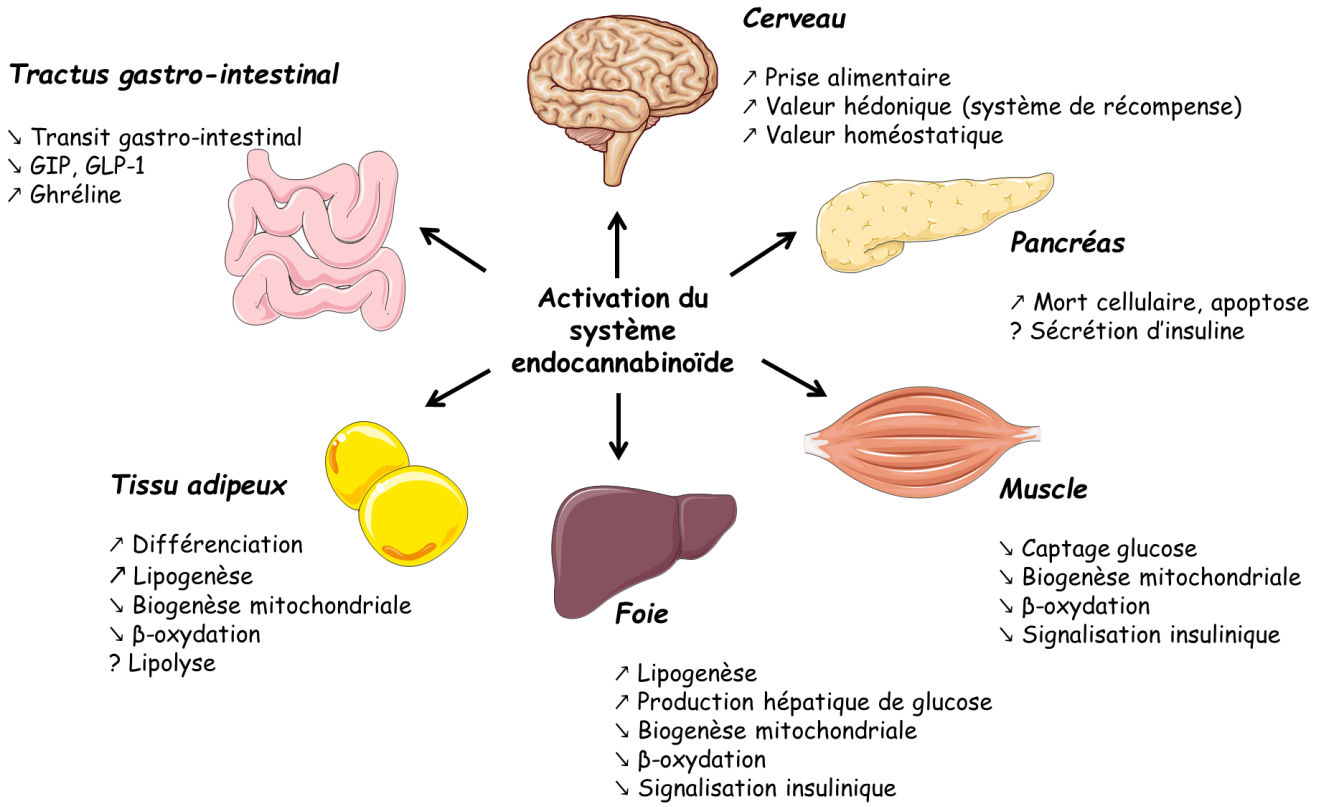


***Figure 27** : Conséquences de l'activation du système endocannabinoïde central et périphérique sur la prise alimentaire et sur le métabolisme glucido-lipidique*
(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical Art)

Hypothèses et objectifs du projet

Cette partie introductive a permis de mettre en avant le rôle fondamental du TA dans le développement de la résistance à l'insuline périphérique. En effet, au cours de l'obésité, l'hypertrophie du TA s'accompagne d'une dérégulation du métabolisme adipocytaire et en particulier d'une augmentation de la lipolyse adipocytaire. La libération accrue d'AGL qui s'en suit participe grandement à l'accumulation ectopique de lipides et à l'altération de la signalisation insulinique principalement dans le foie et le muscle squelettique par un mécanisme de lipotoxicité. Les conséquences métaboliques de la résistance à l'insuline sont multiples. Pendant que la production hépatique de glucose est augmentée et que l'export des VLDL riche en TG est accru, le muscle squelettique, n'est quant à lui plus capable de capter et d'utiliser le glucose comme substrat énergétique.

De nombreuses études ont permis de démontrer que l'activation des récepteurs CB1R stimule la prise alimentaire et la prise de poids. Paralèllement, des arguments ont également été avancés dans la littérature en faveur d'une hyperactivation du SEC au cours l'obésité concernant à la fois le cerveau et plusieurs organes périphériques. Ainsi, une approche thérapeutique visant à bloquer ce système a fait ses preuves chez les patients obèses traités par un antagoniste spécifique des CB1R, le Rimonabant, au début des années 2000. Cependant, étant également à l'origine d'effets psychotropes néfastes, cette molécule a été retirée du marché peu de temps après.

Les multiples études utilisant cet antagoniste ont néanmoins permis de mettre en évidence les effets bénéfiques du blocage de ces récepteurs périphériques sur le métabolisme glucido-lipidique de manière indépendante de leur action centrale sur la prise alimentaire. Ainsi, il semblerait que l'altération du métabolisme énergétique au cours de l'obésité soit en partie due à une dérégulation combinée du SEC dans plusieurs tissus périphériques.

Parmi ces tissus, le TA exprime les récepteurs aux cannabinoïdes et possède la machinerie permettant la production de leurs ligands endogènes. Plusieurs études ont démontré une dérégulation du SEC dans le TA au cours de l'obésité et une amélioration du métabolisme adipocytaire suite au blocage des CB1R. Cependant, les travaux concernant les effets de l'activation du système sur la mise en place des dérégulations du métabolisme adipocytaire et notamment sur la dérégulation de la lipolyse adipocytaire sont peu nombreux. Pourtant, une étude préliminaire réalisée sur des souris invalidées pour les récepteurs CB1R spécifiquement dans les adipocytes montre que ces souris ne développent pas les conséquences métaboliques d'une libération excessive d'AGL telle que la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique induite par un régime riche en graisses.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse de travail suivante : l'activation des récepteurs CB1R du TA contribue à la dérégulation de la lipolyse adipocytaire observée au cours de l'obésité, un évènement précoce dans l'installation de la résistance à l'insuline (**Figure 28**)

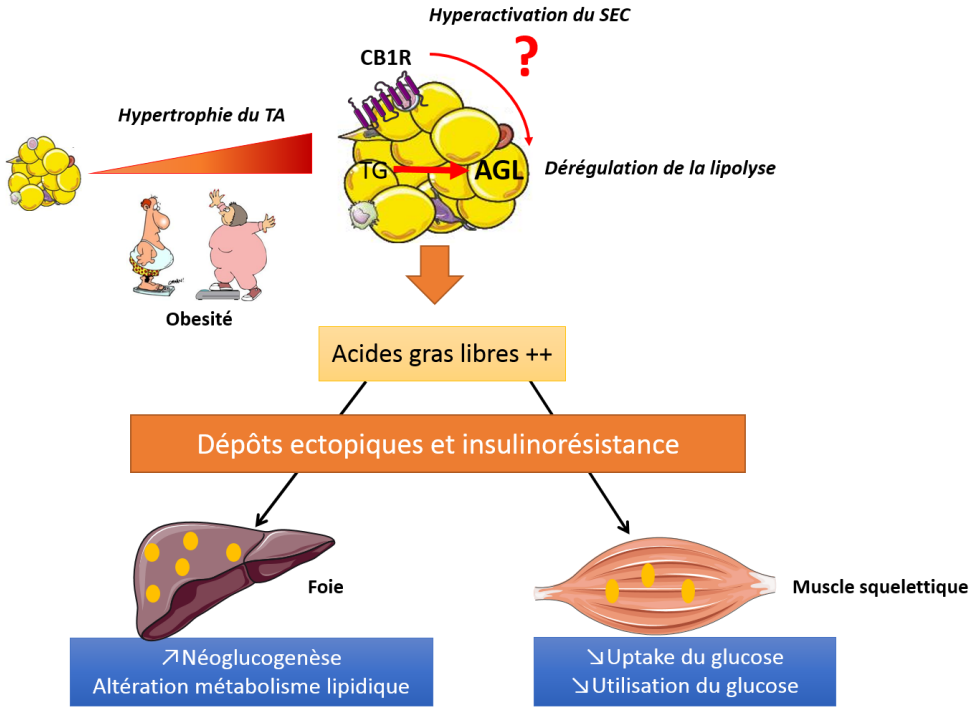


Figure 28 *: **Hypothèse concernant le rôle des récepteurs CB1R dans la dérégulation de la lipolyse***
(Réalisée à partir de la banque d'images PowerPoint Servier Medical Art)

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été définis comme suit :

1) Dans un premier temps, nous avons évalué les effets d'une stimulation des récepteurs CB1R du TA sur la lipolyse adipocytaire. Pour cela, une approche *in vivo* sur des souris minces ou déficientes pour le récepteurs CB1R a été mise en œuvre afin d'étudier les effets d'une activation aigüe des récepteurs sur la lipolyse adipocytaire. Parallèlement, les mécanismes moléculaires mis en jeu ont été étudiés *in vitro* sur des explants de TA péri-épididymaire de rat en culture.
2) Après avoir caractérisé les conséquences de l'activation aigüe des CB1R sur la lipolyse, nous avons étudié l'activité de cette voie métabolique sur des modèles présentant une augmentation du tonus endocannabinoïde endogène. Pour cela, le tonus a été augmenté soit pharmacologiquement ou en induisant une obésité chez des souris par un régime hyperlipidique.
3) Enfin, nous avons cherché à savoir si les effets sur la lipolyse provoqués par la stimulation du SEC sont reversés par le blocage des CB1R. Dans ce contexte, les effets d'antagonistes ont été étudiés sur des modèles de souris obèses ou *in vitro* sur des tissus présentant un tonus endocannabinoïde élevé.

Résultats et discussion

I. Conséquences de l'activation du SEC sur la lipolyse adipocytaire

Compte tenu des données de la littérature indiquant une suractivation du SEC au cours de l'obésité, nous nous sommes intéressés aux effets de l'augmentation de tonus endocannabinoïde dans le TA en étudiant tout particulièrement les conséquences sur la lipolyse. Pour cela, nous avons tout d'abord testé l'impact d'une suractivation aigüe du SEC induite par une injection intrapéritonéale (i.p.) d'AEA sur la mobilisation des acides gras. Une seconde approche a consisté à étudier l'activité lipolytique chez des souris dont le tonus endocannabinoïde endogène a été augmenté par une injection du JZL195, un inhibiteur des enzymes FAAH et MAGL, responsables de la dégradation des ECs. Ce modèle expérimental a été utilisé comme une alternative au modèle de souris obèses permettant d'identifier des mécanismes de régulation dépendants du SEC indépendamment de ceux liés à l'obésité.

Parallèlement, des études *in vitro* sur des explants de TA ont été réalisées afin d'étudier l'implication directe des récepteurs CB1R du TA sur la lipolyse.

L'insuline étant un puissant régulateur de l'activité lipolytique adipocytaire, les expériences *in vivo* ont été réalisées dans différentes situations nutritionnelles permettant de moduler l'insulinémie (état nourri, jeûne 6h, jeûne 24h). De la même façon, les expérimentations *in vitro* ont été conduites en présence ou non de l'hormone afin d'identifier d'éventuelles interactions entre le SEC et les voies de signalisation de l'insuline. L'implication des récepteurs CB1R a été évaluée parallèlement en répétant certaines expériences sur des souris $CB1R^{-/-}$.

L'activité lipolytique a été estimée par un dosage du glycérol et/ou des AGL dans le plasma pour les études *in vivo* et dans le surnageant des explants pour les études *in vitro*. L'analyse des voies de signalisation régulant la lipolyse a également été réalisée par une mesure des taux de phosphorylation de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline, la mesure d'un métabolite clé dans l'induction de la lipolyse, l'AMPc mais également la mesure de l'activité de la PKA et de la LHS par western blot.

L'ensemble des expérimentations réalisées sur le TA de rat ou de souris a été effectué à partir du TA péri-épididymaire qui sera considéré comme du TAV par opposition au TASC.

A. Validation des approches expérimentales utilisées pour activer le SEC

Des études préliminaires ont été réalisées afin de mesurer le tonus endocannabinoïde dans les tissus et certains marqueurs d'hyperactivation du SEC suite aux différentes approches expérimentales utilisées.

1) *Activation du SEC par injection i.p. d'AEA*

Compte tenu de la dégradation rapide des ECs au sein des tissus (Laine et al., 2002; Willoughby et al., 1997), des souris ont été soumises à une injection i.p. d'AEA afin d'estimer la durée d'activation du SEC par une mesure de la température rectale (**Cf. Matériel & Méthodes IV, A, 1**). En effet, plusieurs travaux montrent que l'utilisation de différents agonistes du SEC, produit une hypothermie de manière précoce alors que ces effets ne sont pas observés chez des souris déficientes pour les CB1R ce qui fait de la température, un bon marqueur d'activation de ces récepteurs (Rawls and Benamar).

De plus, une mesure de la concentration en AEA dans le cerveau, le foie et le TAV, prélevés à différents temps (0 ; 5 ; 15 ; 30 et 60 min), a été réalisée.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une diminution importante et maximale de la température rectale (-1,4°C en moyenne) 15 min après l'injection de l'agoniste (**Figure 29A**). La température retrouve ensuite son niveau basal à t=30 min. Parallèlement, les dosages d'ECs dans les divers tissus montrent une augmentation progressive de la concentration d'AEA avec une forte induction dès 5 min de traitement, des valeurs maximales à t=15 min suivies d'une diminution progressive sans pour autant revenir à un niveau basal à t=60 min (**Figure 29B**).

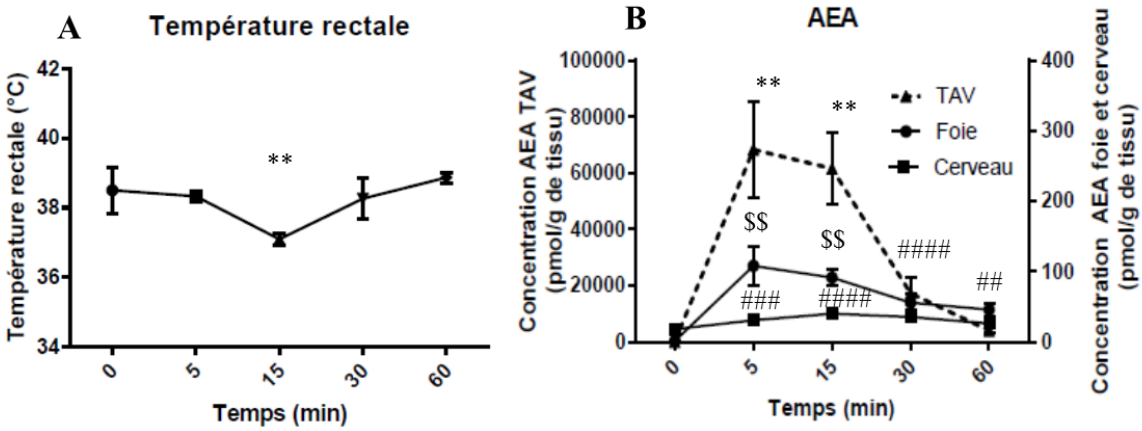


Figure 29 : ***Effet de l'AEA sur la température rectale et la concentration en AEA dans le foie, le cerveau et le TAV.***

***A** : Température rectale des souris au cours du temps après l'injection i.p. d'AEA (10 mg/kg). **B** : Contenu en AEA dans les tissus (TAV, foie et cerveau) au cours du temps après l'injection i.p. d'AEA (10 mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/temps). Les différences statistiques par rapport à t=0 min sont symbolisées par **P<0,01 pour le TAV ;$$P<0,01 pour le foie et ##P<0,01 ; ###P<0,001 ; ####P<0,0001 pour le cerveau.*

En accord avec ces résultats, une étude a montré qu'une administration par intraveineuse de l'AEA conduit à une augmentation des niveaux cérébraux à t=5 min puis à une normalisation à t=15 min (Giuffrida and McMahon, 2010). Cependant, des effets comportementaux peuvent avoir lieu jusqu'à 1h après l'administration de la drogue. Les auteurs ont expliqué ces disparités par le fait que les produits de

dégradation de l'AEA peuvent entrainer des effets similaires à la molécule (Giuffrida and McMahon, 2010). Ainsi, pour les expérimentations qui seront réalisées *in vivo*, les analyses protéiques sur tissus seront réalisées 15 min post-injection c'est-à-dire au pic de concentration de l'AEA de façon à limiter les éventuels effets indirects des produits de dégradation de l'AEA.

Il est également important de noter que nos résultats montrent que le TA semble être la cible préférentielle de l'injection d'AEA puisque sa concentration est jusqu'à 1000 fois plus importante que dans les autres tissus à t=15 min.

Finalement, cette étude préliminaire, en plus de démontrer que l'injection i.p. d'AEA induit bien une augmentation de sa concentration dans les dépôt graisseux, nous a permis de mettre en évidence que le TA apparaît comme une cible privilégiée de la drogue et que l'AEA injecté est rapidement dégradé, en accord avec des effets *in vivo* transitoires.

2) Activation du SEC endogène par injection i.p. de JZL195

Les traitements par injection i.p. d'AEA renseignent sur les conséquences d'une activation aigüe du SEC et sont particulièrement propices à l'étude des voies de signalisation impliquées. Afin de déterminer les effets induits par une activation prolongée du SEC, nous avons utilisé une autre approche permettant d'augmenter le tonus endocannabinoïde endogène *via* une inhibition de la dégradation des ECs. Cette approche nous permet également d'éviter la génération des produits de dégradation de l'AEA lorsqu'il est injecté en quantité importante et de limiter ainsi leurs propres effets.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser le JZL195 (**Cf. Matériel & Méthodes IV, B, 1**) un inhibiteur puissant des principales enzymes de dégradation de l'AEA et du 2-AG, la FAAH et la MAGL à raison de 20 mg/kg. Cette dose permet d'augmenter significativement les niveaux d'AEA et de 2-AG au niveau cérébral avec un maximum d'accumulation observé entre 2h et 5h (Long et al., 2009).

Avec cette approche expérimentale, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la température rectale des souris traitées par le JZL195 en comparaison aux souris traitées par le véhicule dès la première heure et se maintenant durant les 3h de l'expérience (**Figure 30A**) suggérant une élévation rapide et prolongée du tonus endocannabinoïde. Cette élévation a été confirmée par le dosage des ECs dans les tissus prélevés à t=3h. En effet, nous avons observé une tendance globale à l'augmentation des deux principaux ECs, l'AEA et le 2-AG dans le foie, le TAV et le cerveau des souris traitées par l'inhibiteur par rapport aux souris traitées par le véhicule (**Figure 30B, C et D**).

Par rapport à l'activation aigüe du SEC par injection i.p. d'AEA, cette approche apparait également plus physiologique puisque les niveaux d'AEA retrouvés dans les tissus après 3h de traitement sont comparables

à ceux rencontrés au cours de l'obésité (Di Marzo et al., 2001; Osei-Hyiaman et al., 2005; Starowicz et al., 2008).

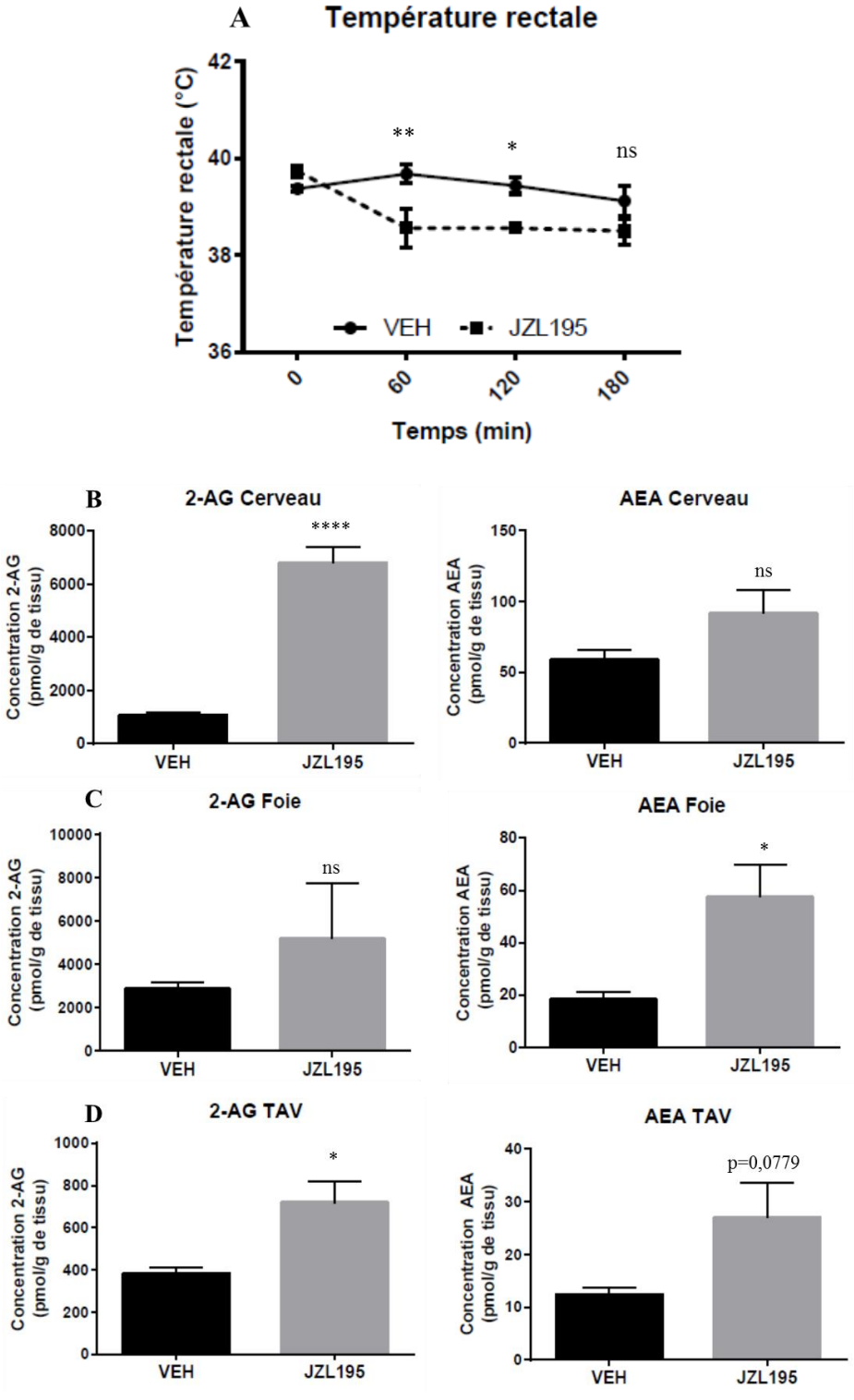


Figure 30 : ***Effet d'une injection de JZL195 sur la température rectale et le tonus endocannabinoïde.*** ***A*** *: Température rectale au cours du temps après l'injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg).* ***B, C, D*** *: Tonus endocannabinoïde à t=3h dans les tissus (****B*** *: cerveau,* ***C*** *: foie,* ***D*** *: TAV) après l'injection i.p. de VEH ou JZL195 (20 mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05 ; **P<0,01 ; ****P<0,0001.*

3) *Activation du SEC par le JZL195 in vitro*

Après avoir validé le modèle d'activation endogène du SEC *in vivo* chez des souris par injection i.p. de JZL195, nous avons également vérifié s'il était possible d'augmenter les taux d'ECs *in vitro* dans des explants de TAV de rat (**Cf. Matériel & Méthodes III, A, 2, a**), d'explants de foie de souris (**Cf. Matériel & Méthodes III, D**) ou des cellules HepG2 (**Cf. Matériel & Méthodes III, E**).

Toujours en se référant aux travaux de Long *et al.*, les explants de TAV de rat ont été incubés avec du JZL195 à une concentration de 10µM pendant 3h. Le traitement conduit à une augmentation modérée de l'AEA sans modifier le 2-AG et les deux autres dérivés de la famille NAE, à savoir l'OEA et le PEA (**Figure 31**).

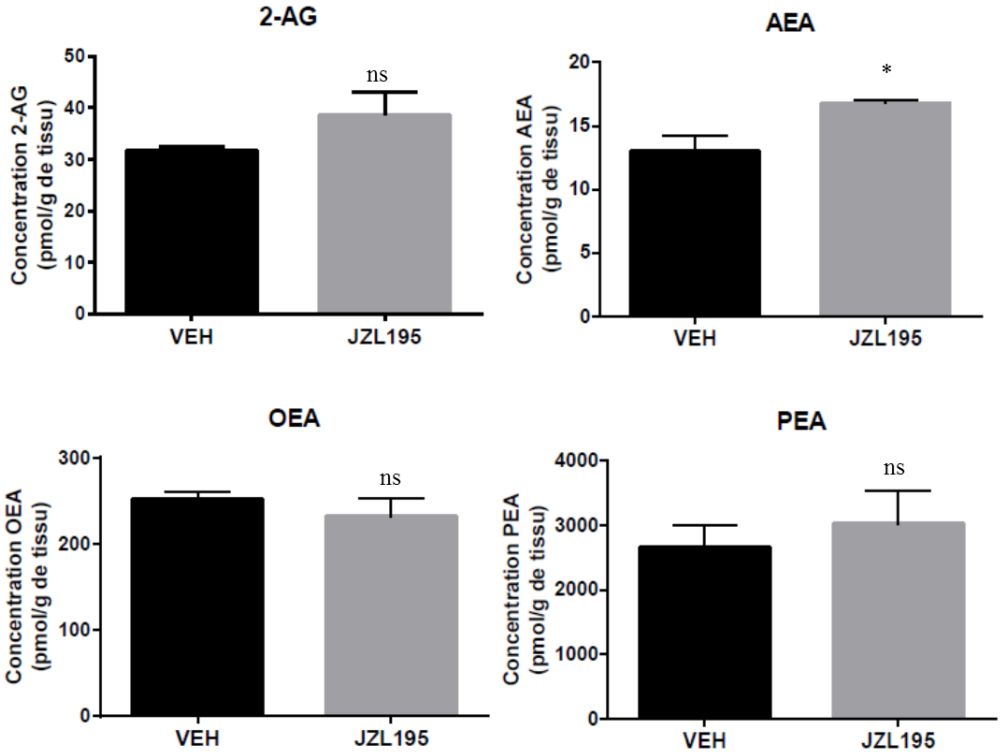


***Figure 31* : Tonus endocannabinoïde dans des explants de TAV de rat traités par le JZL195**

*Le dosage des ECs a été réalisé sur des explants de TAV de rat traités pendant 3h avec le véhicule (VEH) ou le JZL195 (10µM). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05.*

De la même manière, le traitement au JZL195 à une concentration de 10µM pendant 4h semble permettre une augmentation des deux principaux ECs et des deux dérivés dans les explants de foie de souris (**Figure 32**) et une augmentation du 2-AG, de l'AEA et de l'OEA dans la lignée cellulaire HepG2 (**Figure 33**).

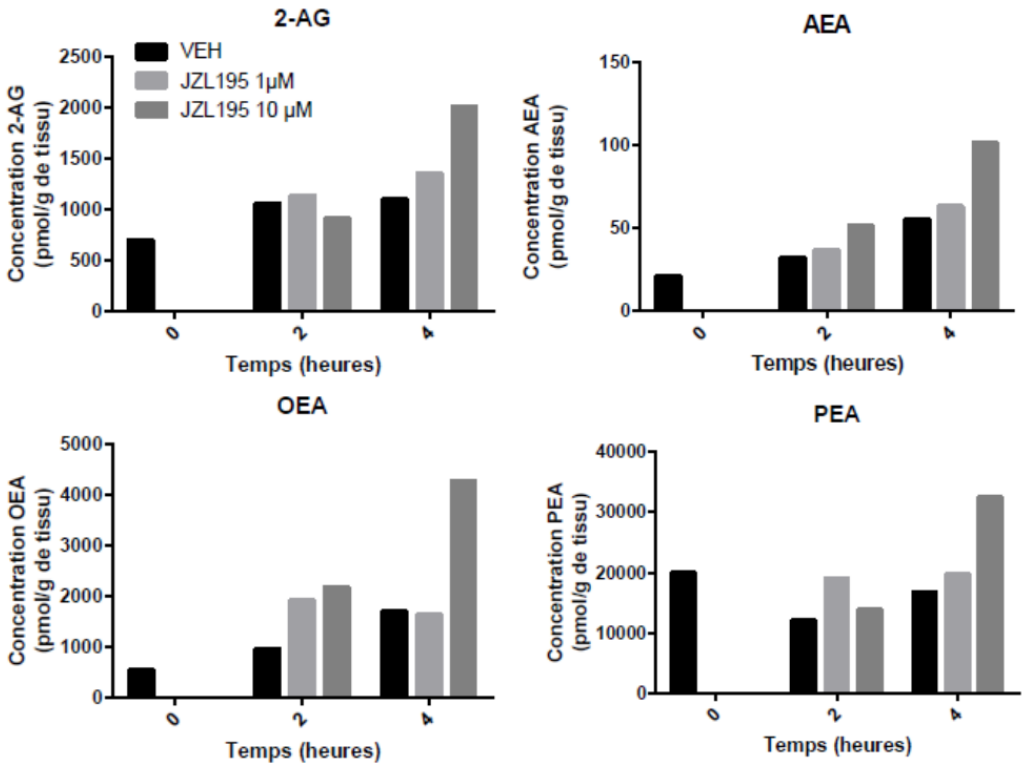


***Figure 32* : Tonus endocannabinoïde dans les explants de foie traités le JZL195.**
Le dosage des ECs a été réalisé sur des explants de foie de souris traités pendant 2 ou 4h avec le véhicule (VEH) ou le JZL195 (1 ou 10µM) (n=1).

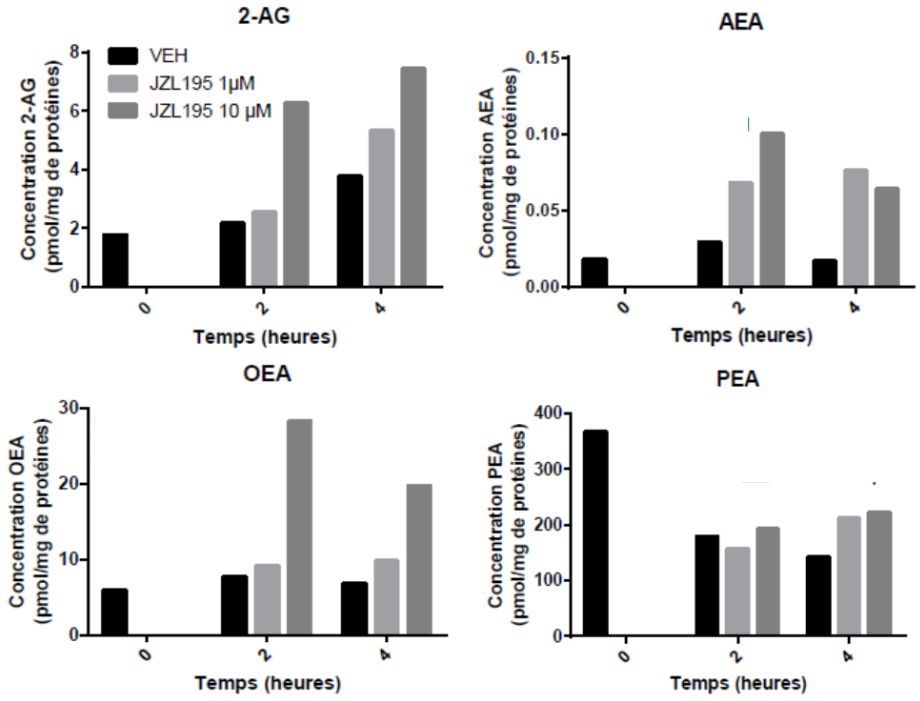


Figure 33 : ***Tonus endocannabinoïde dans les cellules hepG2 traitées par le JZL195.***
Le dosage des ECs a été réalisé dans des cellules HepG2 traitées pendant 2 ou 4h avec le véhicule (VEH) ou le JZL195 (1 ou 10µM) (n=1).

4) *Mise en évidence d'une dérégulation du SEC au cours de l'obésité*

Enfin, une troisième approche expérimentale a consisté à provoquer une augmentation du tonus endocannabinoïde dans différents tissus en induisant l'obésité chez les souris. Pour cela, les souris ont été soumises soit à un régime hyperlipidique contenant 34,6 g de lipides/100g sous forme de lard (HFD, High Fat Diet) (**Annexe B**) pendant 20 semaines alors que le lot contrôle a été maintenu au régime standard (STD, Standard Diet) (**Annexe A**).

Un test de tolérance à l'insuline (**Cf. Matériel & Méthodes IV, C, 1**) a été réalisé afin de vérifier que le régime conduit bien à un état de résistance à l'insuline chez les souris. Alors que les souris contrôles voient leur glycémie diminuer au cours du temps suite à une injection i.p. d'insuline à 0,5 UI/kg, les souris sous régime hyperlipidique ne répondent pas à la charge en insuline et voient au contraire leur glycémie augmenter (**Figure 34A**). Cette augmentation pourrait être la conséquence d'une augmentation de la néoglucogenèse à partir du glycérol contenu dans la solution d'insuline injectée. Ainsi ces données nous permettent d'affirmer que les souris soumises au régime hyperlipidique sont bien résistantes à l'insuline.

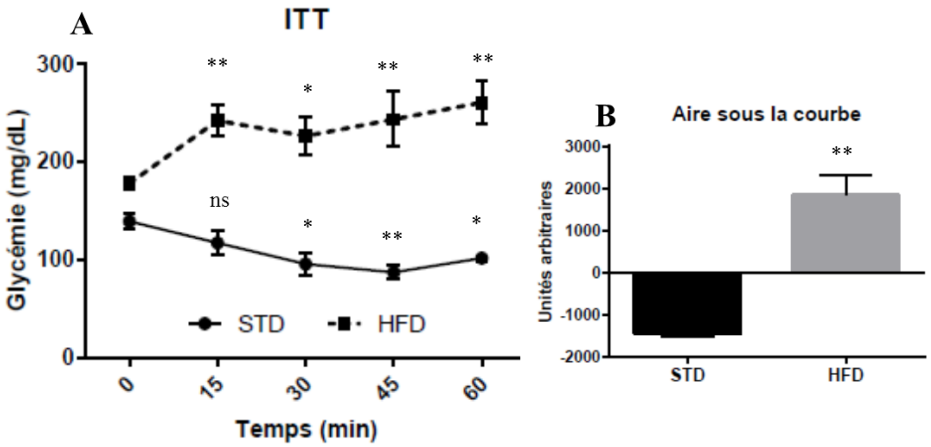


***Figure 34** : Test de tolérance à l'insuline chez des souris contrôles (STD) et obèses (HFD).*
Des souris contrôles ou obèses à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. d'insuline (0,5 UI/kg) à t=0 min. ***A.*** *Glycémie des souris au cours du temps (0 ; 15 ; 30 ; 45 et 60 min).Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4 STD et n=9 HFD) Les différences statistiques par rapport à t=0 min sont symbolisées par *P<0,05 ;**P<0,01.* ***B.*** *Aire sous la courbe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4 STD et n=9 HFD) Les différences statistiques par rapport au STD sont symbolisées par **P<0,01*

A la fin de la période de régime alimentaire, les tissus ont été prélevés post-mortem afin de mesurer le tonus endocannabinoïde dans le cerveau, le foie et le TAV (**Cf. Matériel & Méthodes IV, C, 2**). Les résultats indiquent que le régime hyperlipidique induit une augmentation significative de l'AEA dans le TAV et le cerveau (**Figure 35A et C**). Dans le foie, seul le 2-AG est augmenté par le régime hyperlipidique (**Figure 35B**). Enfin, concernant les composés dits « endocannabinoid-like », une diminution du PEA est observée dans le TAV (**Figure 36A)** alors que la concentration des deux composés augmente dans le foie

(**Figure 36B**). Dans le cerveau, la concentration de l'OEA et celle du PEA ne varient pas significativement (**Figure 36C**).

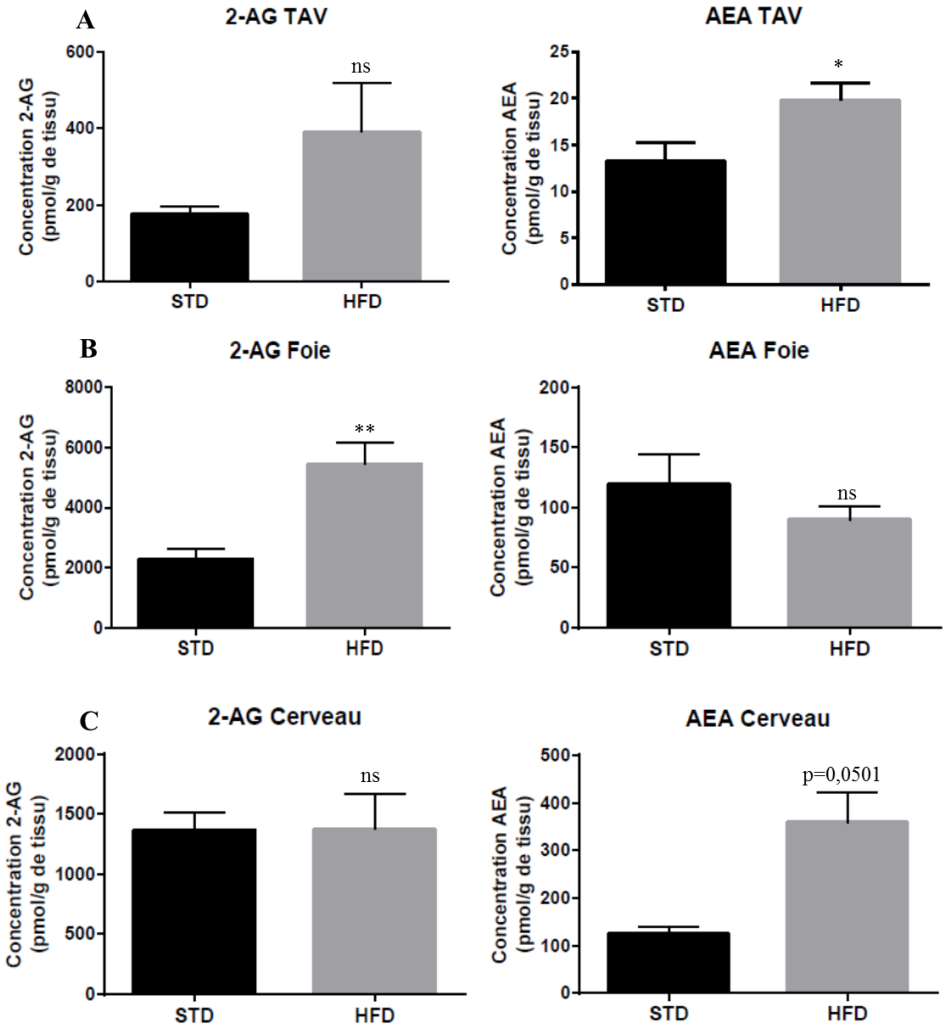


Figure 35 : ***Dosage de l'AEA et du 2-AG dans les tissus de souris contrôles (STD) ou obèses (HFD).*** *Tonus endocannabinoïde dans **A** : le TAV, **B** : le foie et **C** : le cerveau après un régime standard ou hyperlipidique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5 STD et n=7 HFD). Les différences statistiques par rapport au STD sont symbolisées par * P<0,05 ; **P<0,01.*

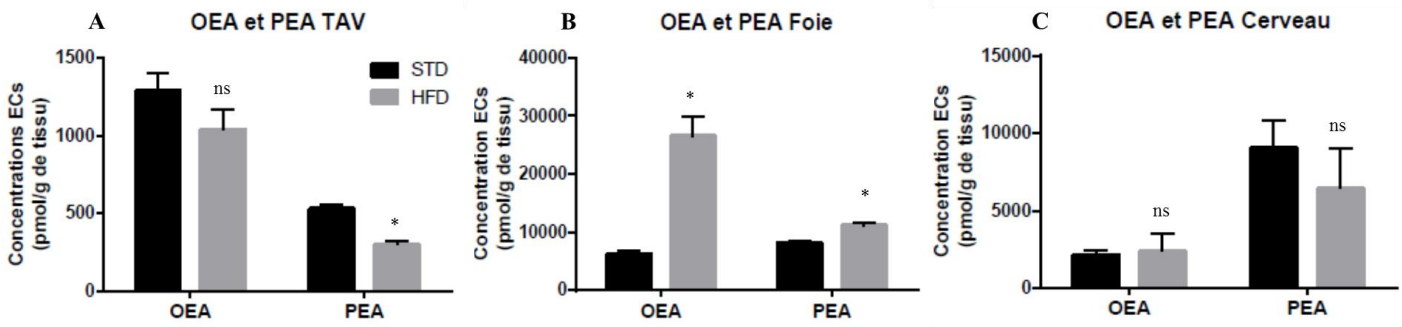


***Figure 36* : Dosage des composés dits « endocannabinoid-like » (OEA et PEA) dans les tissus de souris contrôles (STD) ou obèses (HFD).**

*Tonus des composés « endocannabinoid-like » dans **A** : le TAV, **B** : le foie et **C** : le cerveau après un régime standard ou riche en graisses. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5 STD et n=7 HFD). Les différences statistiques par rapport au STD sont symbolisées par * P<0,05.*

Les récepteurs et les enzymes de synthèse et de dégradation des ECs jouent un rôle important dans l'établissement du tonus endocannabinoïde. C'est pourquoi nous avons également mesuré l'impact du régime hyperlipidique sur le niveau d'expression de ces gènes dans le TAV.

Il est tout d'abord intéressant de noter que l'expression du gène codant pour la FAAH, majoritairement impliquée dans la dégradation de l'AEA, est diminuée chez les souris obèses par rapport aux souris contrôles (**Figure 37**). Ce résultat est en accord avec l'augmentation des concentrations en AEA observée (**Figure 35A**) et avec les observations faites par d'autres auteurs qui rapportent également une diminution de l'expression de la FAAH dans le TAV au cours de l'obésité chez l'Homme (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005). En ce qui concerne l'expression du gène codant pour la NAPE, principale enzyme de synthèse de l'AEA, aucune différence significative n'a été observée (**Figure 37**).

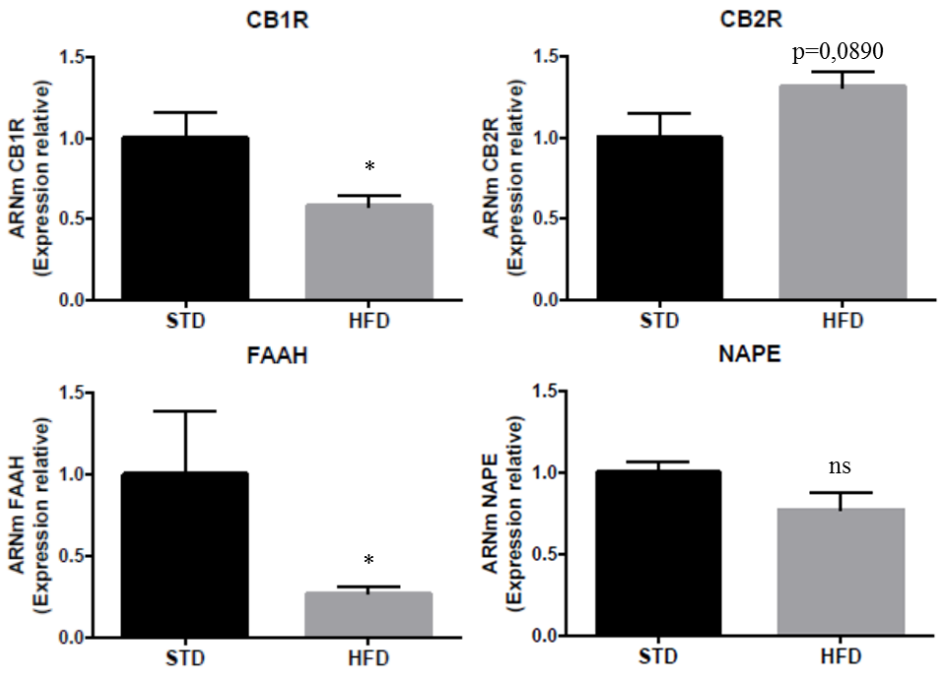


***Figure 37** : Analyse de l'expression génique par PCR en temps réel de gènes codant pour des protéines du SEC dans le TAV de souris contrôles (STD° ou obèses (HFD).*

*Expression relative des gènes codant pour CB1R ; CB2R ; NAPE; FAAH dans le TAV de souris contrôles ou obèses. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=7 STD et n=10 HFD) Les différences statistiques par rapport au STD sont symbolisées par *P<0,05.*

Bien qu'une augmentation de l'expression des CB1R fût attendue dans le TAV des souris obèses compte tenu de l'hyperactivation du SEC au cours de l'obésité, l'analyse moléculaire montre que le régime hyperlipidique induit une diminution de l'expression de ces récepteurs dans le TAV (**Figure 37**). Plusieurs travaux ont également indiqué un tel effet (Blüher et al., 2006; Engeli et al., 2005; Matias et al., 2006) suggérant l'existence d'une boucle de régulation négative régulant l'expression des CB1R en fonction des taux d'ECs. A l'inverse, l'expression des CB2R a, quant à elle, tendance à être augmentée dans le TAV des souris obèses par rapport aux souris contrôles (**Figure 37**). L'expression des CB2R étant majoritaire dans les cellules immunitaires, il est possible que ce résultat soit lié à une infiltration importante de macrophages dans TAV des souris obèses. Cette hypothèse est supportée par l'augmentation très significative de l'expression du gène codant pour le marqueur de macrophages F4/80 suggérant une inflammation du TA (**Figure 38**).

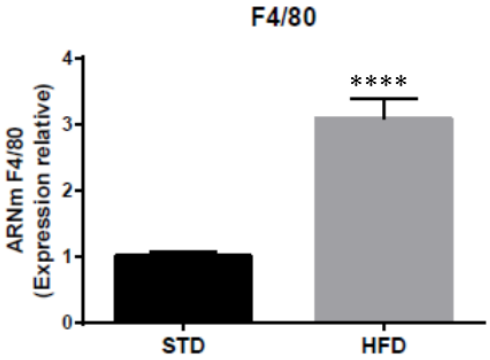


Figure 38 : ***Analyse de l'expression génique par PCR en temps réel du gène codant pour F4/80 dans le TAV des souris contrôles (STD) ou obèses (HFD).***
*Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=7 STD et n=10 HFD) Les différence statistiques par rapport au STD sont symbolisées par ****P<0,0001.*

En conclusion, nous avons montré que, quelle que soit la stratégie expérimentale utilisée (injection i.p. d'AEA, inhibition de la dégradation des ECs ou régime hyperlipidique), le TAV est soumis à une augmentation du tonus endocannabinoïde. C'est pourquoi nous avons utilisé ces différentes approches pour étudier les conséquences de l'activation du SEC sur la lipolyse adipocytaire.

B. L'activation du SEC stimule la lipolyse chez la souris à l'état nourri

La lipolyse adipocytaire est un mécanisme qui est finement régulé par l'état nutritionnel. En effet, après un jeûne prolongé, la lipolyse adipocytaire est augmentée *via* l'activation de la voie β-adrénergique (lipolyse stimulée) alors qu'à l'inverse, en situation postprandiale, l'insuline conduit à une inhibition de la lipolyse (lipolyse basale) en faveur d'un stockage des acides gras dans le TA. Au cours de l'obésité, la lipolyse basale est augmentée à cause de l'insensibilité du tissu à l'action antilipolytique de l'insuline qui accompagne l'hypertrophie des adipocytes et l'inflammation locale (Reynisdottir et al., 1995). A l'inverse, au cours du jeûne, la lipolyse stimulée est quant à elle diminuée du fait d'une augmentation de la réponse α-adrénergique aux catécholamines aux dépens de la réponse β-adrénergique (Large et al., 1999). C'est pourquoi, dans les chapitres qui suivent, nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'activation du SEC sur la lipolyse dans ces deux situations nutritionnelles.

1) *Article de thèse : l'hyperactivation du SEC altère l'action antilipolytique de l'insuline dans le TAV de souris (Muller et al., 2017)*

Am J Physiol Endocrinol Metab 313: E26–E36, 2017.
First published March 21, 2017; doi:10.1152/ajpendo.00374.2016.

RESEARCH ARTICLE | *Endocannabinoids and Cannabinoid Receptors as Regulators of Endocrine Functions and Tissue Metabolism*

Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue

Tania Muller,[1] Laurent Demizieux,[1] Stéphanie Troy-Fioramonti,[1] Joseph Gresti,[1] Jean-Paul Pais de Barros,[2] Hélène Berger,[1] Bruno Vergès,[1,3] and Pascal Degrace[1]

[1]*Team Pathophysiology of Dyslipidemia, INSERM UMR1231 Lipids, Nutrition, Cancer, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France;* [2]*Jean-Paul Pais de Barros, Lipidomic Platform, INSERM UMR1231 Lipids, Nutrition, Cancer, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France; and* [3]*Endocrinology, Diabetology Department, University Hospital of Dijon, Dijon, France*

Submitted 13 October 2016; accepted in final form 8 March 2017

Muller T, Demizieux L, Troy-Fioramonti S, Gresti J, Pais de Barros J, Berger H, Vergès B, Degrace P. Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 313: E26–E36, 2017. First published March 21, 2017; doi:10.1152/ajpendo.00374.2016.—Evidence has accumulated that obesity-related metabolic dysregulation is associated with overactivation of the endocannabinoid system (ECS), which involves cannabinoid receptor 1 (CB1R), in peripheral tissues, including adipose tissue (AT). The functional consequences of CB1R activation on AT metabolism remain unclear. Since excess fat mobilization is considered an important primary event contributing to the onset of insulin resistance, we combined in vivo and in vitro experiments to investigate whether activation of ECS could alter the lipolytic rate. For this purpose, the appearance of plasma glycerol was measured in wild-type and CB1R$^{-/-}$ mice after acute anandamide administration or inhibition of endocannabinoid degradation by JZL195. Additional experiments were conducted on rat AT explants to evaluate the direct consequences of ECS activation on glycerol release and signaling pathways. Treatments stimulated glycerol release in mice fasted for 6 h and injected with glucose but not in 24-h fasted mice or in CB1R$^{-/-}$, suggesting that the effect was dependent on plasma insulin levels and mediated by CB1R. We concomitantly observed that Akt cascade activity was decreased, indicating an alteration of the antilipolytic action of insulin. Similar results were obtained with tissue explants exposed to anandamide, thus identifying CB1R of AT as a major target. This study indicates the existence of a functional interaction between CB1R and lipolysis regulation in AT. Further investigation is needed to test if the elevation of ECS tone encountered in obesity is associated with excess fat mobilization contributing to ectopic fat deposition and related metabolic disorders.

endocannabinoid system; lipolysis; insulin resistance; cannabinoid receptor 1; JZL195

EXCESS FAT ACCUMULATION, particularly in visceral pads, is recognized as a major contributor to metabolic risk. The main function of adipose tissue (AT) is to store excess energy as neutral fat during periods of nutritional excess and to deliver substrates, free fatty acids (FFA) and glycerol, in the bloodstream as an energy source for other organs during states of nutritional needs such as starvation. The process of lipolysis is mediated by several lipases, co-lipases, and proteins, and it is now well characterized that it is initiated by the breakdown of triglycerides by adipose triglyceride lipase to generate diacylglycerides, which are in turn hydrolyzed by hormone sensitive lipase (HSL) to produce monoacylglycerides. The last step is catalyzed by monoacylglyceride lipase (MAGL), which produces FFA and glycerol (4). Catecholamines are potent stimulators of lipolysis since β-adrenergic receptor signaling stimulates the adenylyl cyclase/adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) cascade to finally activate HSL and perilipin. Conversely, insulin negatively regulates lipolysis by increasing cAMP breakdown by phosphodiesterase 3B (PDE3B), through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt-dependent pathways (23, 44). Available evidence suggests that normal regulation of lipolysis may be disrupted in conditions leading to AT expansion. Indeed, it has been reported that catecholamine-induced lipolysis is impaired in obesity while basal lipolysis is increased (1, 33, 39). Excessive FFA delivery from AT is considered an important primary event contributing to the onset of insulin resistance, which induces ectopic fat storage and ultimately lipotoxicity in other organs such as muscle, liver, heart, and pancreas (6, 27, 37, 50, 53).

At the same time, it is now well established that obesity is associated with overactivation of the endocannabinoid system (ECS) (20, 21, 47). The ECS is defined as a set of receptors able to bind endogenous ligands (endocannabinoids), synthesized and degraded by specific enzymes. It includes two membrane receptors, the cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1R and CB2R), and two main endogenous agonists, *N*-arachidonoyl-ethanolamine (anandamide or AEA) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG). AEA is typically synthesized by the enzyme *N*-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), although alternative pathways exist, while 2-AG is formed by the action of diacylglycerol lipase α or β upon diacylglycerols. After release, EC are subjected to rapid breakdown by degrading enzymes such as fatty acid amide hydrolase (FAAH) for *N*-acylethanolamines and monoacylglycerol lipase (MAGL) for 2-AG (15). Evidence has accumulated from

Address for reprint requests and other correspondence: P. Degrace, INSERM UMR1231, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France (e-mail: pascal.degrace@u-bourgogne.fr).

 0193-1849/17 Copyright © 2017 the American Physiological Society

studies using the CB1R antagonist rimonabant and CB1R-deficient ($CB1R^{-/-}$) mice that these receptors are key contributors to the development of metabolic dysregulations associated with obesity (48, 56). While CB1R is localized predominantly in the brain, where it is deputed to food intake and appetite control, this receptor has also been described as an important regulator of energy homeostasis in a number of peripheral tissues such as liver, skeletal muscle, and AT (42). It is suggested that endocannabinoid levels of these tissues are increased during obesity, accounting for an elevation of ECS tone, which contributes to hyperphagia, excessive visceral fat accumulation, and related disorders including Type 2 diabetes and dyslipidemia (22, 61).

The existence of the ECS machinery in AT has been evidenced in mice, rats, and humans (2, 5, 12, 29, 46, 55, 57). Most information concerning the link between ECS and AT metabolism derives from studies using obese animal models treated with the CB1R blocker rimonabant (32, 35), while experimental approaches focusing specifically on adipocyte physiology remain scarce. However, these works collectively support the view that ECS activation promotes triglyceride accumulation and AT expansion (45). Notably, CB1R stimulation in cultured adipocytes increased lipoprotein lipase activity, glucose uptake, and adipogenesis (8, 12, 25, 55, 65). However, the role of ECS in controlling AT lipolysis has been poorly studied. A preliminary report indicated that mice with adipocyte-specific deletion of CB1R failed to develop liver steatosis, glucose intolerance, and insulin resistance after a high-fat diet, suggesting that CB1R activation in AT could be associated with increased FFA delivery (43). A previous study by O'Hare and coworkers (52) indicated an increase in systemic lipolysis in response to an intracerebroventricular injection of CB1R agonists, but peripheral ECS activation was not examined.

Therefore, the primary aim of this study was to determine if stimulation of the ECS in AT was associated with the dysregulation of lipolysis. We provide evidence that activation of CB1R alters the antilipolytic effect of insulin in AT, suggesting that ECS overactivation encountered in obesity may be linked to excessive fat mobilization and related metabolic disorders.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diet. Official French regulations (n°87848) for the use and care of laboratory animals were followed throughout the experimental period. The experimental protocol was approved by the local ethics committee for animal experimentation (n°BX0622).

In vivo studies were performed on male 15-wk-old C57BL/6J mice (JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France) and global $CB1R^{-/-}$ mice (generous gift from Dr. James Pickel, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD) housed individually on a 12/12-h light/dark schedule at 22–23°C with ad libitum access to water and food (Standard diet AO4; UAR, Epinay-sur-Orge, France). In vitro studies were performed by using 250- to 300-g Wistar rats (JanvierLabs) housed and fed in the same conditions as the mice.

Drugs. All chemicals and mediums used in this study were supplied by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) except for JZL195 (Bio-Techne, Lille, France) and insulin (Actrapid, Novo Nordisk, La Défense, France)

In vivo studies. Before testing, the mice were either fasted for 6 h or 24 h as indicated in each figure and then received an intraperitoneal dose of anandamide (10 mg/kg) or vehicle (0.1% DMSO/0.025% Tween 80 in NaCl 0.9%). Fifteen minutes later, the mice were injected intraperitoneally with the specific agonist of β3-adrenergic receptors BRL37344 (5 mg/kg) and/or insulin (0.25 or 0.5 UI/kg) or glucose (2 g/kg), as indicated for each experiment. Glucose and insulin tolerance was estimated by monitoring glycemia with a My Life PuraTM glucose meter (Ypsomed, Paris, France) directly on a blood drop from the tail. Larger blood samples (25 μl) were collected from tails in tubes containing EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) to measure plasma glycerol, FFA, and insulin levels by using colorimetric glycerol FS and NEFA FS assays (DiaSys, Condom, France) and ultrasensitive mouse ELISA kit (Eurobio, Les Ulis, France). The same experimental procedure was used to study signaling pathways, except that the mice were killed and tissues collected 15 min after insulin or glucose administration.

In another experiment, 6-h fasted mice were injected with JZL195 (20 mg/kg), a dual inhibitor of the degradation enzymes for anandamide and 2-AG, FAAH, and MAGL. The mice were followed for 3 h to determine glycemia and plasma glycerol levels. A kinetic approach was designed to determine endocannabinoid accumulation and its underlying effects on AT. Three mice were killed at 0, 30, 60, 120, and 180 min after the JZL 195 injection. Periepididymal AT was collected for immunoblotting experiments, and endocannabinoid measurement and liver was collected for real-time PCR analysis.

Adipose tissue explants. In vitro studies were performed with 250- to 300-g Wistar rats (JanvierLabs) housed and fed in the same conditions as the mice. The rats were fasted overnight and anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg). Epididymal AT was collected, rinsed in warm medium (DMEM-HAM/F12) supplemented with 1% BSA, and dissected into ~10 mg pieces. Then, 5–6 explants were incubated in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C under slight agitation in 1 ml of the same medium supplemented with either norepinephrine (1 μM), insulin (1 nM), and/or anandamide (5 μM). Free glycerol and FFA in the culture medium were determined after 1 h of incubation. For the experiments dedicated to signaling pathway analyses, tissue explants were collected and frozen in liquid nitrogen after 15 min or 1 h of incubation.

Endocannabinoid quantitation by targeted LC-QqQ analysis. Tissues were homogenized in a Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK) with 500 μl MeOH/Tris (50 mM, pH 8) 1:1 containing 11.2 ng of d4-anandamide standard. Then, each homogenate was added to 2 ml of CHCl3/MeOH 1/1 and 500 μl of Tris (50 mM, pH 8), vortexed and centrifuged for 10 min at 3,000 *g* (−2°C). The organic layer was recovered, and the water phase was extracted one more time with ice-cold chloroform. The combined extracts were dried under N_2 and resolubilized in 120 μl of CHCl3. Proteins were precipitated with 2 ml acetone, incubated for 30 min at −20°C, and centrifuged for 10 min at 3,000 *g* (−2°C). The supernatant was carefully transferred to new tubes and dried under N_2. Finally, the dried residue was reconstituted in 200 μl MeOH and injected into a 1200 LC system coupled to a 6460-QqQ MS/MS system equipped with an electrospray ionization source (Agilent Technologies). Separation was achieved on a Zorbax SB-C18 2.1 × 50 mm, 1.8-μm column (Agilent Technologies) at a flow rate of 0.25 ml/min, 40°C, with a linear gradient of (solvent A) water containing 0.1% formic acid and (solvent B) methanol containing 0.1% formic acid as follows: 10% B for 1 min, up to 85% B in 8 min, and then maintained at 10% for 4.5 min. Acquisition was performed in the positive multiple reaction monitoring mode (source temperature: 350°C, nebulizer gas flow rate was 10 l/min, 40 psi, sheath gas flow 10 l/min, temperature 400°C, capillary 4,000 V, nozzle 1,000 V). Transitions used were 2-AG 379.1→91 (frag 120V, CE 62V), AEA-d4 352.2→66 (frag 115V, CE 14V), AEA 348.2→62 (frag 120V, CE 14V), OEA-d4 330.2→66 (frag 120V, CE 14V), OEA 326.2→62 (frag 115V, CE 14V) and PEA 300.2→62 (frag 124V, CE 14V). Endocannabinoids were quantitated by the isotope dilution method by using deuterated standards. Results are expressed as picomole per gram of wet weight of tissue.

Western blot analyses and cAMP assay. For immunoblotting, fat pads were homogenized in RIPA lysis buffer (NaCl 150 mM, Triton 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM pH 8) containing a phosphatase and protease inhibitor cocktail and sonicated three times on ice. Then, extracts were incubated on ice for 1 h and centrifuged twice at 15,000 *g* for 20 min at 4°C to clarify protein lysate from fat. Protein concentration was determined with the BCA Protein Assay Kit (Sigma): 25 μg of proteins were resolved in gradient (4–20%) SDS-PAGE gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and blotted onto nitrocellulose membranes with the Transblot system (Bio-Rad). After 2 h in blocking buffer (BSA 5%), the membranes were incubated with primary antibodies recognizing phospho-Akt T308, phospho-Akt S473, phospho-Akt S474, phospho-PKA T197, phospho-HSL S660, total form of Akt, PKA and HSL, and β-actin. Appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were used for detection. Finally, proteins of interest were visualized by enhanced chemiluminescence with the Bio-Rad Chemi-Doc MP Imaging System after substrate incubation (Clarity, Bio-Rad). Bands were quantified by densitometric analysis performed by ImageLab software. All antibodies were purchased from Cell Signaling (Leiden, the Netherlands) except β-actin (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany).

Intracellular cAMP levels were determined by a competitive ELISA method using a cAMP Complete ELISA kit (Enzo Life Science, Villeurbanne, France). Briefly, frozen AT was extracted with 0.1 M of hydrochloric acid in a tissue grinder and then centrifuged twice at 600 *g* for 10 min at 4°C. The cAMP assay was performed on the supernatant following the supplier's instructions. The results were normalized by fat pad weight.

RT-PCR. Total mRNAs from tissues were extracted with Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France), and 1 μg RNA was reverse transcripted with the Iscript cDNA Kit (Bio-Rad). Real-time PCR was performed as described previously (34) by using a StepOnePlus real-time PCR system (Life Technologies, Saint-Aubin, France). For each gene, a standard curve was established from four cDNA dilutions (1/10 to 1/10,000) and used to determine the relative gene expression variation after normalization with the geometric mean of three housekeeping genes, TATA box binding protein (TBP), L38, and 18S. Forward and reverse primer sequences used for amplification were 5′-aattagtagaaccgggccac-3′ and 5′-ccaactcccaggtacaatca-3′ for FAT/CD36, 5′-atttacgtcacgtttaccccg-3′ and 5′-ataccaccccaccagcttcc-3′ for ACOX1, 5′-agctggggattcaacacagg-3′ and 5′-ccaaggcagctggaattgtg-3′ for FGF21, 5′-acggcacaggacttactcca-3′ and 5′-gctgtctttgttgctcttccaa-3′ for TBP, 5′-catgcctcggaaaattgag-3′ and 5′-tcttgacagacttggcatcct-3′ for L38, and 5′-gtgtggggagtgaatggtg-3′ and 5′-gcgagacagtcaaaccacg-3′ for 18S.

Statistical analysis. Results are expressed as means ± SE. Data were analyzed statistically with GraphPad InStat software (GraphPad Software, La Jolla, CA) by two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test or by Student's *t*-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Anandamide potentiates the action of β3 agonist on lipolysis in vivo. To explore the role of ECS activation on lipolysis, we first examined, in 6-h fasted mice, the effect of acute in vivo treatment with anandamide on plasma glycerol levels when lipolytic activity was stimulated by the specific β3-agonist BRL37344 (5 mg/kg). Interestingly, we found that intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) potentiated the ability of BRL37344 to induce plasma glycerol release (Fig. 1*A*). When the experiment was repeated in CB1R$^{-/-}$ mice, the stimulating action of anandamide was strongly attenuated, indicating that part of the effect of the drug was mediated through CB1R (Fig. 1*A*).

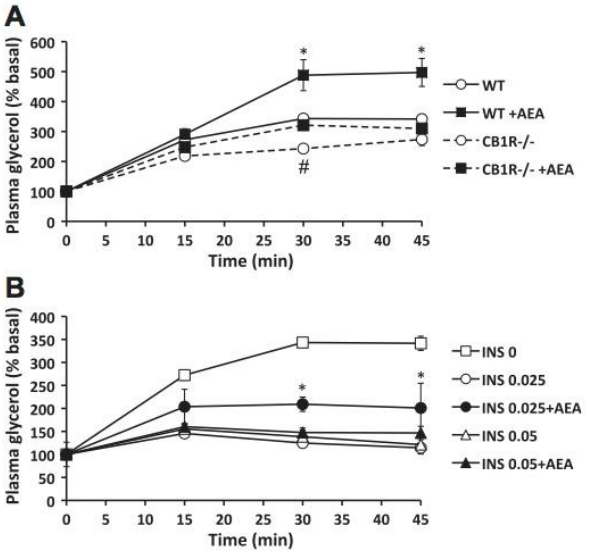


Fig. 1. Anandamide potentiates β3 adrenergic receptor-stimulated lipolysis in wild-type (WT) mice. *A*: wild-type or CB1R$^{-/-}$ mice fasted for 6 h first received an injection of anandamide (AEA; 10 mg/kg) or vehicle. Fifteen minutes later, the mice were injected with BRL37344 (5 mg/kg), and the appearance of plasma glycerol was determined from blood samples collected from the tail tip vein at the indicated times after BRL37344 injection. Data represent % variation from basal plasma glycerol expressed as means ± SE ($n = 7$). *WT vs. WT+AEA, $P < 0.05$; #CB1$^{-/-}$ vs. CB1$^{-/-}$+AEA, $P < 0.05$. *B*: wild-type mice fasted for 6 h first received an injection of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Fifteen minutes later, the mice were injected with BRL37344 (5 mg/kg) alone or in combination with insulin (INS; 0.025 or 0.05 UI/kg). The appearance of plasma glycerol was determined from blood samples collected from the tail tip vein at the indicated times after BRL37344 injection. Data represent % variation from basal plasma glycerol expressed as means ± SE ($n = 7$). Values for the INS 0 series were all significantly different from others at $P < 0.05$. *INS 0.025 vs. INS 0.025+AEA, $P < 0.05$.

Similar experiments were conducted in the presence of insulin. The doses tested were selected according to their potency to decrease glycemia as determined by the insulin tolerance test. The effect of insulin on plasma glucose levels was maximal for 0.05, weak for 0.001, and intermediate for 0.025 UI/kg (data not shown). As expected, the administration of insulin reduced β3 agonist-stimulated lipolysis. In the absence of anandamide, the inhibition of plasma glycerol appearance was maximal with both doses of insulin tested (0.05 and 0.025 UI/kg). Interestingly, the inhibitory effect of insulin 0.025 UI/kg was partially blunted in the presence of anandamide, suggesting that activation of the ECS could impair the antilipolytic action of insulin (Fig. 1*B*).

Anandamide induces insulin resistance in adipose tissue resulting in stimulation of basal lipolysis. The impact of ECS activation on plasma glycerol appearance was also tested in the absence of β3 agonist stimulation, i.e., in conditions regarded as basal lipolysis. We first observed that injections of anandamide compared with vehicle did not induce any significant variation in plasma glycerol levels when mice had been fasted for 24 h, indicating no change in lipolytic activity when insulinemia is very low (Fig. 2*A*). Conversely, in 6-h fasted mice, which showed higher basal insulin levels than 24-h fasted mice (Fig. 2*B*), anandamide injection induced a rapid

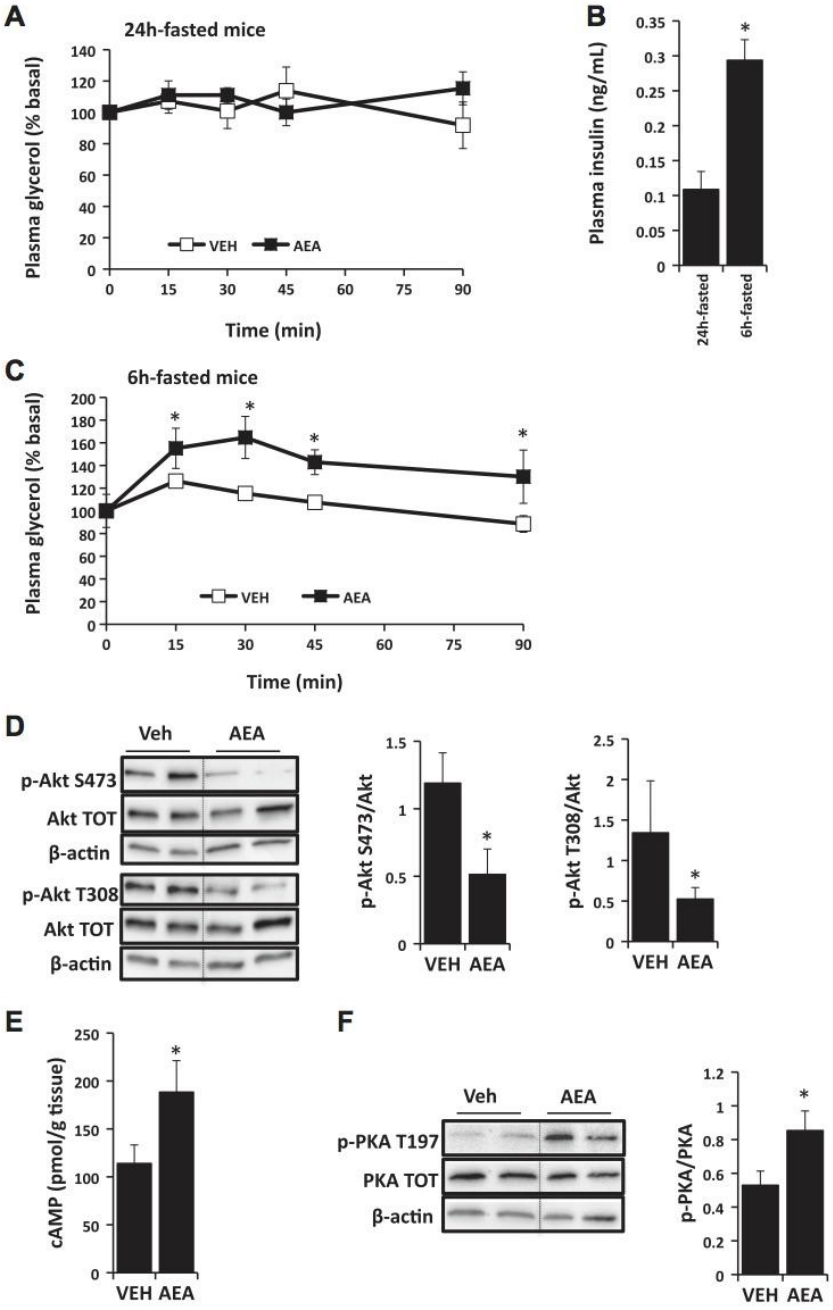


Fig. 2. Anandamide increases basal lipolysis by altering insulin signaling in adipose tissue. *A*: wild-type mice fasted for 24 h received an injection of anandamide (AEA; 10 mg/kg) or vehicle (VEH), and the appearance of plasma glycerol was determined from blood samples collected from the tail tip vein at the indicated times. Data represent % variation from basal plasma glycerol. *B*: basal plasma insulin levels in mice fasted for 24 h and 6 h. *C*: wild-type mice fasted for 6 h received an injection of anandamide (10 mg/kg) or vehicle, and the appearance of plasma glycerol was determined from blood samples collected from the tail tip vein at the indicated times. Data represent % variation from basal plasma glycerol. *D*: representative immunoblots of total and phosphorylated Akt proteins with graphical densitometry quantification activities in adipose tissue of mice treated as in *C* and killed at $t = 15$ min. *E*: cAMP levels in adipose tissue of mice treated as in *C* and killed at $t = 15$ min. *F*: representative immunoblots of total and phosphorylated PKA proteins with graphical densitometry quantification of activities in adipose tissue of mice treated as in *C* and killed at $t = 15$ min. For all experiments, results are expressed as means ± SE ($n = 7$); $^*P < 0.05$. Immunoblots presented in *D* and *F* were subjected to rearrangements consisting in lane splicing within a single gel.

and significant increase in plasma glycerol levels (Fig. 2*C*). To determine if the increase in lipolysis induced by anandamide was associated with an alteration of insulin signaling, we measured Akt and PKA protein activities in periepididymal AT collected 15 min after drug or vehicle administration. Compared with vehicle, anandamide injection decreased phosphorylation of Akt both at the ser473 and thr308 sites, indicating inhibition of the Akt insulin-dependent antilipolytic pathway (Fig. 2*D*). Consistent with this, cellular cAMP content and p-PKA protein levels were increased by anandamide, which is in agreement with the induction of lipolytic activity (Fig. 2, *E* and *F*).

To further examine the effect of anandamide on the antilipolytic action of insulin, glycerol production was measured during a physiological increase in insulinemia induced by an intraperitoneal glucose load (2 g/kg) given to 24-h fasted mice. In these conditions, which mimic refeeding, the acute anandamide injection did not alter plasma insulin levels compared

with vehicle (Fig. 3*A*). However, anandamide induced a transient but strong increase in plasma glycerol levels (Fig. 3*B*) and significantly delayed the decrease in FFA induced by glucose load (Fig. 3*C*). Notably, when the experiment was repeated in $CB1R^{-/-}$ mice, the early increase in plasma glycerol levels induced by anandamide in wild-type mice was abrogated (Fig. 3*D*). In wild-type mice, anandamide injection induced a decrease in Akt activity, an increase in PKA activity (Fig. 3*E*), and a concomitant elevation of cAMP levels (Fig. 3*F*) in AT collected 15 min after the glucose load.

Endogenous activation of ECS in adipose tissue by JZL195 alters insulin signaling and increases lipolysis. Previous results indicated a rapid and transient effect of exogenous anandamide on lipolysis, likely due to its rapid enzymatic degradation (62). To test the consequences of endogenous ECS activation, 6-h mice were treated with JZL195, a dual inhibitor of the endocannabinoid degrading enzymes FAAH and MAGL, to induce the accumulation of anandamide and 2-AG in tissues. First, we observed that JZL195 induced a rapidly increasing elevation of endocannabinoid content in AT over

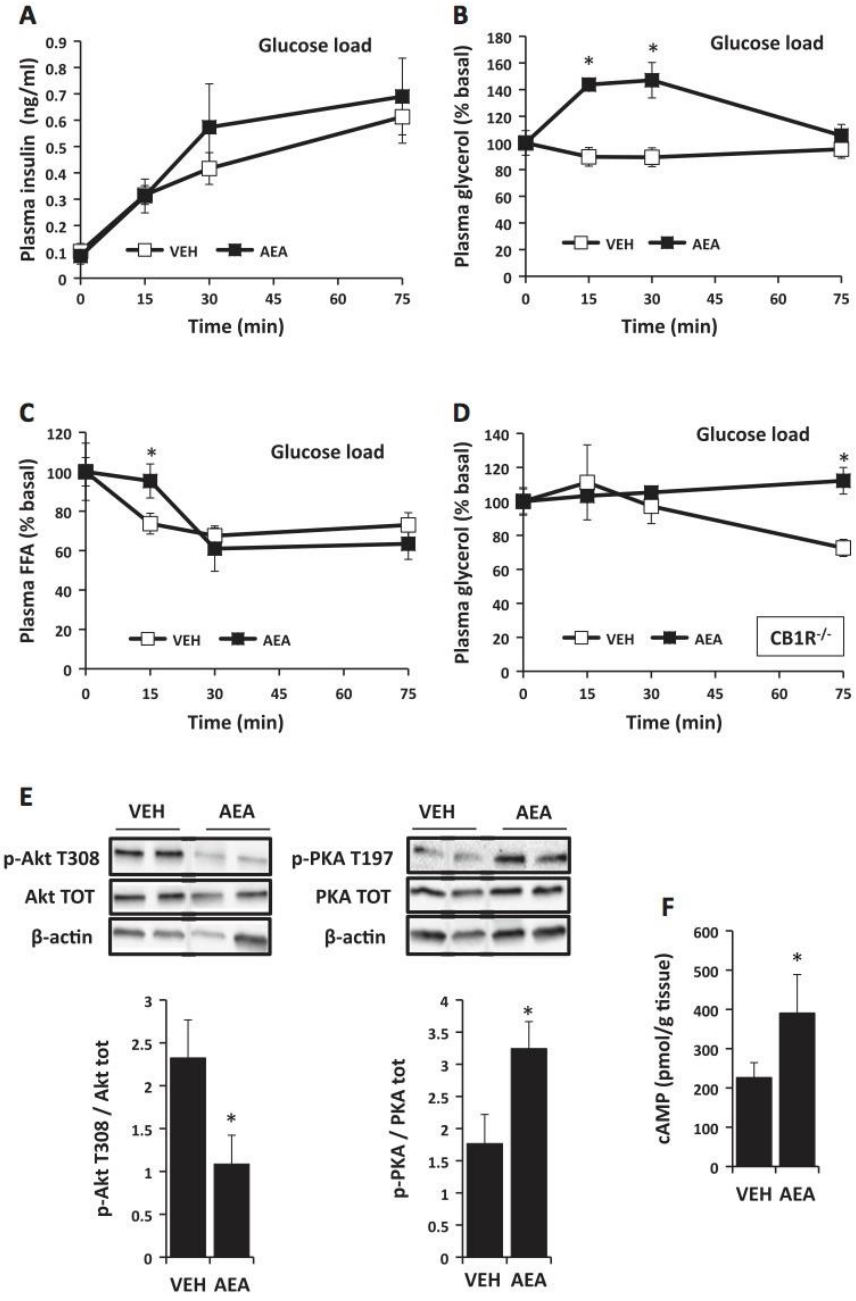


Fig. 3. Anandamide stimulates lipolysis by altering insulin signaling after glucose loading. Wild-type mice fasted for 24 h were treated with anandamide (AEA; 10 mg/kg) or vehicle. Fifteen minutes later, the mice received an intraperitoneal glucose injection (2 g/kg), and blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated times. *A*: plasma insulin levels at $t = 15$ min after glucose load. *B*: plasma glycerol appearance after glucose load. Data represent % variation from basal plasma glycerol. *C*: plasma free fatty acids (FFA) appearance after glucose load. Data represent % variation from basal plasma glycerol. *D*: the appearance of plasma glycerol after glucose load in $CB1R^{-/-}$ mice measured in the same experimental conditions as in wild-type mice. Data represent % variation from basal plasma glycerol. *E*: representative immunoblots of total and phosphorylated Akt and PKA proteins with graphical densitometry quantification of activities in adipose tissue of mice treated as in *A* and killed at $t = 15$ min. Immunoblots presented were subjected to rearrangements consisting in lane splicing within a single gel. *F*: cAMP levels in adipose tissue of mice treated as in *A* and killed at $t = 15$ min. For all experiments, results are expressed as means ± SE ($n = 7$); $^*P < 0.05$.

time (Fig. 4*A*). Finally, 3 h after JZL195 administration, 2-AG levels increased from 372.7 ± 83.8 to 578.9 ± 49.8 pmol/g and anandamide from 7.87 ± 0.52 to 14.47 ± 1.25 pmol/g. Interestingly, endocannabinoid overproduction was associated with an increase in AT lipolysis as indicated by the higher glycerol levels measured in the plasma of JZL195 mice fasted for 6 h compared with vehicle (Fig. 4*B*). It is noteworthy that the induction of lipolysis by JZL195 was not observed when the experiment was performed on mice fasted for 24 h (data not shown). Kinetic analysis of the insulin signaling pathway in 6-h fasted mice revealed that JZL195 injection induced a rapid (t = 30 min) inhibition of both Akt1 and 2 activity as indicated by the decrease in phosphorylation at residues Thr308, Ser473, and Ser474 in the AT of treated mice (Fig. 4*C*). Besides, phospho-PKA and phospho-HSL levels were increased with a slight delay (t = 120 min) in JZL195 mice, which is consistent with the increase in glycerol release observed at t = 180 min (Fig. 4*B*). The long-term consequences of JZL195-induced lipolysis on the liver were evaluated by performing gene expression analysis following a 6-h treatment. We observed higher mRNA levels of FAT/CD36 (fatty acid translocase) related to FA uptake, of the PPARα

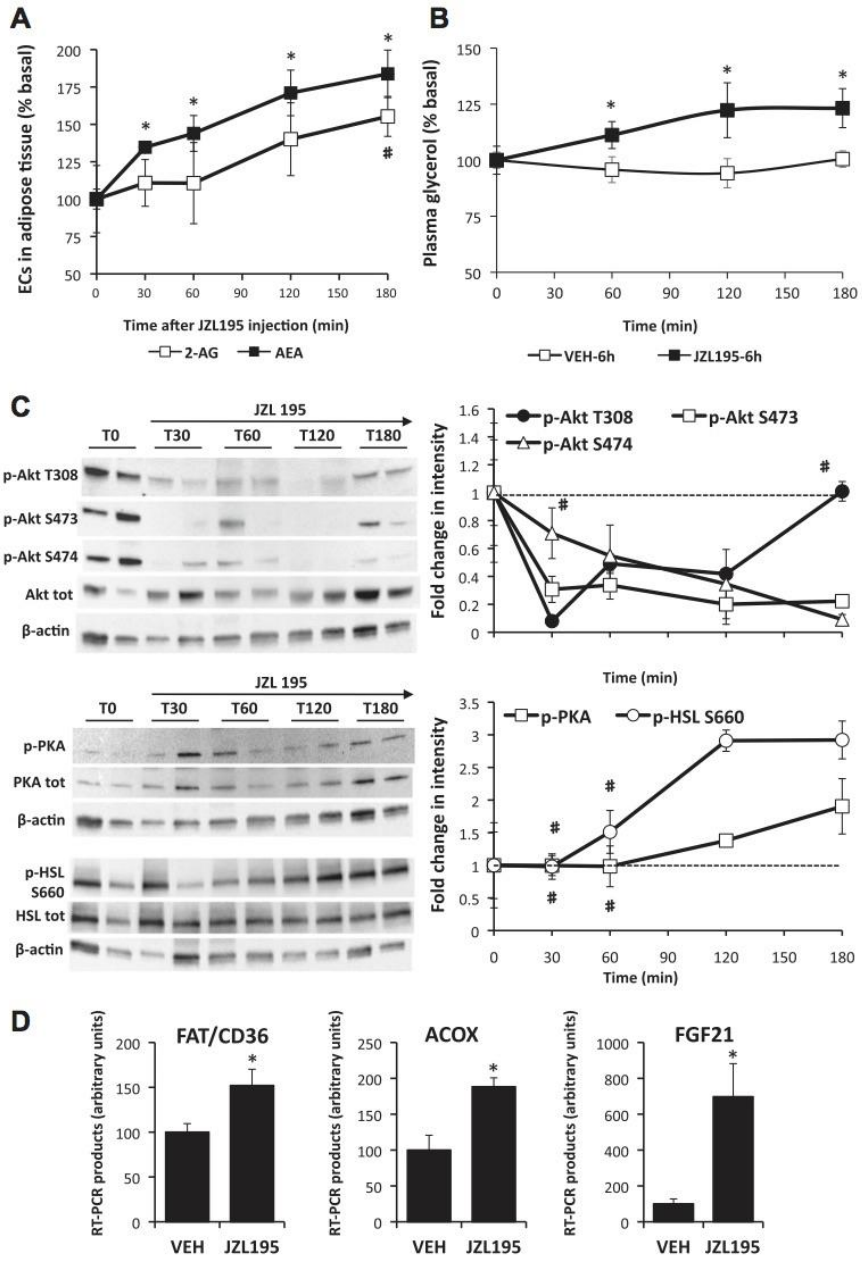


Fig. 4. Treating mice with JZL195, the dual inhibitor of MAGL and FAAH, increases adipose tissue endocannabinoid levels and basal lipolysis. *A*: endocannabinoid (ECs) levels in adipose tissue of 6-h fasted wild-type mice treated with JZL195 (20 mg/kg) or vehicle and killed at indicated times. Results are expressed as means ± SE (n = 5); *statistical difference from basal AEA content, $P < 0.05$; #statistical difference from basal 2-AG content; $P < 0.05$. *B*: appearance of plasma glycerol in 6-h fasted wild-type mice treated with JZL195 (20 mg/kg) or vehicle and killed at indicated times. Data represent % variation from basal plasma glycerol expressed as means ± SE (n = 5). *VEH 6 h vs. JZL195 6 h, $P < 0.05$. *C*: representative immunoblots of total and phosphorylated Akt, PKA, and HSL proteins with graphical densitometry quantification activities in adipose tissue of mice treated as in *A*. Results are expressed as means ± SE (n = 5). For each series, values were statistically different from basal protein activity measured before JZL195 administration (dotted line) at $P < 0.05$ except when indicated by #. *D*: liver real-time PCR analysis of fatty acid translocase (FAT/CD36), acylCoA oxidase 1 (ACOX), and fibroblast growth factor-21 (FGF21) expression in the liver of mice killed 6 h after JZL195 (20 mg/kg) or vehicle injection. Results are expressed as means ± SE (n = 5); *$P < 0.05$.

target gene acyl-CoA oxidase 1 (ACOX), and of fibroblast growth factor-21 (FGF21) considered as a marker of FFA utilization by the liver in mice treated with JZL195 compared with vehicle (Fig. 4*D*).

Evidence for a direct alteration of insulin signaling and lipolysis by anandamide in adipose tissue explants. An in vitro study using rat AT explants was designed to support the concept that ECS activation in AT might limit the stimulatory effect of insulin on Akt pathway. While insulin rapidly increased Akt activity in AT treated with vehicle, we found that the presence of anandamide strongly limited (at $t = 5$ min) or abolished (at $t = 15$ min) this effect (Fig. 5*A*). Moreover, when measured at $t = 15$ min, the inhibitory action of insulin on HSL activity was also blunted by anandamide (Fig. 5*A*). Besides, we used this model to test whether ECS activation might induce lipolysis, consistent with impaired AT insulin action. As expected, glycerol and FFA release by AT explants measured after 1 h of incubation was stimulated by norepinephrine treatment and limited by insulin (Fig. 5*B*). However, we showed, as observed in vivo, that the antilipolytic action of insulin was less effective in the presence of anandamide (Fig. 5*B*). In the same experiment, data related to insulin signaling concomitantly indicated that the strong positive effect of insulin on Akt activity was abrogated by anandamide (Fig. 5*B*, immunoblots). Conversely, we also interestingly noticed that anandamide decreased glycerol release and increased Akt activity in the absence of insulin.

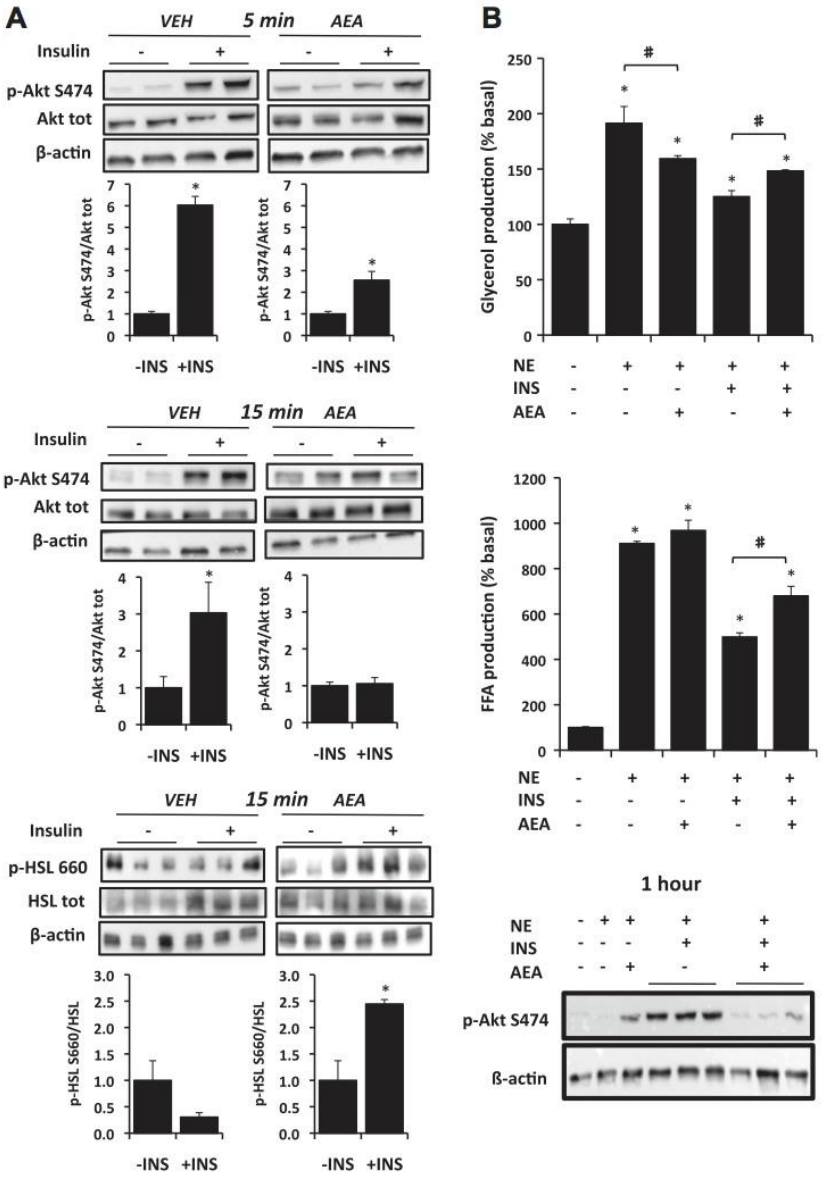


Fig. 5. Evidence for a direct alteration of insulin signaling and lipolysis by anandamide in adipose tissue explants. *A*: effect of a 5- or 15-min insulin treatment (1 nM) on Akt and HSL activity in adipose tissue explants prepared from rat periepididymal fat pads and stimulated with norepinephrine (1 μM) in the presence of anandamide (5 μM) or vehicle. Representative immunoblots with graphical densitometry quantification. Results are expressed as means ± SE ($n = 5$). *$P < 0.05$ −INS vs. +INS. *B*: glycerol and FFA produced in the medium after 1 h of incubation with different treatments. Results are expressed as means ± SE ($n = 5$) of % variation from basal. The bottom panel shows representative immunoblots of p-Akt S474 isoform in adipose tissue explants at the end of the experiment. *$P < 0.05$ vs. basal; #$P < 0.05$ AEA vs. VEH.

In the whole, these findings support the possibility that ECS activation in AT impairs the ability of insulin to suppress lipolysis consistent with in vivo observations.

DISCUSSION

The present literature strongly supports the notion that obesity induces overactivation of the ECS in the AT in both animals and humans (5, 21, 35, 46). Some studies further suggested that ECS overactivity is associated with the dysregulation of adipocyte metabolism, thus promoting fat mass expansion and related disorders. Indeed, CB1R stimulation was shown to alter adipokine secretion and to exert proadipogenic (46) and prolipogenic actions (12, 26, 54, 55, 65). Consistent with this, CB1R knockout mice are resistant to weight gain when fed a high-fat diet (12). While the role of the ECS in regulating fat deposition and synthesis appears manifest, its role in controlling fat mobilization remains poorly studied and unclear. However, numerous studies indicate that the development of peripheral insulin resistance is strongly associated with lipolysis deregulation leading to excessive FFA deliverance, ectopic lipid deposition, and lipotoxicity (3, 13, 27). To address this issue, we have explored the possibility that overactivation of the ECS in AT might represent one of the mechanisms by which FFA mobilization is increased in obesity.

The plasma insulin level is the main hormonal signal that regulates fat cell lipolysis according to the nutritional state. Therefore, during the postprandial state, the typical increase in insulin production stimulates FA storage and suppresses intracellular lipolysis. In contrast, during the interprandial state and fasting, variations in plasma insulin levels combined with tissue sensitivity represent an important adaptive response during which FFA and glycerol are produced as energy sources from extra-AT (64). Evidence has accumulated that the postprandial partitioning of FA is altered in obese individuals and associated with an increase in FFA mobilization (30, 49). Besides, a lack of inhibitory effect of insulin on plasma EC levels has also been observed in insulin-resistant patients (16), supporting the existence of a link between insulin sensitivity and peripheral ECS overactivation. In line with this, the present findings suggest that the activation of the ECS in AT was associated with an increase in lipolytic rates in conditions that mimic the postprandial state. This hypothesis was supported by our results, which showed that acute anandamide administration did stimulate plasma glycerol release, but only when insulin levels were substantial. Specifically, we demonstrated that the antilipolytic action of insulin was actually impaired in response to ECS activation. The hypothesis of an insulin dose-dependent effect of anandamide on lipolysis was confirmed by using different experimental approaches. Insulinemia was modulated either physiologically by glucose administration or by varying fasting durations or artificially by insulin injections. Notably, anandamide was unable to increase the plasma glycerol content when mice were fasted overnight, suggesting that in these conditions of low insulinemia, ECS activation could rather promote FA synthesis and storage. This hypothesis is in agreement with the present literature (8, 12, 25, 55, 65) and supported by our findings showing an increase in p-Akt levels measured in tissue explants incubated in the absence of insulin (Fig. 5*B*). In a previous study which tested the effect of acute central CB1R activation during hyperinsulinemic clamping, the authors also failed to show any significant effect of ECS activation on glycerol release during clamp baseline (i.e., when insulinemia was very low), which can be likened to our fasting conditions (52). Conversely, during clamping, the ability of insulin to suppress lipolysis was impaired by CB1R activation, which is in accordance with our conclusions. However, the experiment exclusively dealt with the effects of intracerebroventricular injections of CB1R agonists on systemic lipolysis while the direct activation of peripheral CB1R was not tested. Our findings further demonstrate that the specific overactivation of the ECS in AT, such as that encountered in obesity, is also able to stimulate lipolysis.

One can argue that the effect of anandamide on lipolysis observed in our in vivo experiments could occur secondary to a variation in insulin secretion since previous studies have shown a direct inhibitory action of CB1R agonists on β cells (36, 51, 63). However, it is very unlikely that the increase in plasma glycerol levels was due exclusively to a decrease in insulin secretion since the effect was maintained when the level of the hormone was controlled by exogenous administration (data not shown). In addition, anandamide did not

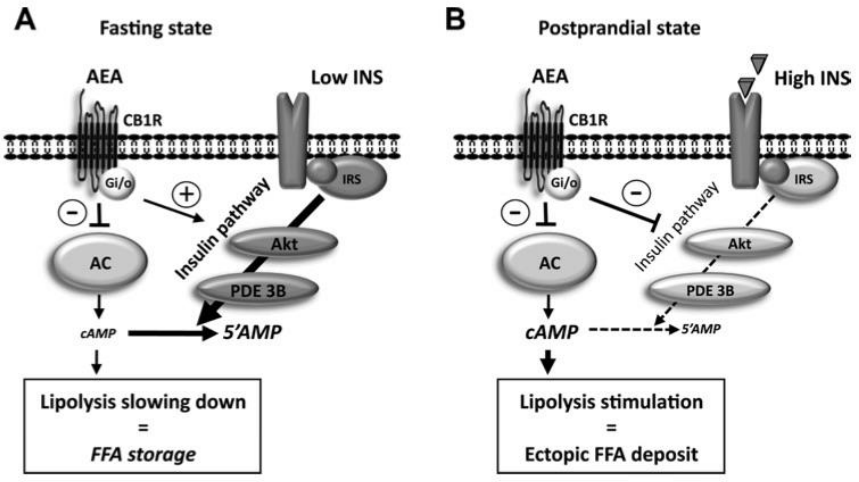


Fig. 6. Putative schematic representation for the impact of CB1R activation in fasting or postprandial state on cAMP-dependent lipolysis regulation. *A*: in the fasting state, i.e., when insulin is typically low and lipolysis high, activation of CB1R decreases cAMP levels both by direct inhibition of adenylyl cyclase (AC) and by stimulating Akt-dependent PDE3B activity. This may result in a slowdown of FFA mobilization, thus promoting storage and adipose tissue expansion as already suggested (31, 45). *B*: in the postprandial state, i.e., when lipolysis is typically low due to the action of insulin, activation of CB1R inhibits Akt-dependent PDE3B activity and thereby cAMP hydrolysis. This results in the stimulation of FFA mobilization, thus promoting deposition in extra-adipose organs.

decrease glucose-stimulated insulin production in our conditions (Fig. 3*A*).

While some studies have demonstrated the existence of alternative mechanisms, Akt signaling is the most frequently described pathway to explain the antilipolytic effect of insulin (11, 17). It is initiated through the phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS1), leading to phosphatidylinositol 3-kinase activation (PI3K) and Akt activation. In turn, the phosphodiesterase 3B (PDE3B) is phosphorylated, thus resulting in the enhanced hydrolysis of cAMP and a decrease in PKA and HSL activities (24). In this study, we provide evidence that the increase in lipolysis induced by ECS activation in AT is associated with a modulation of insulin pathway.

Previous studies on various cell types have demonstrated that ECS may modify the activity of the PI3K/Akt pathway (28, 38, 40, 59), but given the inconsistency of the results, it was not possible to draw any definite conclusions concerning the direction of the effect. Indeed, CB1R agonists have been shown to downregulate Akt activity in glioma and cancer cells (9, 19, 60), while it was increased in CHO cells stably transfected with the CB1R (28). In these studies, whether the CB1R activation interferes with the ability of insulin to stimulate Akt was not tested. However, this notion has been specifically examined in human skeletal muscle cells (18), and similar to our findings a concentration-dependent impairment of insulin-stimulated Akt phosphorylation by anandamide was highlighted. The authors further demonstrated that anandamide enhanced the phosphorylation of IRS-1 on the Ser307 site, which is involved in the negative regulation of insulin signaling.

In AT, cAMP is a second messenger highly involved in the regulation of lipolysis since it controls the activation of PKA and HSL. cAMP levels mainly depend on the activity of adenylyl cyclase, which can be controlled by G protein-coupled receptors such as adrenergic receptors or CB1R. It is well known that CB1R selectively interacts with Gi/o proteins to inhibit adenylyl cyclase and decrease cAMP levels (31), suggesting intuitively that activation by agonists would promote a decrease in lipolysis. In line with this, some studies using antagonists indicated that CB1R blockade abrogates the inhibition adenylyl cyclase activity and thereby enhances cAMP levels and the activation of PKA (7). Besides, the antilipolytic action of insulin is associated with a decrease in intracellular levels of cAMP due to active hydrolysis by PDE3B after Akt-dependent activation (24). Our results support the possibility that CB1R could either decrease or increase Akt activity and thereby modulate cAMP levels depending on insulin levels. Thus activation of CB1R may reduce lipolysis both through the inhibition of adenylyl cyclase and activation of the Akt/PDE3B cascade in the fasting state. Conversely, in the presence of insulin, CB1R activation may induce lipolysis by reducing Akt-dependent pathways and thereby limiting the hydrolysis of cAMP by PDE3B (Fig. 6). As suggested by the residual action of anandamide observed in $CB1R^{-/-}$ mice, part of the effects may be due to CB2R or other noncannabinoid receptors.

Preventing the degradation of endocannabinoids by FAAH and MAGL is recognized as an interesting alternative approach to study the consequences of ECS hyperactivity in obesity (41). Indeed, it has been shown that the activity of these hydrolyzing enzymes is dramatically reduced in the liver of mice fed with a high-fat diet (14, 54). Extrapolating these findings to AT predicts that the activity of hydrolyzing enzymes may be reduced in obese mice and thus induce local ECS overactivity. Here, we give direct evidence that the blockade of FAAH and MAGL by using JZL195 induces an increase in endocannabinoid content in epididymal AT. Notably, the nearly twofold elevation was in the range of what is usually observed in the AT of obese patients in comparison with lean subjects (46). Finally, the ECS activation induced by JZL165, which could be considered physiological, was associated with an alteration of Akt signaling and a stimulation of lipolysis, similarly to what was observed after acute anandamide administration. This increase in peripheral ECS tone and FFA mobilization may induce extra-adipose lipid accumulation. In line with this, it was shown in a previous study that the inhibition of FAAH and MAGL was associated with hepatic triglyceride accumulation in 4-h fasted mice (58). On the basis of the available literature, the authors speculated that the lipid accumulation may not result from increased delivery of FFA from AT. However, this hypothesis should be tested by taking into account the present novel findings showing an increase in lipolysis in close experimental conditions. Previous studies have demonstrated a critical role of FGF21 in mediating ketogenesis during adaptive starvation response. Hepatic FGF21 expression is induced during fasting through a mechanism initiated by the release of FFA from adipocytes and involving the activation of PPARα (10). Consistently, the induction of the expression level of FAT/CD36, ACOX1, and FGF21 observed in the liver after JZL195 treatment further supports the notion of an increased FFA flux from AT to the liver.

In conclusion, the present study strengthens the concept that overactivation of the peripheral ECS is involved in the development of metabolic complications linked to obesity and further suggests a role for the CB1R of AT in the onset of insulin resistance. It also maintains the view that the development of strategies to reduce the activity of peripheral CB1R presents a major therapeutic interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Hélène Choubley from the Lipidomic platform of UMR866 INSERM for excellent technical assistance in the LCMS analysis of endocannabinoids.

GRANTS

This work was supported by funds from the Société Francophone du Diabète (SFD) and a grant from the French National Research Agency (ANR) under the program Investissements d'Avenir with reference ANR-11-LABX-0021 (LipSTIC Labex).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.M., L.D. B.V. and P.D. designed, analyzed the experiments and wrote the manuscript. T.M., L.D., S.T.-F., J.G., H.B. and P.D. performed the experiments related to lipolysis and signaling pathways. T.M. and J-P.P.B. determined tissue endocannabinoid contents. P.D. is the guarantor of this work and, as such, has 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

1. **Arner P.** Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 471–482, 2005. doi:10.1016/j.beem.2005.07.004.

2. **Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P.** The cannabinoid CB_1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63: 908–914, 2003. doi:10.1124/mol.63.4.908.
3. **Bergman RN, Mittelman SD.** Central role of the adipocyte in insulin resistance. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9: 205–221, 1998. doi:10.1515/JBCPP.1998.9.2-4.205.
4. **Bézaire V, Langin D.** Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc* 68: 350–360, 2009. doi:10.1017/S0029665109990279.
5. **Blüher M, Engeli S, Klöting N, Berndt J, Fasshauer M, Bátkai S, Pacher P, Schön MR, Jordan J, Stumvoll M.** Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 55: 3053–3060, 2006. doi:10.2337/db06-0812.
6. **Boden G, Shulman GI.** Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32, *Suppl* 3: 14–23, 2002. doi:10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x.
7. **Boon MR, Kooijman S, van Dam AD, Pelgrom LR, Berbée JF, Visseren CA, van Aggele RC, van den Hoek AM, Sips HC, Lombès M, Havekes LM, Tamsma JT, Guigas B, Meijer OC, Jukema JW, Rensen PC.** Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade activates brown adipose tissue and diminishes dyslipidemia and obesity. *FASEB J* 28: 5361–5375, 2014. doi:10.1096/fj.13-247643.
8. **Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P.** Anandamide induced PPARγ transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 517: 174–181, 2005. doi:10.1016/j.ejphar.2005.05.032.
9. **Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C.** Δ^9-Tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res* 66: 6615–6621, 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4566.
10. **Chen W, Hoo RL, Konishi M, Itoh N, Lee PC, Ye HY, Lam KS, Xu A.** Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 286: 34559–34566, 2011. doi:10.1074/jbc.M111.285965.
11. **Choi SM, Tucker DF, Gross DN, Easton RM, DiPilato LM, Dean AS, Monks BR, Birnbaum MJ.** Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol* 30: 5009–5020, 2010. doi:10.1128/MCB.00797-10.
12. **Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U.** The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112: 423–431, 2003. doi:10.1172/JCI17725.
13. **Cusi K.** The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 10: 306–315, 2010. doi:10.1007/s11892-010-0122-6.
14. **Demizieux L, Piscitelli F, Troy-Fioramonti S, Iannotti FA, Borrino S, Gresti J, Muller T, Bellenger J, Silvestri C, Di Marzo V, Degrace P.** Early low-fat diet enriched with linolenic acid reduces liver endocannabinoid tone and improves late glycemic control after a high-fat diet challenge in mice. *Diabetes* 65: 1824–1837, 2016. doi:10.2337/db15-1279.
15. **Di Marzo V.** Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 160: 1–24, 2008. doi:10.1007/112_0505.
16. **Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A, Petrosino S, Mertens I, Lundbom N, Piscitelli F, Westerbacka J, Soro-Paavonen A, Matias I, Van Gaal L, Taskinen MR.** Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol* 161: 715–722, 2009. doi:10.1530/EJE-09-0643.
17. **DiPilato LM, Ahmad F, Harms M, Seale P, Manganiello V, Birnbaum MJ.** The role of PDE3B phosphorylation in the inhibition of lipolysis by insulin. *Mol Cell Biol* 35: 2752–2760, 2015. doi:10.1128/MCB.00422-15.
18. **Eckardt K, Sell H, Taube A, Koenen M, Platzbecker B, Cramer A, Horrighs A, Lehtonen M, Tennagels N, Eckel J.** Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. *Diabetologia* 52: 664–674, 2009. doi:10.1007/s00125-008-1240-4.
19. **Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L.** Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate pro-apoptotic function of Bad protein. *Cell Signal* 17: 25–37, 2005. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.011.
20. **Engeli S.** Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 20, *Suppl* 1: 110–115, 2008. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01683.x.
21. **Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J.** Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 54: 2838–2843, 2005. doi:10.2337/diabetes.54.10.2838.
22. **Engeli S, Jordan J.** The endocannabinoid system: body weight and metabolic regulation. *Clin Cornerstone* 8, *Suppl* 4: S24–S35, 2006. doi:10.1016/S1098-3597(06)80041-4.
23. **Enoksson S, Degerman E, Hagström-Toft E, Large V, Arner P.** Various phosphodiesterase subtypes mediate the in vivo antilipolytic effect of insulin on adipose tissue and skeletal muscle in man. *Diabetologia* 41: 560–568, 1998. doi:10.1007/s001250050947.
24. **Eriksson H, Ridderstråle M, Degerman E, Ekholm D, Smith CJ, Manganiello VC, Belfrage P, Tornqvist H.** Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim Biophys Acta* 1266: 101–107, 1995. doi:10.1016/0167-4889(94)00237-9.
25. **Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrié P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M.** Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 46: 122–129, 2007. doi:10.1002/hep.21641.
26. **Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agrò AF, Maccarrone M.** Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci* 64: 219–229, 2007. doi:10.1007/s00018-006-6445-4.
27. **Girousse A, Tavernier G, Valle C, Moro C, Mejhert N, Dinel AL, Houssier M, Roussel B, Besse-Patin A, Combes M, Mir L, Monbrun L, Bézaire V, Prunet-Marcassus B, Waget A, Vila I, Caspar-Bauguil S, Louche K, Marques MA, Mairal A, Renoud ML, Galitzky J, Holm C, Mouisel E, Thalamas C, Viguerie N, Sulpice T, Burcelin R, Arner P, Langin D.** Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol* 11: e1001485, 2013. doi:10.1371/journal.pbio.1001485.
28. **Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M.** The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 347: 369–373, 2000. doi:10.1042/bj3470369.
29. **Gonthier MP, Hoareau L, Festy F, Matias I, Valenti M, Bès-Houtmann S, Rouch C, Robert-Da Silva C, Chesne S, Lefebvre d'Hellencourt C, Césari M, Di Marzo V, Roche R.** Identification of endocannabinoids and related compounds in human fat cells. *Obesity (Silver Spring)* 15: 837–845, 2007. doi:10.1038/oby.2007.581.
30. **Guo Z, Hensrud DD, Johnson CM, Jensen MD.** Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes* 48: 1586–1592, 1999. doi:10.2337/diabetes.48.8.1586.
31. **Howlett AC.** Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 168: 53–79, 2005. doi:10.1007/3-540-26573-2_2.
32. **Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, Pénarier G, Soubrié P, Le Fur G, Galiègue S, Casellas P.** The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 19: 1567–1569, 2005. doi:10.1096/fj.04-3177fje.
33. **Jocken JW, Goossens GH, van Hees AM, Frayn KN, van Baak M, Stegen J, Pakbiers MT, Saris WH, Blaak EE.** Effect of β-adrenergic stimulation on whole-body and abdominal subcutaneous adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *Diabetologia* 51: 320–327, 2008. doi:10.1007/s00125-007-0866-y.
34. **Jourdan T, Demizieux L, Gresti J, Djaouti L, Gaba L, Vergès B, Degrace P.** Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: evidence from cultured explants. *Hepatology* 55: 790–799, 2012. doi:10.1002/hep.24733.
35. **Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P.** CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 59: 926–934, 2010. doi:10.2337/db09-1482.
36. **Juan-Picó P, Fuentes E, Javier Bermúdez-Silva F, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A.** Cannabinoid receptors regulate Ca^{2+} signals and insulin secretion in pancreatic β-cell. *Cell Calcium* 39: 155–162, 2006. doi:10.1016/j.ceca.2005.10.005.

37. **Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K.** A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 2461–2474, 2003. doi:10.2337/diabetes.52.10.2461.
38. **Kim W, Lao Q, Shin YK, Carlson OD, Lee EK, Gorospe M, Kulkarni RN, Egan JM.** Cannabinoids induce pancreatic β-cell death by directly inhibiting insulin receptor activation. *Sci Signal* 5: ra23, 2012. doi:10.1126/scisignal.2002519.
39. **Lafontan M, Langin D.** Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48: 275–297, 2009. doi:10.1016/j.plipres.2009.05.001.
40. **Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J, Yin S, Gao P, Shan X, Pickel J, Bataller R, O'Hare J, Scherer T, Buettner C, Kunos G.** Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology* 142: 1218–1228.e1, 2012. doi:10.1053/j.gastro.2012.01.032.
41. **Long JZ, Nomura DK, Vann RE, Walentiny DM, Booker L, Jin X, Burston JJ, Sim-Selley LJ, Lichtman AH, Wiley JL, Cravatt BF.** Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20270–20275, 2009. doi:10.1073/pnas.0909411106.
42. **Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, Konje JC, Kunos G, Mechoulam R, Pacher P, Sharkey KA, Zimmer A.** Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci* 36: 277–296, 2015. doi:10.1016/j.tips.2015.02.008.
43. **Mancini G, Quarta C, Srivastava R, Klaus S, Pagotto U, Lutz B.** Adipocyte-specific CB1 conditional knock-out mice: new insights in the study of obesity and metabolic syndrome. 20th Annual Symposium on the Cannabinoids. Research Triangle Park, NC: Int. Cannabinoid Res. Soc., 2010, p. 17.
44. **Manganiello VC, Smith CJ, Degerman E, Vasta V, Tornqvist H, Belfrage P.** Molecular mechanisms involved in the antilipolytic action of insulin: phosphorylation and activation of a particulate adipocyte cAMP phosphodiesterase. *Adv Exp Med Biol* 293: 239–248, 1991. doi:10.1007/978-1-4684-5949-4_22.
45. **Matias I, Belluomo I, Cota D.** The fat side of the endocannabinoid system: role of endocannabinoids in the adipocyte. *Cannabis Cannabinoid Res* 1: 176–185, 2016. doi:10.1089/can.2016.0014.
46. **Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V.** Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3171–3180, 2006. doi:10.1210/jc.2005-2679.
47. **Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V.** Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 286, *Suppl* 1: S66–S78, 2008. doi:10.1016/j.mce.2008.01.026.
48. **Mazier W, Saucisse N, Gatta-Cherifi B, Cota D.** The endocannabinoid system: pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab* 26: 524–537, 2015. doi:10.1016/j.tem.2015.07.007.
49. **Miles JM, Wooldridge D, Grellner WJ, Windsor S, Isley WL, Klein S, Harris WS.** Nocturnal and postprandial free fatty acid kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: effects of insulin sensitization therapy. *Diabetes* 52: 675–681, 2003. doi:10.2337/diabetes.52.3.675.
50. **Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D.** Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 125: 259–266, 2016. doi:10.1016/j.biochi.2015.10.024.
51. **Nakata M, Yada T.** Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca^{2+} oscillation in islet β-cells via CB1 receptors. *Regul Pept* 145: 49–53, 2008. doi:10.1016/j.regpep.2007.08.009.
52. **O'Hare JD, Zielinski E, Cheng B, Scherer T, Buettner C.** Central endocannabinoid signaling regulates hepatic glucose production and systemic lipolysis. *Diabetes* 60: 1055–1062, 2011. doi:10.2337/db10-0962.
53. **Opie LH, Walfish PG.** Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N Engl J Med* 268: 757–760, 1963. doi:10.1056/NEJM196304042681404.
54. **Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G.** Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115: 1298–1305, 2005. doi:10.1172/JCI200523057.
55. **Pagano C, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, Bianchi K, Rizzuto R, Bernante P, Federspil G, Vettor R.** The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4810–4819, 2007. doi:10.1210/jc.2007-0768.
56. **Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrié P.** CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 640–648, 2004. doi:10.1038/sj.ijo.0802583.
57. **Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F.** Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 126: 177–187, 2006. doi:10.1007/s00418-005-0127-4.
58. **Ruby MA, Nomura DK, Hudak CS, Barber A, Casida JE, Krauss RM.** Acute overactive endocannabinoid signaling induces glucose intolerance, hepatic steatosis, and novel cannabinoid receptor 1 responsive genes. *PLoS One* 6: e26415, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0026415.
59. **Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Díaz-Laviada I.** Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB_1 and CB_2 cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal* 15: 851–859, 2003. doi:10.1016/S0898-6568(03)00036-6.
60. **Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H.** Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem* 281: 39480–39491, 2006. doi:10.1074/jbc.M603495200.
61. **Silvestri C, Di Marzo V.** The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab* 17: 475–490, 2013. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.001.
62. **Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR.** The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 219–227, 1994.
63. **Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, Di Marzo V.** Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 16: 553–565, 2008. doi:10.1038/oby.2007.106.
64. **Stich V, Berlan M.** Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proc Nutr Soc* 63: 369–374, 2004. doi:10.1079/PNS2004350.
65. **Vettor R, Pagano C.** The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 51–63, 2009. doi:10.1016/j.beem.2008.10.002.

2) *Conclusion*

Les effets de l'activation du SEC sur la lipolyse dans des conditions mimant un état postprandial ont largement été décrits dans l'article (Muller et al., 2017) et suggèrent que l'activation du SEC conduit à une augmentation de la lipolyse adipocytaire. Ceci a été démontré *in vivo* chez des souris dont le SEC a été activé par injection i.p. d'AEA ou de manière endogène *via* l'inhibition des enzymes de dégradation des endocannabinoïdes par le JZL195 mais également *in vitro* sur des explants de TAV traités par l'AEA. Les résultats suggèrent, comme illustré sur la **figure 39**, que la stimulation de la lipolyse adipocytaire est dépendante d'une altération de la voie de signalisation insulinique puisque nous avons mis en évidence une diminution des phosphorylations activatrices de l'Akt associée à l'augmentation de la concentration en AMPc.

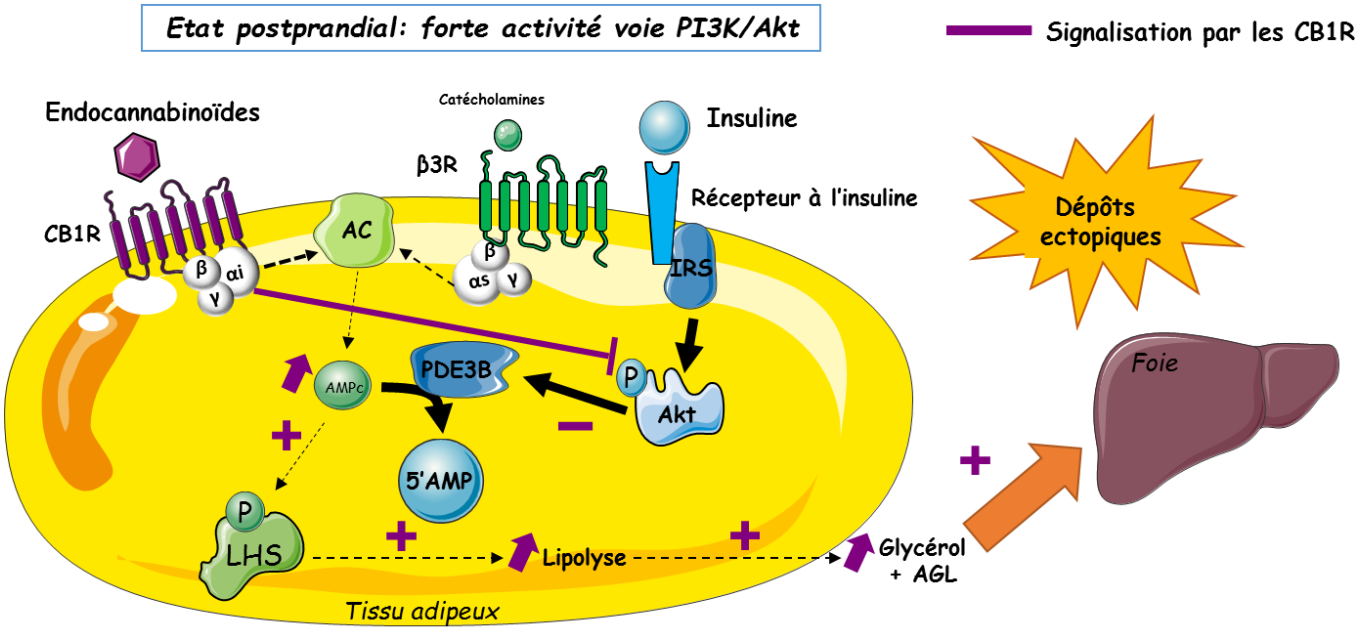


***Figure 39* : Mécanisme d'action hypothétique des CB1R sur la lipolyse adipocytaire en situation postprandiale.**

En période postprandiale, situation au cours de laquelle la forte insulinémie est généralement associée à une lipolyse faible, l'activation des CB1R inhibe l'activité de la voie Akt-dépendante et par conséquent de la PDE-3B ce qui provoque une augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc. Il en résulte une stimulation de la lipolyse adipocytaire et un relargage d'AGL favorisant ainsi les dépôts ectopiques dans des organes périphériques.

C. Conséquences de la stimulation de la lipolyse induite par la suractivation du SEC sur le métabolisme hépatique

Puisque nous avons mis en évidence que l'activation du SEC augmente l'activité lipolytique dans certaines conditions, nous nous sommes demandé si le flux d'AGL provenant du TA pouvait exercer des effets sur le métabolisme hépatique.

1) *L'injection d'AEA induit une augmentation de la triglycéridémie*

Dans un premier temps, nous avons étudié les conséquences d'une activation aigüe du SEC par l'AEA sur la triglycéridémie chez des souris dont l'insulinémie a été augmentée par une charge en glucose (**Cf. Matériel & Méthodes IV, A, 3, c**).

Dans ces conditions, le traitement par l'AEA qui, comme décrit précédemment, conduit à une stimulation de la lipolyse, s'accompagne également d'une triglycéridémie plus élevée à partir du temps t=30 min (**Figure 40**). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la lipolyse pourrait avoir des conséquences sur le métabolisme lipidique hépatique.

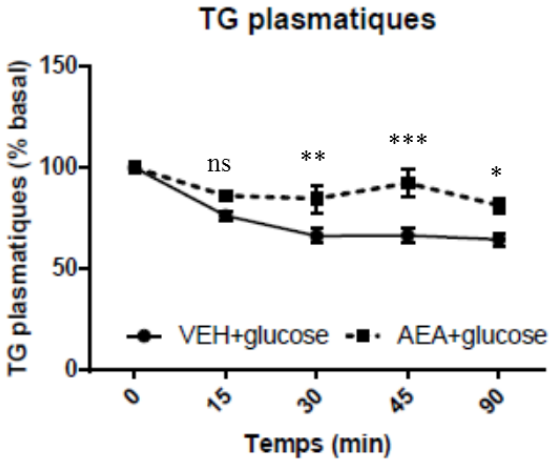


***Figure 40** : La triglycéridémie est plus élevée chez les souris traitées par l'AEA au cours d'une charge en glucose.*

*Des souris à jeun 24h ont été soumises à une injection en i.p. de véhicule (VEH) ou d'AEA (10 mg/kg) à t=0 min en amont d'une charge en glucose à t=15 min. La triglycéridémie a été mesurée sur le plasma à partir du sang prélevé à la veine de la queue des animaux aux différents temps. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe) et représentent le % de variation par rapport à la triglycéridémie basale à t=0 min. Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05 ;**P<0,01 ;***P<0,001*

Afin d'étudier les conséquences d'une exposition prolongée à l'AEA sur le contenu lipidique et l'expression génique dans le foie, des souris ont été soumises à une double injection d'AEA (t=0 et t=30 min) au cours d'une charge en insuline (t=0 min) (**Cf. Matériel & Méthodes IV, A, 3, d**).

Une heure après la première injection d'AEA, la triglycéridémie est comme précédemment supérieure chez les souris traitées par l'AEA par rapport aux souris traitées par le véhicule (**Figure 41A**). Toutefois, lorsque

le foie est prélevé à ce temps, aucune différence concernant le contenu hépatique en TG et en lipides totaux n'est observée entre les deux traitements (**Figure 41B et C**).

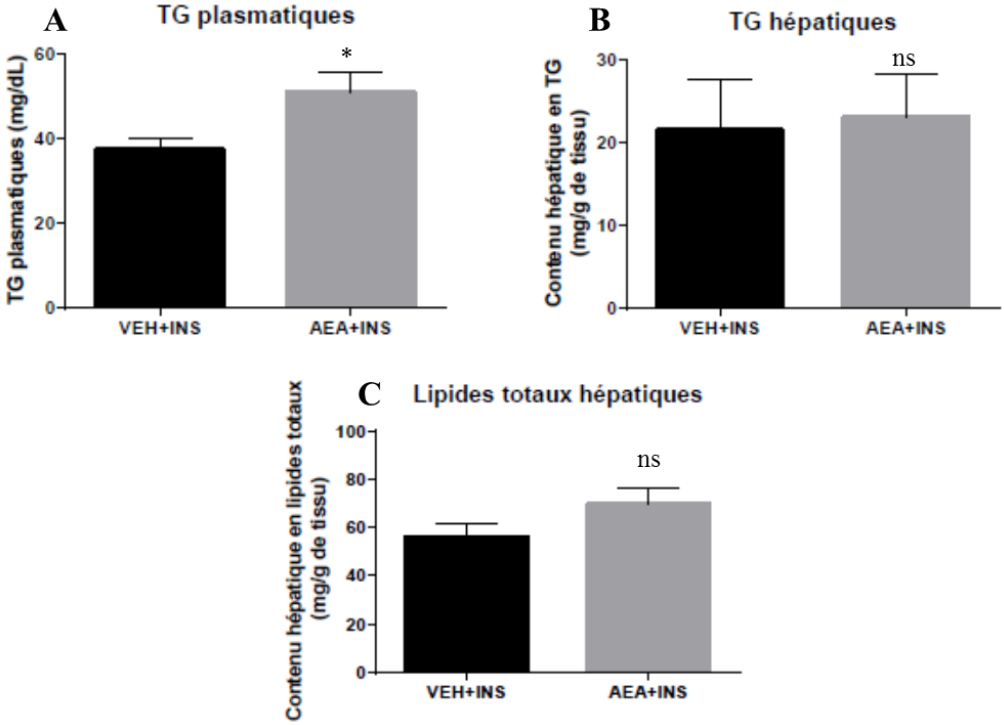


***Figure 41** : L'AEA induit une augmentation de la triglycéridémie chez des souris au cours d'une charge en insuline.*

Des souris à jeun 24h ont été soumises à une première injection en i.p. de véhicule (VEH) ou d'AEA (10 mg/kg) à t=0 min combinée à une charge en insuline (0,5 UI/kg) puis à une seconde injection d'AEA ou de VEH (10 mg/kg) à t=30 min. ***A** : Triglycéridémie.* ***B** : Contenu hépatique en triglycérides et* ***C** : Contenu hépatique en lipides totaux à t=60 min après le traitement à l'AEA par rapport au VEH. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH+INS sont symbolisées par * P<0,05*

L'analyse de l'expression des gènes relatifs au métabolisme lipidique indique que le traitement par l'AEA conduit à des modifications mineures en comparaison avec le traitement par le véhicule. En effet, aucune différence significative n'est observée concernant l'expression des gènes codant pour la FATP5, GPAT, PPARα, FAS, ACC ou SREBP1c impliqués dans la synthèse et le transport intracellulaire des lipides (**Figure 42**). Toutefois, une diminution significative de l'expression des gènes codant pour FAT/CD36 et PPARγ a été mise en évidence après le traitement par l'AEA (**Figure 42**) suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation visant à limiter le captage des AG par le foie.

Quoi qu'il en soit, ces conditions de traitement à court terme (1h) ne sont probablement pas adaptées à l'étude des variations d'expression génique.

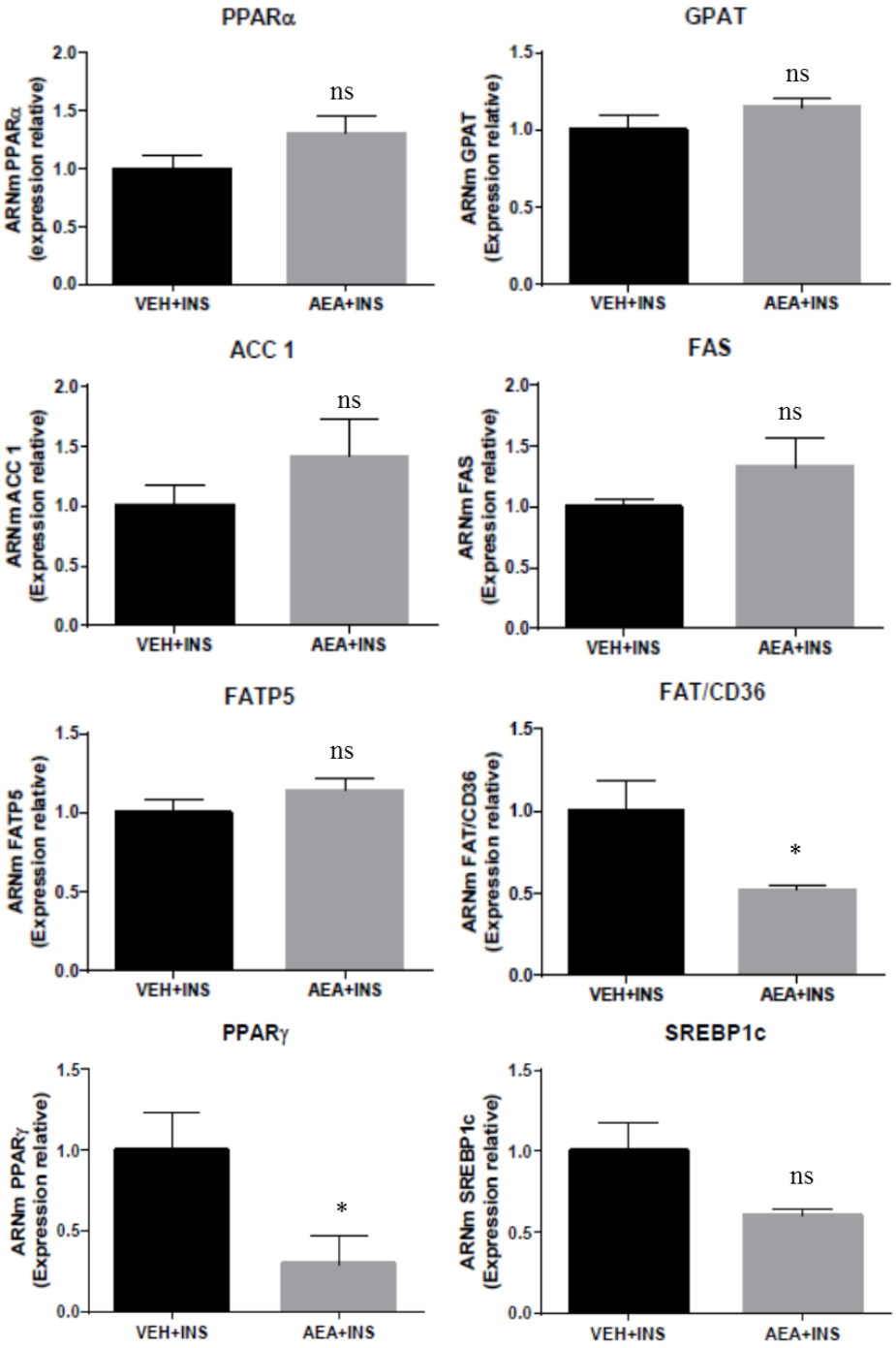


***Figure 42* : L'AEA limite le captage des AG dans le foie.**

*Des souris à jeun 24h ont été soumises à une première injection en i.p. de véhicule (VEH) ou d'AEA (10 mg/kg) à t=0 min combinée à une charge en insuline (0,5 UI/kg) puis à une seconde injection d'AEA ou de VEH (10 mg/kg) à t=30 min. Expression relative de gènes codant pour des protéines du métabolisme lipidique hépatique (PPARα, GPAT, ACC, FAS, FATP5, FAT/CD36, PPARγ, SREBP1c) sur le foie des souris traitées par l'AEA+INS ou le VEH+INS. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH+INS sont symbolisées par * P<0,05*

2) *L'activation du SEC par le JZL195 conduit à des variations de la triglycéridémie*

Afin d'étudier les conséquences d'une exposition plus prolongée d'une suractivation du SEC sur le contenu lipidique et l'expression génique dans le foie, nous avons utilisé le modèle d'activation endogène du SEC par le JZL195 conduisant à une activation du SEC prolongée par rapport au traitement par l'AEA dont les effets sont transitoires.

a. *Traitement au JZL195 pendant 3h*

Les résultats de la cinétique présentés dans l'article indiquent que le JZL195 conduit à une augmentation de la lipolyse adipocytaire au bout de 3h de traitement (Muller et al., 2017).

En parallèle, nous avons mis en évidence une tendance à l'augmentation du contenu hépatique en TG chez ces souris à t=3h par rapport aux souris sacrifiées à t=0h ce qui suggère que les AGL libérés par le TAV sont captés par le foie et stockés sous forme de TG (**Figure 43**).

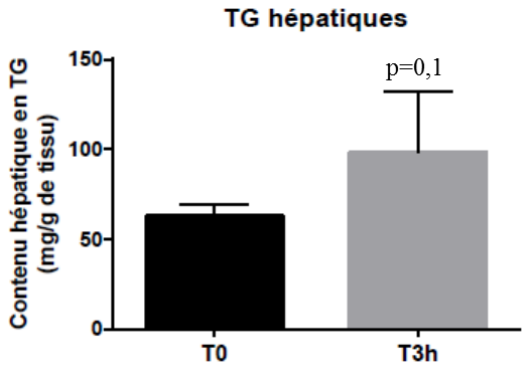


***Figure 43** : Le traitement de souris par le JZL195 pendant 3h tend à augmenter le contenu hépatique en triglycérides.*

Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection en i.p. de JZL195 (20 mg/kg) à t=0h. Le contenu hépatique en triglycérides a été mesuré post-mortem à t=3h versus t=0h. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe).

b. *Traitement JZL195 pendant 6h*

Afin de se placer dans des conditions propices à l'étude d'éventuelles variations d'expression génique hépatiques, l'expérience a été répétée en prélevant les tissus 6h après l'injection de JZL195 (**Cf. Matériel & Méthodes IV, B, 3**). Dans ces conditions, on observe toujours une augmentation du tonus endocannabinoïde dans le foie (**Figure 44A**) alors que dans le TAV, celle-ci ne concerne que l'AEA (**Figure 44B**).

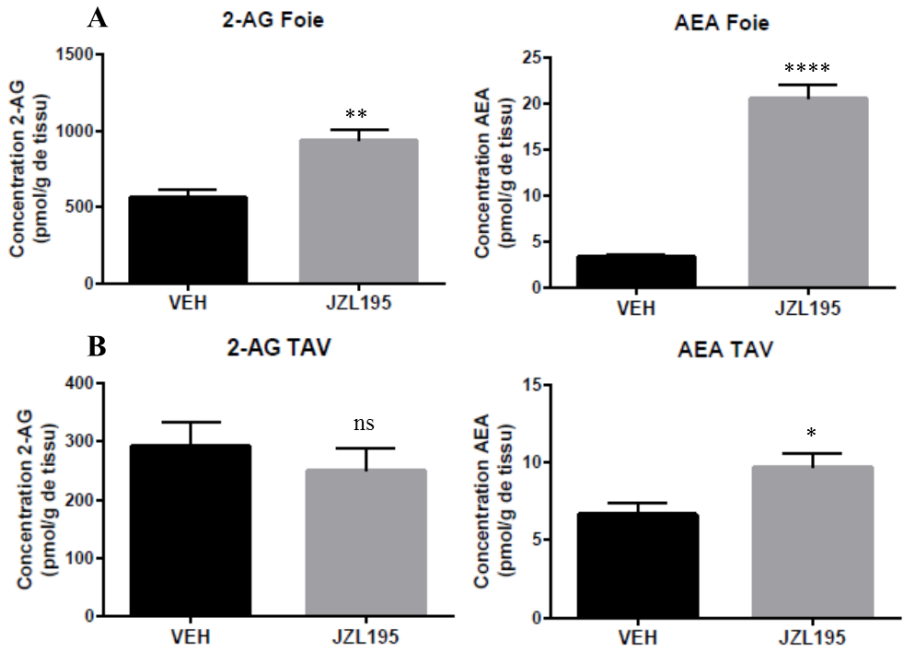


***Figure 44* : Le traitement de souris par le JZL195 pendant 6h augmente le tonus endocannabinoïde dans le foie et le TAV.**

*Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection en i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg) pendant 6h. Le tonus endocannabinoïde a été mesuré à t=6h après l'injection de JZL195 ou de VEH dans **A** : le foie et **B**. le TAV. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05 ;**P<0,01 ;****P<0,0001.*

Après 6h de traitement par l'inhibiteur, on constate cette fois une diminution importante du contenu hépatique en TG chez les souris traitées par le JZL195 par rapport aux souris traitées par le véhicule (**Figure 45**). De plus, les concentrations plasmatiques en glycérol et en AGL ne sont pas modifiées par le traitement dans ces conditions (**Figure 46A et B**). Ces résultats permettent de suggérer un rétrocontrôle consécutif à l'arrivée des AGL vers le foie.

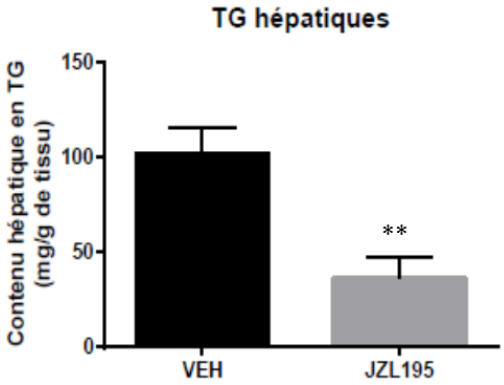


Figure 45* : *Le traitement de souris par le JZL195 pendant 6h diminue le contenu hépatique en triglycérides.

*Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection en i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg) pendant 6h. Le contenu hépatique en triglycérides a été mesuré à t=6h après l'injection de JZL195 en comparaison au VEH Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par **P<0,01.*

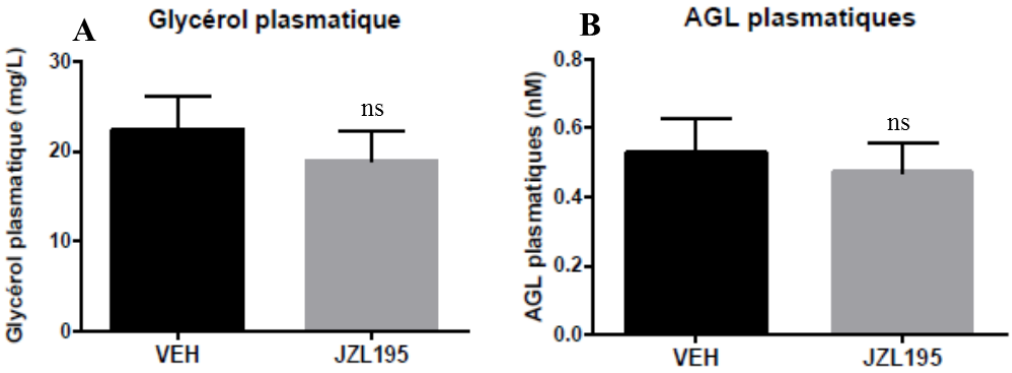


***Figure 46** : La lipolyse adipocytaire n'est pas modifiée par un traitement de 6h par le JZL195.*
Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg) pendant 6h. ***A** : Glycérol plasmatique et* ***B** : AGL plasmatiques mesurés à partir du sang prélevé à la veine cave après sacrifice des animaux à t=6h. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe).*

3) *L'activation du SEC par le JZL195 modifie l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique*

Afin de comprendre les mécanismes pouvant expliquer les variations de contenu lipidique du foie observées lors des traitements par le JZL195, nous avons ensuite réalisé une analyse transcriptionnelle en ciblant des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique.

C'est ainsi que nous avons remarqué que dans le foie prélevé 6h après l'injection de JZL195 (**Cf. Matériel & Méthodes IV, B, 3**), l'expression du gène codant pour le transporteur d'acides gras FAT/CD36 tend à augmenter pendant que celle du gène codant pour l'ACOX relative à la β-oxydation est très significativement induite suggérant une augmentation de l'utilisation des lipides par le foie (**Figure 47**). Parallèlement, on assiste à une diminution de l'expression génique de SCD1 et DGAT2, deux protéines impliquées dans les voies d'estérification (**Figure 47**).

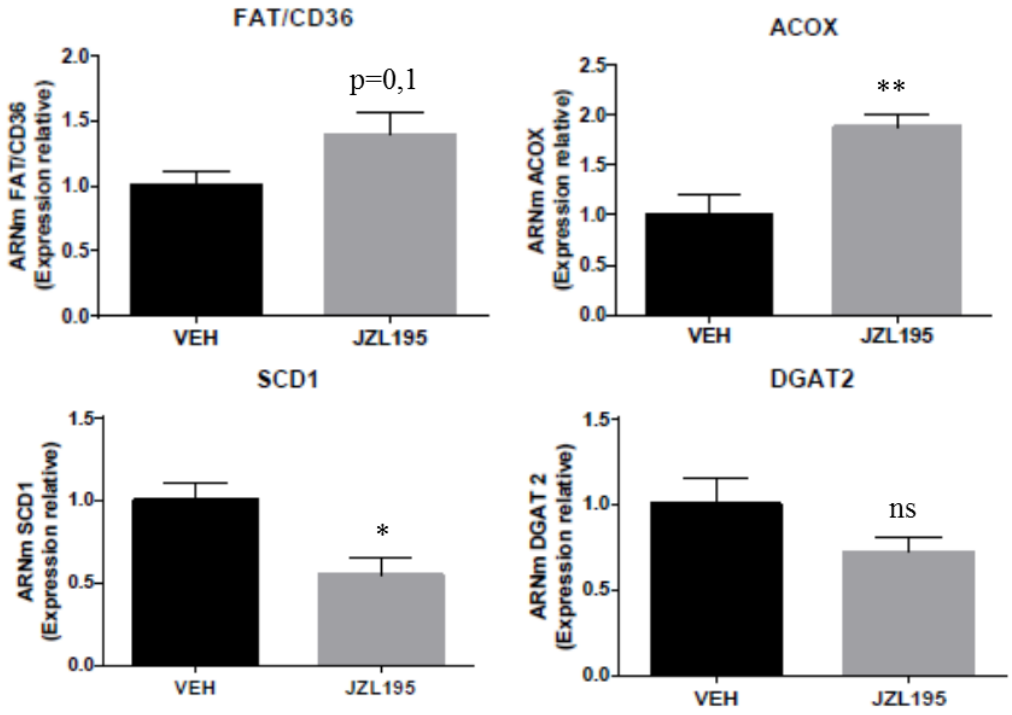


***Figure 47** : Un traitement de 6h par le JZL195 conduit à une modulation de l'expression de gènes codant pour des protéines du métabolisme lipidique hépatique.*
*Expression relative des gènes codant pour les protéines FAT/CD36, ACOX, SCD1, DGAT2 chez des souris à jeun 6h soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg) pendant 6h. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05 ;**P<0,01.*

Plusieurs études suggèrent que le flux d'AGL provenant du TA est un inducteur puissant de l'expression du gène et de la sécrétion de FGF21 par les hépatocytes (Park et al., 2016; Wang et al., 2017; Yu et al., 2011). Le FGF21 est une hormone principalement sécrétée par le foie et impliquée dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique. Ce facteur présente de nombreux bénéfices métaboliques sur l'homéostasie énergétique et la sensibilité à l'insuline. Dans le foie, il augmente la cétogenèse, la néoglucogenèse et l'oxydation des AG et dans le TA, il inhibe la lipolyse et augmente l'activité thermogénique (Ge et al., 2012). Ce facteur est induit en réponse au jeûne (Inagaki et al., 2007), suite à un régime cétogène (Badman et al., 2007) ou au cours de l'obésité (Zhang et al., 2008) *via* l'activation des facteurs de transcription CREBH et PPARα (Park et al., 2016). Ainsi, nous avons mesuré l'expression du gène codant pour FGF21 et sa sécrétion comme marqueur d'une augmentation du flux d'AGL provenant du TA vers le foie. Nos résultats ont montré que suite au traitement par le JZL195 pendant 6h, l'expression hépatique du gène (**Figure 48A**) et la concentration plasmatique de FGF21 (**Figure 48B**) étaient fortement induites en accord avec la stimulation de la lipolyse observée après 3h de traitement.

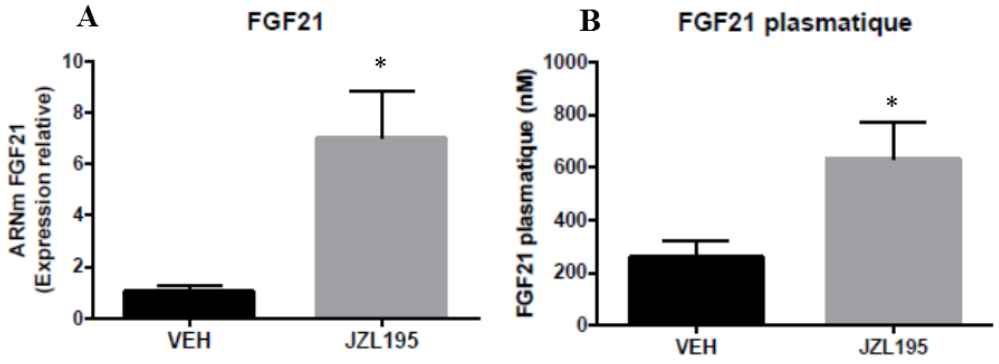


***Figure 48* : Un traitement de 6h par le JZL195 conduit à une augmentation de l'expression du gène codant pour le FGF21 et de sa sécrétion par le foie.**

Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg) pendant 6h. ***A*** *: FGF21 plasmatique mesuré à partir du sang prélevé à la veine cave après sacrifice des animaux.* ***B*** *: Expression relative des gènes codant pour le FGF21. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05.*

De manière intéressante, nous avons également remarqué une forte induction de l'expression du gène codant pour UCP1 ainsi qu'une diminution de celui codant pour la LHS dans le TAV (**Figure 49**). Or, il a été montré que la lipolyse adipocytaire et le brunissement du TA sont régulés par le FGF21 (Fisher et al., 2012; Hotta et al., 2009).

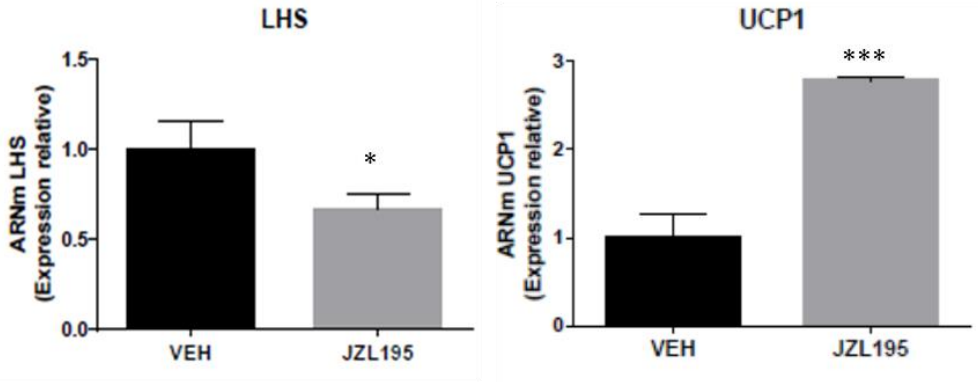


***Figure 49* : Un traitement de 6h par le JZL195 conduit à une modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation des graisses par le TAV.**

*Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg) pendant 6h. Expression relative des gènes codant pour les protéines LHS et UCP1 dans le TAV de souris. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05 ;***P<0,001.*

Récemment, une boucle de régulation entre le foie et le TA visant à protéger les hépatocytes d'un afflux important d'AGL secondaire à l'augmentation de la lipolyse adipocytaire a été décrite (Park et al., 2016) (**Figure 50**).

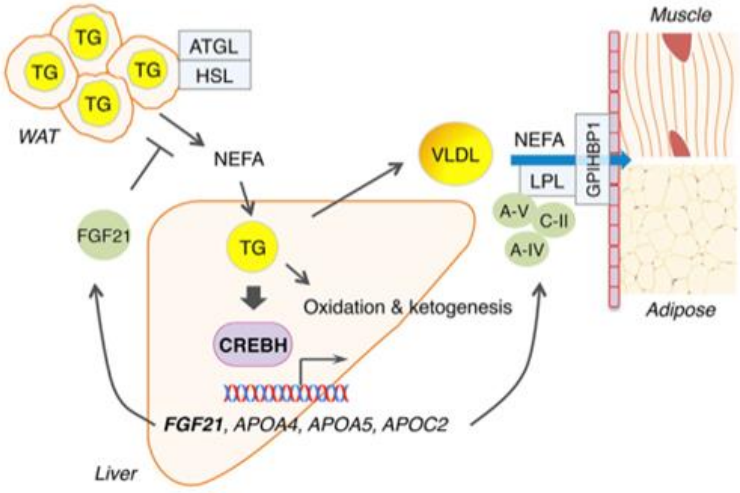


***Figure 50* : Boucle de régulation négative du flux d'AGL entre le TA et le foie via la sécrétion de FGF21.**

L'activation de CREBH dans le foie en réponse à l'augmentation du flux d'AGL conduit à une augmentation de l'expression et de la sécrétion du FGF21. En retour, ce dernier va limiter l'efflux d'AGL par le TA en bloquant la lipolyse.

D'après (Park et al., 2016)

Ainsi, il est possible que ce mécanisme de rétrocontrôle se soit installé suite à la stimulation de la lipolyse induite par le JZL195 à en juger par la normalisation des niveaux circulants d'AGL, de glycérol et la diminution de la triglycéridémie observées 6h *versus* 3h après l'injection de l'inhibiteur.

4) *L'effet du JZL195 est-il dépendant des CB1R ?*

Puisque les ECs ont également la capacité de fixer d'autres récepteurs que les CBR tels que le récepteur TRPV1, GPR55 et GPR119 et des facteurs de transcription tels que PPARα et γ (Fezza et al., 2014), nous nous sommes demandé dans quelle mesure les CB1R pouvaient contribuer à cette boucle de rétrocontrôle. Pour cela, des souris soumises à un traitement de 6h par le JZL195 ont été soumises dans le même temps à une injection i.p. de Rimonabant (10 mg/kg), un agoniste inverse spécifique des CB1R (**Cf. Matériel & Méthodes IV, B, 3**). Dans ces conditions, on constate que l'expression du gène codant pour le FGF21, fortement induite par le JZL195, est normalisée lorsque les CB1R sont bloqués par le Rimonabant (**Figure 51**). Cette diminution s'accompagne également d'une normalisation de l'expression d'autres gènes induits par le JZL195 tels que les gènes codant pour la SCD1 et l'ACOX dans le foie et UCP1 dans le TAV (**Figure 51**). Toutefois, alors que l'on aurait également pu s'attendre à une normalisation de l'expression du gène codant pour la LHS (**Figure 51**), celle-ci a au contraire été diminuée suite au traitement par le Rimonabant suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation propre à l'antagoniste.

Ces données montrent donc que le Rimonabant s'oppose en partie aux effets observés suite au traitement par le JZL195 et suggèrent que la mise en place de la boucle de régulation entre le foie et le TAV induite

par le JZL195 est bien dépendante de l'activation des récepteurs CB1R suite à l'augmentation du tonus endocannabinoïde.

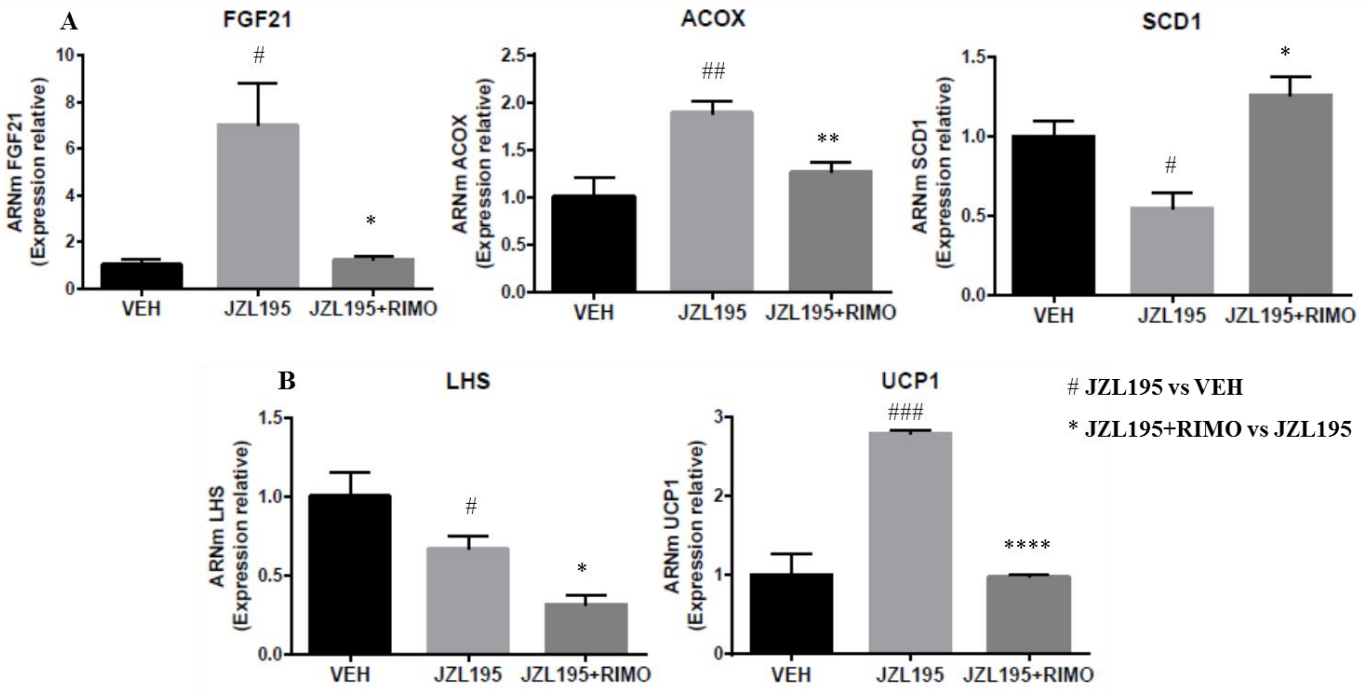


***Figure 51** : Le blocage des CB1R par le Rimonabant rétablit le niveau d'expression des gènes induits par le traitement au JZL195 dans le foie et le TAV.*

Des souris à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH), de JZL195 (20 mg/kg) ou de JZL195+RIMO (10mg/kg) pendant 6h. Expression relative des gènes codant pour les protéines ***A** : FGF21, ACOX et SCD1 dans le foie et **B** : LHS et UCP1 dans le TAV de souris. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par # P<0,05 ;##P<0,01 ; ###P<0,001 et *P<0,05 ; **P<0,01 ; ****P<0,0001*

5) *L'effet du JZL195 sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique est-il direct ?*

Une action directe de l'inhibiteur sur le foie pourrait également expliquer certains des effets observés. En effet, l'induction de l'expression et de la sécrétion de FGF21 pourrait en partie être due à l'action directe des ECs (dont les concentrations hépatiques sont fortement augmentées par le JZL195 (**Figure 44A**) sur les CB1R ou d'autres cibles. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des études *in vitro* sur des explants de foie (**Cf. Matériel & Méthodes III, D**) et des cellules hépatiques HepG2 (**Cf. Matériel & Méthodes III, E**) en culture traités pendant 4h par le JZL195 afin de mesurer les conséquences directes de l'accumulation des ECs sur l'expression d'un gène marqueur de l'activation de PPARα (ACOX) et du facteur de croissance FGF21. En effet, plusieurs travaux ont montré que certains ECs et notamment l'AEA avaient la capacité de fixer PPARα, également connu pour réguler l'expression de FGF21 (Badman et al., 2007; Fezza et al., 2014; Inagaki et al., 2007).

a. Explants de foie

Dans les explants de foie, alors que le traitement JZL195 augmente les concentrations d'ECs (**Figure 32**), l'expression de FGF21 n'est pas significativement modifiée suite au traitement par le JZL195 chez les souris WT et CB1R$^{-/-}$ (**Figure 52**) suggérant que l'induction observée *in vivo* est indépendante des modifications du tonus endocannabinoïde hépatique. Il est à noter que le traitement diminue l'expression du gène de l'ACOX (**Figure 52**) en accord avec l'effet inhibiteur de l'AEA sur la β-oxydation déjà mis en évidence au laboratoire (Jourdan et al., 2012). Cet effet semble bien être dépendant de l'activation des CB1R puisque l'expression du gène codant pour l'ACOX n'est pas modifiée lorsque l'expérience est répétée sur des explants de foie prélevés chez des souris CB1R$^{-/-}$ (**Figure 51**).

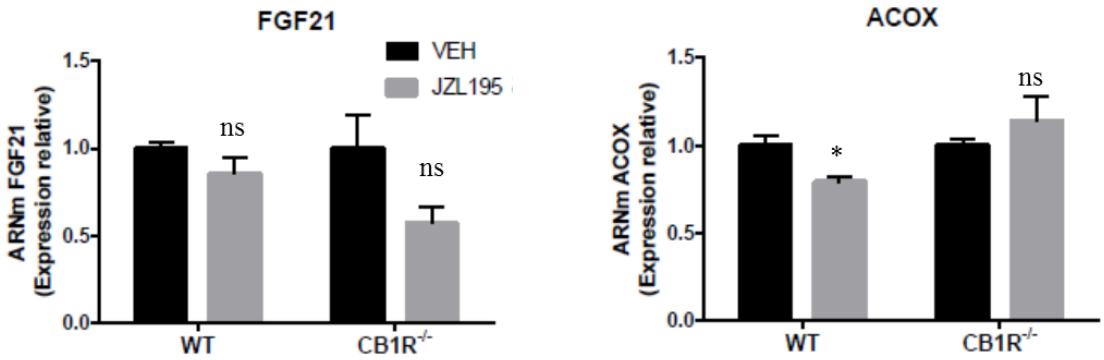


***Figure 52** : Le JZL195 ne modifie pas l'expression du FGF21 dans des explants de foie de souris WT et CB1R$^{-/-}$.*

*Les explants de foie de souris ont été traités pendant 4h par le véhicule (VEH) ou le JZL195 (10 µM). Expression relative des gènes codant pour les protéines FGF21 et ACOX. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe). Les différences statistiques par rapport au WT sont symbolisées par * P<0,05.*

b. Cellules HepG2

Lorsque l'on répète l'expérience sur des cellules HepG2, on observe cette fois que l'expression du gène codant pour FGF21 tend à augmenter suite au traitement par le JZL195 (**Figure 53**). Toutefois, il est à noter que dans ce modèle, l'impact du traitement se limite uniquement aux cellules hépatiques contrairement aux autres modèles d'étude (*in vivo* et explants de foie) qui comprennent également d'autres types cellulaires que les hépatocytes. Par conséquent, il n'est pas exclu qu'une régulation impliquant l'action directe de l'AEA sur les CB1R des hépatocytes ou sur PPARα se mette en place dans ces conditions. Ces résultats sont en accord avec ceux récemment obtenus par Jung *et al.* qui montrent que l'activation des CB1R dans différents modèles de cellules hépatiques (HepG2 et hépatocytes primaires) conduit à une augmentation de l'expression, du niveau protéique et de la sécrétion du facteur de croissance (Jung et al., 2016). Toutefois, dans ces expériences, c'est l'ACEA, un agoniste synthétique puissant, non métabolisable et spécifique des CB1R qui a été utilisé pour activer le SEC. Ainsi, il est possible que dans cette étude réalisée sur des

cellules, la stimulation des CB1R hépatiques soit telle qu'elle conduise à des effets directs inducteurs de l'expression de FGF21.

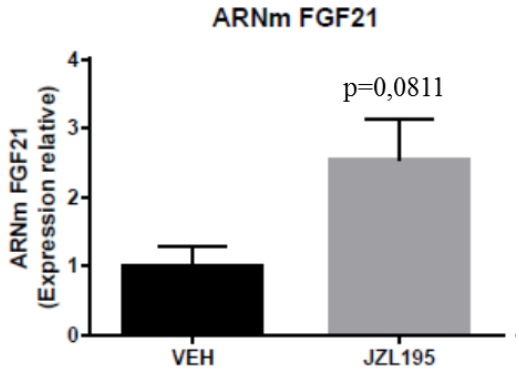


***Figure 53** : Le JZL195 tend à augmenter l'expression du FGF21 dans des cellules HepG2.*
Les cellules HepG2 ont été traitées pendant 4h par le véhicule (VEH) ou le JZL195 (10 µM). Expression relative du gène codant pour le FGF21. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe).

6) *La boucle de régulation dépendante du FGF21 est-elle fonctionnelle au cours de l'obésité ?*

Les résultats précédents obtenus chez des souris contrôles traitées par le JZL195, suggèrent qu'en réponse à la stimulation de la lipolyse induite par l'activation du SEC du TA, une boucle de régulation négative impliquant la sécrétion de FGF21 par le foie se met en place dans le but de limiter la mobilisation des AGL. Nous nous sommes ensuite demandé, si cette boucle de régulation était fonctionnelle dans un contexte pathologique d'obésité au cours duquel le SEC du TA est hyperactivé.

En comparant les paramètres plasmatiques relatifs au relargage et à l'utilisation des AG, on remarque de manière inattendue que les concentrations en AGL et en glycérol sont fortement plus faibles chez les souris obèses par rapport aux souris contrôles (**Figure 54A et B**). Néanmoins, la diminution de ces paramètres est associée à une augmentation de la concentration plasmatique en β-hydroxybutyrate (**Figure 54C**), un corps cétonique produit dans le foie à partir des AGL provenant de la lipolyse notamment lors du jeûne ou lorsque le foie n'est plus capable d'utiliser le glucose comme substrat énergétique comme c'est le cas au cours de l'insulinorésistance (Laffel, 1999). Ceci traduit une utilisation plus importante d'AGL par le foie des souris obèses qui, de plus, est associée à une forte induction de la sécrétion de FGF21 (**Figure 54D**), un autre argument en faveur d'une augmentation du flux d'AGL issus de la lipolyse vers le foie. Par conséquent, ces résultats suggèrent que le mécanisme adaptatif de rétrocontrôle négatif décrit chez la souris contrôle n'est pas fonctionnel chez la souris obèse puisque la lipolyse reste élevée.

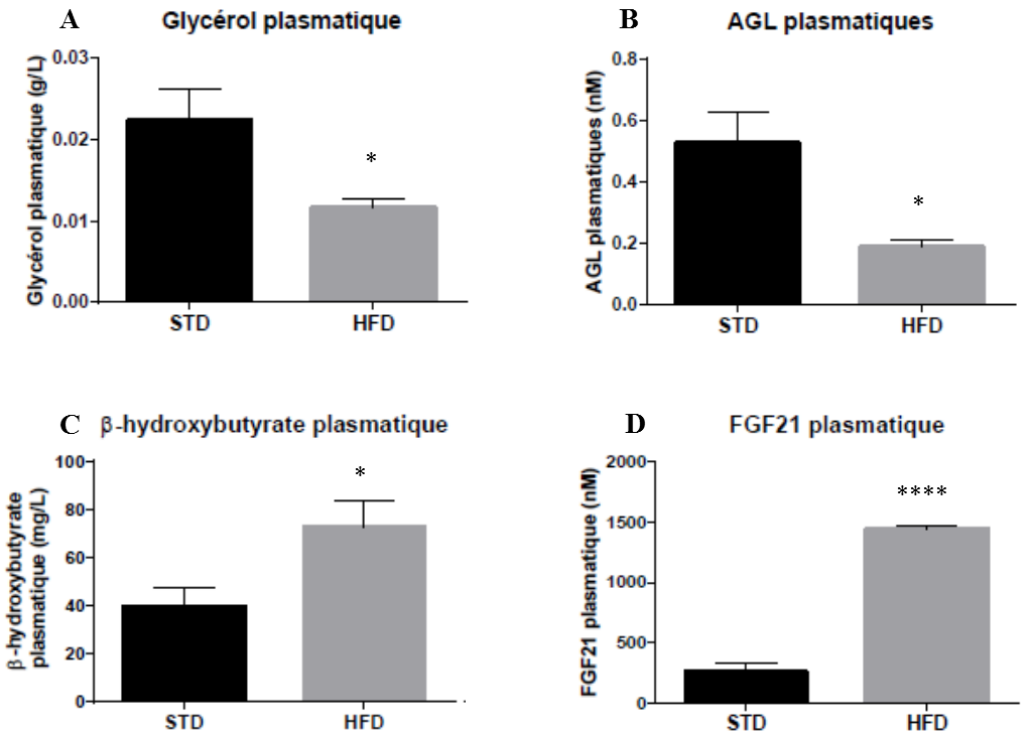


***Figure 54** : La lipolyse n'est plus régulée par le FGF21 au cours de l'obésité.*
*Des souris ont été soumises à un régime standard (STD) ou hyperlipidique (HFD) durant 20 semaine. Les paramètres plasmatiques ont été mesurés à partir du sang prélevé à la veine de la queue des animaux **A** : Glycérol plasmatique, **B** : AGL plasmatiques **C** : β-hydroxybutyrate plasmatique, et **D** : FGF21 plasmatique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au STD sont symbolisées par * P<0,05 ; ****P<0,0001*

7) Conclusion

En conclusion, ces résultats préliminaires nous permettent d'émettre l'hypothèse d'une boucle de rétro-inhibition entre le TA et le foie impliquant FGF21 et ayant comme point de départ la stimulation de la lipolyse provoquée par l'activation du SEC adipocytaire (**Figure 55**). Le flux d'AGL résultant de la lipolyse adipocytaire conduit tout d'abord à l'accumulation des TG dans le foie. En réponse, on assiste à une augmentation de l'expression et de la sécrétion du FGF21 par le foie dépendante de l'activation des facteurs de transcription PPARα ou CREBH par les AGL ou les TG. De plus, dans certaines conditions, en cas de forte activation, le SEC hépatique pourrait directement réguler l'expression de FGF21. L'hormone sécrétée exercerait alors un rétrocontrôle négatif sur la lipolyse adipocytaire et stimulerait la thermogenèse afin de réduire le flux d'AGL vers le foie pour finalement diminuer le contenu hépatique en TG et la production de VLDL. Nous montrons également, qu'au cours de l'obésité, la boucle de régulation s'opérant entre le foie et le TA n'est plus fonctionnelle suggérant que le FGF21 n'est plus capable d'exercer son action sur ses tissus cibles. Un état de résistance à l'action de cette hormone au cours de l'obésité a été décrite par plusieurs travaux (Fisher et al., 2010; Hale et al., 2012). Néanmoins, nos résultats préliminaires n'ont pas permis d'établir une relation entre le SEC et une résistance du TA à l'action inhibitrice du FGF21.

Quoi qu'il en soit, compte tenu des résultats préliminaires obtenus chez la souris obèse et des données de la littérature, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre précisément les mécanismes moléculaires mis en jeu et déterminer dans quelle mesure le SEC participe à l'induction de FGF21 selon l'hypothèse proposée par notre étude.

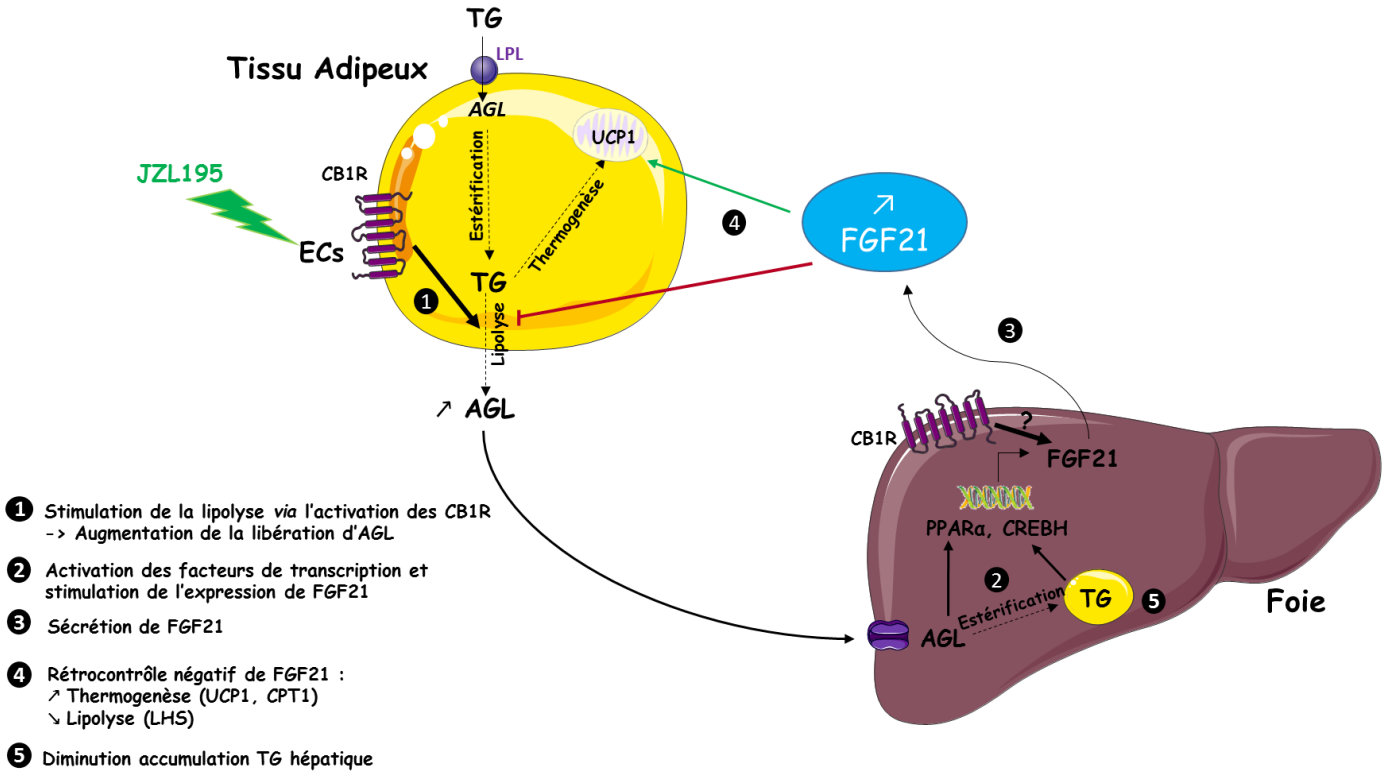


***Figure 55* : Hypothèse proposée expliquant la régulation du flux d'AGL entre le TA et le foie suite à l'augmentation du tonus endocannabinoïde par le JZL195.**

(1) *L'augmentation du tonus endocannabinoïde par le JZL195 conduit à une augmentation de la lipolyse adipocytaire et par conséquent à une augmentation de l'afflux d'AGL* ***(2)*** *L'arrivée d'AGL vers le foie et/ou l'activation directe du SEC dans le foie stimule l'expression du gène codant pour FGF21 et* ***(3)*** *sa sécrétion.* ***(4)*** *Le FGF21 exerce alors un rétrocontrôle négatif sur le TA en vue de limiter l'afflux d'AGL vers le foie.* ***(5)*** *Il en résulte une diminution de l'accumulation de triglycérides dans le foie.*

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que l'hyperactivation du SEC du TA, en dérégulant la lipolyse pourrait être impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline périphérique. Le mécanisme mis en jeu semble lier les CB1R à la voie de signalisation insulinique. Ces observations sont confortées par d'autres travaux qui montrent également, dans d'autres tissus, que les CB1R interagissent avec la voie de signalisation insulinique (Gómez del Pulgar et al., 2000; Kim et al., 2012; Liu et al., 2012b).

Les conséquences sur l'organisme d'une augmentation de la mobilisation des AGL induite par l'activation du SEC à court terme sont difficiles à caractériser. Toutefois dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence des modifications précoces de la lipémie, des lipides hépatiques et de la production de FGF21 indiquant que la communication entre le foie et le TA est rapidement affectée par la stimulation du SEC.

D. L'activation du SEC inhibe la lipolyse et favorise le stockage lipidique chez la souris à jeun

Les résultats présentés dans l'article suggèrent que l'activation aigüe du SEC par l'AEA dans des explants de TAV cultivés en absence d'insuline provoque une diminution de la lipolyse à en juger par la plus faible production de glycérol dans le surnageant (Muller et al., 2017). Ceci nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle une augmentation du tonus endocannabinoïde dans le TA pourrait favoriser le stockage des lipides lorsque l'insulinémie est faible comme c'est le cas en période interprandiale. Afin d'explorer cette hypothèse et ainsi élucider les mécanismes mis en jeu, nous avons entrepris des expériences complémentaires en utilisant des explants de TAV incubés dans différentes conditions.

1) *L'AEA exerce un effet inhibiteur sur l'activité lipolytique d'explants TAV en absence d'insuline*

De nouvelles expérimentations similaires à celles présentées dans l'article (Muller et al., 2017) ont été réalisées pour étudier spécifiquement l'impact de l'AEA sur la lipolyse dans des explants de TAV de rat placés dans des conditions mimant un état de jeûne (avec noradrénaline et sans insuline) (**Cf. Matériel & Méthodes III, A, 1**). Les résultats montrent comme précédemment une diminution significative de la production de glycérol et d'AGL (**Figure 56**).

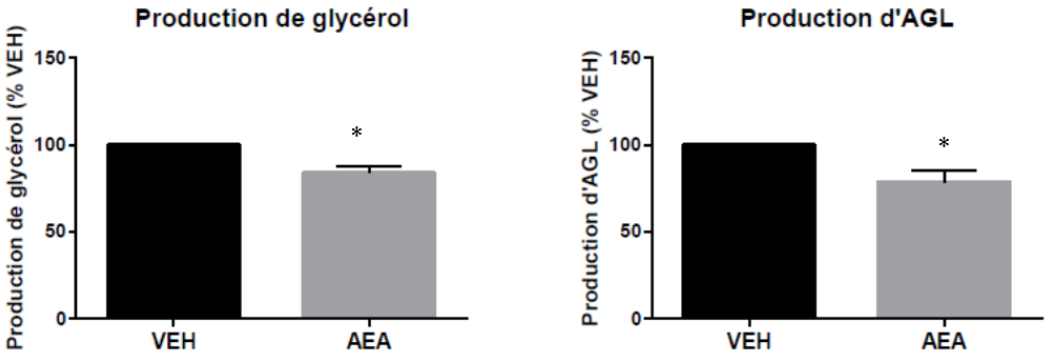


***Figure 56** : Le traitement d'explants de TAV de rat par l'AEA en absence d'insuline conduit à une inhibition de la lipolyse.*

*Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 1h par le véhicule (VEH) ou l'AEA (5 µM) en présence d'une stimulation noradrénergique (1µM) en absence d'insuline. La production de glycérol et d'AGL a été mesurée dans le surnageant après 1h de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4/groupe) et représentent le % de variation par rapport au VEH. Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05.*

Ces expérimentations *in vitro* sur explants de TAV nous ont également permis d'étudier les voies de signalisation régulant la lipolyse adipocytaire (**Figure 57**).

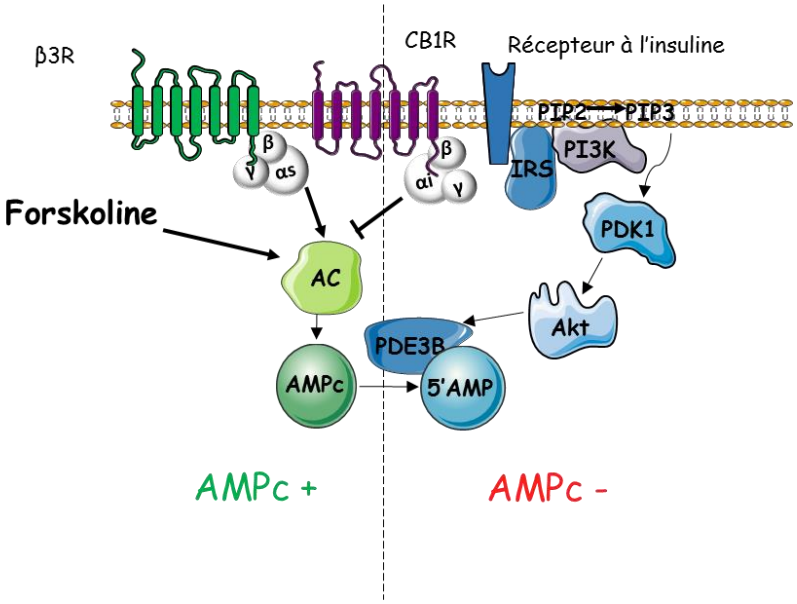


***Figure 57* : Régulation de la concentration intracellulaire en AMPc par différents stimuli.**
L'adénylate cyclase (AC) est à l'origine de la production d'AMPc. La forskoline est un activateur direct et puissant de l'AC qui conduit par conséquent à une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. L'activation des récepteurs β-adrénergiques (β3R) conduit à une stimulation de l'AC via les protéines Gs alors qu'à l'inverse l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) inhibe l'activité AC via les protéines Gi. L'insuline conduit à une diminution de la concentration en AMPc en stimulant sa dégradation en 5'AMP par la PDE 3B

Pour cela, la production d'AMPc a été mesurée dans le cytosol d'explants traités pendant 15 min par l'AEA en présence de forskoline, un activateur puissant de l'adénylate cyclase de façon à avoir un niveau basal d'AMPc facilement détectable. Dans ces conditions, nous avons observé une diminution des taux d'AMPc intracellulaires (**Figure 58**) dans les explants traités par l'agoniste. Afin de préciser si cette baisse d'AMPc dépend d'une diminution de sa production ou d'une augmentation de sa dégradation, nous avons analysé les niveaux de phosphorylation à t=15 min des protéines de la voie Akt impliquées dans l'activation de la PDE-3B. Les résultats ont révélé une augmentation de la forme T308 de l'Akt ainsi qu'une tendance à l'augmentation pour la forme S474 et une diminution de la phosphorylation de la LHS sur le résidu S660 dans les explants traités par l'AEA (**Figure 59**), suggérant que la baisse d'AMPc induite par l'AEA est dépendante au moins en partie d'une activation de la PDE-3B.

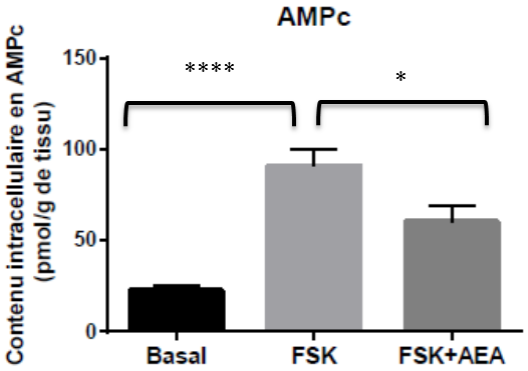


***Figure 58** : L'AEA diminue le pool intracellulaire d'AMPc stimulé par la forskoline en absence d'insuline dans des explants de TAV de rat.*

*Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 15 min par le véhicule (VEH), la forskoline (FSK, 10 µM) ou la FSK + AEA (5 µM). La concentration intracellulaire en AMPc a été mesurée dans les explants au bout de 15 min de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe). Les différences statistiques par rapport au traitement FSK sont symbolisées par * P<0,05.*

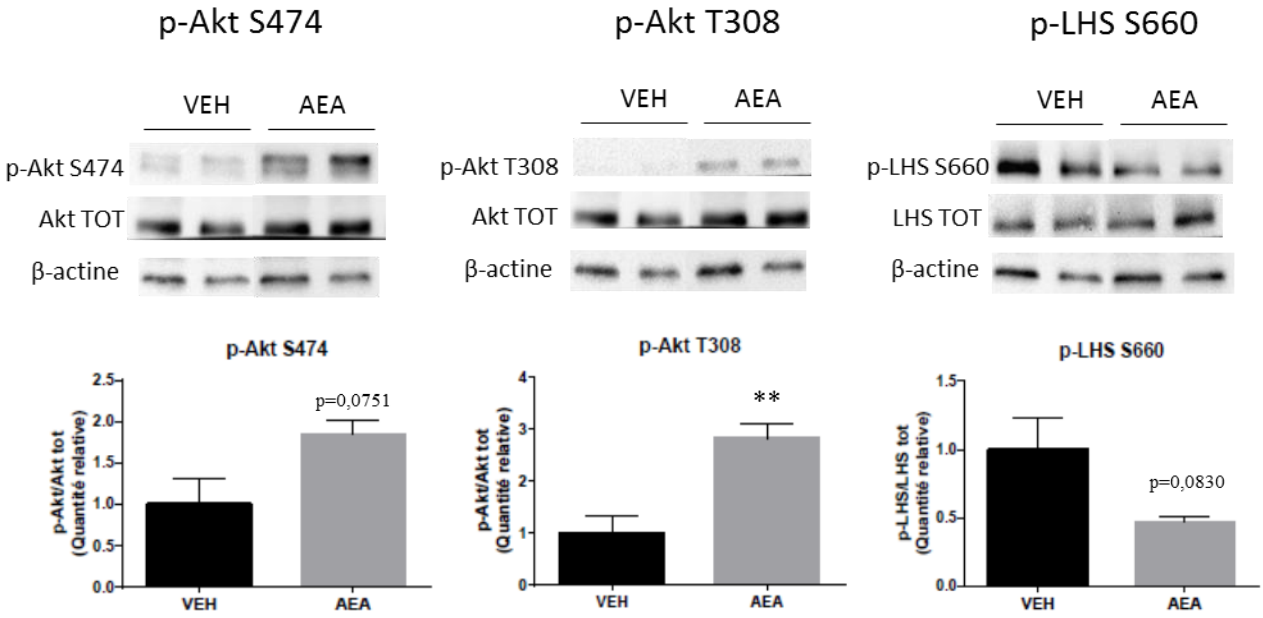


***Figure 59** : L'AEA augmente la phosphorylation d'Akt et diminue celle de la LHS en absence d'insuline dans des explants de TAV de rat.*

*Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 15 min par le véhicule (VEH) ou l'AEA (5 µM). Les immunoblots accompagnés des analyses densitométriques représentent les niveaux de phosphorylations de l'Akt sur les résidus S474 et T308 et de la LHS sur le résidu S660. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par **P<0,01.*

Finalement, ces données sont en accord avec les diminutions de production de glycérol et d'AGL observées dans le surnageant (**Figure 56**) et suggèrent une diminution de la lipolyse adipocytaire dépendante d'une activation de la voie Akt. Deux autres études rapportent également une activation de la voie PI3K/Akt, dans des cellules CHO transfectées par les CB1R ou dans des cellules astrocytaires exprimant les CB1R, suite à

la stimulation de ces récepteurs par divers agonistes dont l'agoniste endogène, l'AEA (Galve-Roperh et al., 2002; Gómez del Pulgar et al., 2000).

2) *La lipolyse est plus élevée dans le TAV de souris CB1R$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages*

Des explants de TAV ont été préparés à partir de souris sauvages et CB1R$^{-/-}$ puis incubés pendant 1h dans des conditions permettant de mesurer la lipolyse basale (sans noradrénaline ni insuline) (**Cf. Matériel & Méthodes III, B**). Nous avons observé que dans ces conditions, la quantité de glycérol produite par les explants de souris CB1R$^{-/-}$ n'était pas significativement différente de celle produite par les souris sauvages (**Figure 60**).

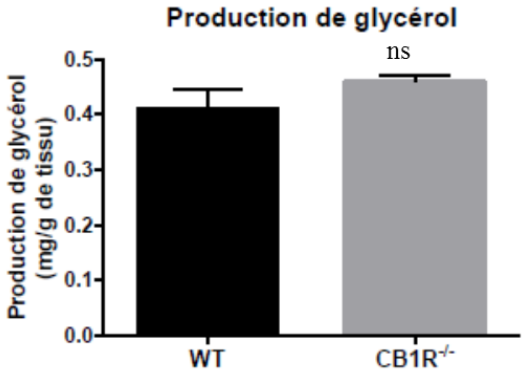


***Figure 60** : La production de glycérol n'est pas modifiée dans des explants de TAV de souris CB1R$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages.*
Des explants TAV de souris sauvages (WT) ou CB1R$^{-/-}$ ont été incubés pendant 1h dans du milieu de culture. La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4 WT et n=5 CB1R$^{-/-}$).

Néanmoins, *in vivo*, la concentration plasmatique en glycérol mesurée après un jeûne de 24h est nettement plus élevée chez les souris CB1R$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages (**Figure 61**) qui possèdent pourtant une masse adipeuse plus importante (Ravinet Trillou et al., 2003). Finalement ces données suggèrent que les récepteurs CB1R pourraient être impliqués dans un mécanisme de régulation inhibiteur de la lipolyse.

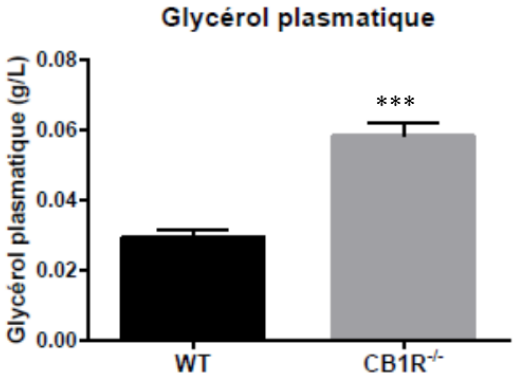


***Figure 61* : La lipolyse est plus élevée chez des souris CB1R$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages (WT).**
*La concentration en glycérol plasmatique a été mesurée à partir du sang collecté à la veine de la queue des animaux suite à un jeûne de 24h. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au WT sont symbolisées par ***P<0,001*

3) *La lipolyse est diminuée dans des explants de TAV prélevés sur des souris traitées par le JZL195*

Le TAV de souris a été prélevé 3 heures après une injection i.p. de JZL195 ou de véhicule puis mis en culture pendant 1h afin de mesurer la lipolyse basale (sans noradrénaline ni insuline) (**Cf. Matériel & Méthodes IV, B, 2, a**). Les résultats ont montré que le TA dont le tonus endocannabinoïde est augmenté par le JZL195 (**Figure 30D**) produit moins de glycérol dans le surnageant que celui provenant des souris contrôles (**Figure 62**). Ainsi, ces données suggèrent que les ECs produits par le TA sont capables *per se* d'activer les CB1R et d'exercer un effet inhibiteur sur la lipolyse.

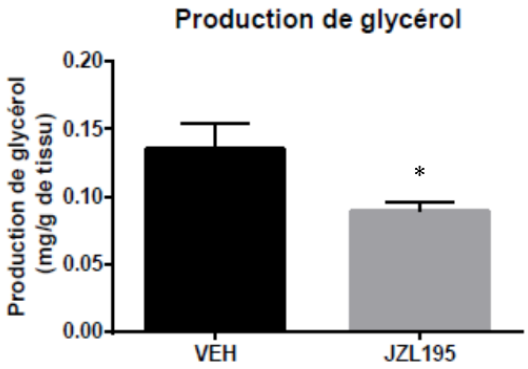


***Figure 62* : La production de glycérol est diminuée dans des explants de TAV de souris soumises à une injection de JZL195.**
*Des souris sauvages à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg). Au bout de 3h, le TAV a été prélevé et incubé pendant 1h dans du milieu de culture. La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05.*

4) *La lipolyse est diminuée dans des explants de TAV traités ex vivo avec le JZL195*

Une expérience complémentaire a consisté à traiter des explants de TAV pendant 3h par le JZL195 avant de mesurer la production de glycérol en condition basale (sans noradrénaline, ni insuline) ou stimulée (avec noradrénaline, sans insuline) (**Cf. Matériel & Méthodes III, A, 2**) Les résultats indiquent une fois encore que la lipolyse est diminuée lorsque la dégradation des ECs est inhibée quelles que soient les conditions testées (basale ou stimulée) (**Figure 63A et B**). Ils confirment que cet effet est bien la conséquence d'une action directe du JZL195 sur le TA et très probablement lié à la surproduction d'ECs.

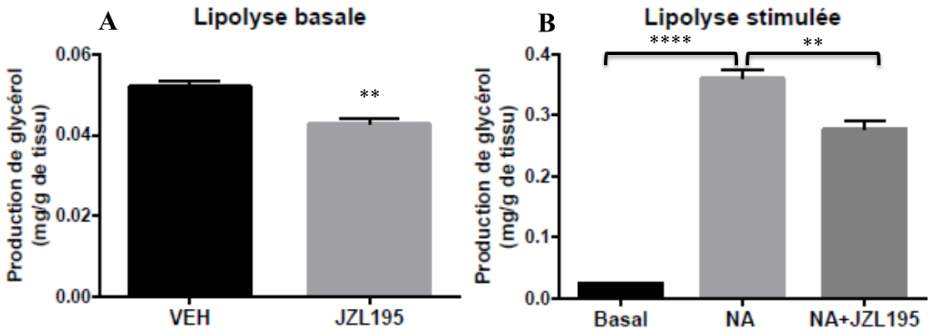


Figure 63* : La lipolyse basale et stimulée est diminuée dans des explants de TAV traités par le JZL195.** *Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 3h* ***A *: par le véhicule (VEH) ou le JZL195 (10 µM) pour la lipolyse basale et* ***B*** *: par le VEH, la noradrénaline (NA, 1µM) ou la NA+JZL195 (10µM) pour la lipolyse stimulée. La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4) Les différences statistiques entre les traitements sont symbolisées par **P<0,01 et ****P<0,0001*

5) *La lipolyse est diminuée in vivo chez des souris traitées par le JZL195*

Les résultats obtenus avec les explants de TAV ont ensuite été transposés *in vivo.* Pour cela, nous avons étudié les conséquences de l'activation endogène du SEC induite par le JZL195 sur la lipolyse de souris soumises à un jeûne de longue durée de 24h (**Cf. Matériel & Méthodes IV, B, 2, b**). Ainsi, lorsque le glycérol plasmatique est mesuré au cours des 3h qui suivent l'injection de l'inhibiteur, on constate une diminution significative de sa concentration chez les souris traitées par le JZL195 par rapport au véhicule à t=1h et 2h (**Figure 64**) confirmant l'hypothèse selon laquelle l'activation du SEC provoque une diminution de la lipolyse lorsque l'insulinémie est faible.

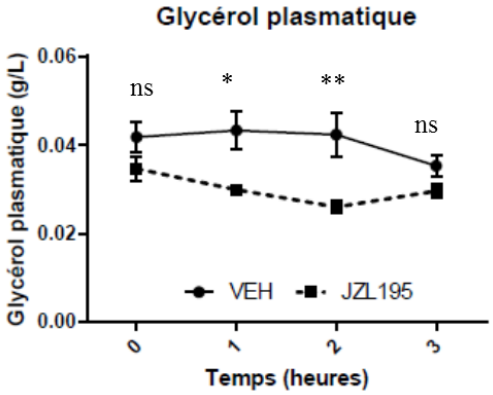


***Figure 64* : La lipolyse au cours du temps est diminuée chez des souris traitées par le JZL195.**
*Des souris à jeun 24h ont reçues une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de JZL195 (20 mg/kg). La concentration en glycérol plasmatique a été mesurée au cours du temps (0 ; 1 ; 2 et 3h) à partir du sang collecté à la veine de la queue des animaux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par * P<0,05 ;**P<0,01.*

Toutefois, nous n'avons pas pu constater ces effets *in vivo* chez des souris à jeun depuis 24h et soumises à une injection d'AEA. En effet, aucune différence de production de glycérol n'a été observée entre les souris traitées par l'agoniste par rapport aux souris traitées par le véhicule (Muller et al., 2017). Au cours de ces expériences, l'effet très bref de l'AEA associé à une utilisation très rapide et continue du glycérol et des AGL produits (à jeun) ne permettent probablement pas de détecter de variations entres les traitements. Cette hypothèse est d'autant plus renforcée que lorsque nous réalisons un traitement au JZL195 au cours duquel l'effet des ECs est plus durable, nous observons une diminution de la production de glycérol (**Figure 64**).

6) *L'activation du SEC par l'AEA stimule la production d'adiponectine in vitro*

Il est maintenant bien établi que l'adiponectine, abondamment sécrétée par le TA, augmente la prolifération adipocytaire, accélère la différenciation et favorise l'accumulation lipidique dans les adipocytes matures (Fu et al., 2005). En effet, cette hormone est principalement sécrétée par les adipocytes matures au cours de la différenciation adipocytaire tardive (Ojima et al., 2016).

Au cours des expérimentations menées *in vitro* avec l'AEA (**Cf. Matériel & Méthodes III, A, 1**), en plus de son effet inhibiteur sur la production de glycérol et d'AGL en absence d'insuline (**Figure 55**), le traitement d'explants de TAV pendant 3h par l'agoniste conduit à une augmentation de la production d'adiponectine dans le surnageant (**Figure 65**) suggérant un effet prolifératif de l'AEA sur le TA. En effet, ces données sont en accord avec les travaux de Bouaboula *et al.* qui démontrent l'effet prolifératif de l'AEA par l'induction de différents gènes dont le gène codant pour l'adiponectine. De plus, ces travaux suggèrent un effet dépendant de l'activation de PPARγ puisqu'il a clairement été démontré que l'AEA a la capacité de lier ce facteur de transcription et que l'adiponectine est un gène cible de PPARγ (Bouaboula et al., 2005).

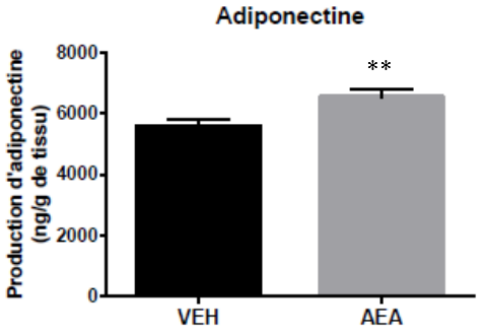


***Figure 65** : La sécrétion d'adiponectine est stimulée dans des explants de TAV traités par l'AEA.*
*Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 3h par le véhicule (VEH) ou l'AEA (5 µM). La sécrétion d'adiponectine a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4/groupe). Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par **P<0,01.*

7) Conclusion

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* suggèrent d'une part, que l'activation du SEC provoque une diminution de la lipolyse lorsque l'insulinémie est faible (*in vivo*) ou en absence d'insuline (*in vitro*) et d'autre part que le TA est le siège des mécanismes de régulation. En effet, la diminution du glycérol plasmatique observée *in vivo* proviendrait bien d'une diminution de la lipolyse adipocytaire et non pas d'une augmentation de son utilisation par différentes tissus tels que le foie. Ainsi, dans une situation de faible insulinémie métaboliquement favorable à la libération de substrats énergétiques (glycérol et AGL), l'activation du SEC limiterait la mobilisation des graisses. Or, au cours de l'obésité, on assiste à une dérégulation de la lipolyse adipocytaire et plus spécifiquement à une diminution de la lipolyse stimulée au cours du jeûne et de l'exercice physique (Large et al., 1999). Actuellement, un des mécanismes proposé pour expliquer cette dérégulation est une augmentation de l'activation des récepteurs α-adrénergiques (inhibiteurs) aux dépens des β-adrénergiques (stimulateurs) (Mauriège et al., 1991; Reynisdottir et al., 1994). Compte tenu des résultats obtenus au cours de nos expérimentations réalisées dans ces conditions de lipolyse stimulée, l'activation du SEC au cours de l'obésité pourrait également constituer un mécanisme à l'origine de la moindre sensibilité du TA aux catécholamines. Nos données suggèrent que ce mécanisme impliquerait l'activation de la voie de signalisation Akt avec comme conséquence une diminution de la concentration intracellulaire en AMPc. Néanmoins, un effet direct de l'activation des récepteurs CBR sur la régulation de l'AMPc ne peut être exclu puisqu'il est bien connu que les récepteurs CBR sont couplés aux protéines G inhibitrices régulant négativement l'adénylate cyclase et donc la production d'AMPc.
Ainsi, il semblerait que l'activation du SEC dans ces conditions soit plutôt favorable à un maintien des graisses dans le TA et donc au stockage et à l'expansion du tissu (**Figure 66**). En accord avec cette hypothèse, l'observation d'une augmentation de la sécrétion d'adiponectine par le TA est en faveur d'un effet pro-adipogénique.

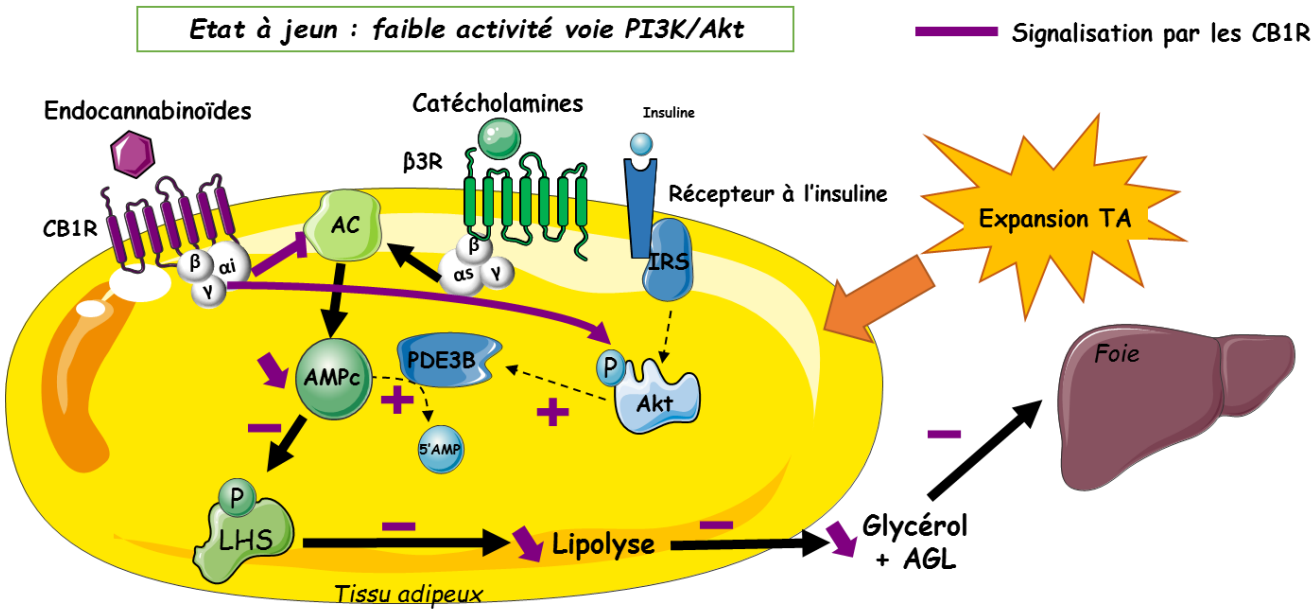


Figure 66* : *Mécanisme d'action hypothétique des CB1R sur la lipolyse adipocytaire en situation de jeûne.

En période de jeûne, situation au cours de laquelle la faible insulinémie est associée à une lipolyse élevée, l'activation des CB1R conduit à une stimulation de la voie Akt-dépendante et par conséquent de la PDE 3B conduisant à une diminution des concentrations intracellulaires en AMPc. La production d'AMPc pouvant également être réduite via l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par les protéines Gi couplées aux CB1R. Il en résulte un ralentissement de la lipolyse adipocytaire et un relargage d'AGL favorisant ainsi le stockage et l'expansion du TA.

L'inhibition de l'activité lipolytique induite par l'activation des CB1R a été mise en évidence en situation de faible insulinémie c'est-à-dire lorsque les voies de signalisation insulinique sont peu actives. On peut supposer que les effets observés dans ces conditions s'appliquent également au TA insulinorésistant dans lequel les voies de signalisation insuliniques ne sont plus efficacement activées par l'insuline. Ainsi, chez la souris obèse, l'hyperactivation endogène du SEC pourrait par ce mécanisme favoriser le stockage des lipides au sein du TA.

E. L'activation du SEC modifie également l'activité lipolytique dans le TA humain

Par la suite, nous avons cherché à transposer les résultats obtenus sur le TAV de souris au TA humain. Pour cela, un protocole (**Annexe C**) a été rédigé et déposé au Comité de Protection de Personnes (CPP) permettant d'obtenir des prélèvements de TAV et TASC sur des hommes sains d'IMC<30. Après acceptation du protocole, des expérimentations similaires à celles réalisées sur des explants de TAV de rat ont été réalisées sur du TA humain afin de mesurer la production de glycérol dans le surnageant suite à une stimulation par l'AEA dans différentes conditions de culture (**Cf. Matériel & Méthodes III, C**).

1) *Mise au point des traitements*

Dans un premier temps, la sensibilité des explants de TAV et TASC à la noradrénaline et à l'insuline a été déterminée. Ainsi, les deux types de tissus ont été exposés à des concentrations croissantes en noradrénaline (0 ; 10 ; 100 ; 1000 nM) et en insuline (0 ; 100 ; 250 ; 500 nM).

a. *Dose réponse à la noradrénaline*

La courbe dose-réponse à la noradrénaline révèle une augmentation significative de la production de glycérol pour la plus forte concentration testée (1µM) uniquement pour les deux tissus (**Figure 67**). On peut également noter que la stimulation de la lipolyse est beaucoup plus importante pour le TAV que pour le TASC pour cette concentration (production de glycérol +550% contre +250% en moyenne respectivement). Ainsi, la concentration de 1µM a été retenue pour la suite des expérimentations.

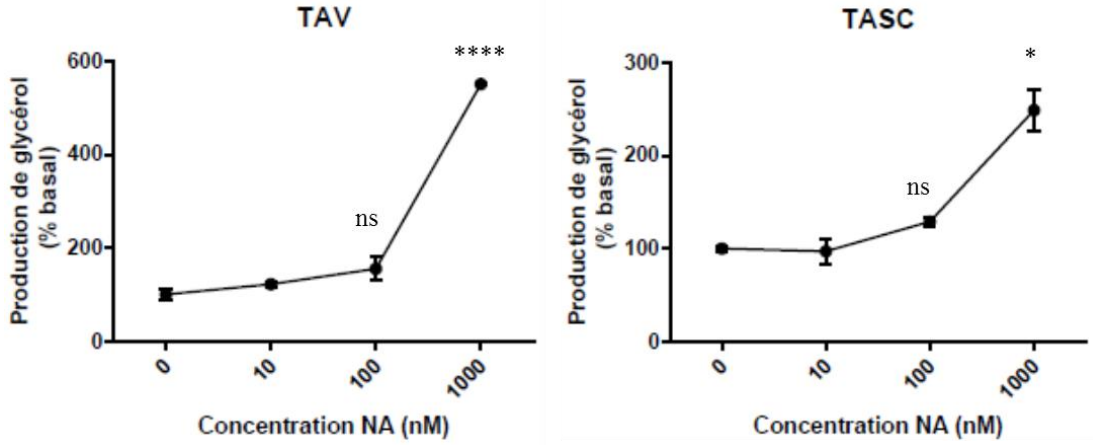


***Figure 67* : Dose réponse à la noradrénaline d'explants de TAV ou TASC humain sur la production de glycérol.**

*Les explants ont été traités pendant 1h par des concentrations croissantes en noradrénaline (NA ; 0 ; 10 ; 100 ; 1000 nM). La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe) et représentent le % de variation par rapport au basal (NA 0nM). Les différences statistiques par rapport au basal (NA 0nM) sont symbolisées par * P<0,05 ;****P<0,0001*

b. *Dose réponse à l'insuline*

Concernant la dose réponse à l'insuline en présence d'une stimulation noradrénergique de 1µM, le TAV répond significativement aux trois doses d'insuline testées à en juger par la diminution de production de glycérol observée (**Figure 68**). Le TASC apparait, quant à lui, moins sensible à l'action de l'hormone et voit sa production de glycérol significativement diminuée uniquement pour la concentration de 500nM.

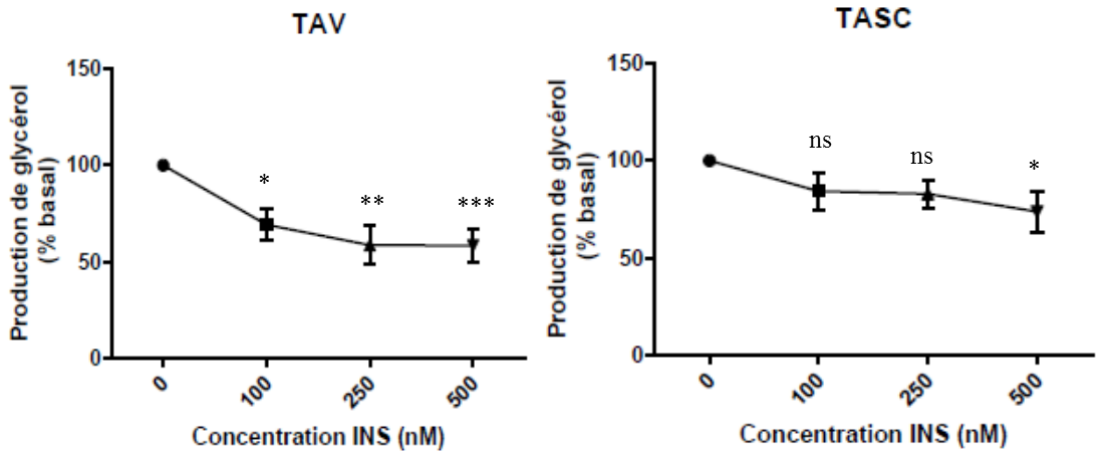


***Figure 68** : Dose réponse à l'insuline d'explants de TAV ou TASC humain sur la production de glycérol.*

*Les explants ont été traités pendant 1h par des concentrations croissantes en insuline (INS ; 0 ; 100 ; 250 ; 500 nM) en présence d'une stimulation noradrénergique (1µM). La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3/groupe) et représentent le % de variation par rapport au basal (INS 0 nM). Les différences statistiques par rapport au basal (INS 0nM) sont symbolisées par * P<0,05 ;**P<0,01 ;***P<0,001*

Compte tenu des résultats obtenus sur le TAV de souris, montrant que les effets de l'activation du SEC sont dépendants de la présence ou non d'insuline et compte tenu de la variabilité de la sensibilité à l'insuline des explants de TA provenant des patients, les trois doses testées ont été retenues afin de se placer dans des conditions d'insulinémie variables au cours des expérimentations.

2) *L'activation du SEC dans le TAV et le TASC humain conduit à une dérégulation de la lipolyse adipocytaire*

L'effet de l'activation du SEC sur la production de glycérol a été testé au cours d'une stimulation noradrénergique de 1µM en présence des concentrations croissantes d'insuline préalablement validées. Lorsque les explants de TA sont incubés sans insuline, le traitement à l'AEA conduit à une diminution significative de la production de glycérol par rapport au véhicule à la fois dans le TAV et dans le TASC (**Figure 69**). Lorsque l'insuline est ajoutée dans le milieu de culture, on observe cette fois une augmentation de la production de glycérol suite au traitement par l'agoniste en comparaison au véhicule uniquement pour les concentrations de 250 et 500 nM pour les deux dépôts adipeux (**Figure 69**). Ces résultats suggèrent donc, comme précédemment observé *in vitro* dans des explants de TAV de rat, qu'en absence d'insuline, soit une situation favorable à la mobilisation de graisses, l'activation du SEC conduit à une inhibition de la lipolyse. A l'inverse, au cours d'une situation favorable au stockage, où l'insulinémie est élevée, l'activation du SEC entraine une augmentation de la lipolyse adipocytaire. Une altération de la voie de signalisation insulinique pourrait être à l'origine de ces dérégulations de façon similaire à ce qui a été observé chez le rat. Néanmoins des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette

hypothèse. Il est également important de noter que ces effets sont observés quel que soit le type de TA considéré.

Au final, ces expérimentations préliminaires menées sur les explants de TA humain suggèrent que les résultats obtenus chez le rat sont transposables à l'Homme. Ainsi, les hypothèses proposées concernant l'implication du SEC du TA dans la mise en place des dérégulations métaboliques liées à l'obésité pourraient également s'appliquer et justifier le développement de stratégies thérapeutiques visant à limiter le tonus endocannabinoïde dans cet organe.

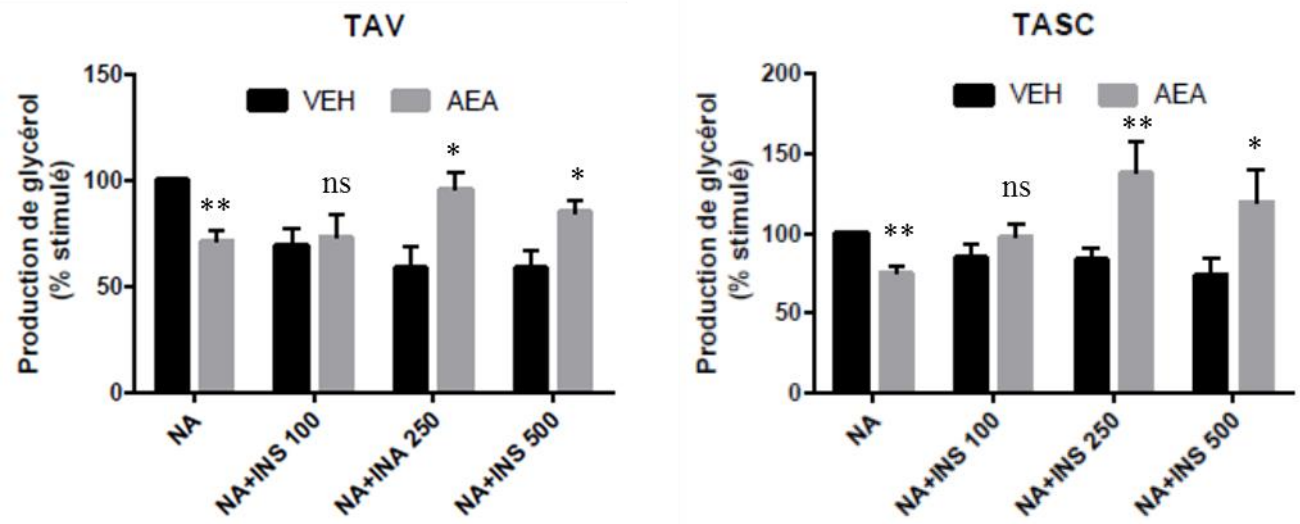


***Figure 69** : L'AEA conduit à une dérégulation de la lipolyse dans le TAV et le TASC.*
*Les explants ont été traités pendant 1h par des concentrations croissantes en insuline (INS ; 0 ; 100 ; 250 ; 500 nM) en présence ou non d'AEA (5µM) au cours d'une stimulation noradrénergique (NA 1µM). La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant à la fin de la période d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n= 4) et représentent le % de variation par rapport au stimulé (NA).Les différences statistiques par rapport au stimulé (NA) sont symbolisées par * P<0,05 ;**P<0,01.*

F. Conclusion : l'activation des CB1R du TA conduit à une dérégulation de la lipolyse

L'ensemble de ces résultats suggère que les CB1R du TA sont impliqués dans la mise en place des altérations du métabolisme glucido-lipidique liées à l'obésité et de ce fait pourraient constituer une cible thérapeutique intéressante. En effet, nous avons montré, à la fois dans le TA murin et humain, que l'activation du SEC conduit à une dérégulation de la lipolyse adipocytaire dont les conséquences sont dépendantes du statut métabolique (**Figure 70**). Alors que l'activation des CB1R conduit à une inhibition de la lipolyse lorsque l'insulinémie est faible comme c'est le cas au cours du jeûne (favorable au stockage et donc à l'expansion du TA), leur activation lorsque que l'insulinémie est élevée (i.e. période postprandiale) conduit à une stimulation de la lipolyse et par conséquent au relargage d'AGL. Ces effets semblent dépendre, au moins en partie, d'une interaction entre les CB1R et la voie de signalisation

PI3K/Akt liée à l'insuline. Dans ce sens, une interaction physique entre le récepteur à l'insuline et les CB1R à l'origine d'une baisse de la signalisation insulinique sous-jacente a été décrite dans d'autres tissus et pourrait être un des mécanismes impliqués (Kim et al., 2012).

En somme, le SEC du TA pourrait être un acteur majeur dans la mise en place de la résistance à l'insuline au sein même de cet organe et ainsi exercer indirectement des effets délétères sur les tissus périphériques dont le foie *via* l'afflux d'AGL généré. La mise en évidence d'une boucle de régulation négative impliquant le FGF21 visant à normaliser la lipolyse illustre l'interrelation entre le TAV et le foie. En réponse aux AGL et/ou à l'accumulation de TG, on assiste à une augmentation de l'expression et de la sécrétion du facteur FGF21 sans doute dépendante de l'activation des facteurs de transcription CREBH et PPARα. Il en résulte une diminution de l'activité lipolytique du TA et par conséquent une réduction du flux d'AGL vers le foie. Nos données suggèrent que cette boucle de régulation entre le foie et le TA est bien initiée par les AGL issus de la lipolyse puisque l'expression du FGF21 n'est pas ou peu stimulée lorsque les CB1R du foie sont activés directement. Le rôle du SEC dans le fonctionnement de cette boucle de régulation négative reste néanmoins à étudier dans un modèle d'obésité pour lequel une résistance à l'action du FGF21 a été suggérée.

Dans notre étude, nous avons également montré que, lorsque la voie de signalisation insulinique est peu active dans les adipocytes comme c'est le cas en période de jeûne, l'activation des CB1R provoque une diminution de la lipolyse. En transposant ces résultats à la souris obèse ayant développé une insulinorésistance, il est possible de suggérer que dans ces conditions, l'élévation du tonus endocannabinoïde favorise le stockage des lipides et l'expansion du TA, comme il l'a déjà été suggéré par plusieurs études (Cota et al., 2003; Matias et al., 2006; Pagano et al., 2007; Teixeira et al., 2010).

Au final, l'hyperactivité du SEC dans le TA, *via* son impact sur la lipolyse, peut être considérée comme un évènement participant à l'installation de la résistance à l'insuline au cours du développement de l'obésité puis à terme, favorisant l'expansion du tissu en partie en limitant la mobilisation des AGL lorsque l'insulinorésistance est établie.

Ainsi, l'inactivation des CB1R du TA semble être une stratégie intéressante pour limiter les effets délétères liés à une dérégulation de lipolyse au cours de l'obésité. C'est ce que nous nous sommes proposés d'étudier dans la dernière partie de cette thèse.

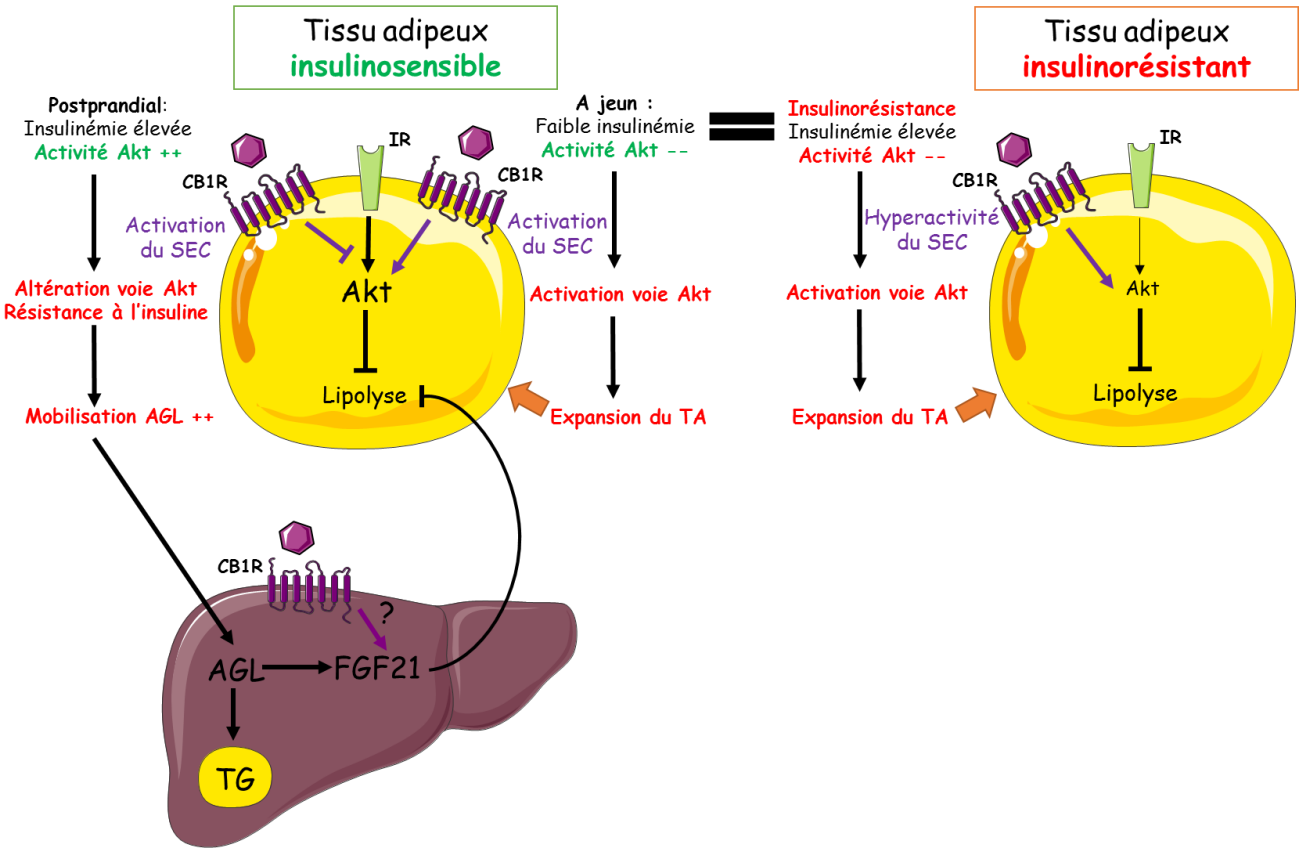


***Figure 70* : Hypothèse concernant les effets de l'activation du SEC dans différentes situations nutritionnelles et physiopathologiques.**

Alors que l'activation des CB1R conduit à une mobilisation des AGL lorsque la voie Akt est fortement activée comme c'est le cas en situation postprandiale, leur activation conduit à un effet inverse, c'est-à-dire une inhibition de la lipolyse en faveur d'une expansion du TA lorsque la voie Akt est faiblement active voire inactive (jeûne ou insulinorésistance).

II. Etude des conséquences de l'inactivation du SEC sur la lipolyse adipocytaire

Les données de la littérature et les résultats précédents suggèrent que l'augmentation du tonus endocannabinoïde participe à la dérégulation de la lipolyse adipocytaire associée à l'obésité. En effet, nous avons démontré que lorsque la signalisation insulinique est faible, comme c'est le cas au cours du jeûne, l'activation du SEC stimule la voie Akt-dépendante favorisant ainsi le stockage des lipides et l'expansion du TA.

Ces conditions expérimentales peuvent être assimilées à l'état d'obésité au cours duquel sont associés un tonus endocannabinoïde élevé et une faible activité des voies de signalisation insuliniques du fait d'une résistance périphérique à l'insuline

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'inactivation des CB1R pourrait limiter les effets pro-adipogéniques du SEC liés à l'activation des voies de signalisation insuliniques en période de jeûne et au contraire favoriser la lipolyse.

A. Effets du blocage des CB1R par le Rimonabant sur la lipolyse chez la souris obèse

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord utilisé le modèle de souris rendue obèse et résistante à l'insuline par l'administration d'un régime hyperlipidique à base de lard et dont le TAV présente une augmentation du tonus endocannabinoïde **(Figure 35A).** L'activité lipolytique a été mesurée après le blocage des CB1R par injection de Rimonabant ou d'AM6545 (**Cf. Matériel & Méthodes IV, D, 3**)

Le Rimonabant est un agoniste inverse spécifique des CB1R ce qui implique qu'en plus d'antagoniser l'action des ECs sur les récepteurs, il a également la capacité d'induire une transduction du signal opposée à celles des ECs (MacLennan et al., 1998).

L'AM6545 est, quant à lui, une antagoniste neutre spécifique des CB1R dépourvu d'effets centraux du fait de ses capacités limitées à franchir la barrière hémato-encéphalique (Tam et al., 2010)

Quel que soit l'antagoniste utilisé, la concentration plasmatique de glycérol est rapidement augmentée au cours du temps traduisant une activation de la lipolyse (**Figure 71**). Ces observations sont en accord avec les travaux de Herling et al. et Mølhøj et al. qui suggèrent également une augmentation de la production d'AGL et de glycérol suite à un traitement aigu par le Rimonabant (Herling et al., 2008; Mølhøj et al., 2010).

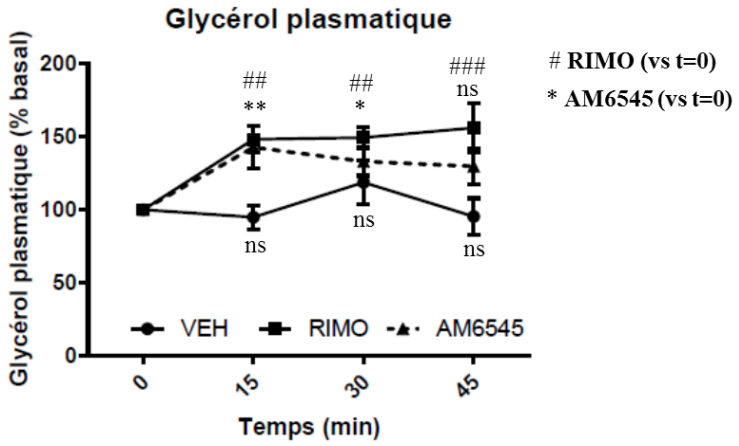


***Figure 71** : Le blocage des récepteurs CB1R conduit à une augmentation de la lipolyse chez la souris obèse.*

*Des souris obèses à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH), de Rimonabant (RIMO ; 10 mg/kg) ou d'AM6545 (10 mg/kg). La concentration en glycérol plasmatique a été mesurée au cours du temps (0 ; 15 ; 30 ; 45 min) à partir du sang collecté à la veine de la queue des animaux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5 VEH ; n=5 RIMO ; n=4 AM6545) et représentent le % de variation par rapport à t=0min. Les différences statistiques par rapport au t=0 min sont symbolisées par *P<0,05 ou**P<0,01 pour l'AM6545 et ##P<0,01 ou ###P<0,001 pour le RIMO.*

L'analyse par western-blot du TAV prélevé sur des souris obèses traitées par le Rimonabant pendant 15 min montre l'absence de modifications de l'activité de la voie de signalisation insulinique (**Figure 72**) suggérant ainsi l'existence d'un autre mécanisme de régulation que celui induit par l'AEA.

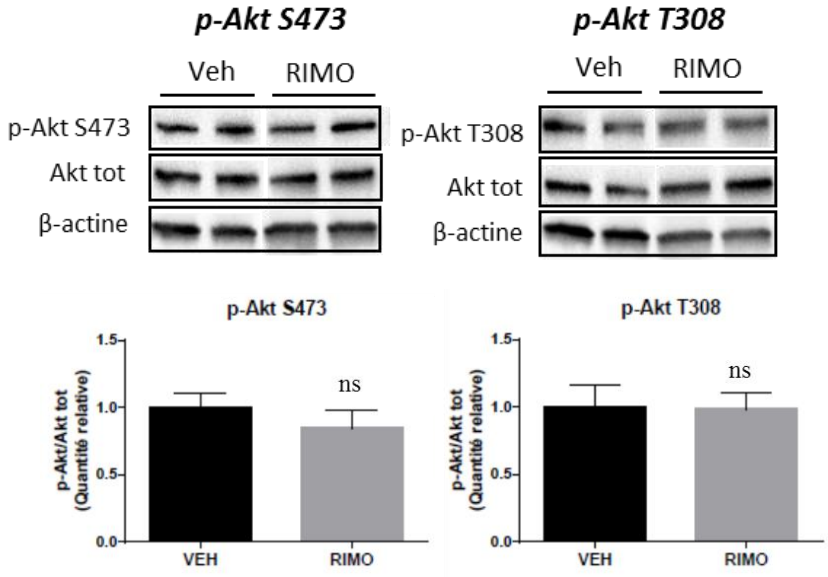


***Figure 72* : Le Rimonabant ne modifie pas l'activité de l'Akt dans le TAV de souris.**
Des souris obèses à jeun 6h ont été soumises à une injection de véhicule (VEH) ou de Rimonabant (RIMO ; 10 mg/kg). A t=15 min, TAV a été récupéré afin de mesurer te taux de phosphorylation d'Akt par Western Blotting. Les immunoblots accompagnés des analyses densitométriques représentent les niveaux de phosphorylations de l'Akt sur les résidus S473 et T308. . Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe).

Une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc consécutive à une activation de l'adénylate cyclase par les protéines Gs couplés aux CB1R pourrait être un mécanisme à l'origine de l'augmentation de la lipolyse adipocytaire. En effet, des expériences menées en collaboration avec une équipe du CSGA de Dijon[1] sur des cellules HEK-293 (**Cf. matériel & Méthodes III, F**) et en accord avec des études réalisées par Huang et collaborateurs sur des cellules HUVEC (Huang et al., 2010), montrent que le Rimonabant augmente de manière dose-dépendante la concentration intracellulaire en AMPc **(Figure 73**).

[1] ***Equipe Perception de la flaveur ; Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA)****- UMR Université de Bourgogne - CNRS 6265 - INRA 1324 - Directeur du Centre : Lionel Bretillon / Responsable d'Equipe : Loïc Briand / Responsable expérimentation : Anne-Marie Lebon/ Technicienne : Christine Belloir*

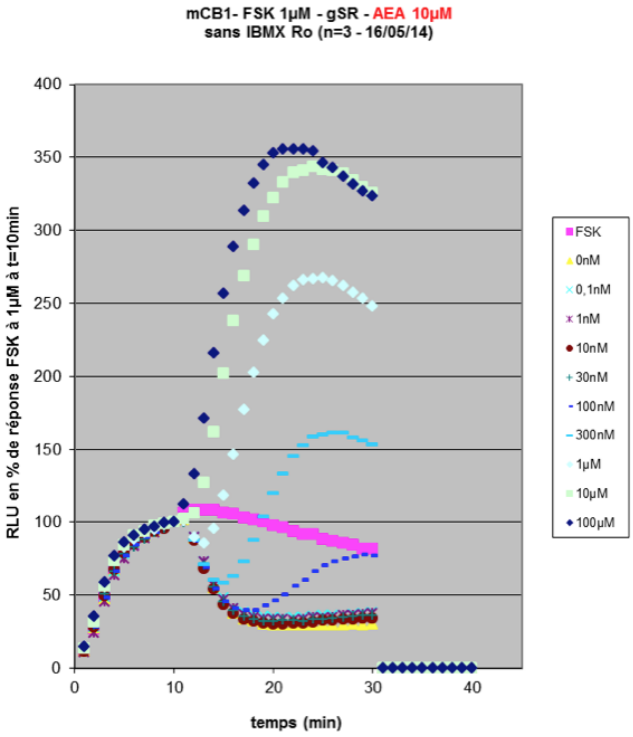


***Figure 73** : Le Rimonabant augmente la concentration intracellulaire en AMPc et contrecarre l'effet inhibiteur de l'AEA.*

Des cellules HEK293T/17 exprimant le récepteur CB1R par transfection transitoire ont été prétraitées pendant 10 min par la forskoline (FSK, 1µM). A t=10min, les cellules ont été traitées pendant 20 min avec de l'AEA (10 µM) et en présence de concentrations croissantes en Rimonabant (RIMO ; 0-100 µM). La concentration en AMPc a été déterminée par mesure du signal lumineux. Les résultats sont exprimés en % de réponse par rapport au signal à t=10 min (FSK)

Néanmoins, dans notre modèle d'étude *in vivo*, nous n'avons pas observé de différence de concentration intracellulaire en AMPc dans le TAV de souris obèses traitées par le Rimonabant en comparaison aux souris traitées par le véhicule (**Figure 74**) alors que dans un modèle d'explants de TAV de rat obèse, une augmentation de la concentration en AMPc similaire à celle induite par la forskoline a été observée suite au traitement par l'antagoniste (**Figure 75**). Ceci suggère que, dans notre modèle *in vivo*, les conditions utilisées ne sont probablement pas adaptées à la mise en évidence d'une augmentation significative de la concentration en AMPc dans le TA.

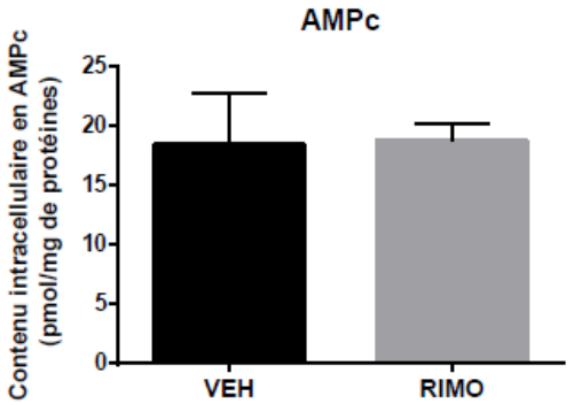


***Figure 74* : Contenu intracellulaire en AMPc dans le TAV de souris traitées par le Rimonabant.**
Des souris obèses à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de véhicule (VEH) ou de Rimonabant (RIMO ; 10 mg/kg). A t=15 min, le TAV a été récupéré afin de mesurer le contenu intracellulaire en AMPc. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe).

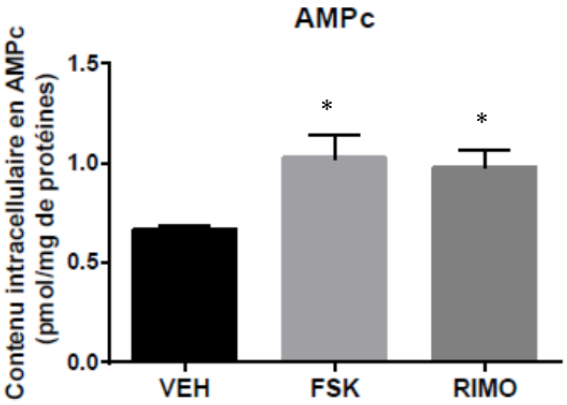


***Figure 75* : Le traitement d'explants de TAV de rat obèse par le Rimonabant augmente le contenu intracellulaire en AMPc.**
*Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 15 min par le véhicule (VEH), la forskoline (FSK 10 µM) ou le Rimonabant (RIMO ; 1µM) en vue de mesurer le contenu intracellulaire en AMPc. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4/groupe) Les différences statistiques par rapport au VEH sont symbolisées par *P<0,05 ; **P<0,01.*

Parallèlement, nous avons évalué l'effet du Rimonabant sur la lipolyse chez des souris contrôles présentant un tonus endocannabinoïde faible et l'avons comparé à celui observé chez les souris obèses (**Cf. Matériel & Méthodes IV, C, 4**). Les résultats montrent que chez les souris contrôles, la production de glycérol est également augmentée par le Rimonabant mais de façon beaucoup moins marquée que chez les souris obèses (**Figure 76**). Ceci suggère que l'effet du Rimonabant sur la lipolyse est plus important lorsque le tonus endocannabinoïde est élevé.

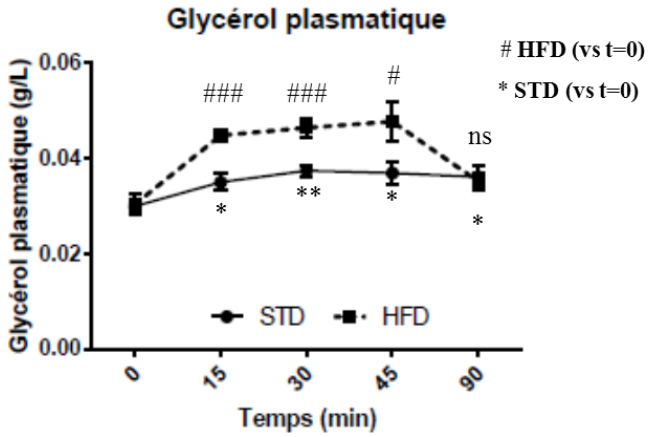


***Figure 76* : Le blocage des récepteurs CB1R par le Rimonabant conduit à une stimulation de la lipolyse plus importante chez les souris obèses que chez les souris contrôles.**

*Des souris contrôles (STD) ou obèses (HFD) à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de Rimonabant (RIMO ; 10 mg/kg). La concentration en glycérol plasmatique a été mesurée au cours du temps (0 ; 15 ; 30 ; 45 ; 90 min) à partir du sang collecté à la veine de la queue des animaux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport à t=0 min sont symbolisées par *P<0,05 ;**P<0,01 pour le STD et #P<0,05 ;###P<0,001 pour le HFD.*

Il est intéressant de noter que l'augmentation de la production de glycérol induite par le Rimonabant s'accompagne dans le même temps et dans des proportions comparables d'une augmentation de la glycémie à la fois chez les souris contrôles et obèses (**Figure 77**). Ces observations sont en accord avec les travaux de Bermudez-Silva et al. qui montrent qu'un traitement aigu au Rimonabant conduit à une intolérance au glucose (Bermudez-Silva et al., 2016). Les auteurs suggèrent que l'augmentation de la glycémie induite par l'antagoniste CB1R est consécutive à une diminution de la sécrétion d'insuline sans que la sensibilité à l'insuline périphérique ne soit affectée. Dans nos expériences, nous avons également mis en évidence une diminution transitoire de l'insulinémie 15 min après le traitement par le Rimonabant uniquement chez les souris obèses (**Figure 77**). L'absence d'effet chez les souris contrôles pourrait être dû à la sensibilité du kit de dosage ne permettant pas de détecter cette diminution chez des animaux présentant déjà une faible insulinémie basale.

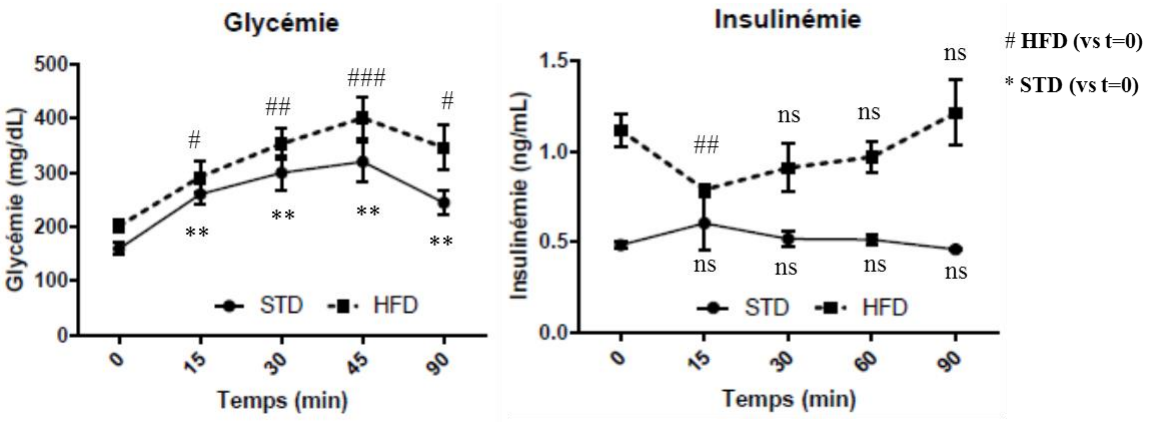


***Figure 77* : Le blocage des CB1R par le Rimonabant diminue l'insulinémie de manière précoce chez les souris obèses.**

*Des souris contrôles (STD) ou obèses (HFD) à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de Rimonabant (10 mg/kg). La glycémie et l'insulinémie ont été mesurées au cours du temps (0 ; 15 ; 30 ; 45 ; 90 min) à partir du sang collecté à la veine de la queue des animaux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=5/groupe). Les différences statistiques par rapport à t=0 min sont symbolisées par **P<0,01 pour le STD et #P<0,05 ;##P<0,01 ;###P<0,001 pour le HFD.*

Ainsi, il est probable que l'augmentation de la lipolyse adipocytaire induite par le Rimonabant chez les souris obèses soit la conséquence d'une baisse de sécrétion d'insuline. Néanmoins, le fait que les effets du traitement sur la glycémie soient comparables entre les souris contrôles et obèses (**Figure 77**) alors que ceux concernant la lipolyse sont plus marqués chez les souris obèses (**Figure 76**), suggère que la production de glycérol pourrait également être stimulée par une action directe du Rimonabant sur les CB1R du TA.

B. Effets du blocage des CB1R par le Rimonabant sur la lipolyse sur le modèle d'explants de TAV de rat

Nous avons ensuite réalisé des expérimentations *in vitro* sur explants de TAV de rat dans le but d'étudier les conséquences directes de l'inactivation des CB1R sur le TA (**Cf. Matériel & Méthodes III, A, 3**). Afin de mimer les dérégulations métaboliques rencontrées au cours de l'obésité (signalisation insulinique faible et tonus endocannabinoïde élevé), les explants de TAV de rat ont été pré-incubés en présence d'AEA et cultivés dans un milieu dépourvu d'insuline. La production de glycérol a ensuite été mesurée après 1h de traitement par le Rimonabant toujours en présence d'AEA.

Comme démontré précédemment (**Figure 56**), le traitement à l'AEA (en absence d'insuline) conduit à une diminution de la production de glycérol (**Figure 78**). Néanmoins, l'effet inhibiteur de l'AEA est contrecarré lorsque le Rimonabant est ajouté au milieu de culture (**Figure 78**). Ceci démontre que le Rimonabant est capable d'exercer un effet activateur direct sur la lipolyse probablement *via* son action compétitive envers l'AEA limitant l'activation des CB1R. Replacé dans un contexte physiologique, ces résultats suggèrent que, lorsque le TA est sujet à un tonus endocannabinoïde élevé, l'antagonisme des CB1R stimule l'activité lipolytique adipocytaire favorisant ainsi le déstockage des graisses.

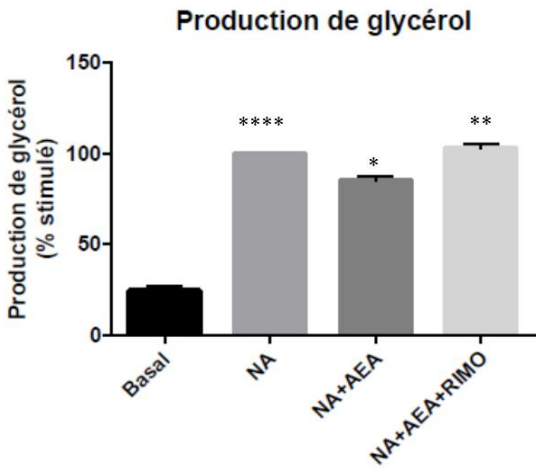


***Figure 78** : Le traitement d'explants de TAV de rat par le Rimonabant contrecarre l'effet inhibiteur de l'AEA.*

*Des explants de TAV de rat ont été traités pendant 1h par le véhicule (VEH), l'AEA (5 µM) ou par un co-traitement AEA (5µM) + Rimonabant (RIMO ; 1µM) en présence d'une stimulation noradrénergique (NA ; 1 µM). La production de glycérol a été mesurée dans le surnageant après 1h de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4/groupe) et représentent le % de variation par rapport au stimulé (NA). Les différences statistiques par rapport au stimulé (NA) sont symbolisées par *P<0,05 ;**P<0,01 ;***<0,001.*

C. Conclusion : le blocage des CB1R du TA conduit à une stimulation de la lipolyse favorable à une amélioration du métabolisme glucido-lipidique

Finalement, ces données préliminaires obtenues dans un contexte d'hyperactivité du SEC et d'insulinorésistance, suggèrent, comme illustré sur la **figure 79**, que le blocage des CB1R est favorable à une mobilisation des AGL probablement dépendante d'une augmentation du pool intracellulaire d'AMPc. Puisque nous n'avons pas observé de diminution d'activité de la voie Akt qui aurait pu être l'origine d'une moindre dégradation de l'AMPc, il est possible de suggérer, dans nos conditions, que le blocage des CB1R par le Rimonabant conduise à l'activation de l'adénylate cyclase *via* le recrutement de protéines G stimulatrices. Dans une situation physiologique, nous avons également montré que l'activation des CB1R en situation postprandiale est également favorable à une mobilisation des AGL. Néanmoins les conséquences métaboliques de ces deux situations ne sont pas les mêmes. Alors que la mobilisation des AGL consécutive à l'activation des CB1R est associée à des effets délétères tels que des dépôts ectopiques dans les organes périphériques comme le foie, celle induite par le Rimonabant serait bénéfique pour l'organisme dans un contexte d'obésité. En effet, en étant associée à une augmentation du catabolisme des lipides dans les organes périphériques, la stimulation de la lipolyse serait, dans ce cas, favorable à une réduction de la masse grasse.

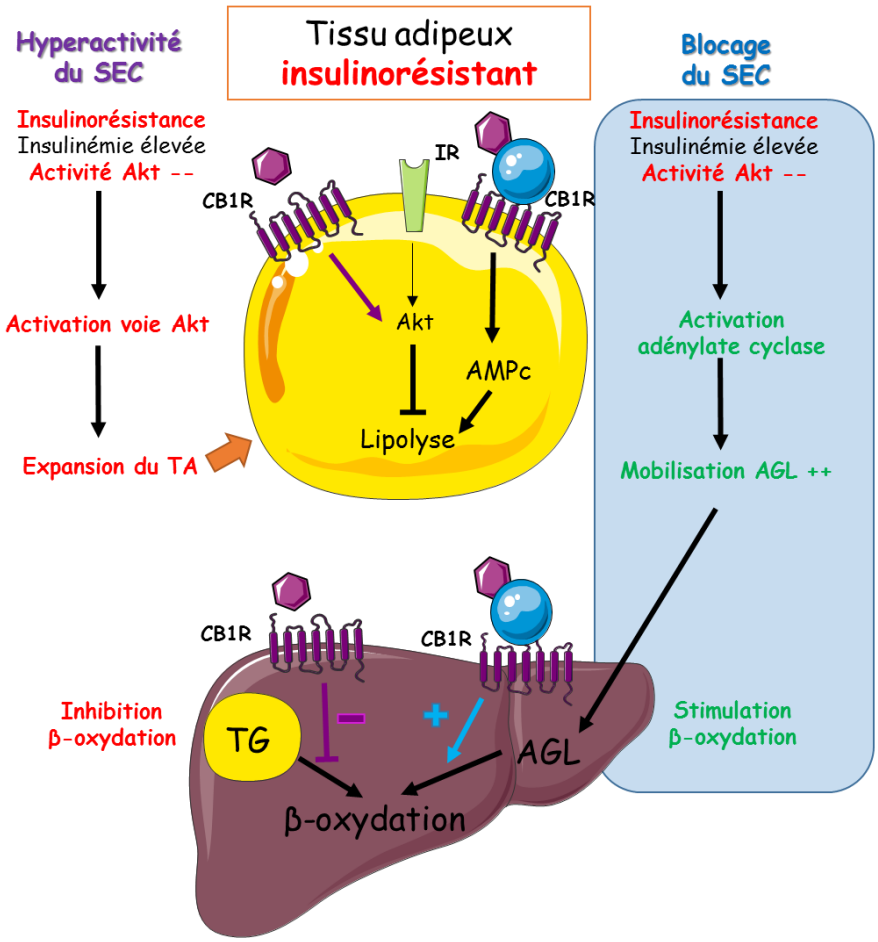


***Figure 79** : Hypothèse concernant les effets de l'inactivation du SEC au cours de l'obésité.*
Dans un contexte d'hyperactivité du SEC et d'insulinorésistance, le blocage des CB1R est favorable à une mobilisation des AGL et à leur utilisation par les organes périphériques tels que le foie.

Conclusion et perspectives

L'ensemble de ce travail montre, comme illustré **Figure 80**, que l'activation des CB1R du TA, en stimulant la lipolyse en période postprandiale et en l'inhibant en période de jeûne, s'oppose aux signaux régulant physiologiquement le métabolisme énergétique adipocytaire en agissant notamment sur la voie de signalisation liée à l'insuline. Néanmoins, d'autres voies régulatrices de la lipolyse nécessiteraient également d'être étudiées, comme AMPK et ERK d'autant que des interactions entre ces voies et le SEC ont déjà été mises en évidence (Eckardt et al., 2009; Jourdan et al., 2012). Quoi qu'il en soit, l'hyperactivation du SEC, telle qu'elle intervient dans certaines situations nutritionnelles, pourrait participer à l'installation de la résistance à l'insuline dans le TA et avoir des conséquences à long terme sur l'ensemble de l'organisme. L'utilisation de souris invalidées spécifiquement pour les CB1R dans les adipocytes serait d'un grand intérêt pour préciser l'implication du SEC adipocytaire dans le déclenchement de la résistance à l'insuline lors d'un challenge hyperlipidique.

En ce sens, une étude très récente utilisant ce modèle montre, qu'au cours d'un challenge hyperlipidique, ces souris présentent à la fois une augmentation de la lipolyse stimulée et une amélioration des paramètres métaboliques en comparaison avec les animaux sauvages. Ces résultats suggèrent que l'absence de CB1R dans les adipocytes favorise la mobilisation des graisses et leur utilisation par les tissus oxydatifs tels que le foie et le muscle (Azua et al., 2017). En accord avec ces résultats, les travaux issus de cette thèse associés à ceux de la littérature suggèrent que l'inactivation du SEC favorise la mobilisation des AGL du TA et leur utilisation par les tissus périphériques, deux évènements qui, lorsqu'ils interviennent conjointement, sont bénéfiques pour l'organisme (**Figure 80**). Nos résultats préliminaires semblent indiquer que les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la lipolyse qui accompagnent le blocage des CB1R sont indépendants de la voie de signalisation insulinique.

Notre objectif principal est maintenant de caractériser d'une part, les voies de signalisation concernées et d'autre part, de déterminer les conséquences de l'inactivation des CB1R présents sur les nombreux macrophages ayant infiltré le TA au cours de l'obésité. Il conviendra en particulier de distinguer le rôle joué par les CB1R des adipocytes et ceux des macrophages dans les mécanismes de régulation de la lipolyse. Dans ce contexte, il a été montré dans d'autres tissus le rôle délétère des CB1R macrophagiques dans le développement du DT2 (Jourdan et al., 2017a). Alors que les CB1R présents sur les cellules de Kuppfer du foie seraient impliqués dans la mise en place de la résistance à l'insuline au cours de l'obésité (Jourdan et al., 2017b), les CB1R des macrophages ayant infiltré les ilôts pancréatiques, en activant le Nlrp3 inflammasome, seraient en partie responsables d'une perte de la masse des cellules β (Jourdan et al., 2013).

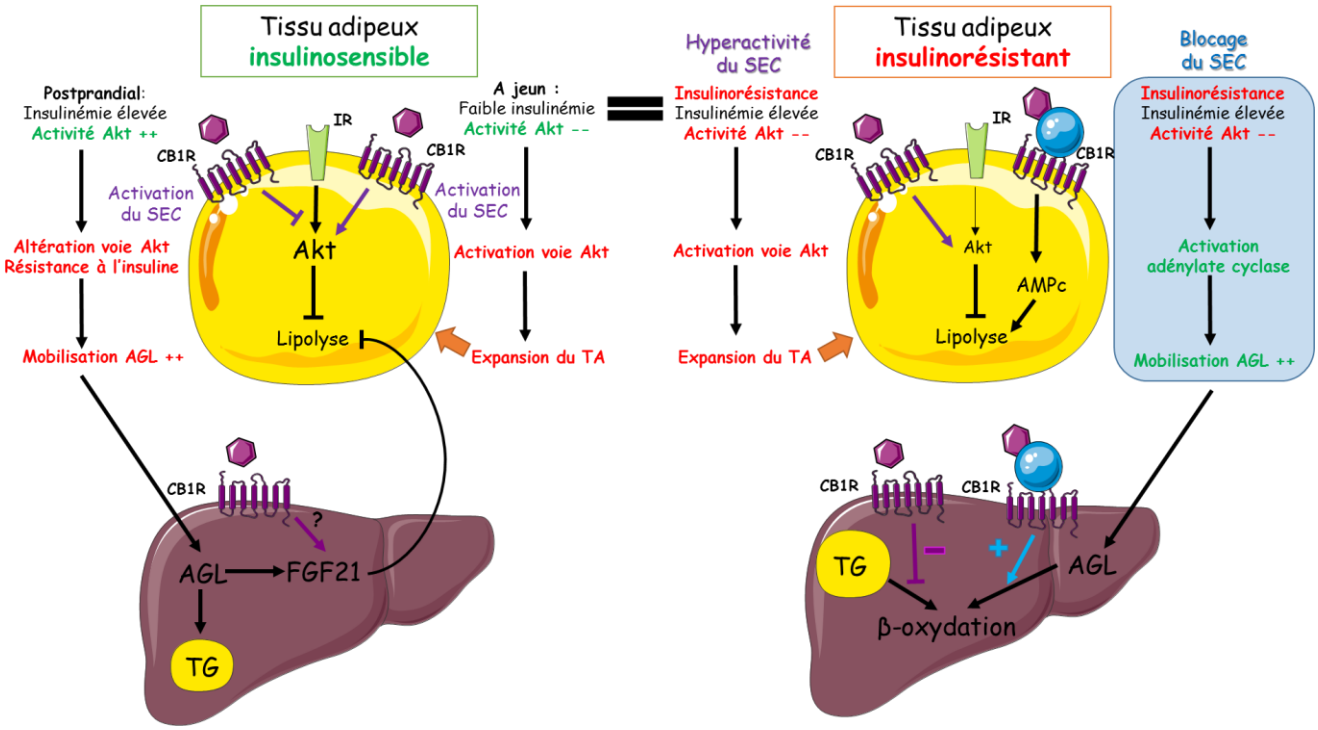


***Figure 80* : Hypothèses générale concernant le rôle des CB1R du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme hépatique**

Dans ce travail, nous avons également montré que la stimulation de la lipolyse induite par l'activation du SEC dans le TA conduit à la mise en place d'une boucle de régulation négative dans le foie dépendante du FGF21 visant à limiter la mobilisation d'AGL par le TA. Il serait maintenant intéressant d'étudier la fonctionnalité de cette boucle au cours de l'obésité et de déterminer l'éventuelle implication du SEC. Des résultats préliminaires obtenus *in vivo* montrent que la lipolyse adipocytaire est beaucoup plus importante chez des souris obèses malgré une forte concentration plasmatique en FGF21. Les souris obèses présentant un tonus endocannabinoïde élevé, il paraît intéressant de vérifier si le SEC joue un rôle dans l'installation d'une résistance au FGF21. Pour répondre à cette question, des approches *in vitro* sur des explants de TA provenant d'animaux sains et obèses seront développées afin d'évaluer les effets de l'activation des CB1R sur la sensibilité au FGF21. Les mécanismes impliqués pouvant être liés à l'inflammation du TA, ils seront parallèlement étudiés sur le modèle de souris invalidées pour les CB1R spécifiquement dans les cellules myéloïdes.

Ces travaux et la littérature actuelle suggèrent un rôle majeur du SEC et en particulier des CB1R du TA dans les altérations métaboliques associées à l'obésité. Les travaux récents réalisés par Ruiz de Azua *et al.*, montrent que les souris déficientes pour le récepteur CB1R spécifiquement dans le TA sont résistantes à l'obésité induite par un régime hyperlipidique. Les auteurs démontrent que le phénotype sain observé chez

ces animaux est la conséquence d'un remodelage du TA avec une diminution des adipocytes blancs et du stockage associée à une augmentation des adipocytes bruns et de la thermogenèse (Azua et al., 2017).

Cibler les CB1R présents sur les tissus périphériques par des antagonistes semble être une stratégie thérapeutique intéressante largement soutenue par la communauté scientifique. Dans cet objectif, une Collaboration a été établie avec l' EA1155 « Chimie Médicinale et Drug Discovery » IICiMed de la Faculté de Pharmacie de Nantes (Professeur Jean-Michel Robert) visant à développer et caractériser de nouveaux agents anti-obésité à action antagoniste des CB1R périphériques. Ce travail collaboratif est à l'origine d'un dépôt de brevet[2]. Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire montrent qu'un composé présentant une activité agoniste-inverse sur les CB1R et s'accumulant de manière importante dans le TA, exerce des effets lipolytiques puissants lorsqu'il est testé sur des explants. Ainsi, nous envisageons également de regarder si cette augmentation de la lipolyse existe *in vivo* et si elle est associée à un catabolisme plus important des acides gras dans les tissus périphériques. De plus, l'étude des conséquences de l'inactivation des CB1R dans des explants de TAV et de TASC humain provenant de patients obèses, insulinorésistants et/ou diabétiques constitue également une des perspectives à ces travaux.

[2] ***1,4-di(4-méthylthio-phényl)-3-phtaloylazétidine-2-one et ses dérivés***. *Brevet français concernant le développement et la caractérisation de nouveaux agents anti-obésité antagonistes des récepteurs aux endocannabinoïdes CB1R périphériques enregistré sous le N° WO2017050990 - 2017-03-30. JM Robert, S Troy-Fioramonti, L Demizieux et P Degrace.*

Matériel & Méthodes

I. Animaux et régimes

Les réglementations officielles Françaises relatives à l'utilisation et l'entretien des animaux de laboratoire (n°87848) ont été respectées pendant la période expérimentale. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique locale concernant l'expérimentation animale (n°BX0622).

Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées sur des souris mâles de souche C57BL/6J âgées de 15 semaines (JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France), des souris mâles déficientes pour le récepteur CB1R ($CB1R^{-/-}$, généreusement fournies par Dr. James Pickel, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). Les animaux ont été répartis en cages individuelles dans une pièce thermorégulée (21-22°C) avec un éclairage jour/nuit 12/12h et avec un libre accès à un régime standard A04 sous forme de bouchons (Safe, Augy, France) (**Annexe A**) ainsi qu'à l'eau de boisson.

Enfin, des souris C57BL/6J ont également été soumises à un régime alimentaire hyperlipidique contenant 34% de lipides sous forme de lard et représentant 60% d'énergie métabolisable Sniff (Soest, Allemagne) durant 20 semaines (**Annexe B**). Après la période de régime, seules les souris présentant un surpoids et une résistance à l'insuline ont été retenues pour la suite de l'étude.

La plupart des expérimentations *in vitro* menées sur les explants de TA péri-épididymaire ont été réalisées à partir du TA provenant de rats Wistar (JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France) de 250-300g répartis et nourris dans les mêmes conditions que les souris. Certaines expérimentations *in vitro* ont également été réalisées sur des explants de TA péri-épididymaire et des explants de foie provenant de souris sauvages ou $CB1R^{-/-}$.

II. Réactifs

Tous les réactifs et drogues utilisés au cours des différentes expériences proviennent de chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) à l'exception du JZL195 (Bio-Techne, Lille, France), de l'insuline humaine (Actrapid®, Novo Nordisk, La Défense, France) et du Rimonabant (SR141716, Sanofi Aventis, Paris, France).

D'autre part le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) + glutamax contenant 4,5 g/L de D-Glucose, le Sérum de Vœu Fœtal (SVF, référence 26140-79) et la solution saline équilibrée de Hank's (Hank's Balanced Sodium Salt, HBSS) avec ou sans calcium et magnésium proviennent de chez Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). Le poudre permettant la préparation du milieu DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham provient quant à elle de chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

III. Expérimentations *in vitro*

L'ensemble des expérimentations réalisées sur le TA du rat ou de la souris ont été effectuées à partir du TA péri-épididymaire qui sera considéré comme du TAV par opposition au TASC.

A. Explants de TAV de rat

Suite à un jeûne de 6h, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique à raison de 50 mg/kg. Après prélèvement, le TAV a rapidement été découpé en petits morceaux d'environ 10 mg. Les explants ont ensuite été rincés avec du milieu de culture complet (DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham supplémenté en albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin, BSA) 1% et en bicarbonate de sodium 0,12%) oxygéné et thermostaté à 37°C.

Les explants ont été répartis dans des plaques de culture de 12 puits à raison de 50-100 mg/puits et pré-incubés 30 minutes à 37°C dans 1 mL de ce même milieu sous atmosphère contrôlée (95% air et 5% CO_2) et sous légère agitation. Différents traitements ont été réalisés en vue d'étudier les conséquences de l'activation et/ou l'inactivation des récepteurs CB1R sur la lipolyse adipocytaire.

1) Traitement des explants de TAV par l'AEA

a. Mesure de l'activité lipolytique

Les explants ont été incubés pendant 1h en présence ou non d'un agent lipolytique, la noradrénaline (1 µM) ayant pour effet de stimuler la lipolyse, d'un agent antilipolytique, l'insuline (0 ou 1nM) et de l'agoniste des CBR, l'AEA (5 µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%). A la fin de cette période d'incubation, le surnageant a été récupéré en vue de doser les AGL et le glycérol libéré dans le surnageant grâce aux kits colorimétriques.

b. Mesure de la production d'adiponectine

La sécrétion d'adiponectine dans le surnageant des explants a été déterminée après avoir incubé les explants pendant 3h en présence d'AEA (5µM) ou de véhicule (DiMéthylSulfOxide (DMSO) 0,1%, Tween 0,025%). A la fin de cette période d'incubation, le surnageant a été récupéré en vue de doser l'adiponectine par la méthode d'immunoadsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

c. Analyse des voies de signalisation régulant la lipolyse

Pour l'étude des voies de signalisation, les explants ont été incubés durant des périodes plus courtes allant de 5 à 15 min en présence ou non d'un agent lipolytique, la noradrénaline (1 µM) ou la forskoline (10 µM),

ayant pour effet de stimuler la lipolyse, d'un agent antilipolytique, l'insuline (0 ou 1nM), inhibant la lipolyse, d'AEA (5 µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%). A la fin de la période d'incubation, les explants ont été récupérés, lavés et congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C en vue de mesurer la concentration intracellulaire en AMPc grâce à un test ELISA ou de réaliser une analyse protéique par Western Blot.

2) Traitement des explants de TAV par le JZL195

a. Mesure du tonus endocannabinoïde

Les explants ont été incubés en présence d'un inhibiteur des enzymes FAAH et MAGL dégradant les endocannabinoïdes, le JZL195 (10 µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%) pendant 3h. A la fin de cette période d'incubation, les explants ont été récupérés en vue de mesurer le tonus endocannabinoïde par spectrométrie de masse.

b. Mesure de l'activité lipolytique

Les explants ont été incubés en présence ou non d'un agent lipolytique, la noradrénaline (1 µM) et de JZL195 (10 µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%) pendant 3h afin de permettre l'action de l'inhibiteur sur les enzymes et l'accumulation d'ECs dans les cellules. A la fin de cette période d'incubation, le surnageant a été récupéré en vue de doser le glycérol libéré dans le surnageant grâce à un kit colorimétrique.

3) Traitement des explants de TAV par le Rimonabant

a. Mesure de l'activité lipolytique

Les explants ont été incubés pendant 1h en présence ou non d'un agent lipolytique, la noradrénaline (1 µM), de l'agoniste des CBR, d'AEA (5 µM) ou de Rimonabant (1µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%). A la fin de cette période d'incubation, le surnageant a été récupéré en vue de doser le glycérol libéré dans le surnageant grâce à un kit colorimétrique.

b. Mesure du contenu intracellulaire en AMPc

Les explants ont été incubés pendant 15 min en présence de forskoline (10 µM), de Rimonabant (1 µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%). A la fin de la période d'incubation, les explants ont été récupérés, lavés et congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C en vue de mesurer la concentration intracellulaire en AMPc grâce à un test ELISA.

B. Explants de TAV de souris

Le TAV de souris sauvages ou $CB1R^{-/-}$ (à jeun 6h) a été prélevé afin de réaliser une culture d'explants. Afin de comparer l'activité lipolytique basale du TA des souris sauvages et $CB1R^{-/-}$, les explants, préparés de la même manière que ceux issus du rat, ont été incubés pendant 1h en absence de stimulation noradrénergique et d'insuline. A la fin de cette période d'incubation, le surnageant a été récupéré en vue de doser le glycérol libéré dans le surnageant grâce à un kit colorimétrique.

C. Explants de TAV et TASC humain

Les TAV et TASC ont été prélevés sur des sujets volontaires de sexe masculin sains (sans cancers, pathologies inflammatoires chroniques, infections) et normo-pondérés (IMC moyen de 24,5 compris entre 20 et 26,1) et de moyenne d'âge 48 ans suite à des chirurgies digestives par cœlioscopie ou éventration. Le protocole d'étude a été approuvé par le CPP (**Annexe C**).

Une fois prélevés, les tissus ont été conservés dans le même milieu de culture complet que les explants de TA de rat (DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham supplémenté en albumine bovine sérique (BSA) 1% et en bicarbonate de sodium 0,12%) oxygéné et maintenu à température ambiante et rapidement transportés au laboratoire afin d'être immédiatement utilisés. Les explants ont été découpés en petits morceaux d'environ 10 mg et pré-incubés 30 min dans du milieu de culture complet à 37°C sous atmosphère contrôlée (95% air et 5% CO_2) et sous agitation.

Après la période de pré-incubation, les explants ont été rincés avec le milieu de culture et répartis dans des plaques de 12 puits puis incubés dans les mêmes conditions durant 1h en présence de 800 µL de milieu additionné des différents traitements. A la fin de cette période d'incubation, le surnageant a été récupéré en vue de doser le glycérol libéré dans le surnageant.

Des études de dose-réponse à l'insuline et à la noradrénaline ont été réalisées afin d'évaluer la sensibilité des deux types de tissus. Ainsi, des doses croissantes : 0 ; 10 ; 100 ou 1000 nM pour la noradrénaline et 0 ; 100 ; 250 ; 500 nM pour l'insuline ont été testées.

Pour la suite des expérimentations, les effets de l'activation du SEC sur la lipolyse ont été étudiés en utilisant l'AEA (5µM), en présence de noradrénaline et avec ou sans insuline.

D. Explants de foie de souris

Le foie des souris a été perfusé *in situ*, sous anesthésie, avec du HBSS avec calcium et magnésium ($HBSS^{+}$) (pH 7,4) saturé en oxygène et maintenu à 4°C afin d'éliminer le sang contenu dans l'organe avant

prélèvement. Une fois prélevé, le foie est tranché en utilisant un slicer Brendel/Vitron (Tucson, AZ, USA) dans le même tampon froid.

Les explants de foie (environ 200 µm) sont ensuite rincés puis pré-incubées 30 min à 37°C sous atmosphère contrôlée (95% air et 5% CO_2) et sous légère agitation dans du milieu de culture complet (DMEM + Glutamax contenant 4,5 g/L de D-Glucose et oxygéné et supplémenté en SVF 10% et cocktail d'antibiotiques antifongiques 1%). Les explants sont ensuite distribués dans des plaques de 6 puits (6-7 explants par puits) contenant 4 ml du milieu de culture complet auquel a été ajouté l'inhibiteur de la dégradation des ECs, le JZL195 (1 ou 10 µM) ou le véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%). Les plaques sont ensuite incubées dans les mêmes conditions durant 2 ou 4h. A la fin de la période d'incubation, les explants sont récupérés, pesés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide en vue de réaliser un dosage des ECs par spectrométrie de masse ou une analyse de l'expression génique.

E. Culture cellulaire sur HepG2

La lignée cellulaire provient de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il s'agit de cellules en lignée continue adhérentes en culture issues d'un hépatome prélevé sur un enfant de 11 ans.

Les cellules HepG2 ont été cultivées en monocouche dans des flasques de 25 cm^2 (F25) à raison de 10^6 cellules/flacon dans du milieu de culture complet (DMEM + Glutamax contenant 4,5g/L de D-Glucose supplémenté en SVF 10%) et entretenues à 37°C avec 5% de CO_2 dans un incubateur saturé en humidité. Les cellules ont été repiquées une fois par semaine. Pour cela, la couche cellulaire a été rincée avec de l'$HBSS^-$ sans calcium ni magnésium puis les cellules ont été décrochées du flacon par ajout de 1 mL de trypsine/Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), ou 1X durant 5 min à 37°C. L'action de la trypsine a ensuite été stoppée par ajout de 2 mL de milieu de culture complet et la suspension cellulaire a été centrifugée pendant 7 min à 120g. Le culot cellulaire a été repris et homogénéisé dans 10 mL de milieu de culture complet avant d'être passé à la seringue (21Gx2'' (0,8x50mm)) une dizaine de fois afin de bien individualiser les cellules. Un volume aliquot de cette suspension cellulaire a été prélevé afin de réaliser un comptage cellulaire. Enfin, les cellules ont été ensemencées dans de nouveaux flacons à une densité de 10^6 cellules dans 4 mL de milieu de culture complet. Ce milieu a été changé tous les deux jours. Les traitements de cellules ont été réalisés 5 jours après le repiquage de cellules. Pour cela, le surnageant a été éliminé à la pipette, les cellules ont été rincés deux fois avec du HBSS. Les cellules ont ensuite été incubées dans les mêmes conditions durant 2 ou 4h dans 4 mL de milieu de culture complet additionné de JZL195 (1 ou 10 µM) ou de véhicule (DMSO 0,1%, Tween 0,025%).

A la fin de la période d'incubation, le surnageant a été éliminé et la couche cellulaire a été rincée deux fois avec du tampon phosphate salin (Phosphate Buffer Salt, PBS) froid.

Pour le dosage des ECs, après les lavages au PBS, la couche cellulaire a été récupérée par grattage dans 2 mL de PBS froid. Le flacon a ensuite été lavé avec 2 mL de PBS froid pour récupérer toutes les cellules La suspension cellulaire a été centrifugée pendant 7 min à 120g à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 1 mL de PBS froid. Après homogénéisation, un volume aliquot de 50µL a été prélevé de la suspension cellulaire et additionné de tampon de lyse RIPA (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1% et de phosphatases 1%) en vue de réaliser un dosage protéique. Le restant de la suspension cellulaire a quant à lui été centrifugé pendant 7 min à 120g à 4°C en vue de récupérer les cellules sur lesquelles vont être dosés les ECs par spectrométrie de masse.

Pour l'extraction d'ARN, les cellules ont été lavées deux fois au PBS froid puis la couche cellulaire a été la recouverte de 1mL de Tri-Reagent froid pendant quelques 5 minutes. Le lysat a ensuite été récupéré et congelé à -80°C.

F. Cellules HEK293T/17 – GloSensor™ cAMP Assay

Les cellules HEK293T/17 (Human Embryonic Kidney) ont été utilisées pour réaliser les études de GloSensor™ cAMP Assay. Ces cellules adhérentes dérivent de la lignée HEK293 et ont été immortalisées par transfection de l'antigène T du virus SV40.

La technique du GloSensor™ cAMP Assay a été utilisée afin de tester le pouvoir antagoniste/agoniste inverse de molécules sur les récepteurs CB1R. Elle s'applique à la lignée cellulaire HEK293T/17, co-transfectée par un plasmide codant pour le gène rapporteur luciférase dont l'expression est dépendante d'un senseur AMPc (pGloSensorTM-22F cAMP plasmid luciferase reporteur, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et un plasmide codant pour le récepteur couplé aux protéines G (RCPG), le récepteur CB1R. Cette technique permet de déterminer l'activité des récepteurs GPCR *via* une mesure de la concentration intracellulaire en AMPc. Le plasmide codant pour une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'AMPc et une forme mutante de la luciférase permet la génération de lumière proportionnelle à la quantité d'AMPc.

Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe Perception de la flaveur ; Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) - UMR Université de Bourgogne - CNRS 6265 - INRA 1324 – Directeur du Centre : Lionel Bretillon / Responsable d'Equipe : Loïc Briand / Responsable expérimentation : Anne-Marie Lebon/ Technicienne : Christine Belloir

1) Transfection de plasmide

Dans un premier temps, les cellules ont été transfectées par le plasmide pcDNA3.1-mCB1 permettent l'expression des récepteurs CB1R dans les cellules et par le plasmide pGloSensor™ permettant l'expression du biosenseur à l'AMPc. Les cellules HEK293T/17 ont été cultivées dans du milieu de culture complet (DMEM contenant 4,5 g/L de D-Glucose, 4mM de L-Glutamine et 1mM pyruvate de sodium supplémenté en SVF 10%) et ensemencées à raison de 30 000 cellules par puits en plaque 96 puits blanche Poly-D-Lysine pendant 24h. A 24h, les cellules ont été transfectées avec les plasmides pcDNA3.1-mCB1(50 ng) et pGloSensorTM-22F cAMP (100 ng) avec ou sans toxine pertussique (Pertussis Toxin X, PTX) en utilisant le kit Fugene HD (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) en vue d'étudier la variation de la concentration en AMPc par la technique GloSensor™ cAMP Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) suite au traitement des cellules par des antagonistes des CB1R.

2) Traitement des cellules

Au temps t=0, les cellules sont prétraitées par la forskoline (1 µM) afin d'augmenter le niveau basal d'AMPc intracellulaire. Une cinétique est réalisée pendant 10 min. Au temps t=10 min, les cellules sont traitées par l'AEA (10 µM) et en présence de concentrations croissantes en Rimonabant (0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 30 ; 100 ; 300 nM et 1 ; 10 ; 100 µM). Une cinétique est réalisée pendant 20 min. Le signal lumineux mesuré en RLU est rapporté en % au signal lu à t=10 min (FSK 1µM).

IV. Expérimentations animales *in vivo*

A. Activation aigüe du SEC par injection i.p. d'AEA

1) *Activation aigüe du SEC et tonus endocannabinoïde*

Des souris sauvages, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. d'AEA (10 mg/kg). Trois souris par temps (0 ; 5 ; 15; 30 et 60 min) ont été sacrifiées et les tissus (TAV, foie, cerveau) ont été prélevés en vue de réaliser une analyse cinétique du tonus endocannabinoïde par spectrométrie de masse. La température rectale des souris a également été mesurée sur chaque souris avant sacrifice (**Figure 81**).

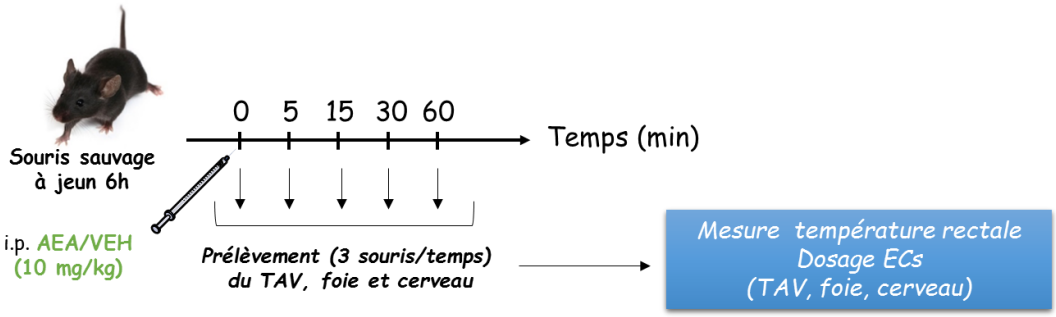


***Figure 81* : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC**
De souris sauvages à jeun 6h ont été soumises à injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) en vue de réaliser une analyse cinétique de la température rectale et du contenu en EC dans les tissus (TAV, foie, cerveau) à t=0, 5, 15, 30 et 60 min.

2) *Activation aigüe du SEC en présence d'une stimulation ß-adrénergique*

Des souris sauvages et/ou CB1R$^{-/-}$, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) suivie, quinze minutes plus tard, d'une injection d'un agoniste spécifique des récepteurs β3, le BRL 37344 (5 mg/kg) en présence ou non d'insuline (0,25 ou 0,5 UI/kg). Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine de la queue des animaux, directement dans des tubes contenant de l'EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), avant la première injection (temps 0 min) et aux temps 15, 30, 45 minutes après la première injection, en vue de réaliser une cinétique du glycérol grâce au dosage par kit colorimétrique (**Figure 82**).

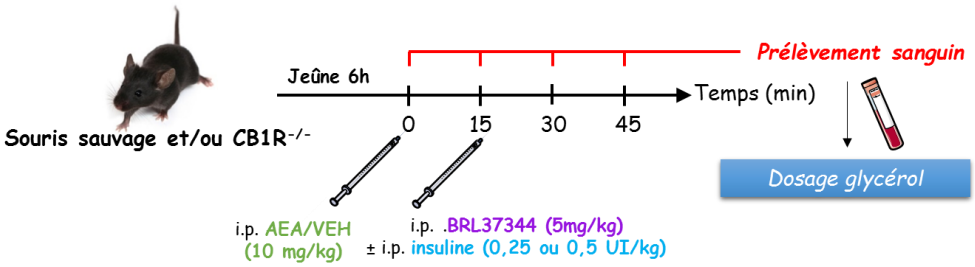


Figure 82 : ***Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC en présence d'une stimulation ß-adrénergique***
Des souris sauvages et/ou CB1R$^{-/-}$ à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. d'AEA ou de véhicule (10 mg/kg) en présence de BRL37344 (10 mg/kg) avec ou sans insuline (0,25 ou 0,5 UI/kg) en vue de réaliser une analyse cinétique du glycérol plasmatique.

3) Activation aigüe du SEC au cours de différentes situations nutritionnelles

a. Après un jeûne de 24h

Des souris sauvages, soumises à un jeûne de 24h, ont reçu une injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%). Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine de la queue des animaux, directement dans des tubes contenant de l'EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), avant l'injection de la drogue (temps 0 min) et aux temps 15, 30, 45 et 90 minutes après l'injection de la drogue, en vue de réaliser une cinétique du glycérol grâce au dosage par kit colorimétrique (**Figure 83**).

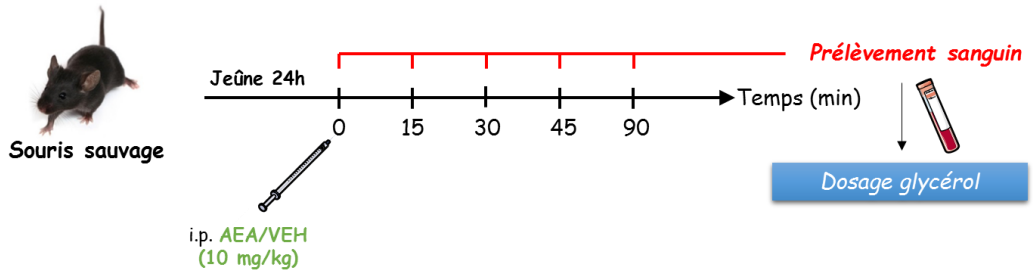


Figure 83* : *Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC après un jeûne de 24h
De souris sauvages à jeun 24h ont été soumises à une injection i.p. d'AEA ou de véhicule (10 mg/kg) en vue de réaliser une analyse cinétique du glycérol plasmatique.

b. Après un jeûne de 6h

Dans un premier temps, des souris sauvages, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%). Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine de la queue des animaux, directement dans des tubes contenant de l'EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), avant l'injection de la drogue (temps 0 min) et aux temps 15, 30, 45 et 90 minutes après l'injection de la drogue, en vue de réaliser une cinétique du glycérol grâce au dosage par kit colorimétrique. La glycémie au cours du temps a également été évaluée à l'aide d'un glucomètre My Life PuraTM (Ypsomed, Paris, France) (**Figure 84**).

Dans un deuxième temps, après environ une semaine de récupération, ces mêmes souris sont à nouveau mises à jeun pendant 6h puis soumises au même traitement. Les souris sont alors sacrifiées au temps t=15 min après l'injection et le TAV est prélevé en vue de mesurer la concentration intracellulaire en AMPc grâce à un test ELISA ou de réaliser une analyse protéique par Western Blot (**Figure 84**).

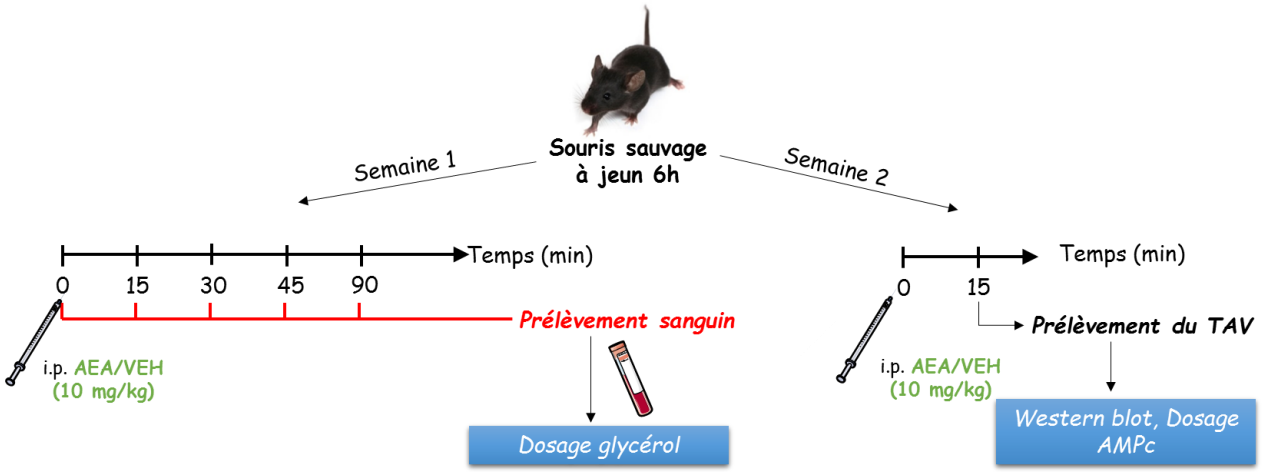


Figure 84* : *Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC après un jeûne de 6h
De souris sauvages à jeun 24h ont été soumises à une injection i.p. d'AEA ou de véhicule (10 mg/kg) en vue de réaliser une analyse cinétique du glycérol plasmatique et une analyse des voies de signalisation régulant la lipolyse à t=15 min.

c. Au cours d'une charge en glucose

Dans un premier temps, des souris sauvages ou CB1R$^{-/-}$, soumises à un jeûne de 24h, ont reçu une injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) suivie, quinze minutes plus tard, d'une injection de glucose (2g/kg). Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine de la queue des animaux, directement dans des tubes contenant de l'EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), avant l'injection d'AEA ou de véhicule (temps -15 min) et aux temps 0, 15, 30, 75 minutes après l'injection de glucose, en vue de réaliser une cinétique du glycérol, des AGL grâce au dosage par kit colorimétrique, une cinétique de l'insuline grâce au dosage par ELISA. La glycémie au cours du temps a également été évaluée à l'aide d'un glucomètre My Life PuraTM (Ypsomed, Paris, France) (**Figure 85**).

Dans un deuxième temps, après environ une semaine de récupération, ces mêmes souris sont à nouveau mises à jeun pendant 24h puis soumises au même traitement. Les souris sont alors sacrifiées au temps t=15 min après l'injection de glucose et le TAV est prélevé en vue de mesurer la concentration intracellulaire en AMPc grâce à un test ELISA ou de réaliser une analyse protéique par Western Blot (**Figure 85**).

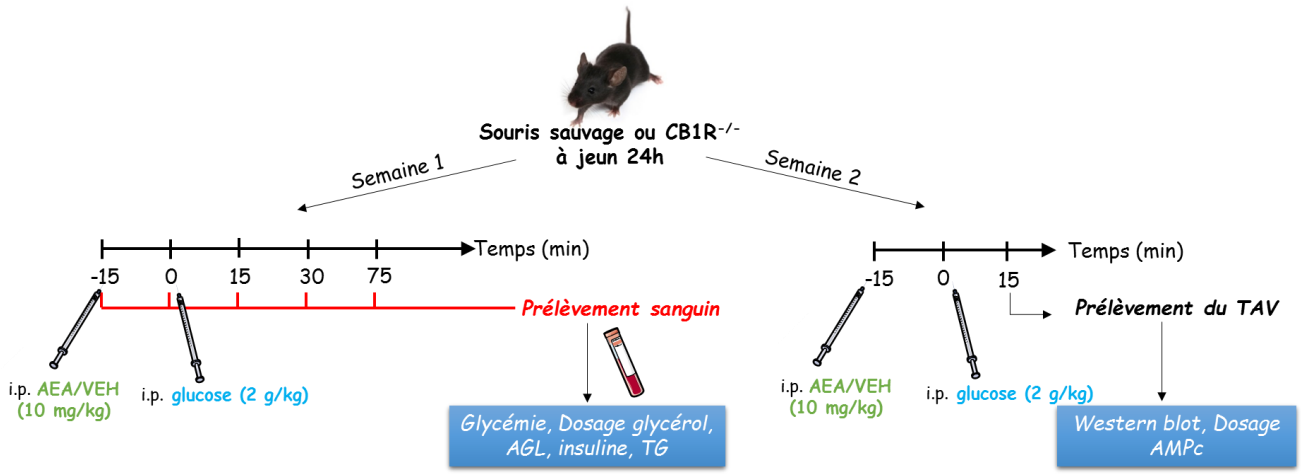


***Figure 85** : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC au cours d'une charge en glucose*
Des souris sauvages ou CB1R$^{-/-}$ à jeun 24h ont été soumises à une injection i.p. d'AEA ou de véhicule (10 mg/kg) et de glucose (2 g/kg) en vue de réaliser une analyse cinétique des paramètres plasmatiques et une analyse des voies de signalisation régulant la lipolyse à t=15 min.

d. *Au cours d'une charge en insuline*

Des souris sauvages, soumises à un jeûne de 24h, ont reçu une première injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) combinée à une charge en insuline (0,5 UI/kg) suivie, trente minutes plus tard, d'une seconde injection i.p. d'AEA (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%). Les souris sont sacrifiées au temps t=90 min après la première injection afin de récupérer le foie pour une analyse du contenu hépatique en lipides totaux et en triglycérides et une analyse de l'expression génique (**Figure 86**)

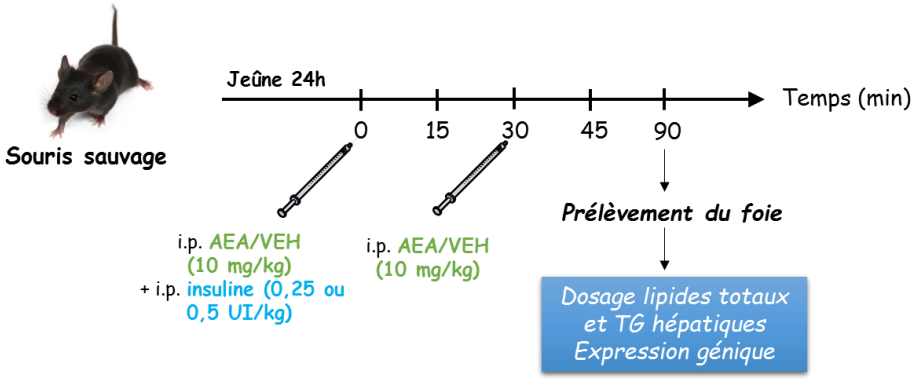


***Figure 86** : Protocole expérimental d'activation aigüe du SEC au cours d'une charge en insuline*
Des souris sauvages à jeun 24h ont été soumises à une injection i.p. d'AEA ou de véhicule (10 mg/kg) et d'insuline (0,5 UI/kg) en vue de réaliser une analyse du contenu hépatique en lipides totaux et triglycérides et une analyse de l'expression génique à t=90 min.

B. Activation prolongée du SEC par injection i.p. de JZL195

1) Activation prolongée du SEC et tonus endocannabinoïde

Des souris sauvages, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. de JZL195 (20 mg/kg) (un inhibiteur des enzymes dégradant les ECs, l'AEA et le 2-AG) ou de véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) pendant 3h. Au bout des 3h de traitement, les tissus (TAV, foie, cerveau) ont été prélevés afin de réaliser une culture d'explants de TAV. Au bout des 3h, les animaux ont été sacrifiés et les tissus (TAV, foie, cerveau) ont été prélevés en vue de réaliser une analyse cinétique du tonus endocannabinoïde par spectrométrie de masse. La température rectale des souris a également été mesurée au cours du temps sur chaque souris (**Figure 87**).

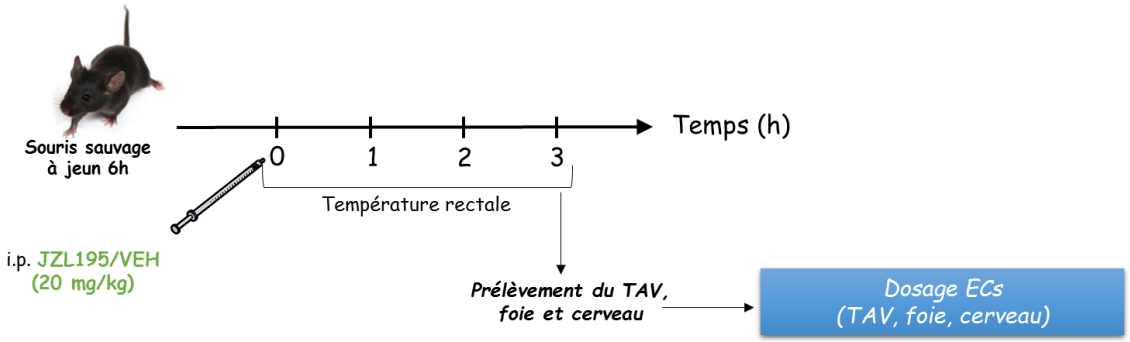


***Figure 87** : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC*
Des souris sauvages à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de JZL195 ou de véhicule (20 mg/kg) pendant 3h après un jeûne de 6h en vue de réaliser une mesure de la température rectale au cours du temps et un dosage des EC dans les tissus (TAV, foie et cerveau) à t=3h.

2) Activation prolongée du SEC pendant 3h

a. Après un jeûne de 6h

Afin d'étudier les conséquences d'une activation prolongée du SEC sur le métabolisme glucido-lipidique, des souris sauvages, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection en i.p. de JZL195 (20 mg/kg) ou de véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) au temps 0 (t=0 min). Des prélèvements plasmatiques ont été réalisés toutes les heures jusqu'au sacrifice des animaux au temps 3h (t=3h) afin d'étudier les effets de l'activation du SEC sur l'activité lipolytique du TA. Au bout des 3h de traitement, le TAV a été prélevé afin de réaliser une culture d'explants de TAV. Les explants ont été mis en culture pendant 1h dans du milieu de culture complet (en absence de traitement) afin de déterminer l'activité lipolytique post-traitement *in vivo* par le JZL195 en comparaison au véhicule (**Figure 88**).

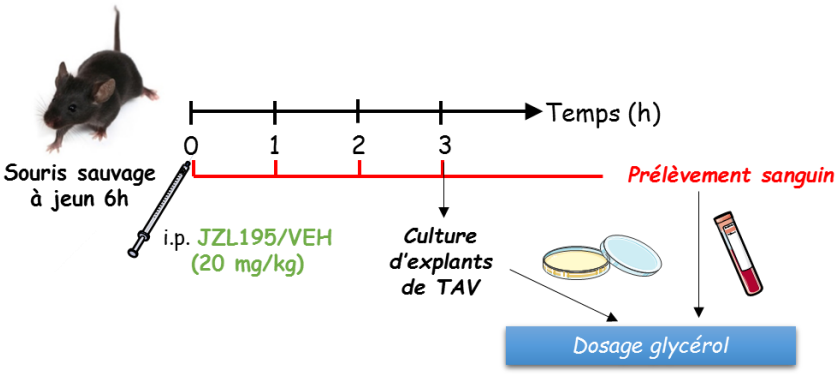


***Figure 88** : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 3h après un jeûne de 6h*
Des souris sauvages à jeun 6h par injection i.p. de JZL195 ou de véhicule (20 mg/kg) pendant 3h en vue de réaliser analyse cinétique du glycérol plasmatique, une culture d'explants de TAV et une analyse de l'expression génique à t=3h.

Dans une seconde expérience, d'autres souris sauvages à jeun 6h ont reçu une injection i.p. de JZL195 (20 mg/kg) au temps 0 (t=0 min). Trois souris par temps (0 ; 30 ; 60 ; 120 et 180 min) ont été sacrifiées et le TAV et le foie ont été prélevés en vue de réaliser une analyse cinétique des voies de signalisation régulant la lipolyse par Western Blot (**Figure 89**).

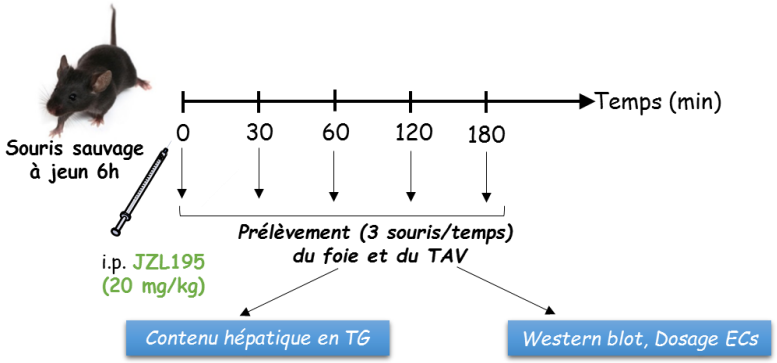


***Figure 89** : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 3h après un jeûne de 6h*
Des souris sauvages à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de JZL195 ou de véhicule (20 mg/kg) pendant 3h en vue de réaliser une analyse du contenu hépatique en TG, une analyse cinétique des voies de signalisation régulant la lipolyse et un dosage des EC dans le TAV à t=0, 30,60,120 et 180 min.

b. *Après un jeûne de 24h*

Des souris sauvages, soumises à un jeûne de 24h, ont reçu une injection i.p. de JZL195 (20 mg/kg) ou de véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) au temps 0 (t=0 min). Des prélèvements plasmatiques ont été réalisés toutes les heures jusqu'au sacrifice des animaux au temps 3h (t=3h) afin d'étudier les effets de l'activation du SEC sur l'activité lipolytique du TAV (**Figure 90**).

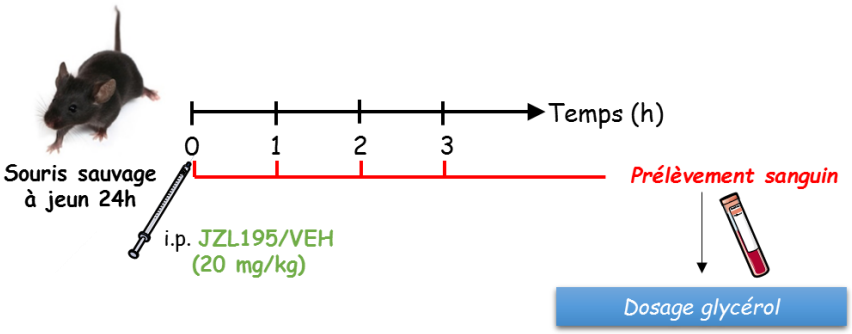


***Figure 90** : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 3h après un jeûne de 24h*
Des souris sauvages à jeun 24h ont été soumises à une injection i.p. de JZL195 ou de véhicule (20 mg/kg) pendant 3h en vue de réaliser analyse cinétique du glycérol plasmatique.

3) Activation prolongée du SEC pendant 6h

Afin d'étudier les conséquences d'une activation prolongée du SEC sur le métabolisme hépatique, une cinétique plus longue de 6h a été réalisée. Pour cela, des souris contrôles ou obèses, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. de JZL195 (20 mg/kg) ou de véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%) combinée ou non à une injection de Rimonabant (10 mg/kg) pendant 6h. Au bout des 6h de traitement, du sang a été prélevé à la veine cave des animaux afin de mesurer le glycérol, les AGL, le β-hydroxybutyrate et le FGF21 plasmatique. De plus, le TAV et le foie ont été prélevés en vue de réaliser un dosage des ECs, une analyse de l'expression génique et un dosage du contenu hépatique en triglycérides. Au cours de cette expérience de plus longue durée, les animaux ayant reçus une injection de JZL195 ont été comparés à un groupe d'animaux contrôle afin de s'affranchir d'éventuels effets occasionnés par la durée du jeûne (**Figure 91**).

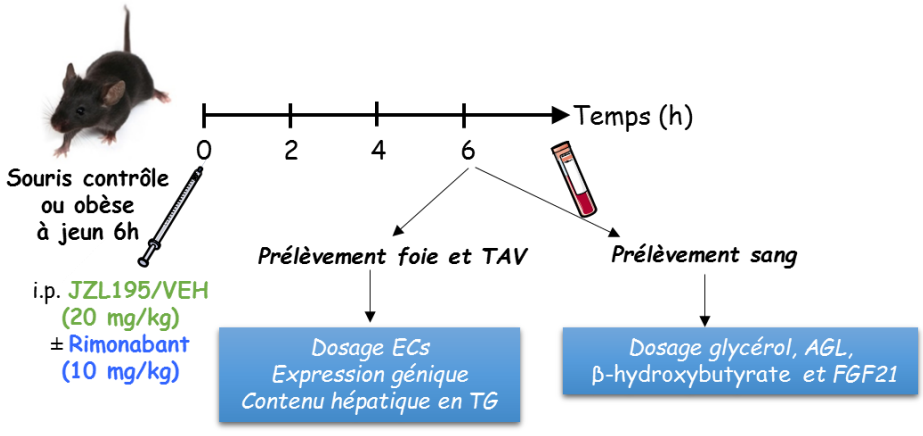


***Figure 91** : Protocole expérimental d'activation prolongée du SEC pendant 6h après un jeûne de 6h*
Des souris sauvages ou obèses à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de JZL195 ou de véhicule (20 mg/kg) combinée à une injection ou non de Rimonabant (10mg/kg) pendant 6h en vue de réaliser analyse des paramètres plasmatiques, un dosage des ECs*, une analyse de l'expression génique et une analyse du contenu hépatique en triglycérides à t=6h.*

C. Inactivation du SEC chez la souris contrôle ou obèse

1) Test de tolérance à l'insuline

Les souris sous régime standard (STD) ou hyperlipidique (HFD), soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. d'insuline humaine (Actrapid, 0,5 UI/kg). La glycémie a été mesurée directement sur le sang collecté à la veine de la queue des animaux avec un glucomètre My Life PuraTM (Ypsomed, Paris, France) aux différents temps (0, 15, 30, 45, 60 min).

2) Régime hyperlipidique et hyperactivité du SEC

A la fin de la période du régime hyperlipidique de 20 semaines (**Cf. Matériel & Méthodes I**), les souris ont été sacrifiées et les tissus (TAV, foie, cerveau) ont été prélevés afin de mesurer le tonus endocannabinoïde par spectrométrie de masse et une analyse de l'expression génique par PCR en temps réel

3) Blocage des CB1R par le Rimonabant ou l'AM6545 chez la souris obèse

Dans un premier temps, des souris obèses, soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. de Rimonabant (10 mg/kg), d'AM6545 (10mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%). Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine de la queue des animaux, directement dans des tubes contenant de l'EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), avant l'injection de la drogue (temps 0 min) et aux temps 15, 30, 45 minutes après l'injection de la drogue en vue de réaliser une cinétique du glycérol grâce au dosage par kit colorimétrique (**Figure 92**).

Dans un deuxième temps, après environ une semaine de récupération, ces mêmes souris sont à nouveau mises à jeun pendant 6h puis soumises à une nouvelle injection i.p. de Rimonabant (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%). Les souris sont alors sacrifiées au temps t=15 min après l'injection et le TAV est prélevé en vue de mesurer la concentration intracellulaire en AMPc grâce à un test ELISA ou de réaliser une analyse protéique par Western Blot (**Figure 92**).

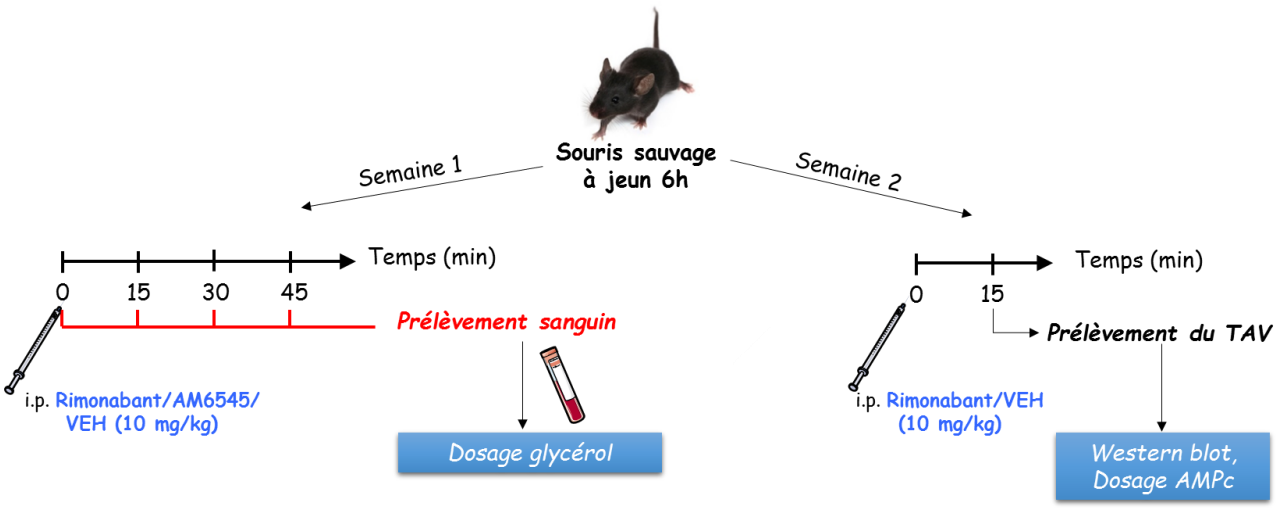


***Figure 92** : Protocole expérimental d'inactivation du SEC par le Rimonabant ou l'AM6545*
Des souris sauvages à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de Rimonabant, d'AM6545 ou de véhicule (10 mg/kg) en vue de réaliser une analyse cinétique du glycérol plasmatique et une analyse des voies de signalisation régulant la lipolyse à t=15 min.

4) Blocage des CB1R par le Rimonabant chez la souris contrôle et obèse

Des souris contrôles sous régime standard (STD) ou obèses sous régime hyperlipidique (HFD), soumises à un jeûne de 6h, ont reçu une injection i.p. de Rimonabant (10 mg/kg) ou du véhicule (0,1% DMSO, 0,025% Tween 80, NaCl 0,9%). Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine de la queue des animaux, directement dans des tubes contenant de l'EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), avant l'injection (temps 0 min) et aux temps 15, 30, 45 et 90 minutes après l'injection en vue de réaliser une cinétique du glycérol grâce au dosage par kit colorimétrique et une cinétique de l'insuline grâce au dosage par test ELISA. La glycémie au cours du temps a également été évaluée à l'aide d'un glucomètre My Life PuraTM (Ypsomed, Paris, France) (**Figure 93**).

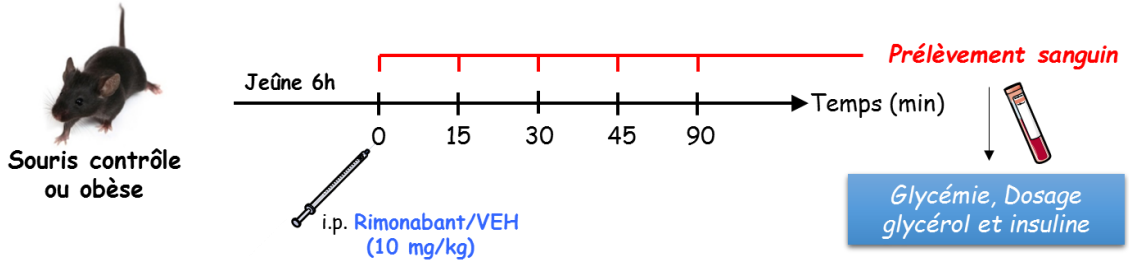


***Figure 93** : Protocole expérimental d'inactivation du SEC chez la souris contrôle ou obèse*
Des souris contrôles ou obèses à jeun 6h ont été soumises à une injection i.p. de Rimonabant, ou de véhicule (10 mg/kg) après un jeûne de 6h à des souris contrôles ou obèses en vue de réaliser analyse cinétique des paramètres plasmatiques.

V. Dosages colorimétriques

Les différents paramètres ont ensuite été estimés grâce à l'utilisation de kits commerciaux: glycérol FS, NEFA FS et TG FS (DiaSys, Condom, France).

A. Dosages sur plasma

Le glycérol libre, les AGL ainsi que les TG plasmatiques ont été déterminés sur le plasma récupéré après centrifugation du sang récupéré à la veine de la queue des animaux pendant 10 min à 6500g, 4°C.

Pour le dosage du glycérol, 10µL de plasma ont été additionnés de 150µL de réactif et incubés 5 min à 37°C. La densité optique a été lue à 500 nm.

Pour le dosage des TG, 5µL de plasma ont été additionnés de 100µL de réactif et incubés 5 min à 37°C en vue de réaliser la lecture densitométrique à 500 nm.

Enfin, pour le dosage des AGL, 5 µL de plasma ont été additionnés de 200µL du réactif 1 et incubés 5 min à 37°C. Après une première lecture d'absorbance A1 à 546 nm, 50µL du réactif 2 ont été ajoutés dans les puits et incubés 10 min à 37°C suivie d'une seconde lecture d'absorbance A2 a été réalisée à 546 nm. Le bruit de fond mesuré par la densité optique A1 a ensuite été retranché de la densité optique A2.

B. Dosages sur surnageant d'explants de TA

Le glycérol libre ainsi que les AGL ont également été dosés dans le surnageant d'explants de TA à la fin de la période d'incubation en vue d'estimer l'activité lipolytique du tissu.

Après une courte centrifugation de 1 min à 6500g, le surnageant a été utilisé pour le dosage du glycérol ou des AGL. Les protocoles de dosage utilisés (volume de réactif, incubation, longueur d'onde) sont les mêmes que ceux utilisés pour le plasma à l'exception du volume de surnageant utilisé qui a été de 50 µL pour les deux dosages.

C. Dosages sur tissus

Le contenu hépatique en TG a été estimé par un dosage colorimétrique suite à l'extraction des lipides totaux du foie. Pour cela, les lipides totaux ont été extraits en présence d'un mélange méthylal/methanol (4:1). Ainsi, environ 50 mg de foie ont été homogénéisés dans 500µL de CH_3OH à l'aide d'un broyeur à billes (BioSpec Products, Bartlesville, Etats-Unis). L'homogénat a ensuite été transféré dans un tube en verre (sovirel) et additionné de 1mL de CH_3OH et de 6 mL de méthylal. Après avoir été homogénéisés au vortex, les homogénats ont été incubés 1h à température ambiante afin de permettre l'extraction des lipides par les solvants. Après la période d'incubation, les extraits ont été homogénéisés au vortex et centrifugés pendant 10 min à 3000g, 16°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube en verre et une partie aliquote

de cette fraction a subi un traitement permettant le dosage colorimétrique en milieu aqueux. Pour cela, une fraction de 2mL (des homogénats de foie de souris contrôles) ou 200 µL (des homogénats de souris obèses) a été évaporée à sec sous un flux d'azote et repris dans 1mL de $CHCl_3$ 2% Triton X-100. Après une seconde évaporation sous flux d'azote, les lipides ont enfin été solubilisés dans 1 mL d'eau.

Le dosage colorimétrique a été réalisé à l'aide du kit TG FS (DiaSys, Condom, France) sur 10 µL de cet extrait lipidique en présence de 200 µL de réactif. Après une incubation de 10 min à 37°C, la densité optique a été lue à 500 nm.

VI. Dosages par test ELISA

A. Dosage de l'AMPc dans des homogénats de TA

La quantité intracellulaire en AMPc a été évaluée par un ELISA compétitif en utilisant le kit cAMP Complete ELISA (Enzo Life Science, Villeurbanne, France).

Suivant les instructions du fournisseur, les morceaux de tissus ont été homogénéisés dans de l'acide chlorhydrique (0,1M) grâce à un broyeur à billes (BioSpec Products, Bartlesville, Etats-Unis) à raison d'1mL d'acide pour 100 mg de tissu. Les homogénats ont ensuite été centrifugés deux fois pendant 10 min à 800g 4°C afin de clarifier le lysat. Une étape d'acétylation des échantillons a ensuite été réalisée sur l'homogénat afin d'augmenter la sensibilité de la mesure en suivant les instructions fournies par le kit. La concentration en AMPc a été normalisée par la masse des explants de TA.

B. Dosage de l'adiponectine dans le surnageant d'explants de TA

La sécrétion d'adiponectine dans le surnageant a été évaluée par un ELISA en utilisant le kit AssayMax Rat Adiponectin ELISA kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Le surnageant d'explants de TA traités pendant 3h par le véhicule ou l'AEA a été récupéré et dilué au 1/10 dans du diluant fourni par le kit. Le dosage de l'adiponectine a été réalisé en suivant les instructions fournies par le kit. La concentration en adiponectine dans le surnageant a été normalisée par la masse des explants de TA.

C. Dosage de l'insuline et du FGF21 plasmatique

Les dosages plasmatiques de l'insuline et du FG21 ont été réalisé grâce aux kits Ultrasensitive mouse Elisa kit (Eurobio, Les Ulis, France) et Mouse/rat FGF 21 Quantikine ELISA (BioTechne, Lille, France) respectivement. Après centrifugation du sang pendant 10 min à 6500g, 4°C, 5µL de plasma pur ou 50µL

de plasma dilué au ½ par un diluant fourni par le kit ont été utilisés pour déterminer la concentration plasmatique en insuline et FGF21 respectivement.

VII. Dosage des ECs par spectrométrie de masse

Le dosage des ECs a été réalisé sur cellules (HepG2), tissus après mise en culture (explants de foie et explants de TAV) ou frais après sacrifice des animaux (TAV, foie, cerveau). Pour le cerveau, tous les dosages ont été réalisés sur la même partie du cerveau obtenue par coupe sagittale et par retrait du cortex préfrontal, du cervelet et du tronc cérébral. Ainsi la partie conservée est principalement composée du thalamus, hypothalamus, amygdale, hippocampe, corps calleux.

Les cellules ou tissus ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes (BioSpec Products, Bartlesville, Etats-Unis) dans 500µL de CH_3OH/Tris (50mM, pH 8) 1:1 contenant 11,2 ng d'un standard deutéré : le d^4-anandamide. Les homogénats ont ensuite été transférés dans des tubes en verre (Sovirel) et additionnés d'un mélange $CHCl_3$/CH_3OH 1:1 et de 500µL de Tris (50 mM, pH 8), homogénéisés au vortex et centrifugés 10 min, 3000g, -2°C. La phase organique inférieure a été récupérée par double pipetage et la phase aqueuse supérieure a été extraite une seconde fois avec 1mL de $CHCl_3$. Les extraits ont été combines et séchés sous un flux d'azote puis resolubilisés dans 120 µL de $CHCl_3$.

Les protéines ont ensuite été précipitées avec 2 mL d'acétone pendant 30 min à -20°C puis les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min, 3000g, -2°C.

Le surnageant a été délicatement transféré dans de nouveaux tubes et séché sous un flux d'azote et finalement repris dans 200µL de CH_3OH puis injecté dans une colonne 1200 LC couplée à un spectromètre de masse 6460-QqQ MS/MS équipé d'une source ESI (Agilent technologies). La séparation a été réalisée grâce à une colonne Zorbax SB-C18 2.1x50 mm, 1.8 µm (Agilent technologies) avec un débit de 0,25 mL/min, 40°C et un gradient linéaire de solvant A (0,1% acide formique/H_2O) et solvant B (0,1% acide formique/CH_3OH) de la manière suivante : 10% de B pendant 1 min jusqu'à 85% de B en 8 min puis maintenu à 100% pendant 4-5 min.

L'acquisition a été réalisée dans un mode SRM (Single Reaction Monitoring) positif (température de la source 350°C, débit du nébulisateur 10mL/min, 40 psi, débit de la gaine de gaz 10L/min, température 400°C, capillaire 4000 V, jet 1000V)

Les transitions utilisées sont les suivantes : 2-AG 379.1→91 (frag 120V, CE 62V), AEA-d4 352.2→66 (frag 115V, CE 14V), AEA 348.2→62 (frag 120V, CE 14V), OEA-d4 330.2→66 (frag 120V, CE 14V), OEA 326.2→62 (frag 115V, CE 14V) et PEA 300.2→62 (frag 124V, CE 14V). Les ECs ont été quantifiés par la méthode de la dilution isotopique en utilisant des standard deutérés. Les résultats sont exprimés en pmol/g de tissu pour les tissus ou pmol/mg de protéines pour les cellules.

VIII. Extraction de protéines et Western-blotting

Les échantillons de TA congelés ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes (BioSpec Products, Bartlesville, Etats-Unis) dans 200µL dans du tampon de lyse RIPA complet (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1% et de phosphatases 1%). Les extraits ont ensuite été incubés sur glace pendant 45 min puis centrifugés deux fois pendant à 15000g pendant 20 min 4°C afin de clarifier le lysat protéique du dépôt de graisses. Tout au long de l'extraction, les échantillons ont été rigoureusement conservés sur glace.

La concentration en protéines a ensuite été estimée par la méthode BCA (acide bicinchonique) et 25µg de protéines additionnées de tampon de charge (Tris-HCl 0,03 M pH 6.8 ; DTT 0,05 M ; glycérol 8% ; bleu de bromophénol 0,05% ; SDS 2% ; β-mercaptoéthanol 2,5%) et dénaturées 3 min à 100°C ont été séparées sur un gel d'acrylamide en gradient (4-20%) SDS-PAGE (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et transférés sur membrane de nitrocellulose en utilisant un appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot, Bio-rad). Après 2h de saturation des membranes dans un tampon TBS-Tween 20 0,1% BSA 5%, les membranes ont été incubées une nuit à 4°C sous agitation avec un anticorps primaire (dilué au 1/1000 dans un tampon TBS-Tween 20 0,1% BSA 5%). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : phospho-Akt T308, phospho-Akt S473, phospho-Akt S474, phospho-PKA T197, phospho-LHS S660, ß-actine ainsi que les formes totales de l'Akt, la PKA et la LHS.

Les membranes ont ensuite été lavées trois fois sous agitation rapide dans un tampon de lavage TBS-Tween 20 0,1% puis incubées pendant 1h à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase et dirigé contre les IgG de lapin ou souris (dilué au 1/5000 dans un tampon TBS-Tween 20 0,1% BSA 5%). Après avoir réalisé le même protocole de lavage que précédemment, les membranes ont été révélées par une méthode de chimiluminescence utilisant un substrat ECL (ClarityTM, Western ECL Substrat, Bio-rad) et exposées grâce à une station d'acquisition d'image (Chemi-Doc MP Imaging System, Bio-Rad). Enfin, l'intensité des bandes a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse d'image ImageLab.

Les anticorps utilisés proviennent tous de chez Cell Signaling (Leiden, Pays-Bas) à l'exception de la ß-actine qui provient de chez Millipore (Merck-Millipore, Darmstadt, Allemagne)

IX. Analyse de l'expression génique

L'expression génique a été évaluée par PCR semi-quantitative en temps réel après une étape de reverse transcription des ARN en ADNc.

Dans un premier temps, les ARN des tissus ou cellules HepG2 ont été extraits par le Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) en présence de chloroforme. Après centrifugation, les ARN contenus dans le surnageant ont été précipités en présence d'isopropanol. Enfin, le culot d'ARN a été lavé par l'éthanol puis séché avant d'être repris dans de l'eau dépourvue de nucléases.

La concentration en acides nucléiques a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm et le rapport d'absorbance à 260 nm/280 nm a été mesuré afin d'estimer la qualité des ARN.

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été réalisée par reverse transcription dans un volume total de 20µL à partir de 1µg d'ARN totaux grâce au mix Iscript cDNA kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). L'hybridation des amorces a été réalisée durant 5 min à 25°C, la reverse transcription pendant 30 min à 42°C et enfin l'inactivation de l'enzyme a été réalisée en augmentant la température à 85°C pendant 5 min. Enfin, la PCR en temps réel a été réalisée dans un volume final de 20 µL à partir de 20 ng d'ADNc en utilisant la méthode du SYBR green grâce au IQ™SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) en présence d'un mélange d'amorces (sens + anti-sens) qui ont été conçues grâce au logiciel NCBI, Primer-BLAST, synthétisées (Eurofins Genomics, Ebersberg, Allemagne) et utilisées à la concentration de 300 nM pour les qPCR sur ADNc murins et en utilisant des amorces conçues et validées par Biorad (PrimePCR Assay). La réaction d'amplification a été réalisée selon le programme détaillé dans le **tableau 3** pour les ADNc obtenus à partir de tissus murins et le **tableau 4** pour les ADNc obtenus à partir des cellules HepG2.

***Tableau 3* : Programme de qPCR sur ADNc murin**

Durée	Température	Etape	Nombre de cycles
10 min	95°C	Dénaturation	1
15 s	95°C	Dénaturation	40
1 min	58°C	Hybridation et élongation	
15 sec	95°C	Courbe de fusion	1
1 min	60°C		
+0,3°C	60-95°C		
15 sec	95°C		

***Tableau 4* : Programme de qPCR sur ADNc humain**

Durée	Température	Etape	Nombre de cycles
2 min	95°C	Dénaturation	1
5 s	95°C	Dénaturation	40
30 sec	60°C	Hybridation et élongation	
15 sec	95°C	Courbe de fusion	1
1 min	65°C		
+0,5°C	65-95°C		
10 sec	95°C		

L'analyse a été réalisée grâce à la station StepOnePlus™ (Life Technologies, Saint-Aubin, France).

Les séquences des amorces murines utilisées sont détaillées dans le **tableau 5.**

Pour chaque gène, une courbe standard a été réalisée à partir de 4 dilutions d'ADNc (1/10, 1/50, 1/100 et 1/500) et utilisée pour déterminer son expression relative. L'expression de chaque gène a ensuite été normalisée par la moyenne géométrique de deux gènes de référence : L38 et 18S pour les ADNc murins et par la β2-microglobuline pour les ADNc humains.

***Tableau 5** : Séquences des amorces sens et anti-sens murines*

Gène cible **(protéine)**	**Amorce sens**	**Amorce anti-sens**
***18s (*18S)**	*gtgtggggagtgaatggtg*	*gcgagacagtcaaaccacg*
***L38 (*L38)**	*catgcctcggaaaattgag*	*tcttgacagacttggcatcct*
***Cnr1 (*CB1R)**	*ccgcaaagatagtcccaatg*	*aaccccacccagtttgaac*
***Cnr2 (*CB2R)**	*caaaggaggaagtgcttggt*	*tggagagatcggcttatgttg*
***Faah (*FAAH)**	*ggaccttgctccccctttct*	*cctgctgggctgtcacata*
***Napepld (*NAPE)**	*ctcgatatctgcgtggaaca*	*ctgaattctggcgctttctc*
***Adgre1 (*F4/80)**	*tgacaaccagacggcttgtg*	*gcaggcgaggaaaagatagtgt*
***Fas (*FAS)**	*ggctgcagtgaatgaatttg*	*ttcgtacctccttggcaaac*
***Acc1 (*ACC1)**	*acaccatgttgggagttgtg*	*gctgttcctcaggctcacat*
***Ppara (*PPARα)**	*gttttcacaagtgcctgtctgt*	*gtatgaacaaaaggcgggttg*
***Gpat (*GPAT)**	*ttcaaccccagtatcccatct*	*ggtgccttgtgtgagtttca*
***Slc27a5 (*FATP5)**	*cctgcggtacttgtgtaacg*	*atttgcccgaagtccattg*
***Cd36 (*FAT/CD36)**	*aattagtagaaccgggccac*	*ccaactcccaggtacaatca*
***Pparg2 (*PPARγ2)**	*atcttaactgccggatccac*	*aggcacttctgaaaccgaca*
***Srebf1 (*SREBP1c)**	*acctggtgtcagcttgtgg*	*accacttcgggtttcatgc*
***Acox1 (*ACOX)**	*atttacgtcacgtttaccccg*	*ataccacccaccagcttcc*
***Scd1(*SCD1)**	*ccggagacccctagatcga*	*tagcctgtaaaagatttctgcaaacc*
***Dgat2 (*DGAT2)**	*agccctccaagacatcttctct*	*tgcagctgtttttccacct*
Fgf21 (*FGF21*)	*agctggggattcaacacagg*	*ccaaggcagctggaattgtg*
***Lipe (*LHS)**	*ttaccatctcacctcccttgg*	*accttgctgtcctgtccttc*
***Ucp1 (*UCP1)**	*gcttaatgactggaggtgtgg*	*ctctgggcttgcattctgac*

X. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM. La différence significative entre ces moyennes est déterminée par un test de Student (t-test) bilatéral ou un test de Mann-Withney pour les comparaisons de deux groupes, et une analyse de variance ANOVA suivi d'une comparaison multiple par un test de Tuckey pour la comparaison de plus de deux groupes. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism, * P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001.

Bibliographie

Abadji, V., Lucas-Lenard, J.M., Chin, C., and Kendall, D.A. (1999). Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. J. Neurochem. *72*, 2032–2038.

Abalo, R., Cabezos, P.A., Vera, G., López-miranda, V., Herradón, E., and Martín-fontelles, M.I. (2011). Cannabinoid-induced delayed gastric emptying is selectively increased upon intermittent administration in the rat: role of CB1 receptors. Neurogastroenterol. Motil. *23*, 457-e177.

Abel, E.L. (1975). Cannabis: effects on hunger and thirst. Behav. Biol. *15*, 255–281.

Adams, J.M., Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004). Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle From Obese Insulin-Resistant Humans. Diabetes *53*, 25–31.

Ailhaud, G. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes. *24 Suppl 2*, S1-3.

Alberti, K.G.M., Zimmet, P., and Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. The Lancet *366*, 1059–1062.

Alvheim, A.R., Malde, M.K., Osei-Hyiaman, D., Lin, Y.H., Pawlosky, R.J., Madsen, L., Kristiansen, K., Frøyland, L., and Hibbeln, J.R. (2012). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. Obes. Silver Spring Md *20*, 1984–1994.

Anthonsen, M.W., Rönnstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E., and Holm, C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. J. Biol. Chem. *273*, 215–221.

Arner, P. (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *19*, 471–482.

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

Arner, P., Hellström, L., Wahrenberg, H., and Brönnegård, M. (1990). Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. J. Clin. Invest. *86*, 1595–1600.

Azua, I.R. de, Mancini, G., Srivastava, R.K., Rey, A.A., Cardinal, P., Tedesco, L., Zingaretti, C.M., Sassmann, A., Quarta, C., Schwitter, C., et al. (2017). Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. J. Clin. Invest. *127*.

Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. Cell Metab. *5*, 426–437.

Bátkai, S., Osei-Hyiaman, D., Pan, H., El-Assal, O., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Hong, F., Harvey-White, J., Jafri, A., Haskó, G., et al. (2007). Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *21*, 1788–1800.

Baye, T.M., Zhang, Y., Smith, E., Hillard, C.J., Gunnell, J., Myklebust, J., James, R., Kissebah, A.H., Olivier, M., and Wilke, R.A. (2008). Genetic variation in cannabinoid receptor 1 (CNR1) is associated with derangements in lipid homeostasis, independent of body mass index. Pharmacogenomics *9*, 1647–1656.

van Beek, L., van Klinken, J.B., Pronk, A.C.M., van Dam, A.D., Dirven, E., Rensen, P.C.N., Koning, F., Willems van Dijk, K., and van Harmelen, V. (2015). The limited storage capacity of gonadal adipose tissue directs the development of metabolic disorders in male C57Bl/6J mice. Diabetologia *58*, 1601–1609.

Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J.P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., and Soubrié, P. (2003). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. Mol. Pharmacol. *63*, 908–914.

Berger, A., Crozier, G., Bisogno, T., Cavaliere, P., Innis, S., and Di Marzo, V. (2001). Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acylethanolamines in piglets. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 6402–6406.

Bergman, R.N., and Mittelman, S.D. (1998). Central role of the adipocyte in insulin resistance. J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. *9*, 205–221.

Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Muñoz, A.L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M.J., Milman, G., et al. (2008). Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. Diabetologia *51*, 476–487.

Bermudez-Silva, F.J., Romero-Zerbo, S.Y., Haissaguerre, M., Ruz-Maldonado, I., Lhamyani, S., Bekay, R.E., Tabarin, A., Marsicano, G., and Cota, D. (2016). The cannabinoid CB1 receptor and mTORC1 signalling pathways interact to modulate glucose homeostasis in mice. Dis. Model. Mech. *9*, 51–61.

Bermúdez-Siva, F.J., Serrano, A., Diaz-Molina, F.J., Sánchez Vera, I., Juan-Pico, P., Nadal, A., Fuentes, E., and Rodríguez de Fonseca, F. (2006). Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats. Eur. J. Pharmacol. *531*, 282–284.

Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Girousse, A., Jocken, J., Laurencikiene, J., Anesia, R., Rodriguez, A.-M., Ryden, M., et al. (2009). Contribution of Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase to Lipolysis in hMADS Adipocytes. J. Biol. Chem. *284*, 18282.

Bigornia, S.J., Farb, M.G., Mott, M.M., Hess, D.T., Carmine, B., Fiscale, A., Joseph, L., Apovian, C.M., and Gokce, N. (2012). Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. Nutr. Diabetes *2*, e30.

Bisogno, T., Ligresti, A., and Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. Pharmacol. Biochem. Behav. *81*, 224–238.

Blankman, J.L., Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem. Biol. *14*, 1347–1356.

Blüher, M., Engeli, S., Klöting, N., Berndt, J., Fasshauer, M., Bátkai, S., Pacher, P., Schön, M.R., Jordan, J., and Stumvoll, M. (2006). Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. Diabetes *55*, 3053–3060.

Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. Diabetes *46*, 3–10.

Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., and Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. Diabetes *54*, 3458–3465.

Bolinder, J., Kager, L., Ostman, J., and Arner, P. (1983). Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. Diabetes *32*, 117–123.

Boon, M.R., Kooijman, S., van Dam, A.D., Pelgrom, L.R., Berbée, J.F.P., Visseren, C.A.R., van Aggele, R.C., van den Hoek, A.M., Sips, H.C.M., Lombès, M., et al. (2014). Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade activates brown adipose tissue and diminishes dyslipidemia and obesity. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *28*, 5361–5375.

Bordicchia, M., Battistoni, I., Mancinelli, L., Giannini, E., Refi, G., Minardi, D., Muzzonigro, G., Mazzucchelli, R., Montironi, R., Piscitelli, F., et al. (2010). Cannabinoid CB1 receptor expression in relation to visceral adipose depots, endocannabinoid levels, microvascular damage, and the presence of the Cnr1 A3813G variant in humans. Metabolism. *59*, 734–741.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. Biochem. J. *312*, 637–641.

Bouaboula, M., Hilairet, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G., and Casellas, P. (2005). Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Eur. J. Pharmacol. *517*, 174–181.

Brown, A.-M., and Gibbons, G.F. (2001). Insulin Inhibits the Maturation Phase of VLDL Assembly via a Phosphoinositide 3-Kinase—Mediated Event. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *21*, 1656–1661.

Brown, I., Cascio, M.G., Rotondo, D., Pertwee, R.G., Heys, S.D., and Wahle, K.W.J. (2013). Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. Prog. Lipid Res. *52*, 80–109.

Bu, L., Gao, M., Qu, S., and Liu, D. (2013). Intraperitoneal Injection of Clodronate Liposomes Eliminates Visceral Adipose Macrophages and Blocks High-fat Diet-induced Weight Gain and Development of Insulin Resistance. AAPS J. *15*, 1001.

Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V., and Amar, J. (2011). Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. Acta Diabetol. *48*, 257.

Cable, J.C., Tan, G.D., Alexander, S.P., and O'Sullivan, S.E. (2014). The effects of obesity, diabetes and metabolic syndrome on the hydrolytic enzymes of the endocannabinoid system in animal and human adipocytes. Lipids Health Dis. *13*, 43.

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. Nat. Med. *11*, 183–190.

Calandra, B., Portier, M., Kernéis, A., Delpech, M., Carillon, C., Le Fur, G., Ferrara, P., and Shire, D. (1999). Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. Eur. J. Pharmacol. *374*, 445–455.

Cani, P.D., Montoya, M.L., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Lambert, D.M. (2004). Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. Br. J. Nutr. *92*, 757–761.

Cani, P.D., Geurts, L., Matamoros, S., Plovier, H., and Duparc, T. (2014). Glucose metabolism: focus on gut microbiota, the endocannabinoid system and beyond. Diabetes Metab. *40*, 246–257.

Cani, P.D., Plovier, H., Hul, M.V., Geurts, L., Delzenne, N.M., Druart, C., and Everard, A. (2016). Endocannabinoids [mdash] at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. Nat. Rev. Endocrinol. *12*, 133–143.

Capasso, R., Matias, I., Lutz, B., Borrelli, F., Capasso, F., Marsicano, G., Mascolo, N., Petrosino, S., Monory, K., Valenti, M., et al. (2005). Fatty Acid Amide Hydrolase Controls Mouse Intestinal Motility In Vivo. Gastroenterology *129*, 941–951.

Capeau, J. (2003). Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. médecine/sciences *19*, 834–839.

Carai, M.A.M., Colombo, G., Gessa, G.L., Yalamanchili, R., Basavarajappa, B.S., Basavarajppa, B.S., and Hungund, B.L. (2006). Investigation on the relationship between cannabinoid CB1 and opioid receptors in gastrointestinal motility in mice. Br. J. Pharmacol. *148*, 1043–1050.

Carpéné, C., Bousquet-Mélou, A., Galitzky, J., Berlan, M., and Lafontan, M. (1998). Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. Ann. N. Y. Acad. Sci. *839*, 186–189.

Cascio, M.G., and Marini, P. (2015). Biosynthesis and Fate of Endocannabinoids. SpringerLink 39–58.

Casu, M.A., Porcella, A., Ruiu, S., Saba, P., Marchese, G., Carai, M.A.M., Reali, R., Gessa, G.L., and Pani, L. (2003). Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. Eur. J. Pharmacol. *459*, 97–105.

Caulfield, M.P., and Brown, D.A. (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. Br. J. Pharmacol. *106*, 231–232.

Cavuoto, P., McAinch, A.J., Hatzinikolas, G., Janovská, A., Game, P., and Wittert, G.A. (2007a). The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. *364*, 105–110.

Cavuoto, P., McAinch, A.J., Hatzinikolas, G., Cameron-Smith, D., and Wittert, G.A. (2007b). Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. Mol. Cell. Endocrinol. *267*, 63–69.

Chanda, D., Kim, D.-K., Li, T., Kim, Y.-H., Koo, S.-H., Lee, C.-H., Chiang, J.Y.L., and Choi, H.-S. (2011). Cannabinoid receptor type 1 (CB1R) signaling regulates hepatic gluconeogenesis via induction of endoplasmic reticulum-bound transcription factor cAMP-responsive element-binding protein H (CREBH) in primary hepatocytes. J. Biol. Chem. *286*, 27971–27979.

Chatzipanteli, K., Rudolph, S., and Axelrod, L. (1992). Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E2 and prostacyclin in rat adipose tissue. Diabetes *41*, 927–935.

Chaves, V.E., Frasson, D., and Kawashita, N.H. (2011). Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. Biochimie *93*, 1631–1640.

Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., and Kim, J.B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. Cell. Endocrinol. 30.

Christensen, R., Kristensen, P.K., Bartels, E.M., Bliddal, H., and Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. Lancet Lond. Engl. *370*, 1706–1713.

Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., et al. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature *392*, 398–401.

Cluny, N.L., Vemuri, V.K., Chambers, A.P., Limebeer, C.L., Bedard, H., Wood, J.T., Lutz, B., Zimmer, A., Parker, L.A., Makriyannis, A., et al. (2010). A novel peripherally restricted cannabinoid receptor antagonist, AM6545, reduces food intake and body weight, but does not cause malaise, in rodents. Br. J. Pharmacol. *161*, 629–642.

Costa, B., Vailati, S., and Colleoni, M. (1999). SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, reverses the behavioural effects of anandamide-treated rats. Behav. Pharmacol. *10*, 327–331.

Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., et al. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. J. Clin. Invest. *112*, 423–431.

Côté, M., Matias, I., Lemieux, I., Petrosino, S., Alméras, N., Després, J.-P., and Di Marzo, V. (2007). Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. Int. J. Obes. 2005 *31*, 692–699.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., and Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature *384*, 83–87.

Crespillo, A., Suárez, J., Bermúdez-Silva, F.J., Rivera, P., Vida, M., Alonso, M., Palomino, A., Lucena, M.A., Serrano, A., Pérez-Martín, M., et al. (2011). Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. Biochem. J. *433*, 175–185.

Croci, T., Manara, L., Aureggi, G., Guagnini, F., Rinaldi-Carmona, M., Maffrand, J.-P., Le Fur, G., Mukenge, S., and Ferla, G. (1998). In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. Br. J. Pharmacol. *125*, 1393–1395.

Cusi, K. (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Curr. Diab. Rep. *10*, 306–315.

Dalmas, E., Clément, K., and Guerre-Millo, M. (2011). Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. Trends Immunol. *32*, 307–314.

Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hajduch, E., Ferré, P., and Foufelle, F. (2005). Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. J. Biol. Chem. *280*, 25250–25257.

De Gottardi, A., Spahr, L., Ravier-Dall'Antonia, F., and Hadengue, A. (2010). Cannabinoid receptor 1 and 2 agonists increase lipid accumulation in hepatocytes. Liver Int. *30*, 1482–1489.

De Petrocellis, L., and Di Marzo, V. (2009). Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca2+ signalling. Cell Calcium *45*, 611–624.

De Petrocellis, L., Marini, P., Matias, I., Moriello, A.S., Starowicz, K., Cristino, L., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007). Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. Exp. Cell Res. *313*, 2993–3004.

DeFronzo, R.A. (2009). From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. Diabetes *58*, 773.

DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. Diabetes Care *32*, S157–S163.

DeLeve, L.D., Wang, X., Kanel, G.C., Atkinson, R.D., and McCuskey, R.S. (2008). Prevention of hepatic fibrosis in a murine model of metabolic syndrome with nonalcoholic steatohepatitis. Am. J. Pathol. *173*, 993–1001.

Delgado-Peraza, F., Ahn, K.H., Nogueras-Ortiz, C., Mungrue, I.N., Mackie, K., Kendall, D.A., and Yudowski, G.A. (2016). Mechanisms of Biased *β*-Arrestin-Mediated Signaling Downstream from the Cannabinoid 1 Receptor. Mol. Pharmacol. *89*, 618–629.

Demizieux, L., Piscitelli, F., Troy-Fioramonti, S., Iannotti, F.A., Borrino, S., Gresti, J., Muller, T., Bellenger, J., Silvestri, C., Marzo, V.D., et al. (2016). Early Low Fat Diet Enriched with Linolenic Acid Reduces Liver Endocannabinoid Tone and Improves Late Glycemic Control After a High Fat Diet Challenge in Mice. Diabetes db151279.

Deng, C., Paoloni-Giacobino, A., Kuehne, F., Boss, O., Revelli, J.P., Moinat, M., Cawthorne, M.A., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1996). Respective degree of expression of beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in human brown and white adipose tissues. Br. J. Pharmacol. *118*, 929–934.

Deng, J., Liu, S., Zou, L., Xu, C., Geng, B., and Xu, G. (2012). Lipolysis Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Cells. J. Biol. Chem. *287*, 6240–6249.

D'Eon, T.M., Pierce, K.A., Roix, J.J., Tyler, A., Chen, H., and Teixeira, S.R. (2008). The Role of Adipocyte Insulin Resistance in the Pathogenesis of Obesity-Related Elevations in Endocannabinoids. Diabetes *57*, 1262–1268.

Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature *444*, 881–887.

Després, J.-P., Golay, A., Sjöström, L., and Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group (2005). Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. N. Engl. J. Med. *353*, 2121–2134.

Deveaux, V., Cadoudal, T., Ichigotani, Y., Teixeira-Clerc, F., Louvet, A., Manin, S., Nhieu, J.T.-V., Belot, M.P., Zimmer, A., Even, P., et al. (2009). Cannabinoid CB2 Receptor Potentiates Obesity-Associated Inflammation, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. PLoS ONE *4*.

Di Marzo, V., and De Petrocellis, L. (2010). Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. Curr. Med. Chem. *17*, 1430–1449.

Di Marzo, V., and Deutsch, D.G. (1998). Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. Neurobiol. Dis. *5*, 386–404.

Di Marzo, V., and Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. Nat. Neurosci. *8*, 585–589.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.-C., and Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature *372*, 686–691.

Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. Nature *410*, 822–825.

Di Marzo, V., Verrijken, A., Hakkarainen, A., Petrosino, S., Mertens, I., Lundbom, N., Piscitelli, F., Westerbacka, J., Soro-Paavonen, A., Matias, I., et al. (2009). Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc. *161*, 715–722.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., and Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. Diabetes Res. Clin. Pract. *93*, S52–S59.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 10819–10824.

DiPatrizio, N.V., Astarita, G., Schwartz, G., Li, X., and Piomelli, D. (2011). From the Cover: Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 12904.

Dominguez, H., Storgaard, H., Rask-Madsen, C., Steffen Hermann, T., Ihlemann, N., Baunbjerg Nielsen, D., Spohr, C., Kober, L., Vaag, A., and Torp-Pedersen, C. (2005). Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. J. Vasc. Res. *42*, 517–525.

Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Invest. *115*, 1343–1351.

Dries, D.R., Gallegos, L.L., and Newton, A.C. (2007). A Single Residue in the C1 Domain Sensitizes Novel Protein Kinase C Isoforms to Cellular Diacylglycerol Production. J. Biol. Chem. *282*, 826–830.

Duncan, M., Thomas, A.D., Cluny, N.L., Patel, A., Patel, K.D., Lutz, B., Piomelli, D., Alexander, S.P.H., and Sharkey, K.A. (2008). Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *295*, G1255-1265.

Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. Annu. Rev. Nutr. *27*, 79–101.

Eckardt, K., Sell, H., Taube, A., Koenen, M., Platzbecker, B., Cramer, A., Horrighs, A., Lehtonen, M., Tennagels, N., and Eckel, J. (2009). Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. Diabetologia *52*, 664–674.

Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. J. Lipid Res. *49*, 1894–1903.

Engeli, S., Böhnke, J., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., Janke, J., Bátkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F.C., Sharma, A.M., et al. (2005). Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. Diabetes *54*, 2838–2843.

Engeli, S., Lehmann, A.-C., Kaminski, J., Haas, V., Janke, J., Zoerner, A.A., Luft, F.C., Tsikas, D., and Jordan, J. (2014). Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. Obes. Silver Spring Md *22*, E70-76.

Engfeldt, P., and Arner, P. (1988). Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences. Horm. Metab. Res. Suppl. Ser. *19*, 26–29.

Esposito, I., Proto, M.C., Gazzerro, P., Laezza, C., Miele, C., Alberobello, A.T., D'Esposito, V., Beguinot, F., Formisano, P., and Bifulco, M. (2008). The Cannabinoid CB1 Receptor Antagonist Rimonabant Stimulates 2-Deoxyglucose Uptake in Skeletal Muscle Cells by Regulating the Expression of Phosphatidylinositol-3-kinase. Mol. Pharmacol. *74*, 1678–1686.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., et al. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 9066–9071.

Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., and O'Rahilly, S. (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N. Engl. J. Med. *341*, 879–884.

Farooqui, A.A., Rammohan, K.W., and Horrocks, L.A. (1989). Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. *559*, 25–36.

Feng, B., Jiao, P., Nie, Y., Kim, T., Jun, D., Rooijen, N. van, Yang, Z., and Xu, H. (2011). Clodronate Liposomes Improve Metabolic Profile and Reduce Visceral Adipose Macrophage Content in Diet-Induced Obese Mice. PLoS ONE *6*.

Ferré, P., and Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. Diabetes Obes. Metab. *12 Suppl 2*, 83–92.

Festa, A., D'Agostino, R., Williams, K., Karter, A.J., Mayer-Davis, E.J., Tracy, R.P., and Haffner, S.M. (2001). The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes. *25*, 1407–1415.

Festuccia, W.T., Laplante, M., Berthiaume, M., Gélinas, Y., and Deshaies, Y. (2006). PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. Diabetologia *49*, 2427–2436.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat. Med. *15*, 930–939.

Fezza, F., Bari, M., Florio, R., Talamonti, E., Feole, M., and Maccarrone, M. (2014). Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes. Molecules *19*, 17078–17106.

Fisher, ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonenkov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. Genes Dev. *26*, 271–281.

Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitonenkov, A., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. Diabetes *59*, 2781–2789.

Flamment, M., Gueguen, N., Wetterwald, C., Simard, G., Malthièry, Y., and Ducluzeau, P.-H. (2009). Effects of the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant on hepatic mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *297*, E1162–E1170.

Fonseca, B.M., Costa, M.A., Almada, M., Correia-da-Silva, G., and Teixeira, N.A. (2013). Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *102*, 13–30.

Forest, C., Tordjman, J., Glorian, M., Duplus, E., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E.G., and Antoine, B. (2003). Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. Biochem. Soc. Trans. *31*, 1125–1129.

Frühbeck, G., Aguado, M., and Martínez, J.A. (1997). In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. Biochem. Biophys. Res. Commun. *240*, 590–594.

Frühbeck, G., Aguado, M., Gómez-Ambrosi, J., and Martínez, J.A. (1998). Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. *250*, 99–102.

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., et al. (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. Nature *425*, 90–93.

Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L., and Garvey, W.T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. J. Lipid Res. *46*, 1369–1379.

Fu, Z., Gilbert, E.R., and Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. Curr. Diabetes Rev. *9*, 25.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J. Clin. Invest. *114*, 1752–1761.

Galitzky, J., Sengenès, C., Thalamas, C., Marques, M.A., Senard, J.M., Lafontan, M., and Berlan, M. (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*, 536–544.

Galve-Roperh, I., Rueda, D., Pulgar, T.G. del, Velasco, G., and Guzmán, M. (2002). Mechanism of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by the CB1 Cannabinoid Receptor. Mol. Pharmacol. *62*, 1385–1392.

Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. J. Am. Chem. Soc. *86*, 1646–1647.

Gary-Bobo, M., Elachouri, G., Gallas, J.F., Janiak, P., Marini, P., Ravinet-Trillou, C., Chabbert, M., Cruccioli, N., Pfersdorff, C., Roque, C., et al. (2007). Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. Hepatol. Baltim. Md *46*, 122–129.

Ge, Q., Maury, E., Rycken, L., Gérard, J., Noël, L., Detry, R., Navez, B., and Brichard, S.M. (2013). Endocannabinoids regulate adipokine production and the immune balance of omental adipose tissue in human obesity. Int. J. Obes. 2005 *37*, 874–880.

Ge, X., Wang, Y., Lam, K.S., and Xu, A. (2012). Metabolic actions of FGF21: molecular mechanisms and therapeutic implications. Acta Pharm. Sin. B *2*, 350–357.

Gerdeman, G., and Lovinger, D.M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. J. Neurophysiol. *85*, 468–471.

Getty-Kaushik, L., Richard, A.-M.T., Deeney, J.T., Krawczyk, S., Shirihai, O., and Corkey, B.E. (2009). The CB1 antagonist rimonabant decreases insulin hypersecretion in rat pancreatic islets. Obes. Silver Spring Md *17*, 1856–1860.

Girousse, A., Tavernier, G., Valle, C., Moro, C., Mejhert, N., Dinel, A.-L., Houssier, M., Roussel, B., Besse-Patin, A., Combes, M., et al. (2013). Partial Inhibition of Adipose Tissue Lipolysis Improves Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity Without Alteration of Fat Mass. PLoS Biol. *11*.

Giuffrida, A., and McMahon, L.R. (2010). In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: therapeutic implications in Parkinson's disease and abuse liability. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *91*, 90.

Gjedsted, J., Gormsen, L.C., Nielsen, S., Schmitz, O., Djurhuus, C.B., Keiding, S., Ørskov, H., Tønnesen, E., and Møller, N. (2007). Effects of a 3-day fast on regional lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle and adipose tissue. Acta Physiol. Oxf. Engl. *191*, 205–216.

Glass, M., and Felder, C.C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *17*, 5327–5333.

Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J.A., and Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides—GPR55 and GPR119. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *89*, 105.

Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., and Guzmán, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. Biochem. J. *347*, 369–373.

Gonthier, M.-P., Hoareau, L., Festy, F., Matias, I., Valenti, M., Bès-Houtmann, S., Rouch, C., Robert-Da Silva, C., Chesne, S., Lefebvre d'Hellencourt, C., et al. (2007). Identification of endocannabinoids and related compounds in human fat cells. Obes. Silver Spring Md *15*, 837–845.

González, S., Manzanares, J., Berrendero, F., Wenger, T., Corchero, J., Bisogno, T., Romero, J., Fuentes, J.A., Di Marzo, V., Ramos, J.A., et al. (1999). Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. Neuroendocrinology *70*, 137–145.

González-Mariscal, I., Krzysik-Walker, S.M., Kim, W., Rouse, M., and Egan, J.M. (2016). Blockade of cannabinoid 1 receptor improves GLP-1R mediated insulin secretion in mice. Mol. Cell. Endocrinol. *423*, 1–10.

Gordon, E.S. (1960). Non-Esterified Fatty Acids in the Blood of Obese and Lean Subjects. Am. J. Clin. Nutr. *8*, 740–747.

Greenberg, I., Kuehnle, J., Mendelson, J.H., and Bernstein, J.G. (1976). Effects of marihuana use on body weight and caloric intake in humans. Psychopharmacology (Berl.) *49*, 79–84.

Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F., and Shulman, G.I. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. Diabetes *48*, 1270–1274.

Guglielmo, G.M.D., Drake, P.G., Baass, P.C., Authier, F., Posner, B.I., and Bergeron, J.J.M. (1998). Insulin receptor internalization and signalling. 59–63.

Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C.X., and Smith, U. (2007). Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *27*, 2276–2283.

Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., and Zechner, R. (2002a). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. J. Biol. Chem. *277*, 4806–4815.

Haemmerle, G., Zimmermann, R., Strauss, J.G., Kratky, D., Riederer, M., Knipping, G., and Zechner, R. (2002b). Hormone-sensitive Lipase Deficiency in Mice Changes the Plasma Lipid Profile by Affecting the Tissue-specific Expression Pattern of Lipoprotein Lipase in Adipose Tissue and Muscle. J. Biol. Chem. *277*, 12946–12952.

Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., et al. (2006). Defective Lipolysis and Altered Energy Metabolism in Mice Lacking Adipose Triglyceride Lipase. Science *312*, 734–737.

Hale, C., Chen, M.M., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Hager, T., Wang, M., Véniant, M.M., and Xu, J. (2012). Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. Endocrinology *153*, 69–80.

Hamilton, J.A., and Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? Diabetes *48*, 2255–2269.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., and Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3662–3665.

Hao, S., Avraham, Y., Mechoulam, R., and Berry, E.M. (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. Eur. J. Pharmacol. *392*, 147–156.

Harada, K., Shen, W.-J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J., Ishibashi, S., and Kraemer, F.B. (2003). Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *285*, E1182–E1195.

Harrold, J.A., and Williams, G. (2003). The cannabinoid system: a role in both the homeostatic and hedonic control of eating? Br. J. Nutr. *90*, 729–734.

van der Heijden, R.A., Sheedfar, F., Morrison, M.C., Hommelberg, P.P.H., Kor, D., Kloosterhuis, N.J., Gruben, N., Youssef, S.A., de Bruin, A., Hofker, M.H., et al. (2015). High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. Aging *7*, 256–268.

Henry, D.J., and Chavkin, C. (1995). Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in Xenopus oocytes. Neurosci. Lett. *186*, 91–94.

Herling, A.W., Kilp, S., Elvert, R., Haschke, G., and Kramer, W. (2008). Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats. Endocrinology *149*, 2557–2566.

Higgs, H.N., and Glomset, J.A. (1994). Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 9574–9578.

Hill, J.O., and Melanson, E.L. (1999). Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. Med. Sci. Sports Exerc. *31*, S515-521.

Hillard, C.J., and Jarrahian, A. (2003). Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. Br. J. Pharmacol. *140*, 802–808.

Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heibült, O., Becker, I., Ziegler, A., Gerber, G., Sina, M., Görg, T., Mayer, H., et al. (1999). Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. *84*, 1483–1486.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature *420*, 333–336.

Hoffman, A.F., and Lupica, C.R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 2470–2479.

Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Biochem. Soc. Trans. *31*, 1120–1124.

Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. Cell *140*, 900–917.

Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., and Itoh, N. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Regulates Lipolysis in White Adipose Tissue But Is Not Required for Ketogenesis and Triglyceride Clearance in Liver. Endocrinology *150*, 4625–4633.

Howlett, A.C. (2002). The cannabinoid receptors. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *68–69*, 619–631.

Howlett, A.C., and Fleming, R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. Mol. Pharmacol. *26*, 532–538.

Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., and Porrino, L.J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. Neuropharmacology *47 Suppl 1*, 345–358.

Hsiao, W.-C., Shia, K.-S., Wang, Y.-T., Yeh, Y.-N., Chang, C.-P., Lin, Y., Chen, P.-H., Wu, C.-H., Chao, Y.-S., and Hung, M.-S. (2015). A novel peripheral cannabinoid receptor 1 antagonist, BPR0912, reduces weight independently of food intake and modulates thermogenesis. Diabetes Obes. Metab. *17*, 495–504.

Huang, N., Juang, J., Wang, Y., Hsueh, C., Liang, Y., Lin, J., Tsai, C., and Lai, L. (2010). Rimonabant inhibits TNF-α-induced endothelial IL-6 secretion via CB1 receptor and cAMP-dependent protein kinase pathway. Acta Pharmacol. Sin. *31*, 1447.

Iannotti, F.A., Piscitelli, F., Martella, A., Mazzarella, E., Allarà, M., Palmieri, V., Parrella, C., Capasso, R., and Di Marzo, V. (2013). Analysis of the "endocannabinoidome" in peripheral tissues of obese Zucker rats. Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA *89*, 127–135.

Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes. *11*, 11–18.

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. Cell Metab. *5*, 415–425.

Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. Diabetes *51*, 2005–2011.

Izzo, A.A., Piscitelli, F., Capasso, R., Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Petrosino, S., and Di Marzo, V. (2009). Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. Br. J. Pharmacol. *158*, 451–461.

Jackson, R.S., Creemers, J.W.M., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.-L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C., and O'Rahilly, S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. Nat. Genet. *16*, 303–306.

Jamshidi, N., and Taylor, D.A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. Br. J. Pharmacol. *134*, 1151–1154.

Jeng, C.-Y., Sheu, W.H.-H., Fuh, M.M.-T., Chen, Y.-D.I., and Reaven, G.M. (1994). Relationship Between Hepatic Glucose Production and Fasting Plasma Glucose Concentration in Patients With NIDDM. Diabetes *43*, 1440–1444.

Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., and Gross, R.W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. J. Biol. Chem. *279*, 48968–48975.

Jeong, W., Osei-Hyiaman, D., Park, O., Liu, J., Bátkai, S., Mukhopadhyay, P., Horiguchi, N., Harvey-White, J., Marsicano, G., Lutz, B., et al. (2008). Paracrine Activation of Hepatic CB1 Receptors by Stellate Cell-Derived Endocannabinoids Mediates Alcoholic Fatty Liver. Cell Metab. *7*, 227–235.

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Vergès, B., and Degrace, P. (2010). CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. Diabetes *59*, 926–934.

Jourdan, T., Demizieux, L., Gresti, J., Djaouti, L., Gaba, L., Vergès, B., and Degrace, P. (2012). Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: evidence from cultured explants. Hepatol. Baltim. Md *55*, 790–799.

Jourdan, T., Godlewski, G., Cinar, R., Bertola, A., Szanda, G., Liu, J., Tam, J., Han, T., Mukhopadhyay, B., Skarulis, M.C., et al. (2013). Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. Nat. Med. *19*, 1132–1140.

Jourdan, T., Szanda, G., Cinar, R., Godlewski, G., Holovac, D.J., Park, J.K., Nicoloro, S., Shen, Y., Liu, J., Rosenberg, A.Z., et al. (2017a). Developmental Role of Macrophage Cannabinoid-1 Receptor Signaling in Type 2 Diabetes. Diabetes *66*, 994–1007.

Jourdan, T., Nicoloro, S.M., Zhou, Z., Shen, Y., Liu, J., Coffey, N.J., Cinar, R., Godlewski, G., Gao, B., Aouadi, M., et al. (2017b). Decreasing CB1 receptor signaling in Kupffer cells improves insulin sensitivity in obese mice. Mol. Metab. *0*.

Juan-Picó, P., Fuentes, E., Bermúdez-Silva, F.J., Javier Díaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodríguez de Fonseca, F., and Nadal, A. (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. Cell Calcium *39*, 155–162.

Julien, B., Grenard, P., Teixeira-Clerc, F., Van Nhieu, J.T., Li, L., Karsak, M., Zimmer, A., Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2005). Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. Gastroenterology *128*, 742–755.

Jung, Y.S., Lee, J.-M., Kim, D.-K., Lee, Y.-S., Kim, K.-S., Kim, Y.-H., Kim, J., Lee, M.-S., Lee, I.-K., Kim, S.H., et al. (2016). The Orphan Nuclear Receptor ERRγ Regulates Hepatic CB1 Receptor-Mediated Fibroblast Growth Factor 21 Gene Expression. PLoS ONE *11*.

Kahn, B.B. (1998). Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. Cell *92*, 593–596.

Kamagate, A., Qu, S., Perdomo, G., Su, D., Kim, D.H., Slusher, S., Meseck, M., and Dong, H.H. (2008). FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. J. Clin. Invest. *118*, 2347–2364.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J. Clin. Invest. *116*, 1494–1505.

Karaliota, S., Siafaka-Kapadai, A., Gontinou, C., Psarra, K., and Mavri-Vavayanni, M. (2009). Anandamide increases the differentiation of rat adipocytes and causes PPARgamma and CB1 receptor upregulation. Obes. Silver Spring Md *17*, 1830–1838.

Karpe, F., and Frayn, K.N. (2004). The nicotinic acid receptor--a new mechanism for an old drug. Lancet Lond. Engl. *363*, 1892–1894.

Kashyap, S., Belfort, R., Gastaldelli, A., Pratipanawatr, T., Berria, R., Pratipanawatr, W., Bajaj, M., Mandarino, L., DeFronzo, R., and Cusi, K. (2003). A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. Diabetes *52*, 2461–2474.

Katayama, K., Ueda, N., Kurahashi, Y., Suzuki, H., Yamamoto, S., and Kato, I. (1997). Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab. *1347*, 212–218.

Katona, I., Sperlágh, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999). Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons. J. Neurosci. *19*, 4544–4558.

Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. Sci. Rep. *2*, 799.

Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., and Glass, M. (2005). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? Mol. Pharmacol. *67*, 1697–1704.

Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A.W., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J.S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. Diabetes *55*, 148–157.

Kim, J.Y., Tillison, K., Lee, J.-H., Rearick, D.A., and Smas, C.M. (2006). The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-α in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARγ. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *291*, E115–E127.

Kim, W., Doyle, M.E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.-K., Carlson, O.D., Kim, H.S., Thomas, S., Napora, J.K., Lee, E.K., et al. (2011). Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic β-cells. Diabetes *60*, 1198–1209.

Kim, W., Lao, Q., Shin, Y.-K., Carlson, O.D., Lee, E.K., Gorospe, M., Kulkarni, R.N., and Egan, J.M. (2012). Cannabinoids induce pancreatic β-cell death by directly inhibiting insulin receptor activation. Sci. Signal. *5*, ra23.

Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., and Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. Br. J. Pharmacol. *136*, 550–557.

Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A.B., et al. (2008). The Orexigenic Effect of Ghrelin Is Mediated through Central Activation of the Endogenous Cannabinoid System. PLoS ONE *3*.

Kotronen, A., Seppänen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., Ruskeepää, A.-L., Orešič, M., and Yki-Järvinen, H. (2009). Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)-1 Activity and Diacylglycerol but Not Ceramide Concentrations Are Increased in the Nonalcoholic Human Fatty Liver. Diabetes *58*, 203.

Kozak, K.R., and Marnett, L.J. (2002). Oxidative metabolism of endocannabinoids. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *66*, 211–220.

Kratz, M., Coats, B.R., Hisert, K.B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K.Q., Kuzma, J.N., Larson, I., Billing, P.S., et al. (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct pro-inflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. Cell Metab. *20*, 614–625.

Krogh-Madsen, R., Plomgaard, P., Møller, K., Mittendorfer, B., and Pedersen, B.K. (2006). Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *291*, E108-114.

Krott, L.M., Piscitelli, F., Heine, M., Borrino, S., Scheja, L., Silvestri, C., Heeren, J., and Marzo, V.D. (2016). Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation. J. Lipid Res. jlr.M065227.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat. Genet. *19*, 155–157.

Kuriyama, H., Yamashita, S., Shimomura, I., Funahashi, T., Ishigami, M., Aragane, K., Miyaoka, K., Nakamura, T., Takemura, K., Man, Z., et al. (1998). Enhanced expression of hepatic acyl-coenzyme A synthetase and microsomal triglyceride transfer protein messenger RNAs in the obese and hypertriglyceridemic rat with visceral fat accumulation. Hepatology *27*, 557–562.

Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. Diabetes Metab. Res. Rev. *15*, 412–426.

Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. Int. J. Obes. *32*, S39–S51.

Lafontan, M., and Berlan, M. (1995). Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. Endocr. Rev. *16*, 716–738.

Laine, K., Järvinen, K., Mechoulam, R., Breuer, A., and Järvinen, T. (2002). Comparison of the Enzymatic Stability and Intraocular Pressure Effects of 2-Arachidonylglycerol and Noladin Ether, a Novel Putative Endocannabinoid. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *43*, 3216–3222.

Langin, D. (2006a). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. C. R. Biol. *329*, 598–607.

Langin, D. (2006b). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. Pharmacol. Res. *53*, 482–491.

Langin, D. (2011). In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. Cell Metab. *14*, 569–570.

Langin, D., and Arner, P. (2006). Importance of TNFα and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. Trends Endocrinol. Metab. *17*, 314–320.

Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Rydén, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C.M., Viguerie, N., et al. (2005). Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. Diabetes *54*, 3190–3197.

Large, V., Reynisdottir, S., Langin, D., Fredby, K., Klannemark, M., Holm, C., and Arner, P. (1999). Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. J. Lipid Res. *40*, 2059–2066.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. Cell Metab. *3*, 309–319.

Lebrun, P., and Van Obberghen, E. (2008). SOCS proteins causing trouble in insulin action. Acta Physiol. Oxf. Engl. *192*, 29–36.

Leibowitz, K.L., Chang, G.-Q., Pamy, P.S., Hill, J.O., Gayles, E.C., and Leibowitz, S.F. (2007). Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight. Int. J. Obes. 2005 *31*, 1210–1221.

Li, C., Jones, P.M., and Persaud, S.J. (2010). Cannabinoid receptors are coupled to stimulation of insulin secretion from mouse MIN6 beta-cells. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *26*, 187–196.

Liang, H.-X., Belardinelli, L., Ozeck, M.J., and Shryock, J.C. (2002). Tonic activity of the rat adipocyte A1-adenosine receptor. Br. J. Pharmacol. *135*, 1457–1466.

Lindborg, K.A., Teachey, M.K., Jacob, S., and Henriksen, E.J. (2010). Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. Diabetes Obes. Metab. *12*, 722–730.

Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 3077–3082.

Liu, J., Gao, B., Mirshahi, F., Sanyal, A.J., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., and Kunos, G. (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. Biochem. J. *346 Pt 3*, 835–840.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., et al. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. Neuropharmacology *54*, 1–7.

Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat. Med. *15*, 940–945.

Liu, J., Zhou, L., Xiong, K., Godlewski, G., Mukhopadhyay, B., Tam, J., Yin, S., Gao, P., Shan, X., Pickel, J., et al. (2012a). Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. Gastroenterology *142*, 1218–1228.e1.

Liu, J., Zhou, L., Xiong, K., Godlewski, G., Mukhopadhyay, B., Tam, J., Yin, S., Gao, P., Shan, X., Pickel, J., et al. (2012b). Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. Gastroenterology *142*, 1218–1228.e1.

Liu, J., Cinar, R., Xiong, K., Godlewski, G., Jourdan, T., Lin, Y., Ntambi, J.M., and Kunos, G. (2013). Monounsaturated fatty acids generated via stearoyl CoA desaturase-1 are endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 18832.

Liu, Y.L., Connoley, I.P., Wilson, C.A., and Stock, M.J. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lepob|[sol]|Lepob mice. Int. J. Obes. *29*, 183–187.

Lo Verme, J., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., and Piomelli, D. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. Mol. Pharmacol. *67*, 15–19.

Löfgren, P., Sjölin, E., Wåhlen, K., and Hoffstedt, J. (2007). Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. J. Clin. Endocrinol. Metab. *92*, 1555–1559.

Long, J.Z., Nomura, D.K., Vann, R.E., Walentiny, D.M., Booker, L., Jin, X., Burston, J.J., Sim-Selley, L.J., Lichtman, A.H., Wiley, J.L., et al. (2009). Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 20270.

Lönnqvist, F., Thöme, A., Nilsell, K., Hoffstedt, J., and Arner, P. (1995). A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. J. Clin. Invest. *95*, 1109.

Lönnqvist, F., Thörne, A., Large, V., and Arner, P. (1997). Sex Differences in Visceral Fat Lipolysis and Metabolic Complications of Obesity. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *17*, 1472–1480.

Louvet, A., Teixeira-Clerc, F., Chobert, M.-N., Deveaux, V., Pavoine, C., Zimmer, A., Pecker, F., Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2011). Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. Hepatol. Baltim. Md *54*, 1217–1226.

Lu, X., Yang, X., and Liu, J. (2010). Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2. Cell Cycle *9*, 2719–2725.

Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J. Clin. Invest. *117*, 175–184.

Maccarrone, M., Di Rienzo, M., Finazzi-Agrò, A., and Rossi, A. (2003). Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. J. Biol. Chem. *278*, 13318–13324.

Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G.A., Dey, S.K., Di Marzo, V., Konje, J.C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., et al. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. Trends Pharmacol. Sci. *36*, 277–296.

MacLennan, S.J., Reynen, P.H., Kwan, J., and Bonhaus, D.W. (1998). Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Br. J. Pharmacol. *124*, 619.

Magnan, C., and Ktorza, A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. EMC - Endocrinol. *2*, 241–264.

Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. ISRN Inflamm. *2013*, 139239.

Matias, I., and Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. Trends Endocrinol. Metab. TEM *18*, 27–37.

Matias, I., Gonthier, M.-P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., et al. (2006). Regulation, Function, and Dysregulation of Endocannabinoids in Models of Adipose and β-Pancreatic Cells and in Obesity and Hyperglycemia. J. Clin. Endocrinol. Metab. *91*, 3171–3180.

Matias, I., Gonthier, M.-P., Petrosino, S., Docimo, L., Capasso, R., Hoareau, L., Monteleone, P., Roche, R., Izzo, A.A., and Di Marzo, V. (2007). Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and β-cells. Br. J. Pharmacol. *152*, 676–690.

Matias, I., Petrosino, S., Racioppi, A., Capasso, R., Izzo, A.A., and Di Marzo, V. (2008). Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. Mol. Cell. Endocrinol. *286*, S66–S78.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature *346*, 561–564.

Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H.S., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., et al. (2010). Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. Diabetologia *53*, 2431–2441.

Mauriège, P., Després, J.P., Prud'homme, D., Pouliot, M.C., Marcotte, M., Tremblay, A., and Bouchard, C. (1991). Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. J. Lipid Res. *32*, 1625–1633.

Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B., and Cota, D. (2015). The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. Trends Endocrinol. Metab. *26*, 524–537.

McGarry, J.D., and Dobbins, R.L. (1999). Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. Diabetologia *42*, 128–138.

McQuaid, S.E., Hodson, L., Neville, M.J., Dennis, A.L., Cheeseman, J., Humphreys, S.M., Ruge, T., Gilbert, M., Fielding, B.A., Frayn, K.N., et al. (2011). Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? Diabetes *60*, 47–55.

Mechoulam, R., Fride, E., and Di Marzo, V. (1998). Endocannabinoids. Eur. J. Pharmacol. *359*, 1–18.

Meloni, A.R., DeYoung, M.B., Lowe, C., and Parkes, D.G. (2013). GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β-cells: mechanism and glucose dependence. Diabetes Obes. Metab. *15*, 15–27.

Migrenne, S., Lacombe, A., Lefèvre, A.-L., Pruniaux, M.-P., Guillot, E., Galzin, A.-M., and Magnan, C. (2009). Adiponectin is required to mediate rimonabant-induced improvement of insulin sensitivity but not body weight loss in diet-induced obese mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *296*, R929-935.

Miyoshi, H., Souza, S.C., Zhang, H.-H., Strissel, K.J., Christoffolete, M.A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F.B., Bianco, A.C., Obin, M.S., et al. (2006). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. J. Biol. Chem. *281*, 15837–15844.

Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Nelson, D.E., Engelgau, M.M., Vinicor, F., and Marks, J.S. (2000). Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. Diabetes Care *23*, 1278–1283.

Mølhøj, S., Hansen, H.S., Schweiger, M., Zimmermann, R., Johansen, T., and Malmlöf, K. (2010). Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. Eur. J. Pharmacol. *646*, 38–45.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature *387*, 903–908.

Moss, C.E., Marsh, W.J., Parker, H.E., Ogunnowo-Bada, E., Riches, C.H., Habib, A.M., Evans, M.L., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2012). Somatostatin receptor 5 and cannabinoid receptor 1 activation inhibit secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from intestinal K cells in rodents. Diabetologia *55*, 3094.

Muccioli, G.G. (2010). Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. Drug Discov. Today *15*, 474–483.

Muccioli, G.G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C.S., Lambert, D.M., Delzenne, N.M., and Cani, P.D. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. Mol. Syst. Biol. *6*, 392.

Mukhopadhyay, S., McIntosh, H.H., Houston, D.B., and Howlett, A.C. (2000). The CB(1) cannabinoid receptor juxtamembrane C-terminal peptide confers activation to specific G proteins in brain. Mol. Pharmacol. *57*, 162–170.

Mulder, H., Sörhede-Winzell, M., Contreras, J.A., Fex, M., Ström, K., Ploug, T., Galbo, H., Arner, P., Lundberg, C., Sundler, F., et al. (2003). Hormone-sensitive Lipase Null Mice Exhibit Signs of Impaired Insulin Sensitivity whereas Insulin Secretion Is Intact. J. Biol. Chem. *278*, 36380–36388.

Müller, G., Ertl, J., Gerl, M., and Preibisch, G. (1997). Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. J. Biol. Chem. *272*, 10585–10593.

Muller, T., Demizieux, L., Troy-Fioramonti, S., Gresti, J., Barros, J.-P.P. de, Berger, H., Vergès, B., and Degrace, P. (2017). Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *313*, E26–E36.

Muñoz-Luque, J., Ros, J., Fernández-Varo, G., Tugues, S., Morales-Ruiz, M., Alvarez, C.E., Friedman, S.L., Arroyo, V., and Jiménez, W. (2008). Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. *324*, 475–483.

Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature *365*, 61–65.

Nakata, M., and Yada, T. (2008). Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca2+ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. Regul. Pept. *145*, 49–53.

Nguyen, P.T., Schmid, C.L., Raehal, K.M., Selley, D.E., Bohn, L.M., and Sim-Selley, L.J. (2012). Beta-arrestin-2 regulates cannabinoid CB1 receptor signaling and adaptation in a CNS region-dependent manner. Biol. Psychiatry *71*, 714.

Nielsen, T.S., Vendelbo, M.H., Jessen, N., Pedersen, S.B., Jørgensen, J.O., Lund, S., and Møller, N. (2011). Fasting, But Not Exercise, Increases Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Protein and Reduces G(0)/G(1) Switch Gene 2 (G0S2) Protein and mRNA Content in Human Adipose Tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E1293–E1297.

Nielsen, T.S., Jessen, N., Jørgensen, J.O.L., Møller, N., and Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. J. Mol. Endocrinol. *52*, R199-222.

Nieri, P., Greco, R., Adinolfi, B., Breschi, M.C., Martinotti, E., Nannetti, C., and Podestà, A. (2003). CB1- and CB2-cannabinoid receptor-independent lipolysis induced by WIN 55,212-2 in male rat adipocytes. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *368*, 352–359.

Nogueras-Ortiz, C., and Yudowski, G.A. (2016). The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. Mol. Pharmacol. *90*, 620–626.

Nyíri, G., Cserép, C., Szabadits, E., MacKie, K., and Freund, T.F. (2005). CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. Neuroscience *136*, 811–822.

Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., and Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. Diabetes *45*, 881–885.

O'Hare, J.D., Zielinski, E., Cheng, B., Scherer, T., and Buettner, C. (2011). Central endocannabinoid signaling regulates hepatic glucose production and systemic lipolysis. Diabetes *60*, 1055–1062.

Ohmura, K., Ishimori, N., Ohmura, Y., Tokuhara, S., Nozawa, A., Horii, S., Andoh, Y., Fujii, S., Iwabuchi, K., Onoé, K., et al. (2010). Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *30*, 193–199.

Ojima, K., Oe, M., Nakajima, I., Muroya, S., and Nishimura, T. (2016). Dynamics of protein secretion during adipocyte differentiation. FEBS Open Bio *6*, 816.

Opie, L.H., and Walfish, P.G. (1963). Plasma free fatty acid concentrations in obesity. N. Engl. J. Med. *268*, 757–760.

Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertáler, L., Wang, L., et al. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. J. Clin. Invest. *115*, 1298–1305.

Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Zhou, L., Godlewski, G., Harvey-White, J., Jeong, W., Bátkai, S., Marsicano, G., Lutz, B., Buettner, C., et al. (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. J. Clin. Invest. *118*, 3160–3169.

Oveisi, F., Gaetani, S., Eng, K.T.-P., and Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide inhibits food intake in free-feeding rats after oral administration. Pharmacol. Res. *49*, 461–466.

Oz, M. (2006). Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. Curr. Pharm. Des. *12*, 227–239.

Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. Science *306*, 457–461.

Pacher, P., Bátkai, S., and Kunos, G. (2006). The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. Pharmacol. Rev. *58*, 389–462.

Pagano, C., Pilon, C., Calcagno, A., Urbanet, R., Rossato, M., Milan, G., Bianchi, K., Rizzuto, R., Bernante, P., Federspil, G., et al. (2007). The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. J. Clin. Endocrinol. Metab. *92*, 4810–4819.

Park, J.-G., Xu, X., Cho, S., Hur, K.Y., Lee, M.-S., Kersten, S., and Lee, A.-H. (2016). CREBH-FGF21 axis improves hepatic steatosis by suppressing adipose tissue lipolysis. Sci. Rep. *6*, srep27938.

Patsouris, D., Li, P.-P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J.M., and Neels, J.G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. Cell Metab. *8*, 301–309.

Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. Nature *510*, 84–91.

Perseghin, G., Ghosh, S., Gerow, K., and Shulman, G.I. (1997). Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. Diabetes *46*, 1001–1009.

Pertwee, R.G. (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. Handb. Exp. Pharmacol. 1–51.

Perwitz, N., Wenzel, J., Wagner, I., Büning, J., Drenckhan, M., Zarse, K., Ristow, M., Lilienthal, W., Lehnert, H., and Klein, J. (2010). Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. Diabetes Obes. Metab. *12*, 158–166.

Peyot, M.-L., Guay, C., Latour, M.G., Lamontagne, J., Lussier, R., Pineda, M., Ruderman, N.B., Haemmerle, G., Zechner, R., Joly, E., et al. (2009). Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. J. Biol. Chem. *284*, 16848–16859.

Pfeifer, M.A., Halter, J.B., and Porte, D. (1981). Insulin secretion in diabetes mellitus. Am. J. Med. *70*, 579–588.

Piazza, P.V., Cota, D., and Marsicano, G. (2017). The CB1 Receptor as the Cornerstone of Exostasis. Neuron *93*, 1252–1274.

Pinto, L., Izzo, A.A., Mascolo, N., Capasso, F., Cascio, M.G., Bisogno, T., Di Marzo, V., Hospodar–Scott, K., and Brown, D.R. (2002). Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. Gastroenterology *123*, 227–234.

Piscitelli, F., Carta, G., Bisogno, T., Murru, E., Cordeddu, L., Berge, K., Tandy, S., Cohn, J.S., Griinari, M., Banni, S., et al. (2011). Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. Nutr. Metab. *8*, 51.

Poirier, B., Bidouard, J.-P., Cadrouvele, C., Marniquet, X., Staels, B., O'Connor, S.E., Janiak, P., and Herbert, J.-M. (2005). The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. Diabetes Obes. Metab. *7*, 65–72.

Popkin, B.M. (2004). The Nutrition Transition: an Overview of World Patterns of Change. Nutr. Rev. *62*, S140–S143.

Popkin, B.M. (2005). Using research on the obesity pandemic as a guide to a unified vision of nutrition.

Porter, A.C., Sauer, J.-M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B., et al. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. *301*, 1020–1024.

Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. Exp. Cell Res. *312*, 727–736.

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet Lond. Engl. *1*, 785–789.

Ravinet Trillou, C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J.-P., and Soubrie, P. (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *284*, R345-353.

Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., and Soubrié, P. (2004). CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes. *28*, 640–648.

Ravussin, E., Valencia, M.E., Esparza, J., Bennett, P.H., and Schulz, L.O. (1994). Effects of a Traditional Lifestyle on Obesity in Pima Indians. Diabetes Care *17*, 1067–1074.

Rawls, S.M., and Benamar, K. Opioid, cannabinoid, and transient receptor potential (TRP) systems: effects on body temperature. Front. Biosci. Sch. Ed. *3*, 822.

Re, G., Barbero, R., Miolo, A., and Di Marzo, V. (2007). Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. Vet. J. Lond. Engl. 1997 *173*, 21–30.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., and Hanson, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. J. Biol. Chem. *278*, 30413–30416.

Reynisdottir, S., Wahrenberg, H., Carlström, K., Rössner, S., and Arner, P. (1994). Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta 2-adrenoceptors. Diabetologia *37*, 428–435.

Reynisdottir, S., Langin, D., Carlström, K., Holm, C., Rössner, S., and Arner, P. (1995). Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. Clin. Sci. Lond. Engl. 1979 *89*, 421–429.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Alonso, R., Shire, D., Congy, C., Soubrié, P., Brelière, J.C., and Le Fur, G. (1995). Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. Life Sci. *56*, 1941–1947.

Rising, R., Harper, I.T., Fontvielle, A.M., Ferraro, R.T., Spraul, M., and Ravussin, E. (1994). Determinants of total daily energy expenditure: variability in physical activity. Am. J. Clin. Nutr. *59*, 800–804.

Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., and Manzoni, O.J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. Proc. Natl. Acad. Sci. *99*, 8384–8388.

Roche, R., Hoareau, L., Bes-Houtmann, S., Gonthier, M.-P., Laborde, C., Baron, J.-F., Haffaf, Y., Cesari, M., and Festy, F. (2006). Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. Histochem. Cell Biol. *126*, 177–187.

Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J. Clin. Invest. *97*, 2859–2865.

Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., and Frühbeck, G. (2006). Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. FEBS Lett. *580*, 4771–4776.

Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Biochimie *87*, 125–128.

Rohrbach, K., Thomas, M.A., Glick, S., Fung, E.N., Wang, V., Watson, L., Gregory, P., Antel, J., and Pelleymounter, M.A. (2012). Ibipinabant attenuates β-cell loss in male Zucker diabetic fatty rats independently of its effects on body weight. Diabetes Obes. Metab. *14*, 555–564.

Roust, L.R., and Jensen, M.D. (1993). Postprandial Free Fatty Acid Kinetics Are Abnormal in Upper Body Obesity. Diabetes *42*, 1567–1573.

Rouzer, C.A., and Marnett, L.J. (2008). Non-redundant Functions of Cyclooxygenases: Oxygenation of Endocannabinoids. J. Biol. Chem. *283*, 8065–8069.

Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., and Guzmán, M. (2000). The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. Mol. Pharmacol. *58*, 814–820.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature *414*, 799–806.

Samuel, V.T., Liu, Z.-X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X., Monia, B.P., Bhanot, S., and Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Invest. *117*, 739–745.

Satoh, N., Shimatsu, A., Himeno, A., Sasaki, Y., Yamakage, H., Yamada, K., Suganami, T., and Ogawa, Y. (2010). Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. Diabetes Care *33*, e7.

Schoelch, C., Kuhlmann, J., Gossel, M., Mueller, G., Neumann-Haefelin, C., Belz, U., Kalisch, J., Biemer-Daub, G., Kramer, W., Juretschke, H.-P., et al. (2004). Characterization of adenosine-A1 receptor-mediated antilipolysis in rats by tissue microdialysis, 1H-spectroscopy, and glucose clamp studies. Diabetes *53*, 1920–1926.

Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase Are the Major Enzymes in Adipose Tissue Triacylglycerol Catabolism. J. Biol. Chem. *281*, 40236–40241.

Scully, T. (2012). Diabetes in numbers. Nature *485*, S2–S3.

Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *14*, 1345–1351.

Senin, L.L., Al-Massadi, O., Folgueira, C., Castelao, C., Pardo, M., Barja-Fernandez, S., Roca-Rivada, A., Amil, M., Crujeiras, A.B., Garcia-Caballero, T., et al. (2013). The Gastric CB1 Receptor Modulates Ghrelin Production through the mTOR Pathway to Regulate Food Intake. PLOS ONE *8*, e80339.

Shaul, M.E., Bennett, G., Strissel, K.J., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2010). Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. Diabetes *59*, 1171–1181.

Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. J. Clin. Invest. *116*, 3015.

Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. J. Clin. Invest. *106*, 171–176.

Sipe, J.C., Waalen, J., Gerber, A., and Beutler, E. (2005). Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). Int. J. Obes. 2005 *29*, 755–759.

Smith, A.J., Thompson, B.R., Sanders, M.A., and Bernlohr, D.A. (2007). Interaction of the Adipocyte Fatty Acid-binding Protein with the Hormone-sensitive Lipase REGULATION BY FATTY ACIDS AND PHOSPHORYLATION. J. Biol. Chem. *282*, 32424–32432.

de Souza, C.J., and Burkey, B.F. (2001). Beta 3-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans. Curr. Pharm. Des. *7*, 1433–1449.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature *453*, 783–787.

Stanton, M.C., Chen, S.-C., Jackson, J.V., Rojas-Triana, A., Kinsley, D., Cui, L., Fine, J.S., Greenfeder, S., Bober, L.A., and Jenh, C.-H. (2011). Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. J. Inflamm. *8*, 8.

Starowicz, K.M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A.A., and Di Marzo, V. (2008). Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. Obes. Silver Spring Md *16*, 553–565.

Steiner, D.F., Park, S.-Y., Støy, J., Philipson, L.H., and Bell, G.I. (2009). A brief perspective on insulin production. Diabetes Obes. Metab. *11 Suppl 4*, 189–196.

Stevens, J., Green, M.H., Kaiser, D.L., and Pohl, S.L. (1981). Insulin resistance in adipocytes from fed and fasted obese rats: dissociation of two insulin actions. Mol. Cell. Biochem. *37*, 177–183.

Storr, M., Gaffal, E., Saur, D., Schusdziarra, V., and Allescher, H.D. (2002). Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. Can. J. Physiol. Pharmacol. *80*, 67–76.

Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *25*, 2062–2068.

Sun, Y., and Chen, J. (2012). Rimonabant, Gastrointestinal Motility and Obesity. Curr. Neuropharmacol. *10*, 212.

Sun, S., Ji, Y., Kersten, S., and Qi, L. (2012). Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. Annu. Rev. Nutr. *32*, 261.

Syed, S.K., Bui, H.H., Beavers, L.S., Farb, T.B., Ficorilli, J., Chesterfield, A.K., Kuo, M.-S., Bokvist, K., Barrett, D.G., and Efanov, A.M. (2012). Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *303*, E1469–E1478.

Taghibiglou, C., Rashid-Kolvear, F., Iderstine, S.C.V., Le-Tien, H., Fantus, I.G., Lewis, G.F., and Adeli, K. (2002). Hepatic Very Low Density Lipoprotein-ApoB Overproduction Is Associated with Attenuated Hepatic Insulin Signaling and Overexpression of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in a Fructose-fed Hamster Model of Insulin Resistance. J. Biol. Chem. *277*, 793–803.

Tam, J., Vemuri, V.K., Liu, J., Bátkai, S., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S.V., Pickel, J., et al. (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. J. Clin. Invest. *120*, 2953–2966.

Tam, J., Cinar, R., Liu, J., Godlewski, G., Wesley, D., Jourdan, T., Szanda, G., Mukhopadhyay, B., Chedester, L., Liow, J.-S., et al. (2012). Peripheral Cannabinoid-1 Receptor Inverse Agonism Reduces Obesity by Reversing Leptin Resistance. Cell Metab. *16*.

Tam, J., Szanda, G., Drori, A., Liu, Z., Cinar, R., Kashiwaya, Y., Reitman, M.L., and Kunos, G. (2017). Peripheral cannabinoid-1 receptor blockade restores hypothalamic leptin signaling. Mol. Metab. *0*.

Tanti, J.-F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. Curr. Opin. Pharmacol. *9*, 753–762.

Tanti, J.-F., Ceppo, F., Jager, J., and Berthou, F. (2012). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. Front. Endocrinol. *3*, 181.

Taschler, U., Radner, F.P.W., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., Preiss-Landl, K., Jaeger, D., Reiter, B., Koefeler, H.C., et al. (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. J. Biol. Chem. *286*, 17467–17477.

Tchernof, A., Bélanger, C., Morisset, A.-S., Richard, C., Mailloux, J., Laberge, P., and Dupont, P. (2006). Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women. Diabetes *55*, 1353–1360.

Tedesco, L., Valerio, A., Dossena, M., Cardile, A., Ragni, M., Pagano, C., Pagotto, U., Carruba, M.O., Vettor, R., and Nisoli, E. (2010). Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. Diabetes *59*, 2826–2836.

Teixeira, D., Pestana, D., Faria, A., Calhau, C., Azevedo, I., and Monteiro, R. (2010). Modulation of adipocyte biology by δ(9)-tetrahydrocannabinol. Obes. Silver Spring Md *18*, 2077–2085.

Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2006). CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. Nat. Med. *12*, 671–676.

Teixeira-Clerc, F., Belot, M.-P., Manin, S., Deveaux, V., Cadoudal, T., Chobert, M.-N., Louvet, A., Zimmer, A., Tordjmann, T., Mallat, A., et al. (2010). Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. Hepatol. Baltim. Md *52*, 1046–1059.

Thornton-Jones, Z.D., Kennett, G.A., Benwell, K.R., Revell, D.F., Misra, A., Sellwood, D.M., Vickers, S.P., and Clifton, P.G. (2006). The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. Pharmacol. Biochem. Behav. *84*, 353–359.

Troy-Fioramonti, S., Demizieux, L., Gresti, J., Muller, T., Vergès, B., and Degrace, P. (2015). Acute activation of cannabinoid receptors by anandamide reduces gastrointestinal motility and improves postprandial glycemia in mice. Diabetes *64*, 808–818.

Tucci, S.A., Rogers, E.K., Korbonits, M., and Kirkham, T.C. (2004). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. Br. J. Pharmacol. *143*, 520–523.

Unger, R.H., and Zhou, Y.T. (2001). Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. Diabetes *50 Suppl 1*, S118-121.

Vague, J. (1956). The Degree of Masculine Differentiation of Obesities A FACTOR DETERMINING PREDISPOSITION TO DIABETES, ATHEROSCLEROSIS, GOUT, AND URIC CALCULOUS DISEASE. Am. J. Clin. Nutr. *4*, 20–34.

Vähätalo, L.H., Ruohonen, S.T., Mäkelä, S., Ailanen, L., Penttinen, A.-M., Stormi, T., Kauko, T., Piscitelli, F., Silvestri, C., Savontaus, E., et al. (2015). Role of the endocannabinoid system in obesity induced by neuropeptide Y overexpression in noradrenergic neurons. Nutr. Diabetes *5*, e151.

Valet, P., Berlan, M., Beauville, M., Crampes, F., Montastruc, J.L., and Lafontan, M. (1990). Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. J. Clin. Invest. *85*, 291–295.

Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O., Rössner, S., and RIO-Europe Study Group (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. Lancet Lond. Engl. *365*, 1389–1397.

Vergès, B. (2015). Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? Diabetologia *58*, 886–899.

Verty, A.N.A., Allen, A.M., and Oldfield, B.J. (2009). The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. Obes. Silver Spring Md *17*, 254–261.

Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.-H., and Sul, H.S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. J. Biol. Chem. *279*, 47066–47075.

Wagner, I.V., Perwitz, N., Drenckhan, M., Lehnert, H., and Klein, J. (2011). Cannabinoid type 1 receptor mediates depot-specific effects on differentiation, inflammation and oxidative metabolism in inguinal and epididymal white adipocytes. Nutr. Diabetes *1*, e16.

Wallenius, V., Wallenius, K., Ahrén, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C., and Jansson, J.-O. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. Nat. Med. *8*, 75–79.

Wang, J.G., Guo, Y.Z., Kong, Y.Z., Dai, S., and Zhao, B.Y. (2017). High non-esterified fatty acid concentrations promote expression and secretion of fibroblast growth factor 21 in calf hepatocytes cultured in vitro. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.

Watanabe, S., Doshi, M., and Hamazaki, T. (2003). n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *69*, 51–59.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J. Clin. Invest. *112*, 1796–1808.

Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J. Clin. Invest. *116*, 115–124.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. J. Clin. Invest. *115*, 1111–1119.

Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., and Ting, J.P.-Y. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-PYCARD inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat. Immunol. *12*, 408.

Williams, C.M., Rogers, P.J., and Kirkham, T.C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. Physiol. Behav. *65*, 343–346.

Willoughby, K.A., Moore, S.F., Martin, B.R., and Ellis, E.F. (1997). The Biodisposition and Metabolism of Anandamide in Mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. *282*, 243–247.

Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. Science *296*, 678–682.

Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. Nat. Med. *17*, 610–617.

Wright, K., Rooney, N., Feeney, M., Tate, J., Robertson, D., Welham, M., and Ward, S. (2005). Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. Gastroenterology *129*, 437–453.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., et al. (2012). Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. Cell *150*, 366.

Yang, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G.B., Chi, Y.-I., Guerin, T.M., Smart, E.J., and Liu, J. (2010). The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. Cell Metab. *11*, 194–205.

Ye, J. (2009). Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. Int. J. Obes. 2005 *33*, 54–66.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J. Biol. Chem. *277*, 50230–50236.

Yu, H., Xia, F., Lam, K.S.L., Wang, Y., Bao, Y., Zhang, J., Gu, Y., Zhou, P., Lu, J., Jia, W., et al. (2011). Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans. Clin. Chem. *57*, 691–700.

Yudkin, J.S., Stehouwer, C.D., Emeis, J.J., and Coppack, S.W. (1999). C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *19*, 972–978.

Zbucki, R.L., Sawicki, B., Hryniewicz, A., and Winnicka, M.M. (2008). Cannabinoids enhance gastric X/A-like cells activity. Folia Histochem. Cytobiol. *46*, 219–224.

Zhang, C., Klett, E.L., and Coleman, R.A. (2013). Lipid signals and insulin resistance. Clin. Lipidol. *8*, 659–667.

Zhang, X., Yeung, D.C.Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.-G., Liu, F., Wong, R.L.C., Chow, W.-S., Tso, A.W.K., Lam, K.S.L., et al. (2008). Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. Diabetes *57*, 1246–1253.

Zierath, J.R., Livingston, J.N., Thörne, A., Bolinder, J., Reynisdottir, S., Lönnqvist, F., and Arner, P. (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. Diabetologia *41*, 1343–1354.

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

Sources issus de sites internet

CEEDMM (2010) « Diabète sucré de type 2 » [En ligne] http://campus.cerimes.fr/endocrinologie/enseignement/item233b/site/html/1.html (Consulté le 06 février 2017)

FID (2015) « Atlas du Diabète de la FID, Septième édition » [En ligne] http://diabetesatlas.org/ (Consulté le 15 mai 2017)

INVS (2009) « Prévalence et incidence du diabète » [En ligne] http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Diabete/Donnees-epidemiologiques/Prevalence-et-incidence-du-diabete (Consulté le 15 mai 2017)

INVS (2016) « Prévalence du surpoids, de l'obésité et des facteurs de risque cardio-métaboliques dans la cohorte Constances » [En ligne] http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2016/35-36/2016_35-36_5.html (Consulté le 15 mai 2017)

INVS (2017) « Corpulence des enfants et des adultes en France métropolitaine en 2015. Résultats de l'étude Esteban et évolution depuis 2006 [En ligne] (http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2017/13/2017_13_1.html) (Consulté le 22 juin 2017)

OMS (2003) « Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale » [En ligne] http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42734/1/WHO_TRS_894_fre.pdf?ua=1 (Consulté le 15 mai 2017)

Roche (2012) « ObEpi-Roche 2012 : enquête nationale sur l'obésité et le surpoids » [En ligne] http://www.roche.fr/innovation-recherche-medicale/decouverte-scientifique-medicale/cardio-metabolisme/enquete-nationale-obepi-2012.html (Consulté le 15 mai 2017)

Annexes

***Annexe A* : Composition du régime standard (STD)**

SAFE
SCIENTIFIC ANIMAL FOOD & ENGINEERING
www.safe-diets.com

Aliment entretien Rats, Souris & Hamsters

A04

Photo non contractuelle

Définition

Aliment complet entretien pour rats, souris & hamsters.

Objectif Produit

Aliment rongeur destiné à des animaux adultes et en maintenance. Ne contient pas de luzerne.
A utiliser dans le cadre de protocoles expérimentaux.

Période de distribution : peut être distribué dès le sevrage et à des rongeurs adultes.

Consommation journalière : rats de 18 à 25 g, souris de 3 à 6 g, hamsters de 8 à 12 g.

Mode de distribution : ad libitum ou rationnement selon protocoles expérimentaux.

Présentation du Produit

Granulé 15 mm de diamètre. Possibilité de modifier sur demande.

Désignation	Conditionnement	Fiche contrôle	Dose d'irradiation	Statut des animaux	Code produit
A04	Sac papier 10 kg	Non	Aucune	Conventionnel	U8220G10R
A04-10	Sac papier double 10 kg	Non	>10 kiloGrays	Hétéroxénique	U8221G10R
R04-10	Sac papier sous vide 1x10 kg par carton	Non	>10 kiloGrays	Hétéroxénique	U8231G10R
R04-25	Sac papier sous vide 1x 10kg par carton	Non	>25 kiloGrays	Hétéroxénique	U8232G10R
R04-40 10x1 kg	Sac sous vide double 10 x 1kg par carton	Non	>40 kiloGrays	Axénique et Gnotoxénique	U8233G10R
A04C	Sac papier double 10 kg	Oui	Aucune	Conventionnel	U8224G10R
A04C-10	Sac papier double 10 kg	Oui	>10 kiloGrays	Hétéroxénique	U8225G10R

Tous les aliments sont disponibles conditionnés à façon, ionisés et avec une analyse complète sur demande. Egalement disponibles en farine sur demande.

Mise à jour le 22 février 2016

T: +33(0)3 86 53 76 90 • Fax: +33(0)3 86 53 35 96 • info@safe-diets.com

SAFE
SCIENTIFIC ANIMAL FOOD & ENGINEERING
www.safe-diets.com

Aliment entretien Rats, Souris & Hamsters

A04

Composition Nutritive /kg

ACIDES AMINÉS		TOTAL *
Arginine	mg	9 000
Cystine	mg	2 500
Lysine	mg	7 200
Méthionine	mg	2 800
Tryptophane	mg	1 900
Glycine	mg	8 100

ACIDES GRAS		TOTAL *
Acide palmitique	mg	5 900
Acide palmitoléique	mg	150
Acide stéarique	mg	600
Acide oléique	mg	4 800
Acide linoléique	mg	15 000
Acide linolénique	mg	1 200

MINÉRAUX		TOTAL *
P	mg	5 500
Ca	mg	7 300
Na	mg	2 500
K	mg	6 000
Mg	mg	1 600
Mn	mg	70
Fe	mg	270
Cu	mg	16
Zn	mg	55
Cl	mg	4 000

VITAMINES		TOTAL *
Vitamine A	UI	7 500
Vitamine D3	UI	1 000
Vitamine B1	mg	7
Vitamine B2	mg	6,5
Vitamine B5	mg	16,5
Vitamine B6	mg	2,6
Vitamine B12	mg	0,02
Vitamine E	mg	30
Vitamine K3	mg	2,5
Niacine	mg	75
Ac.Folic	mg	0,5
Biotine	mg	0,04
Choline	mg	1 600

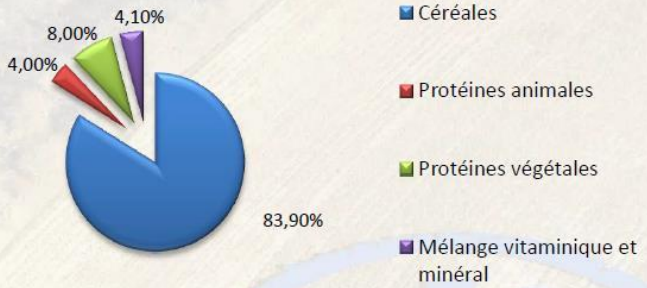
Technologie des Pellets

		Moyenne*
Diamètre	mm	16,43
Résistance à l'écrasement	kgf/cm²	22,7
Résistance à l'abrasion	%	97,3
Masse spécifique	g/l	645
Poids	g	5,319
Longueur	mm	22,64

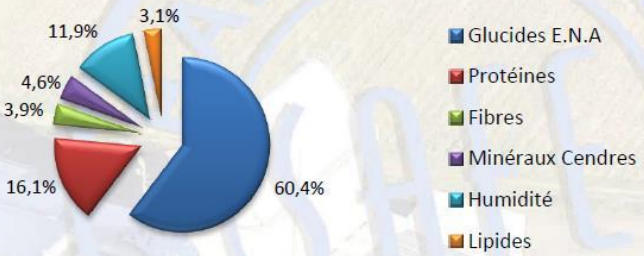
Composition

Orge, blé, maïs, tourteau d'extraction de soja, son de blé, protéine de poissons hydrolysée, phosphate bicalcique, prémélange de minéraux, carbonate de calcium, prémélange de vitamines.

Composition Centésimale en %



Composition Nutritive en %



Valeur Energétique**	Kcal/kg	Mj/kg	% Protéines	% Lipides	% Carbohydrates
Atwater	3 339	13,97	19,3	8,4	72,4
ME	3 145	13,17	-	-	-

** Information du calcul de l'Energie:
http://www.safe-diets.com/fre/produits/informations/energy/aliments-et-energie.html

Glucides E.N.A. dont		
- Amidon	(en %)	43,5
- Sucres totaux	(en %)	3,2

* Les valeurs sont données à titre d'information, il s'agit de moyennes calculées sur valeurs brutes du produit. Elles sont indicatives et n'ont pas de valeur contractuelle. Elles sont soumises à des variations liées aux conditions de production, stockage et de méthodes analytiques. Une analyse peut être réalisée sur demande.

Glucides E.N.A. : Extrait non azoté, valeur calculée.

Mise à jour le 22 février 2016

T: +33(0)3 86 53 76 90 • Fax: +33(0)3 86 53 35 96 • info@safe-diets.com

Annexe B : Composition du régime hyperlipidique (HFD)

ssniff® EF acc. D12492 (I) mod.

Experimental diet for rats and mice, very high fat content (LARD) / DIO series

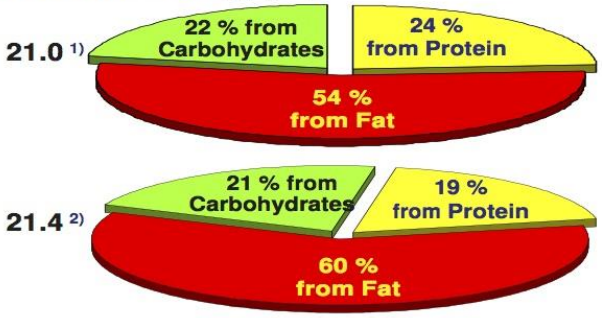
Description

The experimental diet is characterized by extremely high amounts of fat and low (original) cholesterol contents. However, the cholesterol concentration and the fat source (fatty acids) can be individually adjusted to the scientific question or to the experimental design. The feed will quickly induce obesity and promotes the development of diabetes type 2 (NIDDM), because of the high fat content and the saturated fatty acids. The feeding period until first clinical symptoms might be observed depends largely on the mouse strain and the previous dietary history (fat supply).

Crude Nutrients	[%]
Dry matter	97.1
Crude protein (N x 6.25)	24.1
Crude fat	**34.0**
Crude fibre	6.0
Crude ash	6.0
N free extracts	27.1
Starch	1.1
Sugar / Dextrines	**23.8**

Energy	[MJ/kg]
Gross Energy (GE)	**24.0**

Metabolizable Energy (ME)



[1] *ME calculated according to the pig formula, Annex 4 of the German feed regulation*

[2] *ME calculated with the Atwater factors*

Minerals	[%]
Calcium	1.03
Phosphorus	0.61
Sodium	0.20
Magnesium	0.17
Potassium	1.00

Fatty acids	[%]
C 8:0	—
C 10:0	0.04
C 12:0	0.07
C 14:0	0.44
C 16:0	7.72
C 16:1	0.94
C 17:0	—
C 18:0	4.34
C 18:1	13.57
C 18:2	4.75
C 18:3	0.51
C 20:0	0.02
C 20:1	0.01
C 20:4	0.53
C 20:5	—
C 22:6	—
Cholesterol [mg/kg] (original content)	**265**

Amino acids	[%]
Lysine	1.98
Methionine	0.83
Cystine	0.46
Met+Cys	1.28
Threonine	1.07
Tryptophan	0.31
Arginine	0.88
Histidine	0.76
Valine	1.64
Isoleucine	1.25
Leucine	2.36
Phenylalanine	1.29
Phe+Tyr	2.57
Glycine	0.50
Glutamic acid	5.41
Aspartic acid	1.79
Proline	2.76
Alanine	0.79
Serine	1.43

Vitamins	per kg
Vitamin A	15,000 IU
Vitamin D_3	1,500 IU
Vitamin E	150 mg
Vitamin K (as menadione)	20 mg
Vitamin C	30 mg
Thiamin (B_1)	16 mg
Riboflavin (B_2)	16 mg
Pyridoxine (B_6)	18 mg
Cobalamin (B_{12})	30 µg
Nicotinic acid	45 mg
Pantothenic acid	55 mg
Folic acid	19 mg
Biotin	310 µg
Choline-Chloride	2,300 mg
Inositol	80 mg

Trace elements	per kg
Iron	139 mg
Manganese	82 mg
Zinc	56 mg
Copper	12 mg
Iodine	0.97 mg
Selenium	0.13 mg
Cobalt	0.13 mg

Feed composition
On request

Main products

E15742-34 10 mm pellets, Colour BLUE

E15742-347 10 mm pellets, Colour BLUE, 25 kGy
γ-irradiated is *vitamin fortified*

Production and sale
ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone:+49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

* *Research Diets Inc.*

Annexe C : Protocole d'étude pour les biopsies de TAV et TASC humain

ID RCB : 2015-A01619-40

Acronyme : CBR1

Utilisation de biopsies de graisse sous-cutanée abdominale pour l'étude du rôle de l'activation des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) sur le métabolisme glucido-lipidique adipocytaire

Etude CB1R

Version 2 du 12/08/2016
Approuvée le 22/09/2016 par le CPP Est I

Version 1.1 du 29/09/2015
Approuvée le 07/01/2016 par le CPP Est I

Catégorie de la recherche : Evaluation des soins courants

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONATEUR
CHU de DIJON 14 rue Gaffarel 21079 DIJON Tel : 03-80-29	Monsieur le Professeur **Bruno Vergès** CHU de DIJON **Service d'Endocrinologie** 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.38.54 Fax : 03.80.29.35.19 bruno.verges@chu-dijon.fr

Assurance :
Société Hospitalière d'Assurances Mutuelles (SHAM)
Police n° 129.234

Investigateurs et structure administrative de l'étude

Promoteur	CHU DE DIJON 14, rue Gaffarel 21079 DIJON CEDEX
Responsable de la Recherche	Direction de la recherche clinique et de l'innovation Madame Florence MARTEL 14, rue Gaffarel 21079 DIJON CEDEX 03.80.29.50.13
Investigateur coordonnateur	Monsieur le Professeur **Bruno Vergès** CHU de DIJON **Service d'Endocrinologie** 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.38.54 Fax : 03.80.29.35.19 bruno.verges@chu-dijon.fr
Investigateur principal	Monsieur le Professeur **Pablo ORTEGA DEBALLON** CHU de DIJON **Service de Chirurgie Digestive et Cancérologique** 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.37.47
Méthodologiste / Statisticien	Monsieur le Professeur **Bruno Vergès** CHU de DIJON **Service d'Endocrinologie** 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.29.38.54. Fax : 03.80.29.35.19 bruno.verges@chu-dijon.fr
Responsable de la vigilance	Madame le Docteur Camille FLECK CHU de DIJON Centre Régional de Pharmacovigilance 14 rue Gaffarel 21079 DIJON Cedex Tél : 03.80.29.54.31– Fax : 03.80.29. 37.23 vigilance.ec@chu-dijon.fr
Investigateurs (médecins thèsés)	Liste fournie dans un document indépendant

SYNOPSIS

Titre de l'étude	**Utilisation de biopsies de graisse sous-cutanée abdominale pour l'étude du rôle de l'activation des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) sur le métabolisme glucido-lipidique adipocytaire**
N° d'enregistrement	**2015-A01619-40**
Promoteur	**Centre Hospitalier Universitaire de Dijon**
Investigateurs	Coordonnateur : Pr Bruno BERGES (service d'endocrinologie) Principal : Pr Pablo ORTEGA DEBALLON (service de chirurgie digestive et cancérologique)
Rationnel	L'obésité abdominale et le diabète de type 2 sont associés à une hyperactivation du système endocannabinoïde et plusieurs études chez l'animal et chez l'Homme indiquent que les récepteurs CB1 (CB1R) périphériques du système endocannabinoïde pourraient également être impliqués dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique. Le rôle précis des récepteurs CB1R du tissu adipeux viscéral dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique demeure inconnu chez l'Homme. Il apparaît essentiel de préciser, chez l'Homme, le rôle des CB1R localisés dans les tissus périphériques et en particulier dans le tissu adipeux, dans le contrôle de l'homéostasie glucido-lipidique. En effet, si les données humaines confirment les données animales attestant d'un rôle essentiel du système endocannabinoïde périphérique dans la régulation des métabolisme glucidique et lipidique, cela ouvrira une voie de recherche majeure dans le développement de molécules antagonistes CB1R (type rimonabant) mais à action exclusivement périphérique (ne passant pas la barrière méningée afin d'éviter les effets secondaires psychiatriques) pour le traitement de l'obésité métabolique et du diabète de type 2.
Objectifs de la recherche	OBJECTIF PRINCIPAL: - Déterminer les effets de l'activation du système endocannabinoïde sur le métabolisme glucido-lipidique du tissu adipeux humain viscéral et sous-cutané. OBJECTIFS SECONDAIRE : - Tester les effets de nouvelles molécules antagonistes des CB1R à action périphérique sur le métabolisme du tissu adipeux
Critères d'évaluation de l'étude	• CRITERES D'EVALUATION PRINCIPAUX 1. **Aucun critère d'évaluation clinique** puisque les traitements expérimentaux seront réalisés ex vivo sur des biopsies de tissu adipeux 2. Effets de l'activation des récepteurs CB1 du système endocannabinoïde (SEC) sur les paramètres suivants : - Activité du SEC par mesure des ARNm CB1R et dosage des endocannabinoïdes (collaboration). - Oxydation des acides gras : Catabolisme de l'acide palmitique [1-14C], mesure de la consommation d'O2 (électrode de Clark). - Estérification des acides gras et lipogenèse : Uptake de l'acide palmitique [1-14C], Uptake du [14C]-glucose, activité de la FAS, analyse CPG des acides gras, activité LPL, western-blotting p-ACC, p-Akt, AMPK. - Activité lipolytique (dosage glycérol et acides gras libres) et voies de signalisation impliquées (western-blotting voies de l'AMPc et de insuline) - Production d'adipokines (dosage BioPlex et Elisa) - Régulation génique : Expression des ARNm codant pour des protéines du métabolisme glucido-lipidique, du SEC et des facteurs de transcription par RT-PCR

	en temps réel. • CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES Les mêmes que les critères principaux avec stimulation du système endocannabinoïde par nouvelles molécules antagonistes des CB1R à action périphérique (molécules élaborées en collaboration avec l'université de Nantes)
Nombre de participants prévu	15 prélèvements exploitables sont prévus pour la participation à cette recherche biomédicale
Sélection des sujets	• Critères d'inclusion - homme âgé de 18 à 70 ans - personne ayant donné son accord oral - devant subir une chirurgie pour hernie (Pr P. Ortega Deballon) • Critères de non inclusion - personne non affiliée à un régime de sécurité sociale - BMI > 30 - diabète - pathologie associées : cancer, maladies inflammatoires chroniques - adulte protégé
Evaluation des bénéfices et des risques attendus	Etude ex-vivo sur échantillons de tissu adipeux de faible volume (quelques cm3) prélevés lors d'une intervention chirurgicale programmée. Pas de risque particulier à prévoir pour les patients.
Déroulement de l'étude	• DESCRIPTION CHRONOLOGIQUE DE L'ETUDE 1. Information de la personne participant à la recherche 2. Recueil de son accord oral 3. Prélèvement de tissu adipeux (chirurgie) 4. Expérimentations in vitro
Collection d'échantillons biologiques	NA : utilisation des échantillons biologiques dans le cadre du projet avec destruction à la fin de cette recherche
Traitements, produits, utilisés	Non applicable
Posologie, voie d'administration et durée d'administration	Non applicable
Analyse statistique	Justification du nombre de personnes nécessaires Même si l'ensemble des tests prévus devrait pouvoir être réalisés à partir d'un seul prélèvement (répartition du tissu adipeux prélevé en lots multiples), il paraît indispensable de répéter les expériences afin de s'affranchir des différences inter-individus. Un nombre de 15 prélèvements exploitables est suffisant pour s'affranchir de telles différences et permettra l'obtention de résultats interprétables avec une puissance statistique acceptable. La majorité des études ex-vivo réalisées sur du tissu humain sont réalisées sur des groupes de 6 à 10 personnes Tests utilisés Les moyennes des données obtenues avant puis après stimulation seront comparées par un test non paraméttrique pour données appariées (T de Wilcoxon). Les differences seront considérées significatives at $P<0.05$. Logiciel utilisé : GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA.
Résultats attendus et alternative	Des résultats obtenus chez la souris in vivo et in vitro à partir d'explants de tissu adipeux indiquent que l'activité lipolytique est fortement stimulée en présence d'anandamide et suggèrent que c'est l'action anti-lipolytique de l'insuline qui est

	diminuée. Ainsi, ces données convergent vers une hypothèse nouvelle selon laquelle l'activation des CB1R du tissu adipeux conduit à une stimulation de la lipolyse dépendante d'une altération du signal insulinique. Ce projet devrait nous permettre de vérifier si l'activation du système endocannabinoïde conduit aux mêmes effets sur le tissu adipeux humain et de montrer que l'inactivation du système endocannabinoïde par le blocage des CB1R périphériques pourrait bien constituer une piste thérapeutique pour améliorer l'insulino-résistance et les dyslipidémies associées à l'obésité.
Calendrier Prévisionnel	- durée de la période d'inclusion : 12 mois - durée totale de participation pour une personne se prêtant à la recherche : durée de l'intervention chirurgicale - durée totale de l'étude (inclusion + suivi éventuel) : 1 jour Période d'exclusion pour la personne : non Période d'exclusivité pour la personne : non

Annexe D* : *Publication (Troy-Fioramonti et al., 2015)

Stephanie Troy-Fioramonti, Laurent Demizieux, Joseph Gresti, Tania Muller, Bruno Vergès, and Pascal Degrace

Acute Activation of Cannabinoid Receptors by Anandamide Reduces Gastrointestinal Motility and Improves Postprandial Glycemia in Mice

Diabetes 2015;64:808–818 | DOI: 10.2337/db14-0721

METABOLISM

The endocannabinoid system (ECS) is associated with an alteration of glucose homeostasis dependent on cannabinoid receptor-1 (CB1R) activation. However, very little information is available concerning the consequences of ECS activation on intestinal glucose absorption. Mice were injected intraperitoneally with anandamide, an endocannabinoid binding both CB1R and CB2R. We measured plasma glucose and xylose appearance after oral loading, gastrointestinal motility, and glucose transepithelial transport using the everted sac method. Anandamide improved hyperglycemia after oral glucose charge whereas glucose clearance and insulin sensitivity were impaired, pointing out some gastrointestinal events. Plasma xylose appearance was delayed in association with a strong decrease in gastrointestinal transit, while anandamide did not alter transporter-mediated glucose absorption. Interestingly, transit was nearly normalized by coinjection of SR141716 and AM630 (CB1R and CB2R antagonist, respectively), and AM630 also reduced the delay of plasma glucose appearance induced by anandamide. When gastric emptying was bypassed by direct glucose administration in the duodenum, anandamide still reduced plasma glucose appearance in wild-type but not in CB1R$^{-/-}$ mice. In conclusion, our findings demonstrated that acute activation of intestinal ECS reduced postprandial glycemia independently on intestinal glucose transport but rather inhibiting gastric emptying and small intestine motility and strongly suggest the involvement of both CB1R and CB2R.

The endocannabinoid system (ECS) consists of cannabinoid receptors (CBRs), endocannabinoids, and enzymes involved in their synthesis and degradation. The two main receptors, CB1R and CB2R, are both G protein–coupled receptors differing structurally and by their tissue localization. Whereas CB2Rs are mainly expressed in the immune system, CB1Rs are abundantly present in the central nervous system and to a lower extent in peripheral tissues (1). Arachidonoyl ethanolamide (anandamide) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) are the two best-characterized endogenous cannabinoids produced in the brain and peripheral tissues that bind CB1R and CB2R with no marked selectivity (2) to activate or inactivate metabolic pathways similarly to Δ9-THC (tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzopyran-1-ol), the major active constituent of marijuana (1,3).

It is now well established that the ECS is involved in many biological functions, including the regulation of energy balance and the pathogenesis of obesity. Obesity is associated with central ECS overactivation, and since activation of CB1R in the brain stimulates food intake, ECS appears to be located at the center of a vicious circle inducing weight gain and related disorders (4,5). However, even if the CB1R-dependent stimulation of food intake may be the main initial cause of various metabolic deregulations associated with obesity, several data collected from animal and human studies using the specific CB1R antagonist SR141716 (rimonabant) suggested that peripheral ECS might also directly regulate energy metabolism

INSERM 866, Team Pathophysiology of Dyslipidemia, University of Burgundy, Dijon, France

Corresponding author: Pascal Degrace, pascal.degrace@u-bourgogne.fr.

Received 6 May 2014 and accepted 1 October 2014.

This article contains Supplementary Data online at http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db14-0721/-/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.

(6–8). It was recently reported that activation of peripheral CB1R signaling in key tissues relevant to insulin action is associated with alteration of glucose homeostasis and contributes to diet-induced insulin resistance in mice (9–11). Nevertheless, very little information is available concerning the impact of peripheral ECS activation on intestinal glucose absorption that is however the major determinant of how quickly glucose appears in the circulation during the fed state.

The presence of a functional ECS in the gastrointestinal tract has been pointed out in many species (12–14), and available evidence suggests that cannabinoids reduce gastric and intestinal motility (15,16), but the consequences on plasma glucose appearance were poorly studied. However, consistent data indicate the existence of a positive relationship between gastrointestinal motility and plasma glucose appearance in healthy and diabetic patients (17–19). We therefore investigated the impact of acute activation of CBR by anandamide on postprandial glycemia, recognized as an important component of the overall glycemic control (20,21). Our data showed that activation of gastrointestinal ECS improved postprandial glycemia and further indicated this was associated with neither an increase in glucose clearance nor a decrease in intestinal transport but rather with a reduction in gastrointestinal motility involving both CB1R and CB2R.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and Diets

Official French regulations (no. 87848) for the use and care of laboratory animals were followed throughout the experimental period. The experimental protocol was approved by the local ethic committee for animal experimentation (BX0622). Eleven-week-old C57BL/6J male mice (JANVIER LABS, Le Genest Saint Isle, France) and global $CB1R^{-/-}$ mice (gift from Dr. James Pickel, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD) were housed individually on a 12/12-h light/dark schedule at 22–23°C with ad libitum access to water and food (Standard Diet AO4; UAR, Epinay-sur-Orge, France). A group of mice was subject to a high-fat diet (30% lard) manufactured by SSNIF (Soest, Germany). After 16 weeks of diet, animals with a weight gain less than +10 g compared with controls were excluded from the study. Diet-induced obesity (DIO) mice (39.1 ± 1.1 vs. 27.3 ± 0.9 g, DIO vs. control) were glucose intolerant and insulin resistant (Supplementary Fig. 2*A* and *B*). On the day of each experiment, food was removed from the cages for 6 h (from 8:00 A.M. to 2:00 P.M.).

Drugs

Anandamide, AM630, AM6545, and exendin 9-39 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), and SR141716 was provided by Sanofi (Paris, France). Anandamide and CBR antagonists were prepared in 4% DMSO/1% Tween 80 and administered intraperitoneally at 10 mg/kg. In control experiments, animals were injected with vehicle (4% DMSO/1% Tween 80).

Glucose, Xylose, and Insulin Tolerance Tests

For glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test, mice respectively received a glucose load (2 g/kg) or insulin intraperitoneal injection (0.5 UI/kg, Actrapid; Novo Nordisk, La Défense, France). For GTT, a D-glucose solution (20% weight for volume) was either injected intraperitoneally (intraperitoneal GTT) or given orally (oral GTT [OGTT]). Oral D-xylose loading test (OXT) consisted in the administration of a D-xylose solution (10% weight for volume; 1 g/kg body weight). Drugs were administered intraperitoneally to 6-h fasting mice 10 min before glucose, xylose, or insulin. Each treatment was tested with a 1-week interval on the same series of mice in the same conditions. Glycemia was measured directly in blood sampled from the tail with a My Life Pura glucose meter (Ypsomed, Paris, France). In some OGTT experiments, blood (25 μL) from tail vein was collected in chilled tubes containing EGTA and DPPIV inhibitor (Millipore S.A.S., Molsheim, France) for determination of insulin, glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), and GLP-1 concentration with a Bio-Plex Mouse Diabetes Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). In OXT, some control experiments included oral administration of phlorizin (Sigma-Aldrich) as a sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT-1) inhibitor, 15 min before the first injection. Plasma xylose concentrations were measured with a spectrophotometric kit (Megazyme, Wicklow, Ireland).

Intestinal Glucose Transport

Wistar rats (JANVIER LABS) weighing 250–300 g were anesthetized by intraperitoneal injection of 50 mg/kg sodium pentobarbital. Two 5-cm proximal jejunum segments (5 cm from the ligament of Treitz) were taken from each animal and prepared as previously described (22). In brief, sleeves were flushed, everted, and mounted in a 15-mL centrifuge tube. The installation allowed the introduction of buffer into the sac (serosal compartment) and the collection of samples periodically. Sacs were filled with 200 μL buffer consisting of 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L KH_2PO_4, 4 mmol/L K_2HPO_4, and 5 mmol/L fructose, pH 7.4, and immersed in 14 mL of the same buffer (mucosal compartment) added with 0.1 μmol/L or 30 mmol/L D-glucose. [^{14}C]D-glucose (3.2 μCi/μmole; PerkinElmer, Courtaboeuf, France) was used as a marker to quantify transporter-mediated uptake from the mucosal to the serosal compartment. Fragments were incubated for 40 min at 37°C in the presence of anandamide (5 μmol/L) or vehicle added both in the serosal and mucosal compartment. A 30-μL sample was collected from the serosal compartment every 10 min and replaced with an equivalent volume of glucose-free buffer. Samples were mixed with 4.5 mL of Ultima Gold XR liquid scintillation cocktail (PerkinElmer) and radiolabeled glucose counted by a Packard Tricarb 2000 counter (PerkinElmer).

Gastrointestinal Transit

Transit through the stomach and small intestine was measured by administering a nonabsorbed marker (10% charcoal suspension in 5% gum arabic) as previously

described (23). In brief, fasting mice were injected intraperitoneally with anandamide and CBR antagonists respectively 10 and 30 min before gavage with 0.2 mL of the charcoal suspension. Animals were killed by cervical dislocation 25 min later. The entire small intestine was removed, and the distance from the pylorus to the front of the charcoal bolus was measured. Transit rate was calculated as [(distance to charcoal front)/(total length from pylorus to cecum)] × 100 (%).

RT-PCR

Total mRNAs were extracted with Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France), and 1 μg RNA was reverse transcribed using the Iscript cDNA kit (Bio-Rad). Real-time PCR was performed as described previously (24) using a StepOnePlus real-time PCR system (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Primer sequences used for amplification were as follows: forward ccgcaaagatagtcccaatg and reverse aaccccacccagtttgaac for CB1R, forward ccgcaaagatagtcccaatg and reverse aaccccacccagtttgaac for CB2R, and forward ccgcaaagatagtcccaatg and reverse aaccccacccagtttgaac for TATA box binding protein. For each gene, a standard curve was established from four cDNA dilutions (1/10 to 1/10,000) and used to determine the relative gene expression variation after normalization with TATA box binding protein expression.

Statistical Analysis

Results are expressed as means ± SEM. Data were analyzed statistically with GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) using two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test, or using Student *t* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Anandamide Prevents Hyperglycemia Induced by Oral Glucose Loading

To evaluate the impact of CBR activation on whole-body glucose homeostasis, we first assessed glucose tolerance after a single intraperitoneal anandamide injection (10 mg/kg). In order to respect the natural route of nutrient administration, we performed OGTT (2 g/kg). Interestingly, the increase in glycemia in response to glucose ingestion was considerably smaller in mice treated with anandamide compared with control, and this was associated with an improvement of glucose tolerance as illustrated by the AUC_{0-2h} calculations (Fig. 1).

Anandamide Alters Blood Glucose Clearance and Insulin Sensitivity

To determine whether anandamide affected tissue glucose utilization, we measured glucose clearance after intraperitoneal administration (intraperitoneal GTT, 2 g/kg). In these conditions, excluding any involvement of the gastrointestinal tract, results indicated that anandamide induced glucose intolerance (Fig. 2*A*) and prevents insulin (intraperitoneal injection, 0.5 UI/kg) to rapidly decrease plasma glucose compared with controls (Fig. 2*B*). Figure 2*C* also showed that anandamide did not decrease fasting glycemia; rather, drug injection even induced a rapid elevation of $t_{0-15\ min}$ plasma glucose levels (+29.69 ± 2.68% for anandamide vs. 11.3 ± 2.87% for vehicle).

Anandamide-Induced Improvement of Postprandial Glycemia Is Not Dependent on a Reduction of Intestinal Glucose Transport

To explore the possibility of an alteration of intestinal glucose absorption in anandamide-injected mice, we first performed an OXT (1 g/kg), an investigative tool to study small intestinal function (25). To verify that OXT accurately reflected the efficiency of glucose absorption, OGTT and OXT were also performed in the presence of phlorizin, a potent inhibitor of the SGLT-1 (26). Results confirmed that phlorizin suppressed both plasma appearance of glucose (data not shown) and xylose in response to oral glucose and xylose load, respectively (Fig. 3*A*). Using this method, we interestingly observed that plasma xylose

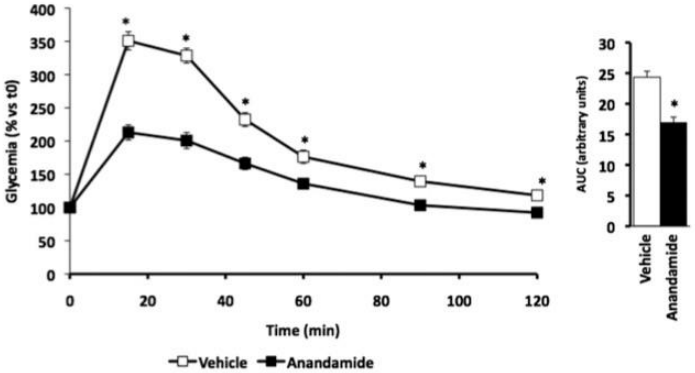


Figure 1—Anandamide reduces hyperglycemia induced by oral glucose loading. Mice were subject to OGTT (2 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated time points after glucose loading. Data represent % variation from basal glycemia during OGTT expressed as means ± SEM (n = 20) and corresponding AUC_{0-2h} calculations. Glycemia values expressed as mg/dL are presented in Supplementary Fig. 1. *$P < 0.05$ vs. corresponding value in vehicle-treated mice.

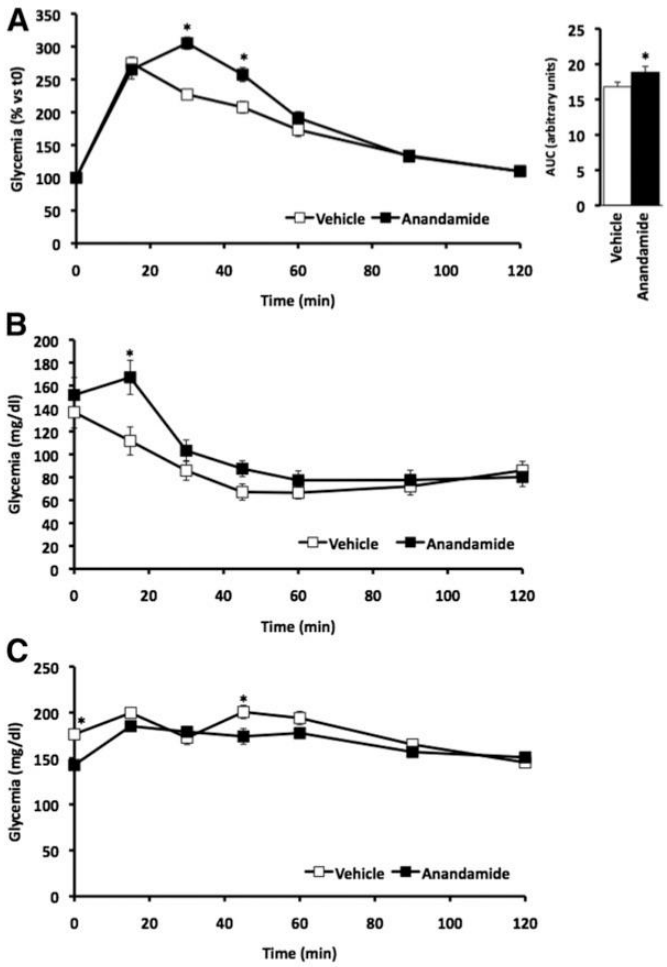


Figure 2—Effect of anandamide on blood glucose clearance and insulin sensitivity. *A*: Intraperitoneal GTT (2 g/kg) and corresponding AUC_{0-2h} calculations. *B*: Insulin tolerance test (ITT, 0.5 UI/kg). *C*: Fasting glycemia monitoring. For all experiments, blood samples were collected from the tail tip vein of wild-type mice at the indicated time points, 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Results are expressed as means ± SEM (n = 10). *P < 0.05 vs. corresponding value in vehicle-treated mice.

appearance was strongly delayed in response to anandamide injection compared with vehicle whereas the maximum plasma levels were not different (Fig. 3*A*), suggesting that anandamide did not alter *trans* epithelial transport. To further investigate this notion, the direct effect of anandamide on intestinal glucose transport was evaluated using jejunal everted sacs exposed either to low glucose (10 μmol/L) or high glucose (30 mmol/L) concentration to study respectively SGLT-1– and GLUT-2–mediated transport. As expected, glucose transport was strongly inhibited by phlorizin in 10 μmol/L glucose experiments (Fig. 3*B*) and by the combination of both phlorizin and phloretin in 30 mmol/L glucose experiments (Fig. 3*C*). On the other hand, we did not observe any effect of anandamide on transporter-mediated uptake of glucose in comparison with vehicle whatever the concentration tested (Fig. 3*B* and *C*).

Anandamide-Induced Delay in Plasma Glucose Appearance Is Associated With a Decrease in Gastrointestinal Motility

The effect of acute anandamide treatment on gastrointestinal motility was evaluated using the charcoal meal test. The distance traveled by the nonmetabolizable charcoal solution in the small intestine 25 min after gavage was considerably reduced after administration of anandamide compared with vehicle (Fig. 4*A*), suggesting that the drug decreased either gastric emptying or small intestine motility or both. To determine whether the delay in plasma glucose appearance induced by anandamide

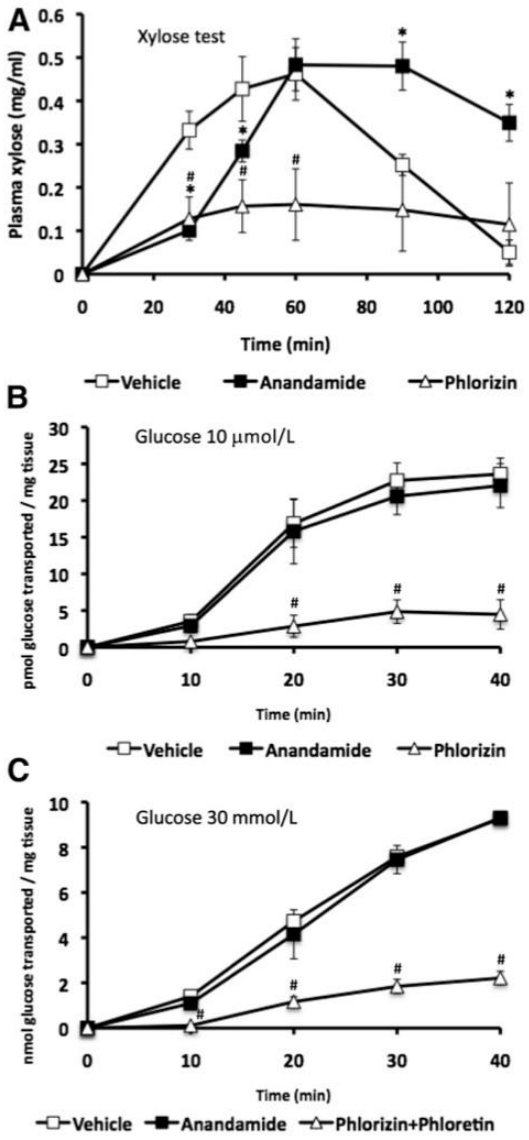


Figure 3—Effect of anandamide on intestinal glucose transport. *A*: Mice were subject to oral xylose loading test (OXT, 1 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. A series of mice received an oral dose of phlorizin (200 mg/kg) 15 min before OXT. Plasma xylose appearance was determined in blood samples collected from the tail tip vein at the indicated time points after xylose loading. Values are expressed as means ± SEM (n = 6 per group). *P < 0.05, anandamide vs. corresponding value in vehicle-treated mice. #P < 0.05, phlorizin vs. corresponding value in vehicle-treated mice. *B*: SGLT-1–mediated glucose transport measured in rat everted jejunal fragments incubated with 10 µmol/L [^{14}C]D-glucose in the presence of anandamide (5 µmol/L) or vehicle. In some experiments, phlorizin (0.2 mmol/L) was added into the medium to inhibit SGLT-1 transport. *C*: GLUT-2–mediated glucose transport measured in rat everted jejunal fragments incubated with 30 mmol/L [^{14}C]D-glucose in the presence of anandamide (5 µmol/L) or vehicle. In some experiments, phlorizin (0.2 mmol/L) and phloretin (1 mmol/L) were added into the medium to inhibit both SGLT-1 and GLUT-2 transport. For *B* and *C*, values are pico- or nanomoles glucose transported per milligram of tissue, expressed as means ± SEM (n = 5 per group). #P < 0.05, inhibitors vs. corresponding value in vehicle-treated segments.

was exclusively due to a slower gastric emptying, we next performed a GTT in response to a direct duodenal load. In these conditions, plasma glucose levels were significantly lower at t = 15 min after infusion in anandamide-treated mice compared with control mice (Fig. 4*B*). Furthermore, we noticed both in duodenal GTT and OXT that anandamide delayed absorption without affecting maximal blood glucose and xylose levels, suggesting that anandamide could reduce small intestine motility. We also tested the possibility that the inhibitory action of the drug could be limited due to its rapid degradation in cells and tissues (27). To verify this hypothesis, two successive doses of anandamide (at t = 10 and t = 0 min) were administered during duodenal GTT. Results showed a prolonged effect of the drug as it further delayed maximal blood glucose associated with a glucose intolerance as indicated by AUC_{0-120} (Fig. 4*B*), suggesting that a steady-state activation of CBR would profoundly alter glucose absorption and plasma clearance. Remarkably, glucose absorption was no more altered by anandamide when duodenal GTT was performed in CB1R$^{-/-}$ mice (Fig. 4*C*).

Anandamide-Induced Improvement of Hyperglycemia Is Not Mediated by Incretins

GIP and GLP-1 are rapidly released from enteroendocrine cells of the small intestine in response to food ingestion. Both stimulate insulin secretion in a glucose-dependent manner in order to tightly control postprandial glycemia (28). As we showed that anandamide prevents hyperglycemia when glucose was given orally, we investigated whether anandamide's effect on blood glucose was mediated by incretin-dependent stimulation of insulin production. We showed that plasma GIP, GLP-1, and insulin levels were strongly lower in anandamide-injected animals during OGTT (Fig. 5*A*). In addition, when glucose clearance was measured in the presence of the GLP-1R antagonist exendin 9-39 (to block the action of GLP-1 on pancreas β-cells), the effect of anandamide on glycemia was not prevented (Fig. 5*B*).

Anandamide-Induced Reduction in Gastrointestinal Transit and Plasma Glucose Appearance Involve both CB1R and CB2R

The role of CB1R and CB2R in controlling gastrointestinal motility and postprandial glycemia was approached using different CBR antagonists. The inhibitory effect of anandamide on transit was partially abrogated when mice were pretreated with specific CB1R antagonist SR141716 or AM6545, the action of the latter being restricted to the periphery (Fig. 6*A*). Whereas the CB2R antagonist AM630 also slightly limited the effect of anandamide, the coinjection of AM630 and SR141716 nearly normalized gastrointestinal

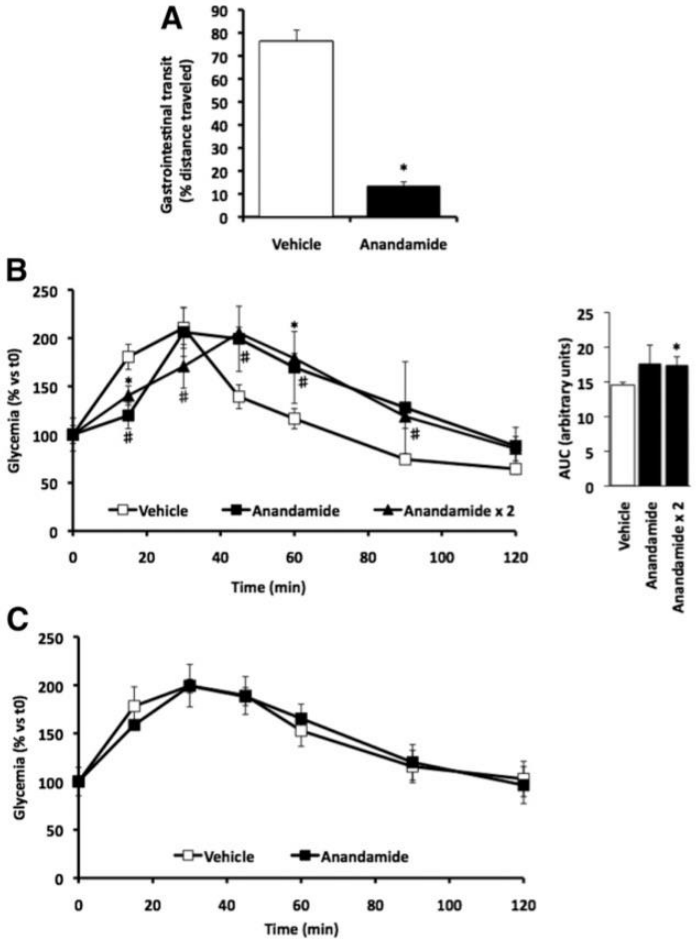


Figure 4—Effect of anandamide on gastrointestinal motility and on glycemia after duodenal glucose loading. *A*: Wild-type mice received by gavage 0.2 mL of a nonmetabolizable solution of charcoal 10 min after a single intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Mice were killed 25 min later, and distance from the pylorus to the front of the charcoal bolus was measured. Transit rate corresponds to [(distance to charcoal front)/(total length from pylorus to cecum)] × 100 (%) expressed as means ± SEM (n = 6 per group). *P < 0.05, anandamide vs. vehicle-treated mice. *B*: Wild-type mice were subject to intraduodenal GTT (DGTT, 1 g/kg) after one or two consecutive intraperitoneal injections of anandamide (10 mg/kg) or vehicle, the first 10 min before the beginning of DGTT and the second at t = 15 min (anandamide × 2) after glucose infusion. Results represent % variation from basal glycemia during glucose challenge and corresponding AUC_{0-2h} calculations. *C*: $CB1R^{-/-}$ mice were subject to DGTT (1 g/kg) 10 min after a single intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. For experiments *B* and *C*, blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated time points. Values are expressed as means ± SEM (n = 7 per group). *P < 0.05 anandamide and #P < 0.05, anandamide × 2 vs. corresponding value in vehicle-treated mice.

transit (Fig. 6*A*). It was concomitantly observed that the delay of plasma glucose appearance induced by anandamide during OGTT was minored in the presence of AM630 (Fig. 6*B*). Besides, in the stomach of these animals, molecular analysis revealed the presence of much higher levels of CB2R mRNA compared with CB1R mRNA (Fig. 6*C*).

Anandamide Causes CB2R-Mediated Reduction in Plasma Glucose Appearance in $CB1R^{-/-}$ Mice

To further investigate the contribution of CB2R on postprandial glycemia, OGTT and OXT were performed in $CB1R^{-/-}$ mice. Plasma glucose and xylose levels were also altered by anandamide during carbohydrate challenge in $CB1R^{-/-}$ mice (Fig. 7*A* and *B*). However plasma xylose appearance was far more reduced by anandamide in wild-type mice than in $CB1R^{-/-}$ (Fig. 7*B*), suggesting that the action of the drug was largely mediated by CB1R but also by CB1R-independent mechanisms. In line with this hypothesis, we showed that AM630 partially counteracted the action of anandamide on plasma glucose levels during OGTT performed in $CB1R^{-/-}$ mice (Fig. 7*A*). Interestingly, we also observed that $CB1R^{-/-}$ mice exhibited

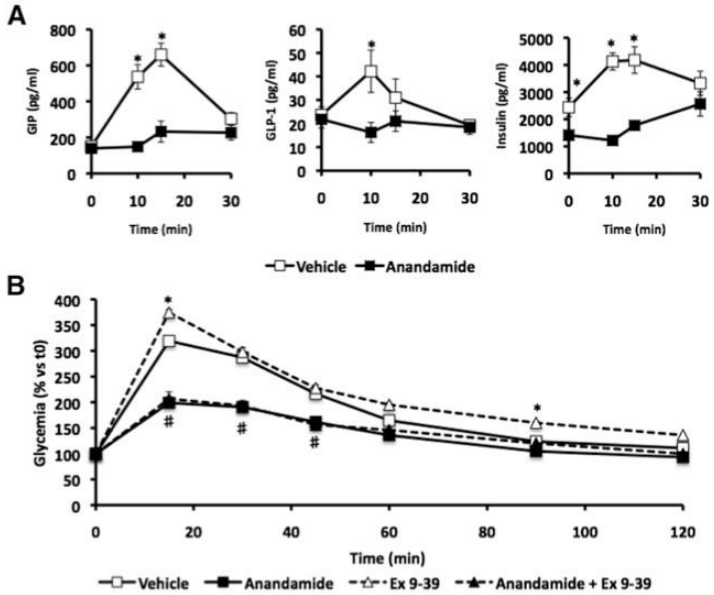


Figure 5—Effect of anandamide on plasma glucose appearance during OGTT is not mediated by incretins. *A*: Mice were subject to OGTT (2 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated time points for GIP, GLP-1, and insulin assay. Values are expressed as means ± SEM (n = 6). *P < 0.05, anandamide vs. corresponding value in vehicle-treated mice. *B*: Mice were subject to OGTT (2 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg), exendin 9-39 (Ex 9-39; 170 μg/kg), Ex 9-39 in combination with anandamide, or vehicle. Results represent % variation from basal glycemia during OGTT. Values are expressed as means ± SEM (n = 10). *P < 0.05, Ex 9-39 vs. vehicle; #P < 0.05, anandamide and anandamide + Ex 9-39 vs. vehicle.

a much slower gastrointestinal motility compared with wild type and that AM630 strongly improved transit (Fig. 7*C*). As glucose absorption was no longer altered by anandamide during duodenal GTT in CB1R$^{-/-}$ mice (Fig. 4*C*), it could be advanced that the delay in glucose absorption in CB1R$^{-/-}$ mice observed during OGTT was consecutive to a slowing down of gastric emptying induced by stomach CB2R activation.

Anandamide-Induced Inhibition of Glucose Appearance Is Amplified in Obese Mice

The impact of anandamide on whole-body glucose homeostasis was also assessed in DIO mice. These mice were both glucose intolerant and insulin resistant. Injection of anandamide into DIO mice reduced blood glucose appearance during OGTT (Fig. 8*A*). Xylose appearance was also strongly inhibited by anandamide in the 0–45-min range of OXT (Fig. 8*B*). It should be pointed out that the administration of the CB1R antagonist SR141716 alone before OXT did not induce any effect on xylose absorption (Fig. 8*B*), suggesting that intestinal CB1Rs were likely not activated by endogenous cannabinoids in DIO mice. Thus, evidence comes from these findings that the effect of anandamide on glucose appearance was maintained in obese mice. Considering that anandamide was more potent in reducing xylose appearance in DIO versus lean mice (Fig. 8*C*), we explored the possibility that intestinal ECS activation by anandamide was accentuated in obese mice due to the presence of high levels of CB1R. This assumption was supported by the expression levels of CB1R mRNA in the small intestine mucosa that were threefold higher in DIO than in lean mice (Fig. 8*D*).

DISCUSSION

In a recent study showing that hepatic CB1Rs contribute to diet-induced hepatic insulin resistance by inhibiting both insulin signaling and clearance, Liu et al. (10) provided evidence that acute peripheral administration of anandamide causes CB1R-mediated glucose intolerance in mice. Although we drew the same conclusions from the present findings obtained after intraperitoneal glucose load, we also intriguingly observed that the same dose of anandamide improved postprandial glycemia during an OGTT. The discrepancies between the results of intraperitoneal GTT experiments (10 and present study) and OGTT experiments reported here are unquestionably due to the impact of anandamide on events related to intestinal glucose absorption that are bypassed when glucose load is administered intraperitoneally. Since concordant findings from this study and literature (10) showed that peripheral CB1R activation by anandamide induced insulin resistance and endogenous glucose production, it could be excluded that the drug prevented

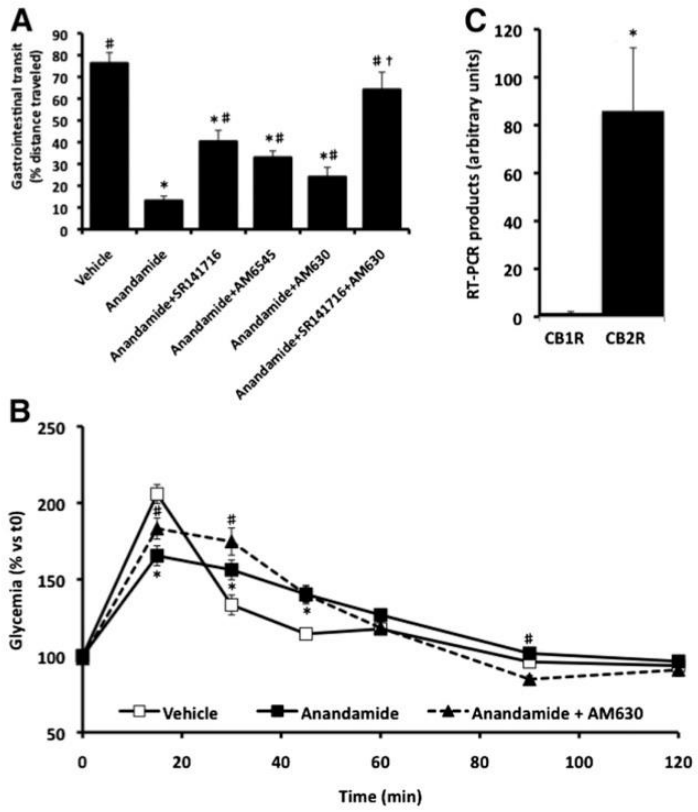


Figure 6—Role of CB1R and CB2R in anandamide-induced reduction in gastrointestinal transit and plasma glucose appearance. *A*: Wild-type mice were injected intraperitoneally (10 mg/kg) with CB1R antagonists SR141716 and AM65456 or CB2R antagonist AM630, 20 min before a single intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg). Animals received 10 min later by gavage 0.2 mL of a nonmetabolizable solution of charcoal. Mice were killed 25 min after gavage, and distance from the pylorus to the front of the charcoal bolus was measured. Transit rate corresponds to [(distance to charcoal front)/(total length from pylorus to cecum)] × 100 (%) expressed as means ± SEM (n = 6 per group). *P < 0.05 vs. vehicle; #P < 0.05 vs. anandamide; †P < 0.05 vs. other treatments. *B*: Mice were subject to OGTT (2 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide alone (10 mg/kg), anandamide in combination with the specific CB2R antagonist AM630 (10 mg/kg), or vehicle. Blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated time points after glucose loading. Results represent % variation from basal glycemia during OGTT and are expressed as means ± SEM (n = 6). *P < 0.05, anandamide vs. vehicle; #P < 0.05, anandamide + AM630 vs. vehicle. *C*: RT-PCR analysis of stomach CB1R and CB2R mRNA expression in control mice. Results are expressed as means ± SEM (n = 6). *P < 0.05.

hyperglycemia after oral load increasing blood glucose clearance, insulin sensitivity, and/or insulin production. Rather, we presented evidence that anandamide reduced postprandial glycemia, delaying intestinal glucose absorption. This was first demonstrated using oral xylose test (OXT) as a clinical marker for intestinal absorption. Since xylose metabolism is not affected by either insulin secretion or insulin resistance, OXT directly informed about the impact of anandamide on gastrointestinal events without being hindered by the peripheral effects of the drug on glucose clearance. Therefore, it should be considered that two main factors might prevent hyperglycemia after oral glucose loading following anandamide injection: *1*) reduction of gastrointestinal motility and/or *2*) inhibition of small intestine glucose transport.

The presence of a functional ECS has been identified in the gut. CB1Rs are expressed in the gastrointestinal tract of many species (12,14). Immunohistochemical studies indicate that the enteric nervous system is the main site of CB1R expression and could be the main site of action for cannabinoids in the gastrointestinal tract (13). Myenteric CB1Rs are physiologically involved in the regulation of gastric and intestinal motility and may constitute a physiological "brake" along the gastrointestinal tract in vivo (15,29,30). Interestingly, CB1R and CB2R are expressed in the epithelium of human colonic tissue (31), and our molecular analysis also revealed CB1R and CB2R gene expression in gastric and small intestine mucosa.

It is generally accepted that there is a positive relationship between gastrointestinal motility and glucose absorption. Notably, even minor perturbations in gastric emptying

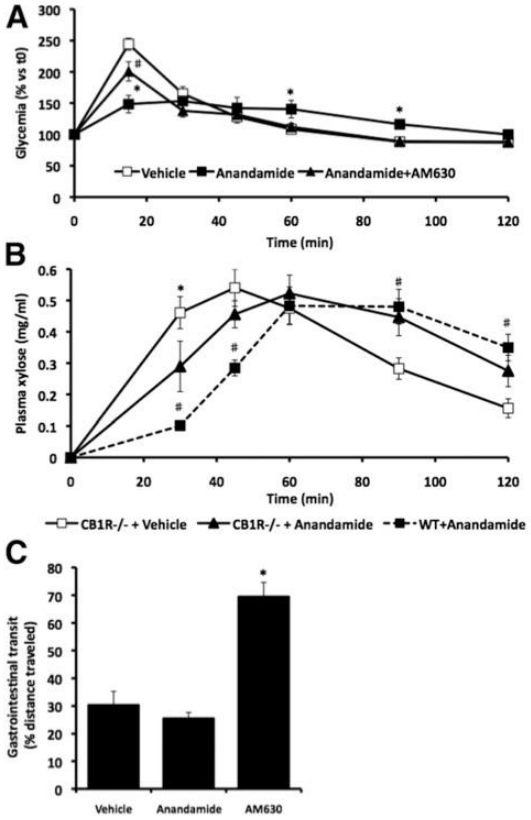


Figure 7—Effect of anandamide on plasma glucose appearance and gastrointestinal motility in CB1R$^{-/-}$ mice. *A*: CB1R$^{-/-}$ mice were injected intraperitoneally with the specific CB2R antagonist AM630 (10 mg/kg) and/or with anandamide (10 mg/kg), respectively, 20 and 10 min before they were subject to an OGTT (2 g/kg). Blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated time points after glucose loading. Results represent % variation from basal glycemia during OGTT. *P < 0.05, anandamide vs. vehicle; #P < 0.05, anandamide + AM630 vs. vehicle (n = 10 per group). *B*: CB1R$^{-/-}$ mice were subject to oral xylose loading test (OXT, 1 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Anandamide effect on xylose absorption in wild-type mice was reported on the graph (dotted line). For all experiments, values are expressed as means ± SEM (n = 10 per group). *P < 0.05, anandamide vs. vehicle-treated CB1R$^{-/-}$ mice; #P < 0.05, anandamide-treated wild-type mice vs. corresponding value in anandamide-treated CB1R$^{-/-}$. *C*: CB1R$^{-/-}$ mice received by gavage 0.2 mL of a nonmetabolizable solution of charcoal 10 min after intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or 30 min after intraperitoneal administration of AM630 alone. Mice were killed 25 min later, and distance from the pylorus to the front of the charcoal bolus was measured. Transit rate corresponds to [(distance to charcoal front)/(total length from pylorus to cecum)] × 100 (%) expressed as means ± SEM (n = 6 per group). *P < 0.05, AM630 vs. vehicle-treated mice.

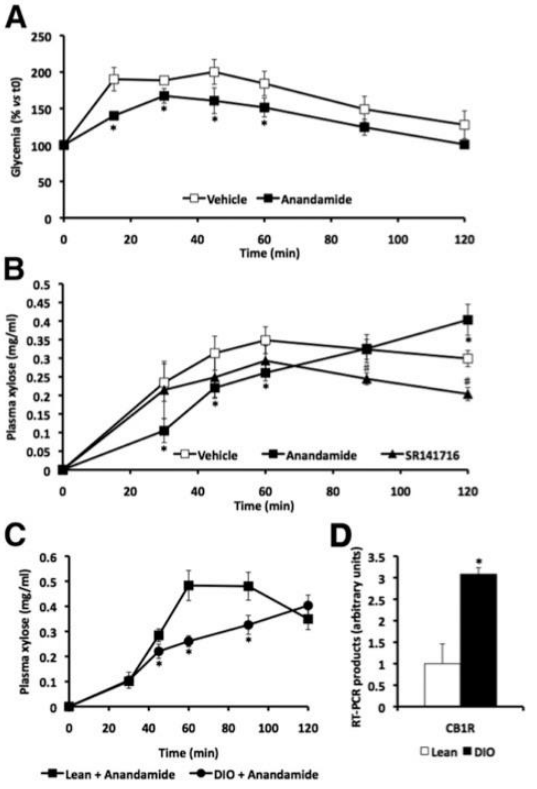


Figure 8—Effect of anandamide on plasma glucose and xylose appearance after oral loading in obese mice (DIO). *A*: Obese mice (n = 10) were subject to OGTT (2 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg) or vehicle. Results represent % variation from basal glycemia during OGTT. *P < 0.05, anandamide vs. vehicle. *B*: Obese mice (n = 7) were subjected to oral xylose loading test (OXT, 1 g/kg) 10 min after an intraperitoneal administration of anandamide (10 mg/kg), or SR141716 (10 mg/kg) or vehicle. *P < 0.05, anandamide vs. vehicle; #P < 0.05, SR141716 vs. vehicle. *C*: Comparison of anandamide effect on plasma xylose appearance during OXT in obese vs. lean mice. *P < 0.05, DIO vs. lean mice. For all experiments, blood samples were collected from the tail tip vein at the indicated time points after glucose or xylose loading. *D*: RT-PCR analysis of small intestine CB1R mRNA expression in DIO vs. lean mice (n = 6 per group). *P < 0.05, DIO vs. lean mice.

may have a substantial impact on postprandial glycemia in healthy subjects and patients with diabetes. Indeed, more rapid gastric emptying results in a greater initial glycemic response (17–19). The reduction of gastric and intestinal motility by cannabinoids has been well documented in both human and animal studies (15,16), whereas the consequences on glycemic control are poorly described. In our study, reduction of maximal plasma glucose and delay in xylose appearance is consistent with the strong reduction of gastrointestinal motility induced by anandamide. Available evidence indicates that CBR agonists reduce smooth muscle contractility in different regions of the gastrointestinal tract in animals and humans (32). In line with this, distinct effects of anandamide on gastric emptying and small intestine motility could explain why blood glucose appearance was also reduced in duodenal GTT experiments in which the influence of gastric emptying was insubstantial.

Monosaccharides are absorbed through the intestine by a transepithelial transport system. Two types of hexose transporters have been identified in human and murine small intestine: SGLTs and sodium-independent GLUTs (33). When the lumen of the bowel is exposed to high concentrations of glucose, GLUT-2 appears to account for the absorption from the enterocytes after a rapid dynamic process of translocation to the apical membrane. Recent studies suggest that the presence of GLUT-2 at the apical membrane is dependent on the activity of SGLT-1 (34–36). The effect of cannabinoids on intestinal absorption of ^{3}H-2-deoxy-D-glucose (2-DG) has previously been investigated in Caco-2 cells (37). From this study, authors hypothesized that cannabinoids do not interfere with the intestinal GLUT-2–mediated apical uptake of glucose. In accordance with these previous data, our findings obtained from the everted sac method further indicated that activation of intestinal CBR by anandamide does not alter SGLT-1– or GLUT-2–mediated glucose transport. Finally, this strongly suggests that improvement of postprandial glycemia induced by anandamide was not due to a direct inhibition of the intestine mucosa capacity to absorb glucose.

GIP release is triggered by the arrival of nutrients in the upper small intestine, where it is produced by enteroendocrine K cells located predominantly in the duodenal epithelium (38), and it is well recognized that exogenous GLP-1 and GIP inhibit glucose absorption by slowing gastric emptying (39,40) or reducing intestinal motility (41). However, it is very unlikely that incretin variations were responsible for alteration of glucose absorption in our study since GIP and GLP-1 plasma levels were reduced after anandamide injection and blockade of GLP-1 receptors by exendin 9-39 did not modify glycemic profile. Rather, it is very likely that hormone secretion was reduced due to the slow delivery of glucose into the duodenum.

To date, available evidence suggests a role for CB2R in the regulation of gastrointestinal motility. CB2R has been showed to inhibit defecation in mice (42) and to reduce the gastrointestinal transit in a model of intestinal inflammation (43,44). It has also been demonstrated that CB2Rs were expressed in the stomach and that activation of the receptor with exogenous agonists reduces gastric motility (45,46). In the current study, we first observed that CB2R gene expression was significant in the stomach. Then, we showed that part of the effects of anandamide on glycemia during glucose challenge observed in wild-type mice persisted in CB1R$^{-/-}$ and were partially counteracted by the CB2R antagonist AM630. In addition, the action of anandamide on gastrointestinal transit was abrogated only by the combined injection of SR141716 and AM630, suggesting that anandamide could reduce transit and thereby plasma glucose appearance, activating both receptors. Nevertheless, the problem of the respective contribution of CB1R and CB2R in regulating gastric emptying and small intestine motility was not resolved. The case of CB1R$^{-/-}$ mice is also of particular interest since these animals exhibited a naturally low transit rate that could be strongly improved by AM630, suggesting the existence of a CB2R-mediated inhibitory tone. However, in these conditions, AM630 could also have exerted a CB2R inverse agonist effect, as already described in CHO cells (47). Finally, our data suggested that the regulation of gastrointestinal motility by CB2R deserves to be further studied especially in pathological conditions since an enhanced expression of these receptors has been reported during obesity and endotoxic inflammation (31).

In our study, the inhibitory effect of anandamide on glucose appearance was amplified in DIO mice and associated with high mRNA CB1R expression in the intestine of these animals. Nevertheless, recent data revealed that obesity was associated with a decrease in anandamide content in the stomach of obese mice and the intestine of Zucker rats (15,48), suggesting that ECS activity is downregulated in the gastrointestinal tract of obese animals (49), contrary to other peripheral organs (5,50). In line with this, we also showed that SR141716 administered alone to DIO mice before OXT did not modify xylose appearance, whereas it was strongly inhibited with exogenous anandamide. This suggests that even though CB1R expression was increased, it is very unlikely that CB1Rs were tonically activated by endocannabinoids in DIO mice.

In summary, our findings demonstrated that acute activation of intestinal ECS reduced postprandial glycemia. Reduction of plasma glucose appearance was not due to an alteration of intestinal glucose transport but rather to the inhibition of gastrointestinal transit consecutive both to CB1R and CB2R activation. Identifying precisely the respective role of CB1R and CB2R in each part of the gastrointestinal tract could help to develop new pharmacological tools to improve postprandial glycemia, an important component of the overall glycemic burden (20,21). Further studies are also necessary to determine whether the endocannabinoid tone is modified in the gastrointestinal tract of DIO mice and the consequences on postprandial intestinal glucose delivery.

Acknowledgments. The authors thank Serge Monier (Plateforme de Cytométrie) for excellent technical assistance.

Funding. This work was supported by funds from the Regional Council of Burgundy and European Union (FEDER).

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

Author Contributions. S.T.-F., L.D., J.G., and P.D. designed, performed, and analyzed the experiments and wrote the manuscript. T.M. performed some experiments. B.V. analyzed the data and reviewed the written draft of the manuscript. P.D. 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

1. Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. Curr Med Chem 2010;17:1382–1393

2. Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. Int J Obes (Lond) 2006;30(Suppl. 1):S13–S18

3. Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2009;89:112–119
4. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. Nature 2001;410:822–825
5. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. Cell Metab 2013;17:475–490
6. Di Marzo V, Després JP. CB1 antagonists for obesity—what lessons have we learned from rimonabant? Nat Rev Endocrinol 2009;5:633–638
7. Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. Diabetes 2010;59:926–934
8. Nogueiras R, Veyrat-Durebex C, Suchanek PM, et al. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. Diabetes 2008;57:2977–2991
9. Chanda D, Kim DK, Li T, et al. Cannabinoid receptor type 1 (CB1R) signaling regulates hepatic gluconeogenesis via induction of endoplasmic reticulum-bound transcription factor cAMP-responsive element-binding protein H (CREBH) in primary hepatocytes. J Biol Chem 2011;286:27971–27979
10. Liu J, Zhou L, Xiong K, et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. Gastroenterology 2012;142:1218.e1–1228.e1
11. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. J Clin Invest 2008;118:3160–3169
12. Casu MA, Porcella A, Ruiu S, et al. Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. Eur J Pharmacol 2003;459:97–105
13. Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. J Comp Neurol 2002;448:410–422
14. Croci T, Manara L, Aureggi G, et al. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. Br J Pharmacol 1998;125:1393–1395
15. Di Marzo V, Capasso R, Matias I, et al. The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. Br J Pharmacol 2008;153:1272–1280
16. Sanger GJ. Endocannabinoids and the gastrointestinal tract: what are the key questions? Br J Pharmacol 2007;152:663–670
17. Horowitz M, Edelbroek MA, Wishart JM, Straathof JW. Relationship between oral glucose tolerance and gastric emptying in normal healthy subjects. Diabetologia 1993;36:857–862
18. Jones KL, Horowitz M, Wishart MJ, Maddox AF, Harding PE, Chatterton BE. Relationships between gastric emptying, intragastric meal distribution and blood glucose concentrations in diabetes mellitus. J Nucl Med 1995;36:2220–2228
19. Schwartz MP, Samsom M, Renooij W, et al. Small bowel motility affects glucose absorption in a healthy man. Diabetes Care 2002;25:1857–1861
20. Leiter LA, Ceriello A, Davidson JA, et al.; International Prandial Glucose Regulation Study G: Postprandial glucose regulation: new data and new implications. Clin Ther 2005;27(Suppl. B):S42–S56
21. Haffner SM. The importance of hyperglycemia in the nonfasting state to the development of cardiovascular disease. Endocr Rev 1998;19:583–592
22. Wagner B, Galey WR. Kinetic analysis of hexose transport to determine the mechanism of amygdalin and prunasin absorption in the intestine. J Appl Toxicol 2003;23:371–375
23. Yamada K, Hosokawa M, Fujimoto S, et al. The spontaneously diabetic Torii rat with gastroenteropathy. Diabetes Res Clin Pract 2007;75:127–134
24. Jourdan T, Demizieux L, Gresti J, et al. Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: evidence from cultured explants. Hepatology 2012;55:790–799
25. Antunes DM, da Costa JP, Campos SM, et al. The serum D-xylose test as a useful tool to identify malabsorption in rats with antigen specific gut inflammatory reaction. Int J Exp Pathol 2009;90:141–147
26. Hediger MA, Rhoads DB. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. Physiol Rev 1994;74:993–1026
27. Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. Biochem Pharmacol 1993;46:791–796
28. Phillips LK, Prins JB. Update on incretin hormones. Ann N Y Acad Sci 2011; 1243:E55–E74
29. Capasso R, Matias I, Lutz B, et al. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. Gastroenterology 2005;129:941–951
30. Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, et al. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. Gastroenterology 2002;123:227–234
31. Wright KL, Duncan M, Sharkey KA. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. Br J Pharmacol 2008;153:263–270
32. Izzo AA, Camilleri M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. Gut 2008;57:1140–1155
33. Drozdowski LA, Thomson AB. Intestinal sugar transport. World J Gastroenterol 2006;12:1657–1670
34. Chaudhry RM, Scow JS, Madhavan S, Duenes JA, Sarr MG. Acute enterocyte adaptation to luminal glucose: a posttranslational mechanism for rapid apical recruitment of the transporter GLUT2. J Gastrointest Surg 2012;16:312–319; discussion 319
35. Kellett GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. J Physiol 2001;531:585–595
36. Zheng Y, Scow JS, Duenes JA, Sarr MG. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. Surgery 2012;151:13–25
37. Gonçalves P, Araújo JR, Azevedo I, Martel F. Lack of a significant effect of cannabinoids upon the uptake of 2-deoxy-D-glucose by Caco-2 cells. Pharmacology 2008;82:30–37
38. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology 2007;132:2131–2157
39. Holst JJ. Treatment of type 2 diabetes mellitus with agonists of the GLP-1 receptor or DPP-IV inhibitors. Expert Opin Emerg Drugs 2004;9:155–166
40. Linnebjerg H, Park S, Kothare PA, et al. Effect of exenatide on gastric emptying and relationship to postprandial glycemia in type 2 diabetes. Regul Pept 2008;151:123–129
41. Ogawa E, Hosokawa M, Harada N, et al. The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice. Biochem Biophys Res Commun 2011;404:115–120
42. Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, et al. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:14228–14233
43. Duncan M, Mouihate A, Mackie K, et al. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008;295:G78–G87
44. Mathison R, Ho W, Pittman QJ, Davison JS, Sharkey KA. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. Br J Pharmacol 2004;142:1247–1254
45. Mulè F, Amato A, Baldassano S, Serio R. Involvement of CB1 and CB2 receptors in the modulation of cholinergic neurotransmission in mouse gastric preparations. Pharmacol Res 2007;56:185–192
46. Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD. Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. Can J Physiol Pharmacol 2002;80:67–76
47. Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. Br J Pharmacol 2012; 165:2561–2574
48. Iannotti FA, Piscitelli F, Martella A, et al. Analysis of the "endocannabinoidome" in peripheral tissues of obese Zucker rats. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013;89:127–135
49. Capasso R, Izzo AA. Gastrointestinal regulation of food intake: general aspects and focus on anandamide and oleoylethanolamide. J Neuroendocrinol 2008;20(Suppl. 1):39–46
50. Osei-Hyiaman D, Harvey-White J, Bátkai S, Kunos G. The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis. Int J Obes (Lond) 2006;30(Suppl. 1):S33–S38

Annexe E* : *Publication (Demizieux et al., 2016)

Laurent Demizieux,[1] Fabiana Piscitelli,[2] Stephanie Troy-Fioramonti,[1]
Fabio Arturo Iannotti,[2] Simona Borrino,[2] Joseph Gresti,[1] Tania Muller,[1]
Jerome Bellenger,[3] Cristoforo Silvestri,[2] Vincenzo Di Marzo,[2] and Pascal Degrace[1]

Early Low-Fat Diet Enriched With Linolenic Acid Reduces Liver Endocannabinoid Tone and Improves Late Glycemic Control After a High-Fat Diet Challenge in Mice

Diabetes 2016;65:1824–1837 | DOI: 10.2337/db15-1279

METABOLISM

Evidence suggests that alterations of glucose and lipid homeostasis induced by obesity are associated with the elevation of endocannabinoid tone. The biosynthesis of the two main endocannabinoids, *N*-arachidonoylethanolamine and 2-arachidonoyl-glycerol, which derive from arachidonic acid, is influenced by dietary fatty acids (FAs). We investigated whether exposure to n-3 FA at a young age may decrease tissue endocannabinoid levels and prevent metabolic disorders induced by a later high-fat diet (HFD) challenge. Three-week-old mice received a 5% lipid diet containing lard, lard plus safflower oil, or lard plus linseed oil for 10 weeks. Then, mice were challenged with a 30% lard diet for 10 additional weeks. A low n-6/n-3 FA ratio in the early diet induces a marked decrease in liver endocannabinoid levels. A similar reduction was observed in transgenic Fat-1 mice, which exhibit high tissue levels of n-3 FA compared with wild-type mice. Hepatic expression of key enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism was concomitantly changed. Interestingly, some gene modifications persisted after HFD challenge and were associated with improved glycemic control. These findings indicate that early dietary interventions based on n-3 FA may represent an alternative strategy to drugs for reducing endocannabinoid tone and improving metabolic parameters in the metabolic syndrome.

The endocannabinoid (EC) system (ECS) is known to play a crucial role in energy homeostasis. Regulation by this system takes place at the central level by changing food intake (1), and at the peripheral level by the modification of energy metabolism (2). An overactive ECS plays a crucial role in obesity by increasing food intake (3) and lipogenesis (4), by downregulating catabolic reactions (5,6), and by promoting fat accumulation and alteration of glucose homeostasis. As a consequence, treating obesity by decreasing ECS activity has been considered. A pharmacological approach was developed, leading to the commercialization of an inverse agonist of the cannabinoid receptor type-1 (CB1R) rimonabant. However, this drug was withdrawn from the market because of its undesired central nervous system side effects (7). Meanwhile, the downregulation of ECS tone in peripheral tissues involved in energy homeostasis, either with non–brain-penetrant CB1R blockers, or inhibitors of the biosynthesis of endogenous CB1R agonists, is still considered to be a potential approach to counter the adverse events observed in obesity (8).

The ECS is defined as a set of endogenous ligands (ECs), synthesized and degraded by specific enzymes and receptors that are able to bind these molecules. It includes two membrane receptors, CB1R and CB2R, and two main endogenous agonists, *N*-arachidonoyl-ethanolamine (AEA [or anandamide]) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG). AEA is typically synthesized by the enzyme *N*-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), although alternative pathways

[1]Team Pathophysiology of Dyslipidemia, Faculty of Sciences Gabriel, INSERM UMR866 "Lipides, Nutrition, Cancer," Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
[2]Endocannabinoid Research Group, Institute of Biomolecular Chemistry, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli, Naples, Italy
[3]Team Lipid Transfer Proteins and Lipoprotein Metabolism, Faculty of Sciences Gabriel, INSERM UMR866 "Lipides, Nutrition, Cancer," Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

Corresponding authors: Vincenzo Di Marzo, vdimarzo@icb.cnr.it, and Pascal Degrace, pascal.degrace@u-bourgogne.fr.

Received 11 September 2015 and accepted 28 March 2016.

This article contains Supplementary Data online at http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db15-1279/-/DC1.

© 2016 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.

exist, whereas 2-AG is formed by the action of diacylglycerol lipase α or β upon diacylglycerols. After release, ECs are subjected to rapid breakdown by degrading enzymes such as fatty acid (FA) amide hydrolase (FAAH) for N-acylethanolamines and monoacylglycerol lipase (MAGL) for 2-AG (9) (Fig. 1*A*).

AEA and 2-AG are lipids, and both ultimately derive from arachidonic acid (AA [or C20:4n-6]) via AA-containing phospholipids. AA is endogenously biosynthesized from the essential FA (10) linoleic acid (LA [or C18:2n-6]). As a consequence, a dietary supplementation in LA (11,12) or AA itself (13) is able to elevate the tissue contents of EC. Conversely, diets enriched with n-3 polyunsaturated FAs, such as eicosapentaenoic acid (C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA [or C22:6n-3]), cause a decrease in 2-AG and AEA levels because of the replacement of AA in phospholipids with such FAs (13,14).

It is well known that dietary n-3 FAs exert beneficial effects on obesity (15). For instance, n-3 FAs have the ability to reduce ectopic fat and inflammation in Zucker rats and to reduce glucose intolerance that is generally associated with obesity (16). Thus, they were shown to improve insulin sensitivity and gluconeogenesis in rodents (17,18). Evidence, involving transcription factors such as cAMP-responsive element–binding protein H (CREBH) (19) and sterol regulatory element–binding protein (20), for the existence of a direct causal link between EC tone and the ability of n-3 FAs to improve some of these features of obesity has recently been shown (16). This emphasizes the potential benefits of nutritional interventions in the treatment of pathologies related to obesity, particularly using n-3 FAs.

Accumulating evidence (21) shows that dietary factors, including lipids, in developmental periods such as fetal life, infancy, and early childhood, are associated with obesity risk later in life. In line with this, it has been shown that early overnutrition leads to persistent dysregulation in leptin and insulin sensitivity (22), along with enhanced inflammatory response (23). In addition to excess calories, the FA composition of the perinatal diet is also an important factor in the nutritional programming of the metabolic phenotype in adulthood. Recent studies (24) have shown that perinatal exposure to a rich n-6 FA diet is able to induce obesity and to affect body fat mass across generations. On the other hand, the beneficial role of dietary n-3 FA during early life has been emphasized because n-3 FA deficiency increases adiposity in guinea pigs (25). This idea was reinforced by the study of Massiera et al. (26), showing that the addition of α-linolenic acid (α-LNA [or C18:3n-3]) to an LA-rich high-fat diet (HFD) under isolipidic and isocaloric conditions reduces the deleterious

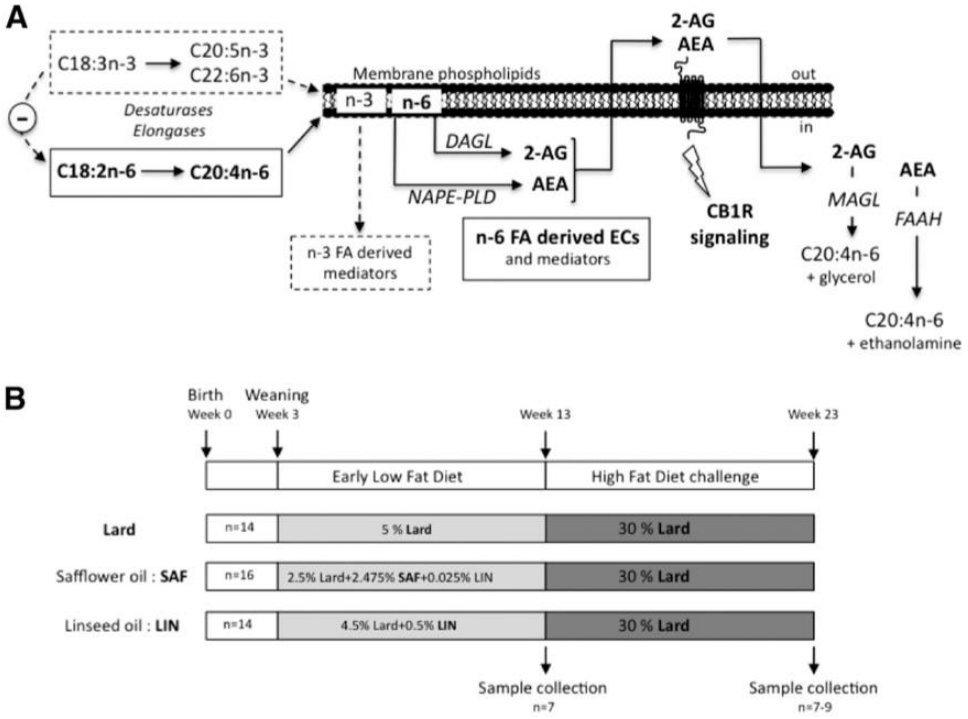


Figure 1—Schematic illustration of the pathways for biosynthesis and degradation of ECs (*A*) and the experimental study design (*B*). AEA, *N*-arachidonoyl-ethanolamine; 2-AG, 2-arachidonoyl-glycerol; DAGL, diacylglycerol lipase; ECs, endocannabinoids; FAAH, fatty acid amide hydrolase; MAGL, monoacylglycerol lipase; NAPE-PLD, *N*-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D.

effect of n-6 FAs when given to mouse pups. The beneficial preventive effect of n-3 FA is not restricted to a HFD. Even in a normolipidic diet, they are able to limit HFD-induced insulin resistance (IR) and hepatic steatosis, two main features of obesity (27). In keeping with this, the improvement of glucose and lipid homeostasis was also observed in transgenic Fat-1 mice, which can synthesize n-3 FA from n-6 FA without the need for dietary supplementation (28).

In this study, we aimed to investigate the role of the FA composition of a normolipidic diet (n-6 vs. n-3 FA) in the early prevention of HFD-induced obesity and its relationship with EC tone. Our starting hypothesis was that a n-3 FA–enriched diet given to weaning mice can decrease ECS activity, which in turn prevents HFD-induced metabolic disorders. To support our data, we also examined liver EC tone in Fat-1 mice presenting consistently high levels of n-3 FA in their tissues.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and Diets

Official French regulations (#87848) for the use and care of laboratory animals were followed throughout the experimental period. The experimental protocol was approved by the local ethics committee for animal experimentation (#BX0622). Three-week-old C57BL/6J male mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France). Mice surviving the stress of delivery were randomly separated in three series of 14–16 animals receiving different low-fat diets (LFDs; 5% w/w total lipids) for 10 weeks as schematized in Fig. 1*B*. Animals were housed individually on a 12-h/12-h light/dark schedule at 22–23°C with ad libitum access to water and food. Lipids in lard series came exclusively from pork fat, while lard was partially substituted with safflower oil (SAF) or linseed oil (LIN) in SAF and LIN series, respectively. The FA composition of the custom diets manufactured by SSNIF (Soest, Germany) is presented in Table 1. After 10 weeks, half of the population of each series was used for analyses, and the rest was challenged with an HFD (30% w/w total lipids from lard) for an additional period of 10 weeks. C57BL/6J transgenic fat-1 mice were generated and housed as described previously (29).

Body and Plasma Parameters

Body composition (fat mass, lean mass, and total body water) was measured by EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX). Plasma triglyceride (TG) and cholesterol concentrations were determined using commercial kits (DyaSis Diagnostics, Grabels, France). Adiponectin levels were measured by ELISA from Merck Millipore (Darmstadt, Germany), while leptin and insulin plasma content was determined using a Luminex-based Bio-Plex Pro mouse assay (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Glucose Tolerance and Insulin Tolerance Tests

For an oral glucose tolerance test (OGTT) and an insulin tolerance test (ITT), mice respectively received an oral load (2 g/kg) of a D-glucose solution (20% w/v) or an intraperitoneal injection of insulin (0.5 UI/kg; Actrapid; Novo Nordisk, Paris, France) after a 6-h fast. OGTTs and ITTs were performed in the same mice within a 3-day interval. Glycemia was measured at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min directly in blood sampled from the tail vein with a My Life Pura Glucose Meter (Ypsomed, Paris, France). During an OGTT, larger blood samples (25 μl) were collected from tail in tubes containing EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) to measure insulinemia at time 0, 15, 30, and 60 min after glucose load. Insulin levels were determined using an Ultrasensitive Mouse ELISA Kit (eurobio, Les Ulis, France).

Lipid and EC Analyses

For the determination of total FA composition in tissue and diets, lipids were extracted according to the method of Folch et al. (30). Concentrations were determined using

Table 1—Diet and liver total FA composition

	Diet (% total FA)			Liver after early LF diet			Liver after HF diet challenge		
FA	Lard	SAF	LIN	Lard	SAF	LIN	Lard	SAF	LIN
C14:0	2.1	1.2	1.7						
C16:0	27.7	17.6	24.0	24.40 ± 0.56	22.49 ± 0.24	25.36 ± 0.22	25.19* ± 0.25	25.34* ± 0.36	26.23* ± 0.35
C16:1n-7	3.1	1.7	2.6	7.69^{a} ± 1.14	4.00^{b} ± 0.21	7.29^{a} ± 0.28	4.38* ± 0.14	4.14 ± 0.12	4.26* ± 0.16
C18:0	16.7	9.1	14.4	3.71^{a} ± 0.19	7.97^{b} ± 0.54	4.83^{a} ± 0.17	3.91 ± 0.44	3.82* ± 0.43	3.92* ± 0.43
C18:1n-9	40.5	28.1	37.4	44.47^{a} ± 0.19	22.75^{b} ± 0.81	35.63^{c} ± 0.67	47.75* ± 1.63	46.49* ± 1.65	45.58* ± 1.73
C18:2n-6	8.6	40.9	10.0	5.11^{a} ± 0.09	18.0^{b} ± 0.51	7.34^{c} ± 0.18	5.92* ± 0.33	6.33* ± 0.44	6.68 ± 0.37
C18:3n-3	0.4	0.8	9.2						
C20:4n-6				5.49^{a} ± 0.36	14.0^{b} ± 0.80	3.94^{c} ± 0.09	5.23* ± 0.82	5.09* ± 0.83	5.05* ± 0.79
C22:6n-3				1.14^{a} ± 0.17	2.34^{b} ± 0.09	7.25^{c} ± 0.13	0.27^{a*} ± 0.22	1.37^{b*} ± 0.22	1.99^{b*} ± 0.40
n-6/n-3	22.3	52.7	1.1	8.72^{a} ± 0.10	13.46^{b} ± 0.73	1.03^{c} ± 0.02	8.73^{a} ± 0.63	9.34^{a*} ± 0.59	6.36^{b*} ± 0.50

Liver FAs are expressed as the mean ± SEM (n = 7–9). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant statistical differences between groups after early LF diet or after HF diet challenge at $P < 0.05$. Values are not indicated when FA content did not reach 1 g/100 g in at least one series. *Significant statistical differences between HF diet challenge vs. corresponding early LF diet means ($P < 0.05$).

C17:0 as the internal standard, after methylation according to the procedure of Christie (31) and separation by gas chromatography, as previously described (32). ECs and congeners were purified from lipid extracts and determined by isotope dilution liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry using deuterated standards as described in the study by Bartelt et al. (33).

Western Blot Analysis

The isolation and quantification of total proteins from tissues was performed as previously described (34). Briefly, from each animal that was previously anesthetized, the liver was isolated and immediately frozen in liquid nitrogen. Each tissue was subsequently washed in cold PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+}, pH 7.4) and homogenized in a lysis solution containing the following: 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L β-glycerophosphate, 1 mmol/L Na_3VO_4, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8, and 1% SDS, plus protease inhibitors, at pH 7.4. Lysates were incubated for 30 min at 4°C on a shaker and then were centrifuged for 15 min at 13,000*g* at 4°C. Supernatants were transferred into clear tubes and quantified by DC Protein Assay (Bio-Rad). Subsequently, the samples (60–80 μg of total protein) were boiled for 5 min in Laemmli SDS loading buffer and loaded on 8–10% SDS-PAGE and then transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. Filters were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: *1*) mouse anti-FAAH clone 4H8 (dilution 1:1,000; Sigma-Aldrich); *2*) rabbit anti–NAPE-PLD (dilution 1:2,500; Abnova, Taipei, Taiwan); *3*) rabbit anti-MAGL (dilution 1:200; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI). The monoclonal anti-tubulin clone B-5–1-2 (dilution 1:5,000; Sigma-Aldrich) was used to check for equal protein loading. Reactive bands were detected by chemiluminescence by the use of Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad). Images were analyzed on a Chemi-Doc station with Quantity One Software (Bio-Rad).

Enzyme Assays

FAAH and MAGL activity was measured as previously described (34). In particular, 2-AG hydrolysis was measured by incubating the 10,000*g* liver cytosolic fraction (100 μg/sample) in Tris-HCl 50 mmol/L, at pH 7.0 at 37°C for 20 min, with synthetic 2-arachidonoyl-[^{3}H]-glycerol (40 Ci/mmol; ARC, St. Louis, MO) properly diluted with 2-AG (Cayman Chemicals) to the final concentration of 10 μmol/L. The amount of [^{3}H]-glycerol produced was measured by scintillation counting of the aqueous phase after extraction of the incubation mixture with 2 volumes of $CHCl_3/CH_3OH$ (1/1; v/v). AEA hydrolysis was measured by incubating the 10,000*g* liver membrane fraction (70–100 μg/sample) in Tris-HCl l50 mmol/L, at pH 9–10 at 37°C for 30 min, with synthetic *N*-arachidonoyl-[^{14}C]-ethanolamine (55 mCi/mmol; ARC, St. Louis, MO) properly diluted with AEA (Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, U.K.) to the final concentration of 2 μmol/L. The amount of [^{14}C]-ethanolamine produced was measured by scintillation counting of the aqueous phase. Activities were calculated in picomoles of substrate hydrolyzed × minutes × milligrams of protein.

RT-PCR

Total mRNAs from tissues were extracted with Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France), and 1 μg of RNA was reverse transcribed using the Iscript cDNA Kit (Bio-Rad). Real-time PCR was performed as described previously (6) using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Primer sequences used for amplification are indicated in Supplementary Table 1. For each gene, a standard curve was established from four cDNA dilutions (1:10 to 1:10,000) and used to determine the relative gene expression variation after normalization with the geometric mean of three housekeeping genes (TATA box binding protein, L38, and 18S).

Statistical Analysis

Results are expressed as the means ± SEM. Data were analyzed statistically using two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test, or using the Student *t* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Liver Total FA Composition

Lard used for the preparation of the LFD was partially replaced by SAF or LIN to modify the proportions of LA and α-LNA, while limiting background variations. In this way, the final n-6/n-3 FA ratios in lard, SAF, and LIN diets were 22, 53 and 1, respectively (Table 1). The impact of 10 weeks of feeding with the different LFDs was estimated through the analysis of total liver FA composition (Table 1). As expected, when compared with lard, the SAF diet increased the proportions of LA and AA in liver lipids at the expense of C18:1n-9, while LIN induced an increase in DHA. This resulted in strong alterations of tissue n-6/n-3 FA ratios. After challenging the animals with a 30% lard oil diet for 10 weeks, the liver SAF and LIN FA profiles became very close to that of the lard diet. Nevertheless, the n-6/n-3 FA ratio in liver LIN remained slightly lower than those for lard and SAF.

Tissue EC Levels

Switching the n-6/n-3 FA ratio from 53 to 1 in the diet (SAF vs. LIN diet) affected both AEA and 2-AG tissue levels in the liver (Fig. 2). By comparing the SAF group with the lard group, we aimed to reflect the impact of a specific elevation of LA levels on tissue EC contents. Elevating dietary LA levels increased only 2-AG levels in the liver. Likewise, the specific impact of the elevation of n-3 FA levels in the diet on EC levels was estimated by comparing the LIN group with lard group. In these conditions, AEA levels were significantly lower in the liver of LIN mice compared with lard mice, while the same trend was observed for 2-AG. In other tested tissues (Supplementary Fig. 1), a huge nutritional alteration in the n-6/n-3 FA ratio in the diet always significantly reduced AEA levels, except for the visceral adipose tissue (VAT). The levels of 2-AG were concomitantly reduced in brain and muscle but was not modified in subcutaneous adipose tissue (SCAT) or in VAT.

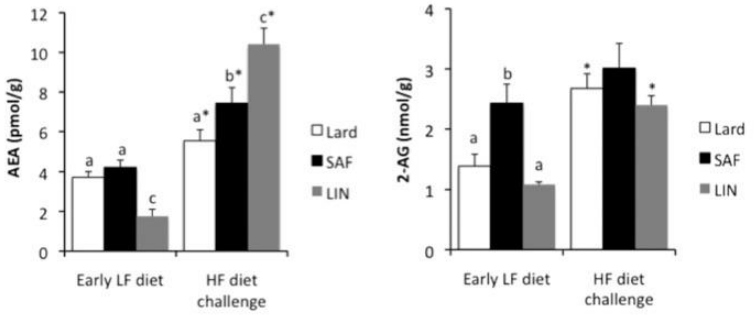


Figure 2—Effect of early diets and later HFD challenge on liver AEA and 2-AG contents. Three-week-old mice were fed a 5% lipid diet containing lard, lard plus SAF, or lard plus LIN for 10 weeks (early LF diet). Then all mice were challenged with a 30% lard diet for 10 additional weeks (HF diet challenge). Results are expressed as the mean ± SEM (n = 4–6). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant statistical differences between groups after early LF diet or after HF diet challenge at $P < 0.05$. *Significant statistical differences between HF diet challenge and corresponding early LF diet means ($P < 0.05$).

Whatever the early diet that was administered, feeding the HFD raised liver AEA and 2-AG levels (Fig. 2). However, the increase was not significant for 2-AG in SAF series because levels were already elevated at the end of the LFD. EC levels were also generally increased after the HFD in brain, VAT, and muscle. Otherwise, SCAT appeared to be differently influenced by the HFD regardless of the early diet, as suggested by the decrease in EC levels (Supplementary Fig. 1).

Transcriptomic and Proteomic Analysis of ECS

Transcriptomic and proteomic analysis of the ECS are presented in Figure. 3*A–C*. Data concerning FAAH and MAGL, which mainly hydrolyze AEA and 2-AG, respectively, indicated that the liver protein levels and activity of MAGL were more influenced by the composition of the early diet than those of FAAH. In particular, both the protein levels and activity of MAGL were reduced by the SAF diet compared with other diets, which is in accordance with the higher levels of 2-AG in this group. Protein levels of NAPE-PLD, which is involved in the formation of AEA, were also reduced by the SAF and LIN diets compared with the lard diet. Regarding CB1R, liver mRNA levels were unchanged, whatever the diet.

Challenging mice with a 30% lard diet induced a more pronounced alteration of liver enzymes linked to ECS. Data related to FAAH indicated a strong downregulation, while NAPE-PLD levels were increased, suggesting an inverse regulation of EC degradation and biosynthetic pathways in favor of an elevation of AEA levels. The HFD concomitantly induced the mRNA expression of CB1R in the liver for all groups. Interestingly, the impact of the HFD sometimes appeared to depend on the nutritional history. In particular, CB1R mRNA expression was lower in the LIN group compared with the SAF group, and FAAH protein levels were higher in the LIN group than in the lard group.

Body Composition, Plasma Parameters, and Glycemic Control

Body weight and fat pad relative mass measured at the end of the early LFD did not differ among the three groups (Table 2). Nevertheless, LIN induced a significant decrease in total fat mass, as determined by EchoMRI. The particular sensitivity of the liver to the different early diets was indicated by the decrease in relative mass and lipid content induced by SAF and LIN compared with lard. Similarly, muscle lipids were also the highest for the lard group (data not shown). As expected, total body fat, fat pad weight, and tissue lipid levels were increased after the HFD challenge, but no differences were observed among groups.

Early feeding with SAF and LIN experimental diets improved some important plasma parameters related to glucose and lipid homeostasis compared with lard (Table 2). Notably, fasting triglyceridemia and cholesterolemia were reduced after the SAF and LIN diets. Although these diets did not affect glycemia, insulin levels in these groups were higher than those in lard group, suggesting a possible impairment of β-cell function by early and prolonged exposure to a lard diet. Interestingly, levels of plasma adiponectin were significantly higher in animals eating a LIN diet than in those eating a lard diet, pointing out a putative impact of n-3 FA on adipose tissue metabolism. Data relative to glycemic control (Fig. 4*A* and *B*) showed that only the LIN diet exerted slight changes on glucose clearance after oral glucose load or insulin administration.

As expected, HFD challenge induced marked variations in most of the metabolic parameters measured (Table 2). Glycemia, cholesterolemia, insulinemia, and adiponectin and leptin levels increased in all groups. The slight hyperglycemia associated with the compensatory hyperinsulinemia reflected the onset of an insulin-resistant state, no matter which early diet was consumed. However, calculations derived from OGTT results and insulin response (DI_{0-15}/DG_{0-15} [ratio of insulin production to glucose load] and DI_0 [oral disposition index]) suggested an alteration in β-cell function for mice fed with the lard diet only (Table 2). Data also revealed that animals fed with the diet enriched in n-3 FA over the 10 weeks after weaning had higher plasma adiponectin levels and better glycemic control after HFD challenge. Notably, OGTT, ITT,

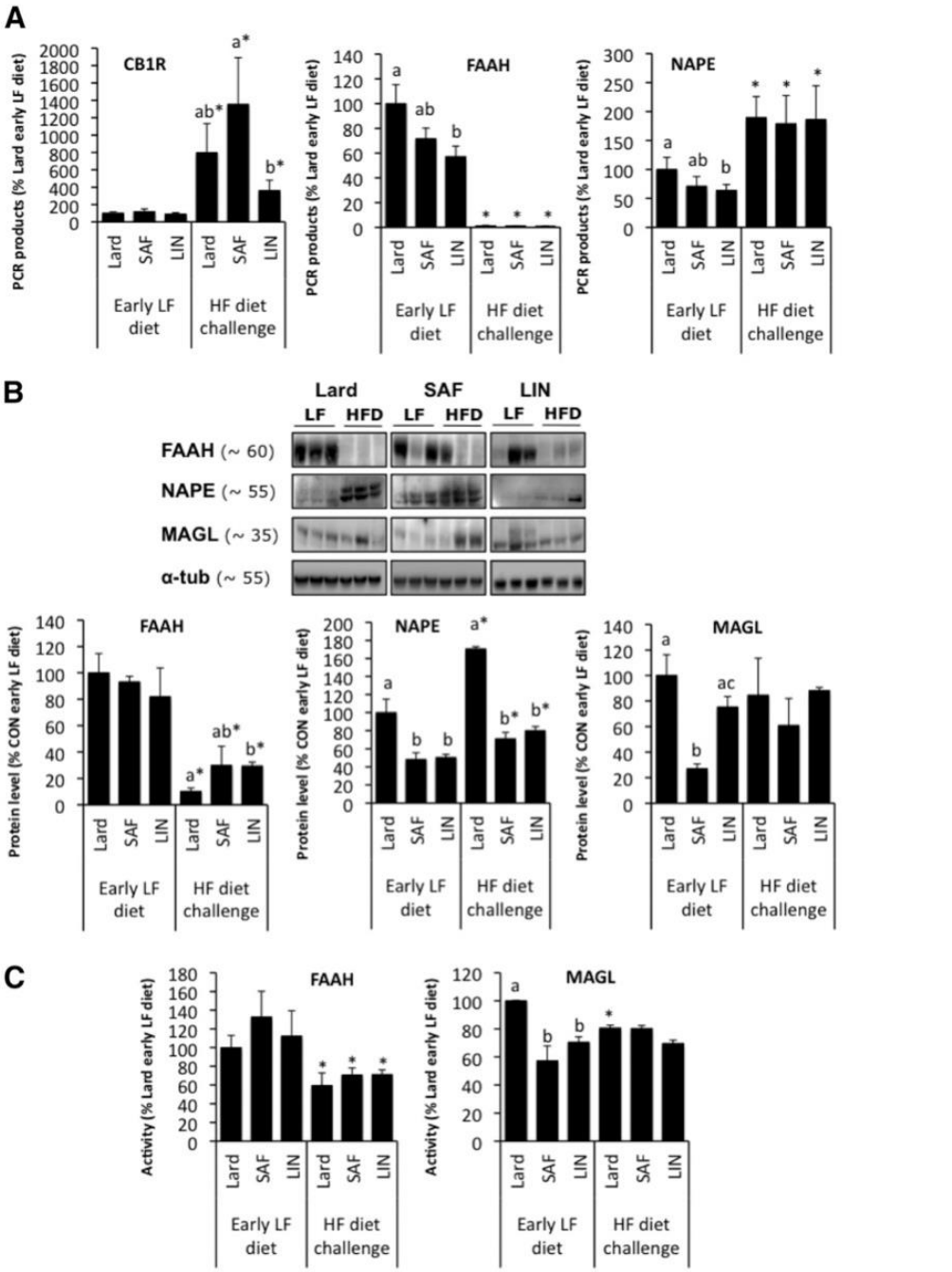


Figure 3—Effect of early diets and later HFD challenge on the regulation of proteins involved in liver ECS activity. Three-week-old mice were fed a 5% lipid diet containing lard, lard plus SAF, or lard plus LIN for 10 weeks (early LF diet). Then all mice were challenged with a 30% lard diet for 10 additional weeks (HF diet challenge). *A*: Gene expression analysis of CB1R, NAPE-PLD (denoted as NAPE), and FAAH. *B*: Representative immunoblots of liver protein analysis of FAAH, NAPE-PLD (denoted as NAPE), and MAGL with graphic densitometry quantification. *C*: FAAH and MAGL activity measured in four separate samples, as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 4–6). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant statistical differences between groups after early LF diet or after HF diet challenge at $P < 0.05$. *Significant statistical differences between HF diet challenge and corresponding early LF diet means ($P < 0.05$). α-tub, α-tubulin; CON, control.

Table 2—Body composition and plasma parameters

	After early LF diet			After HF diet challenge		
	Lard (n = 7)	SAF (n = 7)	LIN (n = 7)	Lard (n = 7)	SAF (n = 9)	LIN (n = 7)
BW (g)	22.7 ± 0.74	22.8 ± 0.47	23.5 ± 0.74	35.4* ± 1.60	36.3* ± 2.13	36.4* ± 1.63
Liver (% of BW)	4.43^{a} ± 0.07	3.61^{b} ± 0.10	3.61^{b} ± 0.07	4.00 ± 0.19	4.17 ± 0.25	3.78 ± 0.22
pVAT (% of BW)	2.19 ± 0.17	2.23 ± 0.08	2.34 ± 0.17	6.19 ± 0.34	5.91 ± 0.42	6.33 ± 0.29
iSCAT (% of BW)	1.33^{a} ± 0.07	1.02^{b} ± 0.04	1.16^{c} ± 0.06	2.74 ± 0.28	2.84 ± 0.31	2.82 ± 0.18
Fat mass (% of BW)	13.9^{a} ± 0.46	14.8 ^{a} ± 0.95	12.9 ^{b} ± 0.27	33.3* ± 1.73	33.4* ± 2.43	34.3* ± 1.88
TGs (mg/mL)	0.43^{a} ± 0.04	0.27^{b} ± 0.03	0.29^{b} ± 0.04	0.27* ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Cholesterol (mg/mL)	1.30^{a} ± 0.06	1.17^{b} ± 0.09	1.07^{b} ± 0.12	1.68* ± 0.12	1.71* ± 0.12	1.69* ± 0.05
Adiponectin (μg/mL)	15.5^{a} ± 2.17	20.9^{b} ± 3.07	22.3^{b} ± 2.59	28.66^{a*} ± 1.69	31.75^{ab*} ± 1.61	35.54^{b*} ± 2.16
Leptin (pg/mL)	40.1 ± 26.6	16.1 ± 10.5	21.0 ± 10.1	526.4* ± 129.1	890.5* ± 156.1	622.6* ± 141.3
Insulin (pg/mL)	25.4^{a} ± 15.4	108.3^{b} ± 36.0	131.5^{b} ± 62.7	715.5* ± 168.3	837.0* ± 151.5	755.9* ± 119.2
Glucose (g/L)	1.76 ± 0.06	1.70 ± 0.02	1.63 ± 0.10	2.07* ± 0.14	2.09* ± 0.11	1.97* ± 0.08
HOMA-IR				20.0^{ab} ± 2.63	22.7^{a} ± 3.40	15.4^{bc} ± 1.98
DI_{0-15}/DG_{0-15}				−176^{a} ± 220	2,344^{b} ± 646	1,993^{b} ± 504
DI_{0}				−0.002^{a} ± 0.005	0.056^{b} ± 0.014	0.060^{b} ± 0.013

All parameters except glucose levels were measured from blood and tissue samples collected on the day of sacrifice from overnight-fasted animals. Glucose levels and calculations were determined from blood samples collected during OGTT experiments initiated with animals fasted for 6 h. BW, body weight; DI_{0-15}/DG_{0-15}, insulin production to glucose load (μIU/mmol); DI_{0}, oral disposition index ($mmol^{-1}$) = (DI_{0-15}/DG_{0-15})*1/fasting insulin; HOMA-IR, fasting glucose (mmol/L)*fasting insulin (μIU/L)/22.5; iSCAT, inguinal subcutaneous adipose tissue; pVAT, periepididymal adipose tissue. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 7–9). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant statistical differences between groups after early LF diet or after HF diet challenge at $P < 0.05$. *Significant statistical differences between HF diet challenge and corresponding early LF diet means ($P < 0.05$).

and HOMA-IR results were improved in the LIN group compared with the other groups (Fig. 4*C* and *D* and Table 2). In addition, $t_{0-30min}$ insulin production in response to glucose load was also significantly higher in the LIN group than in the lard group (Fig. 4*E*).

Expression of Genes Related to Carbohydrate and Lipid Metabolism in the Liver

The fact that early feeding with LIN induced long-lasting positive effects on glycemic control prompted us to study the impact of the different diets on the expression of genes related to carbohydrate and lipid metabolism in the liver (Fig. 5). Thus, early feeding with the LIN diet significantly decreased mRNA levels of the key gluconeogenic enzyme genes PEPCK and glucose-6-phosphate (G6P), as well as that of glucokinase gene (GCK), FA synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), and the transcription factor CREBH, compared with the lard group. Data also revealed that young mice fed with the diet exclusively containing lard as a lipid source showed the highest mRNA expression of FAT/CD36 (FA translocase) and LPL genes related to FA uptake. This observation also applied to tumor necrosis factor-α (TNF-α) mRNA levels, suggesting an elevated liver inflammatory status in the livers of mice eating the lard diet, which was decreased by the SAF and LIN diets.

Whatever the early diet, feeding mice with HFD-induced changes in the expressions of genes responsive to insulin, such as PEPCK and GCK, which were, respectively, decreased and increased. We further noticed that mice prefed with the LIN diet showed lower expression of several genes after HFD challenge compared with other diets, suggesting that the addition of n-3 FA in the early diet may induce biological imprinting mechanisms controlling gene expression. In this way, PEPCK, CREBH, LPL, and TNF-α mRNA levels were lower in the LIN group than in the SAF and lard groups.

EC Levels and Gene Expression in Fat-1 Mice Liver

For further insight into the impact of n-3 FA tissue enrichment on ECS tone, we measured EC content in the livers of Fat-1 mice (Fig. 6). These transgenic animals are able to endogenously synthesize n-3 FA from n-6 FA and consequently exhibit high levels of n-3 FA in their tissues. Interestingly, EC levels were strongly reduced in Fat-1 mouse livers (Fig. 6*A*). We also found that the expression of FAAH, PEPCK, G6P, and FAS genes was lower in Fat-1 than in wild-type mice (Fig. 6*B*).

DISCUSSION

The objective of this study was twofold. First, we explored whether early exposure to a diet enriched in n-3 or n-6 FA could concomitantly influence EC tone in several mouse tissues and metabolic parameters, with particular attention to the liver, which is considered to be the most vulnerable organ after nutritional programming during the perinatal period. Second, we examined the long-term effects of these postnatal nutritional manipulations by examining whether they were associated with alterations

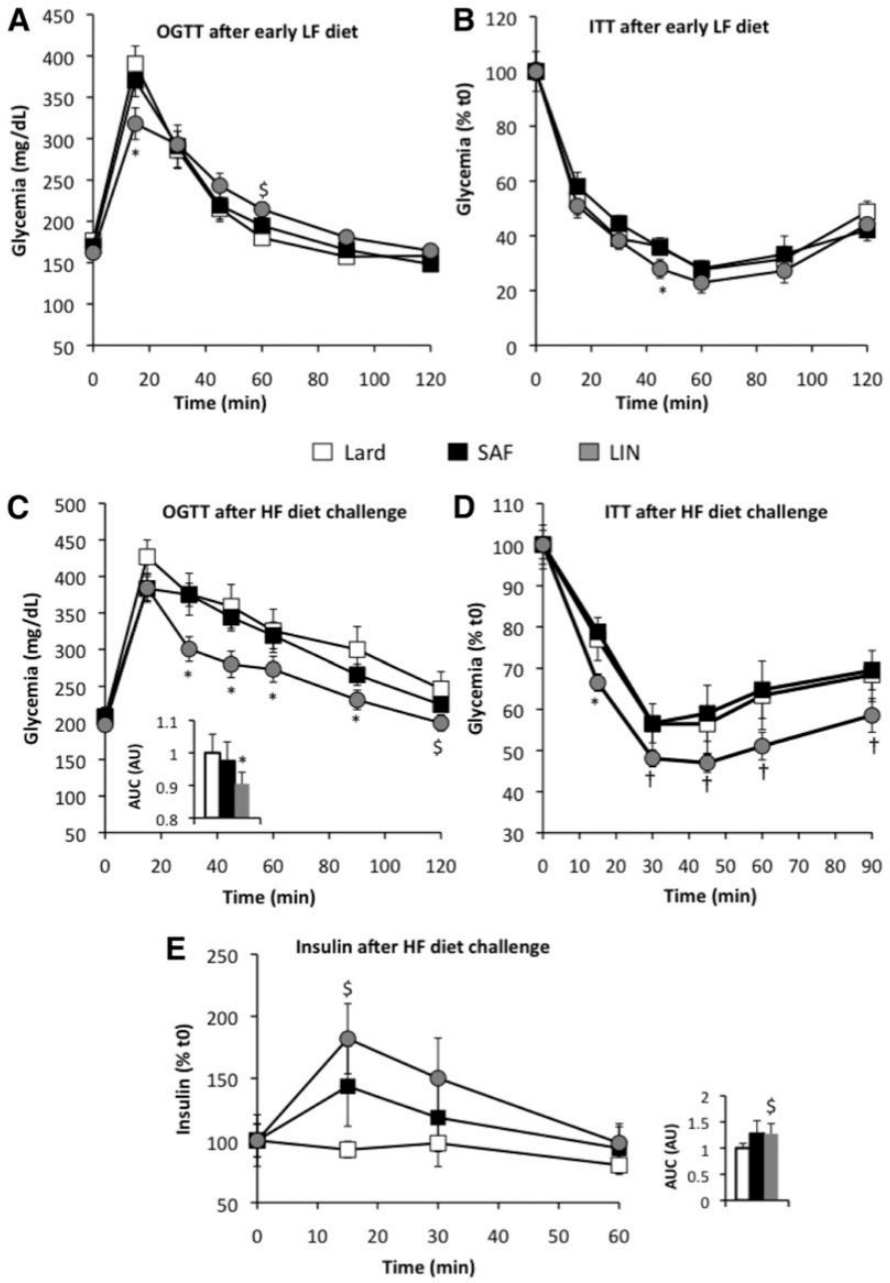


Figure 4— Effect of early diets and later HFD challenge on glycemic control. Three-week-old mice were fed a 5% lipid diet containing lard, lard plus SAF, or lard plus LIN for 10 weeks (early LF diet) and were subjected to an OGTT (2 g/kg) (*A*) and an ITT (0.5 IU/kg) (*B*). Then all mice were challenged with a 30% lard diet for 10 additional weeks (HF diet challenge) and subjected to an OGTT (*C*) and an ITT (*D*). *E*: Plasma insulin appearance after oral glucose load (2 g/kg) was determined after HF diet challenge. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 7–9). *P < 0.05, LIN vs. lard and SAF. †P < 0.05, LIN vs. SAF. \$$P$ < 0.05, LIN vs. lard. AU, arbitrary units; AUC, area under the curve.

of metabolic parameters in response to a later HFD challenge. Our data indicate in particular that exposure to an n-3 FA–enriched diet at an early age induces a marked reduction in liver ECS activity associated with an alteration of key enzymes involved in liver carbohydrate and lipid metabolism. In addition, we observed that some of the liver gene expression modifications induced by n-3 FA feeding in the first weeks of life

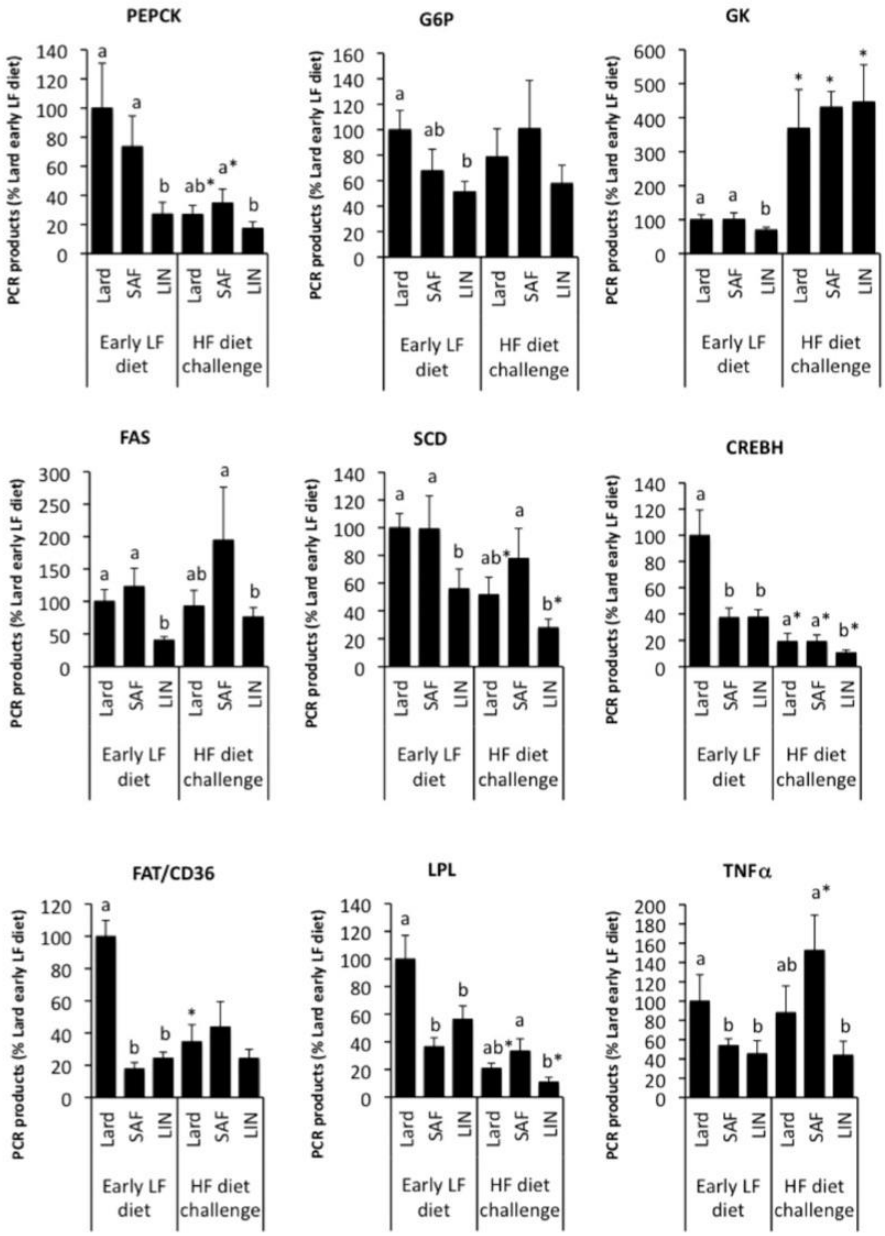


Figure 5—Expression of genes related to carbohydrate and lipid metabolism in the liver. Three-week-old mice were fed a 5% lipid diet containing lard, lard plus SAF, or lard plus LIN for 10 weeks (early LF diet). Then all mice were challenged with a 30% lard diet for 10 additional weeks (HF diet challenge). The results are expressed as the mean ± SEM (n = 6–9). Different superscript letters (a, b) indicate significant statistical differences between groups after early LF diet or after HF diet challenge at $P < 0.05$. *Significant statistical differences between HF diet challenge vs. corresponding early LF diet means ($P < 0.05$).

persisted after HFD challenge and were associated with an improved glycemic control.

A recent series of studies carried out by Alvheim et al. (11,12,14) highlighted the importance of the dietary LA on EC tone. These works demonstrated that excessive LA consumption elevates tissue EC levels and is associated with metabolic alterations. Here, some important issues concerning the impact of dietary FA, and particularly n-3 FA, on ECS activity were also emphasized. First, we observed that the substitution of 0.5% lard for LIN in the

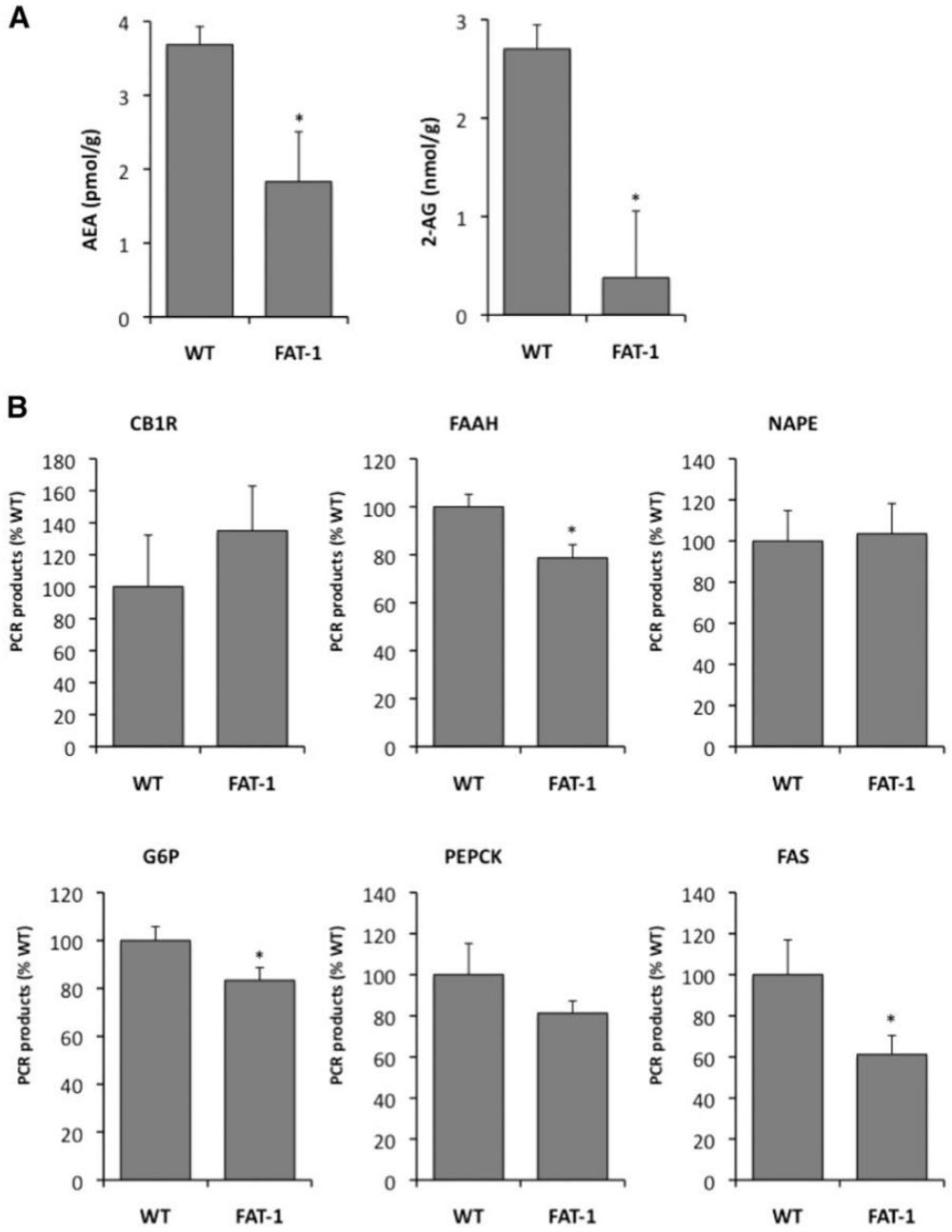


Figure 6—AEA and 2-AG contents and expression of genes related to the ECS and the carbohydrate and lipid metabolism in the livers of Fat-1 mice. *A*: Liver AEA and 2-AG contents. *B*: Gene expression analysis. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 5). *Significant statistical differences between groups at $P < 0.05$. WT, wild type.

early diet was sufficient to decrease EC levels in brain, liver, and muscle. Because EC tissue levels were generally decreased when the diet was enriched in α-LNA, regardless of changes in LA levels, it might be suggested that EC synthesis is more influenced by n-3 than n-6 dietary FA. The fact that increasing the amount of LA in the diet while α-LNA levels remained constant did not induce a marked variation in EC levels also supports this assumption.

In line with this, the decrease in liver AEA level induced by long-term administration of LIN compared with lard could not be due to a net decrease in the supply of n-6 biosynthetic precursors of EC because LA levels were in the same range in the two diets. Instead, competition between n-6 and n-3 FA for elongation and desaturation steps may be crucial for EC synthesis in these conditions. We also found here that early dietary n-3 FA reduces EC levels in the brain and the skeletal muscle. Decreases in both AEA and 2-AG, with the former persisting after HFD challenge, were observed in the LIN group compared with the SAF group. On the whole, these findings, in agreement with previous data in adult mice (35) and rats (34,36), confirm that early dietary interventions based on n-3 FA, might constitute an alternative strategy to "global" CB1R blockers to reduce ECS overactivity and, subsequently, various parameters of the metabolic syndrome, while possibly limiting the consequences on brain function.

Animals from the lard series were fed with a 5% lipid diet, consisting mainly of long chain–saturated and monounsaturated FA (MUFA), and were initially prone to the induction of metabolic disorders related to IR. So it was not surprising to observe that replacing part of the lard with SAF or LIN in the diet was able to limit the alterations of some metabolic parameters, such as triglyceridemia, cholesterolemia, and liver and muscle lipid content, which is in agreement with previous studies (37). The lower insulin levels observed in lard compared with SAF and LIN mice may also represent an impairment of β-cell function induced by prolonged exposure to saturated FA (38). However, a notable finding from this work is that only the diet enriched with α-LNA induced specific changes in the liver expression of genes involved in gluconeogenesis and de novo lipogenesis. Thus, the LIN diet decreased PEPCK, G6P, and GCK mRNA levels, suggesting a slowing down of liver glucose production. Molecular data also indicated that dietary n-3 FA reduces the liver expression of SCD1 and FAS, suggesting a decrease in FA de novo synthesis, which was further illustrated by the lower liver lipid content observed in this group. These findings concur with those of other studies (39,40) showing an inhibitory effect of n-3 FA on gluconeogenesis and de novo lipogenesis, two key actors in IR setup. Although the changes were not statistically significant, the LIN diet also tended to improve glucose and insulin tolerance compared with the lard diet, suggesting that stronger positive effects of the diet might have occurred with longer treatment.

Our findings are reminiscent of those observed in Fat-1 transgenic mice, which can endogenously synthesize n-3 FA from n-6 FA, and consequently show elevated levels of DHA in the liver compared with wild-type mice. They also appear to be protected from HFD-induced glucose intolerance, dyslipidemia, and liver steatosis (10,41). A recent study (28) indicated that Fat-1 mice display reduced capacity for gluconeogenesis and lipid synthesis, as suggested by the low hepatic protein expression of PEPCK, G6P, acetyl-CoA carboxylase (ACC), and FAS in the liver. Interestingly, in addition to confirming lower mRNA levels of these enzymes, we demonstrated that AEA and 2-AG levels are also strongly reduced in the livers of Fat-1 mice.

The observation that tissue enrichment with n-3 FA (by dietary or transgenic manipulation) induces a significant decrease in ECS tone in the liver and muscle supports the possible existence of a direct causal link between the decrease in EC tone induced by LIN diet and the improvement of metabolic parameters observed in our study. The role of the ECS in regulating glucose homeostasis is well known (19,42–44). In particular, studies using liver-specific CB1R knock-out mice demonstrated that hepatic CB1R activation is both necessary and sufficient to account for diet-induced hepatic IR (42). In primary hepatocytes, direct CB1R activation was found to induce glucose production by increasing the expression of CREBH and gluconeogenic genes (19). CREBH is a liver-specific transcription factor recently described as a crucial actor in the regulation of hepatic glucose metabolism in mammals. CREBH has been shown to be induced by fasting or insulin-resistant states in rodents and to activate the transcription of PEPCK or G6Pase gene. Consistent with this, we observed that mice fed with the LIN diet show low levels of PEPCK, G6P, and CREBH, which are associated with a reduced activity of the ECS in the liver. Therefore, it is conceivable that the low gluconeogenic gene expression observed in the livers of these mice is mediated by reduced CREBH expression observed in response to the decrease in EC tone induced by n-3 FA exposure.

Liu et al. (45) have recently proposed a functional link between the ECS and de novo lipogenesis pathways that could also apply to our findings. The authors identified hepatic MUFAs generated via SCD1 as endogenous inhibitors of FAAH in the liver, and thereby as being responsible for elevated hepatic levels of AEA. Here, the addition of LIN to the diet increased n-3 FA levels in liver lipids without depressing n-6 FA levels, but decreased the C18:1/C18:0 ratio, suggesting that part of the effects might be due to desaturase activity modification. Thus, the low AEA levels observed in the liver of LIN mice could result from the downregulation of FAS and SCD1 gene expression, and by low liver MUFA production, which in turn would increase the degradation of AEA by FAAH. The increase in ECS activity induced by HFD challenge is also in agreement with the potential impact of MUFA on EC biosynthesis. Thus, long-term administration of the lipogenic diet might have increased NAPE-PLD levels and decreased FAAH activity, thus leading to higher AEA levels.

Altogether, our results suggest that decreasing ECS activity by introducing n-3 FA into the early diet induces liver gene expression changes that may contribute to carbohydrate and lipid metabolism improvements. The reduction in fat mass expansion observed in LIN mice also suggests a general amelioration of energy homeostasis.

It is widely accepted that the nutritional environment and weight gain in the first years of life are associated with the risk of developing metabolic disorders. It has been shown that during the postnatal period, metabolic imprinting may occur and create a predisposition to an early onset and aggravation of metabolic disorders induced by exposure to HFD later in life (46). In the current study, the impact of early diets on the susceptibility to develop metabolic disorders induced by a subsequent HFD was tested by challenging mice with a 30% lard-based diet for 10 weeks. Evidence has accumulated indicating a tonic overactivation of ECS after HFD-induced obesity (14,35,47). Nevertheless, data from the literature (12,14,48) also suggest that the effect of HFD feeding on peripheral EC levels may depend on the FA composition of the diet. In the current study, we consistently observed that tissue EC contents were generally higher after long-term administration of an HFD, whatever the early LFD. Liver transcriptomic and proteomic analyses related to the ECS also supported a stimulatory effect of HFD on EC tone, as indicated by the marked increase in NAPE-PLD and CB1R expression along with the concomitant decrease in FAAH expression and activity. However, an important finding concerns EC levels in the inguinal AT, which were lowered in all groups after HFD challenge, which is in agreement with previous works (47,49) concerning the impact of HFD on adipose depots of both rodents and humans. Because leptin and insulin were strongly increased after HFD challenge, it might be suggested that the decrease in SCAT EC levels is due to the action of these hormones on EC production, as previously shown (50,51). This possibility implies that our dietary conditions did not yet alter SCAT metabolism to such a degree that it became resistant to hormonal control. The fact that adiponectin levels were increased by eating an HFD suggests that fat depots still had the capacity to expand by recruiting new adipocytes. Indeed, adiponectin production is suppressed as adipocytes become hypertrophic and macrophages infiltrate the tissue (52). So, it would be informative to determine whether ECS activity is still decreased in other, more severe, models of obesity in which the SCAT shows excessive hypertrophy and metabolic stress.

Feeding mice with 30% lard caused metabolic disorders that are typically attributed to diet-induced obesity independent of the postnatal nutritional history. However, the metabolic consequences were somehow limited, likely because of the total lipid content and the duration of the diet, which were not elevated. Thus, mice became fatter, and showed liver TG accumulation, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, slight hyperglycemia, and hypercholesterolemia. While the differences concerning liver EC tone and lipid composition induced by the LIN early diet did not persist after HFD challenge, interestingly, we observed better glucose tolerance in these animals compared with the lard and SAF groups. Data further suggest that the better glycemic control observed in mice fed the early LIN diet was not dependent on β-cell function but rather was associated with an improvement in insulin sensitivity. This may be closely related to the reduced expression of some key genes involved in lipid and carbohydrate homeostasis in the liver of LIN-fed mice. Although differences were not always quite statistically significant for genes taken individually, the concomitant decrease in CB1R, PEPCK, G6P, CREBH, FAS, SCD1, SREBP1c, FAT/CD36, LPL, and TNF-α mRNA levels collectively suggests the existence of a metabolic imprinting set up by the early n-3 FA exposure period.

In conclusion, our results strongly support the possibility that early dietary n-3 FA induces a decrease in liver EC tone, giving rise to modifications persisting later in life and promoting resistance toward metabolic complications induced by an obesogenic diet. These findings support the emerging notion that dietary n-3 FA could be an alternative strategy to drug use to reduce the overactivity of peripheral ECS, and consequently to improve or prevent metabolic disorders related to obesity.

Acknowledgments. The authors thank Serge Monier (Plateforme de Cytométrie) from INSERM UMR866, Lipides, Nutrition, Cancer, for excellent technical assistance.

Funding. This work was supported by funds from the Regional Council of Burgundy and Groupe Lipides et Nutrition.

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

Author Contributions. L.D. and P.D. designed and analyzed the experiments, wrote the manuscript, and performed experiments related to FA compositions and metabolic and molecular parameters. F.P., S.B., and C.S. determined the tissue endocannabinoid contents. S.T.-F. performed experiments related to FA compositions and metabolic and molecular parameters and reviewed the written draft of the manuscript. F.A.I. performed Western blotting and enzyme activity experiments. J.G. and T.M. performed experiments related to FA compositions and metabolic and molecular parameters. J.B. produced Fat-1 mouse tissue samples. V.D. designed and analyzed the experiments and wrote the manuscript. V.D. and P.D. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

1. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. Nature 2001;410:822–825

2. Quarta C, Mazza R, Obici S, Pasquali R, Pagotto U. Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. Trends Mol Med 2011;17:518–526

3. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology (Berl) 1999;143:315–317

4. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and their role in fatty liver disease. Dig Dis 2010;28:261–266

5. Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. Cell Metab 2008;7:227–235

6. Jourdan T, Demizieux L, Gresti J, et al. Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: evidence from cultured explants. Hepatology 2012;55:790–799

7. Buggy Y, Cornelius V, Wilton L, Shakir SA. Risk of depressive episodes with rimonabant: a before and after modified prescription event monitoring study conducted in England. Drug Saf 2011;34:501–509

8. Di Marzo V, Després JP. CB1 antagonists for obesity–what lessons have we learned from rimonabant? Nat Rev Endocrinol 2009;5:633–638
9. Di Marzo V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. Rev Physiol Biochem Pharmacol 2008;160:1–24
10. Li J, Li FR, Wei D, et al. Endogenous ω-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. Mol Endocrinol 2014;28:1316–1328
11. Alvheim AR, Torstensen BE, Lin YH, et al. Dietary linoleic acid elevates the endocannabinoids 2-AG and anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. Lipids 2014;49:59–69
12. Alvheim AR, Torstensen BE, Lin YH, et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-arachidonoylglycerol and anandamide in Atlantic salmon (Salmo salar L.) and mice, and induces weight gain and inflammation in mice. Br J Nutr 2013;109:1508–1517
13. Berger A, Crozier G, Bisogno T, Cavaliere P, Innis S, Di Marzo V. Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acylethanolamines in piglets. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:6402–6406
14. Alvheim AR, Malde MK, Osei-Hyiaman D, et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. Obesity (Silver Spring) 2012;20:1984–1994
15. Sato A, Kawano H, Notsu T, et al. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. Diabetes 2010;59:2495–2504
16. Batetta B, Griinari M, Carta G, et al. Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats. J Nutr 2009;139:1495–1501
17. Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. J Nutr 2010;140:1915–1922
18. Hein GJ, Chicco A, Lombardo YB. Fish oil normalizes plasma glucose levels and improves liver carbohydrate metabolism in rats fed a sucrose-rich diet. Lipids 2012;47:141–150
19. Chanda D, Kim DK, Li T, et al. Cannabinoid receptor type 1 (CB1R) signaling regulates hepatic gluconeogenesis via induction of endoplasmic reticulum-bound transcription factor cAMP-responsive element-binding protein H (CREBH) in primary hepatocytes. J Biol Chem 2011;286:27971–27979
20. Furuya DT, Poletto AC, Freitas HS, Machado UF. Inhibition of cannabinoid CB1 receptor upregulates Slc2a4 expression via nuclear factor-κB and sterol regulatory element-binding protein-1 in adipocytes. J Mol Endocrinol 2012;49:97–106
21. Zalewski BM, Patro B, Veldhorst M, et al. Nutrition of infants and young children (1-3 years) and its effect on later health: a systematic review of current recommendations (EarlyNutrition Project). Crit Rev Food Sci Nutr. 9 March 2015 [Epub ahead of print]
22. Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, et al. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. Endocrinology 2010;151:1598–1610
23. Liu Z, Lim CY, Su MY, et al. Neonatal overnutrition in mice exacerbates high-fat diet-induced metabolic perturbations. J Endocrinol 2013;219:131–143
24. Massiera F, Barbry P, Guesnet P, et al. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. J Lipid Res 2010;51:2352–2361
25. Pouteau E, Aprikian O, Grenot C, et al. A low alpha-linolenic intake during early life increases adiposity in the adult guinea pig. Nutr Metab (Lond) 2010;7:8
26. Massiera F, Saint-Marc P, Seydoux J, et al. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? J Lipid Res 2003;44:271–279
27. González-Périz A, Horrillo R, Ferré N, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J 2009;23:1946–1957
28. Romanatto T, Fiamoncini J, Wang B, Curi R, Kang JX. Elevated tissue omega-3 fatty acid status prevents age-related glucose intolerance in fat-1 transgenic mice. Biochim Biophys Acta 2014;1842:186–191
29. Bellenger J, Bellenger S, Bataille A, et al. High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition. Diabetes 2011;60:1090–1099
30. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957;226:497–509
31. Christie WW. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. J Lipid Res 1982;23:1072–1075
32. Niot I, Gresti J, Boichot J, et al. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on lipid-metabolizing enzymes in obese rat liver. Lipids 1994;29:481–489
33. Bartelt A, Orlando P, Mele C, et al. Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe(-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance. Diabetologia 2011;54:2900–2910
34. Iannotti FA, Piscitelli F, Martella A, et al. Analysis of the "endocannabinoidome" in peripheral tissues of obese Zucker rats. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013;89:127–135
35. Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: effect of high fat diets. Mol Cell Endocrinol 2008;286(Suppl. 1):S66–S78
36. Di Marzo V, Griinari M, Carta G, et al. Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. Int Dairy J 2010;20:231–235
37. Sealls W, Gonzalez M, Brosnan MJ, Black PN, DiRusso CC. Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 omega6 and C18:3 omega3) do not suppress hepatic lipogenesis. Biochim Biophys Acta 2008;1781:406–414
38. Elks ML. Chronic perifusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release. Endocrinology 1993;133:208–214
39. Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? Reprod Nutr Dev 2004;44:289–299
40. Rossi AS, Lombardo YB, Chicco AG. Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: effects of fish oil. Nutrition 2010;26:209–217
41. White PJ, Arita M, Taguchi R, Kang JX, Marette A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. Diabetes 2010;59:3066–3073
42. Liu J, Zhou L, Xiong K, et al. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. Gastroenterology 2012;142:1218–1228.e1
43. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. Cell Metab 2013;17:475–490
44. Troy-Fioramonti S, Demizieux L, Gresti J, Muller T, Vergès B, Degrace P. Acute activation of cannabinoid receptors by anandamide reduces gastrointestinal motility and improves postprandial glycemia in mice. Diabetes 2015;64:808–818
45. Liu J, Cinar R, Xiong K, et al. Monounsaturated fatty acids generated via stearoyl CoA desaturase-1 are endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:18832–18837
46. Sullivan EL, Grove KL. Metabolic imprinting in obesity. Forum Nutr 2010;63:186–194
47. Starowicz KM, Cristino L, Matias I, et al. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. Obesity (Silver Spring) 2008;16:553–565
48. Piscitelli F, Carta G, Bisogno T, et al. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. Nutr Metab (Lond) 2011;8:51

49. Annuzzi G, Piscitelli F, Di Marino L, et al. Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. Lipids Health Dis 2010;9:43
50. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:3171–3180
51. D'Eon TM, Pierce KA, Roix JJ, Tyler A, Chen H, Teixeira SR. The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. Diabetes 2008;57:1262–1268
52. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:1023–1033

Liste des publications et présentations

Publications

- **Muller T.**, Demizieux L., Troy-Fioramonti S., Gresti J., Pais de Barros J.P., Berger H., Vergès B., and Degrace p. (2017) Overactivation of the endocannabinoid system alters the anti-lipolytic action of insulin in mouse adipose tissue, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab, 313 :E26-E36
- Laurent Demizieux L., Piscitelli F., Troy-Fioramonti S., Iannotti FA. , Borrino S., Gresti J., **Muller T**., Bellenger J., Silvestri C., Di Marzo V. and Degrace P. (2016) Early low fat diet enriched with linoleic acid reduces liver endocannabinoid tone and improves late glycemic control after high fat diet challenge in mice, Diabetes, 65 : 1–14
- Troy-Fioramonti S., Demizieux L., Gresti J., **Muller T**., Vergès B. and Degrace P. (2015) Acute activation of Cannabinoid Receptors by Anandamide Reduces Gastrointestinal Motility and Improves Postprandial Glycemia in Mice, Diabetes, 64 : 808-818

Communications orales

- **28-31 mars 2017 : Congrès de la SFD** (Société Francophone du Diabète) Lille, France
  Muller T., Demizieux L., Troy-Fioramonti S., Gresti J., Pais de Barros J-P., Berger H., Vergès B., Degrace P. L'activation du système endocannabinoïde dans le tissu adipeux altère l'action antilipolytique de l'insuline
- **11-14 mars 2014 : Congrès de la SFD** (Société Francophone du Diabète), , Paris France
  Muller T., Troy-Fioramonti S., Demizieux L., Gresti J., Bouam M., Vergès B. and Degrace P. Système endocannabinoïde et obésité : Le blocage des récepteurs aux endocannabinoïdes 1 (CB1R) du tissu adipeux comme stratégie pour diminuer l'activité lipolytique et améliorer la résistance à l'insuline chez la souris obèse

Communications affichées commentées (poster)

- **18-19 juin 2015 : Forum des Jeunes Chercheurs**, Dijon, France
  Muller T., Troy-Fioramonti S., Demizieux L., Gresti J., Bouam M., Vergès B. and Degrace P. Consequences of cannabinoid receptor 1 activation on adipose tissue lipolysis in mice
- **15-19 Septembre 2014 : Congrès de l'EASD** (European Association for the Study of Diabetes), Vienne, Autriche
  Muller T., Troy-Fioramonti S., Demizieux L., Gresti J., Bouam M., Vergès B. and Degrace P. Activation of adipose tissue cannabinoid receptors 1 (CB1R) alters antilipolytic action of insulin and increases lipolysis in mice

ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé
Bourgogne | Franche-Comté

Rôle des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris.

Mots clés : Obésité, Insulinorésistance, Système Endocannabinoïde, Tissu Adipeux, Lipolyse, Métabolisme glucido-lipidique

L'obésité s'accompagne d'une dérégulation de la lipolyse responsable d'une libération excessive d'Acides Gras Libres (AGL) qui sont des acteurs majeurs dans la mise en place de la résistance périphérique à l'insuline. En parallèle, il est maintenant bien établi qu'au cours de l'obésité, une altération de l'activité du Système EndoCannabinoïde (SEC) dans plusieurs tissus métaboliques est observée. S'il est bien décrit que l'hyperactivation de ce système au sein du Tissu Adipeux (TA) favorise son expansion, les conséquences sur la lipolyse adipocytaire restent à déterminer.
Ces travaux de thèse ont pour objectif principal de préciser le rôle du SEC dans la régulation de la lipolyse. Pour cela, l'AEA, un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) et le JZL195, un inhibiteur des enzymes de dégradation des endocannabinoïdes, ont été utilisés *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur un modèle d'explants pour augmenter le tonus endocannabinoïde dans le TA et en mesurer les conséquences sur l'activité lipolytique. Ensuite, les effets du blocage du SEC sur la lipolyse ont été étudiés chez la souris obèse par l'utilisation d'un antagoniste spécifique des CB1R, le Rimonabant.
Ces travaux montrent que l'activation du SEC adipocytaire dans des conditions d'insulinémie élevée (période postprandiale) conduit à une altération du signal insulinique et à une perte de son effet antilipolytique favorisant le relargage d'AGL et pouvant, à terme, conduire à des effets délétères sur les tissus périphériques. A l'inverse, lorsque les voies de signalisation à l'insuline sont peu actives comme c'est le cas au cours du jeûne, la stimulation du SEC s'accompagne d'une activation de la voie PI3K/Akt freinant la lipolyse induite par le jeûne et favorisant ainsi le stockage des lipides et l'expansion du TA. Cette situation expérimentale est comparable à celle rencontrée au cours de l'obésité qui est associée à la fois, à une faible activité de la voie PI3K/Akt (résistance à l'insuline) et à une hyperactivation du SEC. Le blocage des CB1R par le Rimonabant chez la souris obèse, conduit à une stimulation importante de la lipolyse qui semble dépendre d'une activation de l'adénylate cyclase. Etant donné qu'un traitement par le Rimonabant s'accompagne également d'une augmentation du catabolisme des acides gras, il est raisonnable de penser que dans ces conditions, les AGL libérés n'exercent pas leurs effets délétères
En conclusion, ces travaux suggèrent que l'activation du SEC participe à l'installation d'une résistance à l'insuline dans le TA qui pourrait, à plus long terme, s'étendre aux tissus périphériques *via* les effets lipotoxiques des AGL issus de la lipolyse. Au cours de l'obésité, l'association d'une insulinorésistance et d'un tonus endocannabinoïde élevé favoriserait le stockage des lipides et l'expansion de la masse grasse. Au final, le blocage ciblé des CB1R du TA pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante pour lutter contre les dérégulations métaboliques associées à l'obésité.

Role of adipose tissue cannabinoid receptor 1 (CB1R) on lipolysis and consequences on lipid and carbohydrate metabolism in mice

Key words: Obesity, Insulin Resistance, Endocannabinoid System, Adipose Tissue, Lipolysis, Lipid and carbohydrate metabolism.

Obesity is accompanied with lipolysis deregulation responsible for excessive Free Fatty Acid (FFA) release, which are key actors in the implementation of peripheral insulin resistance. In parallel, it is now well established that obesity is associated with EndoCannabinoid System (ECS) activity dysfunction in several metabolic tissues. If it is well described that overactivation of this system in the Adipose Tissue (AT) is favourable to its expansion, the consequences on lipolysis remain to be elucidated.
The main objective of this thesis work was to precise the role of ECS on lipolysis regulation. To achieve this, AEA, a cannabinoid receptor 1 (CB1R) agonist and JZL195, an inhibitor of the enzymes responsible for the degradation of endocannabinoids, were used, *in vivo* in mice and *in vitro* on an explant model, to increase the endocannabinoid tone in the AT and analyse the consequences on lipolytic activity. Then, ECS blockade effect on lipolysis was studied in obese mice by using a specific CB1R antagonist, Rimonabant.
This work demonstrates that activation of ECS under high insulinemia condition (postprandial state) alters insulin signalling limiting its antilipolytic effect and increasing FFA release which can ultimately be deleterious for peripheral tissues. Conversely, when insulin signalling pathways are weakly activated, as it is the case during fasting, ECS activation comes with PI3K/Akt activation impeding fasting induced lipolysis and promoting lipid storage and AT expansion. This experimental situation resembles that encountered in obesity which is associated, both with low activity of PI3K/Akt pathway (insulin resistance) and ECS overactivation. CB1R blockade by Rimonabant in obese mice lead to a strong stimulation of lipolysis which seems to be dependent on adenylate cyclase activation. Considering that Rimonabant treatment was also reported to be associated with improved fatty acid catabolism, it can be advanced that FFA released in excess in these conditions, do not have deleterious effects.
In conclusion, this work suggests that ECS activation is involved in the onset of AT insulin resistance which ultimately could indirectly affect peripheral tissues *via* lipolysis derived FFA lipotoxicity. During obesity, the association of insulin resistance and ECS tone elevation would promote lipid storage and AT expansion. Finally, AT CB1R specific blockade could constitute an interesting therapeutic target limiting metabolic deregulations linked to obesity.

UBFC
UNIVERSITE
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besançon