



UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Laboratoire de Neurosciences Cognitives/UMR 7291
Biomeostasis

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Neurosciences

Clément PIERRE

Rôle de la mPGES-1 dans le développement de l'inflammation chronique de bas seuil et de l'obésité

Soutenu le 05/10/2018 devant le jury :

Pr. Jean-Luc Olivier, rapporteur (Nancy)
Dr. Cédric Moro, rapporteur (Toulouse)
Dr. Patrick-Pierre Michel, examinateur (Paris)
Pr. Anne Kastner, examinateur (Marseille)
Dr. Jean-François Landrier, invité (Marseille)
Dr. Bruno Bariohay, invité (Marseille)
Pr. Jean-Denis Troadec, directeur de thèse (Marseille)

Remerciements

A mes pairs,

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Jean-Denis Troadec, qui a accepté de m'encadrer et qui m'a accompagné pendant ces cinq années. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, merci pour votre patience et d'y avoir toujours cru malgré les nombreux rebondissements. J'ai souvent douté mais le jeu en valait la chandelle.

Un grand merci aux docteurs Bruno Bariohay et Julien Roux sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir fait confiance pour intégrer votre équipe il y a maintenant presque sept ans (eh oui !). Merci Bruno pour ton implication dans mes travaux de thèse, et tes conversations scientifiques qui sont toujours passionnantes et enrichissantes.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse, et me font l'honneur de leur présence lors de la soutenance : le Pr Jean-Luc Olivier, le Dr Cédric Moro, le Pr Anne Kastner, le Dr Patrick-Pierre Michel et le Dr Jean-François Landrier. Merci encore à vous Jean-François pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire.

Aux collègues,

Je tiens évidemment à remercier tous les membres du LNC (anciennement PPSN), qui m'ont accueilli et épaulé tout au long de ma thèse. Je remercie chaleureusement le Pr Jérôme Trouslard pour son accueil dans le laboratoire. Merci Kévin et Guenièvre, pour votre bonne humeur et les moments partagés autant à l'intérieur qu'à l'extérieur du laboratoire, et d'avoir un humour encore plus douteux que le mien. Coraline, tu trouves que je dis trop souvent merci, mais tu n'y échapperas pas, merci de t'être toujours rendue disponible pour m'aider et m'encadrer. Merci Florent, Michel et Stéphanie d'avoir participé à un nombre incalculable de prélèvements terminaux. Si vous rêvez de tissu adipeux la nuit, c'est grâce à moi. Merci à Anne, Rym et Bruno pour leur soutien et leur grande gentillesse. Enfin, merci Adeline de m'avoir accueilli lors de mon arrivée à Marseille et pour ton amitié.

Je tiens à vivement remercier mes collègues de Biomeostasis, les drôles de dames : Julie, Manar et Thais. Merci de m'avoir soutenu et d'avoir supporté mes étourderies pendant ces cinq années.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire de Nutrition Obésité et Risque Thrombotique (NORT) de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de leur laboratoire. Merci Laurianne de m'avoir initié à la culture cellulaire.

Merci à la Fédération de recherche 3C (Comportement – Cerveau – Cognition) et en particulier à Nathalie Baril, de m'avoir permis d'utiliser leur IRM pour petits animaux.

Aux Marseillais,

Un grand merci aux habitants de la colocation Labadié, dont certains sont devenus des amis. Merci Florian pour mon premier vol en avion, de m'avoir donné le virus du voyage, pour les sorties dans les bars Marseillais et les discussions philosophiques sans fin que nous avons eues. Merci Elise pour ta bonne humeur du matin, les dimanches canapé-kayak, ton humour et ton sens de la répartie (et tes blagues nulles). Merci à Célia la Stakhanoviste, d'avoir enrichi mon vocabulaire de façon non négligeable, pour ta maladresse légendaire et tes ateliers pâtisserie. Merci Marie pour ta gentillesse et tes goûts musicaux, que j'apprécie particulièrement. Et bien-sûr, merci à toi Léa, qui est devenue bien plus qu'une simple colocataire. Merci pour ta tendresse, ton soutien indispensable et tout ce que nous avons vécu ensemble tout au long de ces dernières années. Tu es à ce jour, ma plus belle histoire d'amour.

Aux Nancéiens,

On dit souvent loin des yeux loin du cœur mais c'est faux, même si nos rencontres se font trop rares. Merci en particulier à toi David, tu fais partie des personnes qui ont changé ma vie. Merci pour tous les moments vécus ensemble et tout ce que tu m'as apporté. Merci Nadège pour ton amitié et les fous-rires que nous avons partagés. Merci à toi Loïc, peut-être la personne la plus généreuse que j'ai rencontrée. Merci Julie, on ne s'est pas connu longtemps mais ce fut une très belle rencontre. Peut-être arriverons-nous enfin à faire ce week-end dans les gorges du Verdon. En espérant tous vous revoir plus souvent maintenant ma thèse finie.

A ma famille,

Enfin, des remerciements n'en seraient pas vraiment sans remercier ses parents. Cette thèse, c'est aussi la vôtre. Un immense merci à vous deux ! Vous êtes d'excellents papa et maman. Je suis fier de vous et de l'éducation que vous m'avez donnée. Vous avez toujours tout fait pour que Thibaut et moi soyons heureux, et je ne vous remercierai jamais assez pour ça. On ne le dit pas souvent dans la famille mais je vous aime. Merci à Thibaut mon petit frère. Au moment où j'écris ces lignes beaucoup de souvenirs d'enfance me reviennent en tête, et tu es présent dans

quasiment chacun d'eux. Merci Céline de partager sa vie (et tes chats) et de contribuer à le rendre heureux. C'est toujours un plaisir de vous voir et de discuter avec vous.

A mes voyages passés et futurs,

A vous tous,

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	1
TABLE DES FIGURES.....	5
AVANT-PROPOS.....	9
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	13
CHAPITRE I : L'OBÉSITÉ	13
I.1 Généralités	13
I.2 Homéostasie énergétique	14
<i>I.2.1 Régulation de la prise alimentaire</i>	14
<i>I.2.2. Régulation des dépenses énergétiques</i>	18
I.3 Tissu adipeux	23
<i>I.3.1 Tissu adipeux blanc</i>	23
<i>I.3.2 Tissu adipeux brun</i>	24
<i>I.3.3 Tissu adipeux beige</i>	25
<i>I.3.4 Origine des tissus adipeux</i>	26
<i>I.3.5 Adipogenèse</i>	27
I.3.5.a Différenciation des adipocytes blancs.....	27
I.3.5.b Différenciation des adipocytes bruns.....	28
I.3.5.c Différenciation des adipocytes beiges.....	29
I.3.5.d Activation des adipocytes bruns/beiges.....	29
I.4 L'obésité : une maladie inflammatoire	32
<i>I.4.1 Inflammation liée aux nutriments</i>	32
<i>I.4.2 Microbiote intestinal</i>	35
I.5 Altérations du tissu adipeux au cours de l'obésité	36
<i>I.5.1 Altérations tissulaires</i>	36
<i>I.5.2 Altérations du métabolisme du tissu adipeux</i>	37
I.5.2.a Altérations de la sécrétion d'adipokines.....	37

I.5.2.b Altérations de la lipolyse	41
I.4.2.c Altérations des tissus adipeux bruns/beiges.....	44
<i>I.5.3 Plasticité et inflammation</i>	45
I.5.3.a Chez l'individu sain.....	45
I.5.3.b Chez l'individu obèse.....	47
I.6 Inflammation hypothalamique	51
I.7 Lipotoxicité	54
<u>CHAPITRE II : La mPGES-1, un rôle au-delà de l'inflammation</u>	57
II.1 Découverte	57
II.2 Biosynthèse des prostanoides	57
II.3 Voies de dégradation de la PGE2	61
<i>II.3.1 Voie enzymatique</i>	61
<i>II.3.2 Voie non enzymatique</i>	62
II.4 Voies de transport de la PGE2	63
II.5 Voies de signalisation de la PGE2	64
<i>II.5.1 EP1</i>	64
<i>II.5.2 EP2</i>	64
<i>II.5.3 EP3</i>	65
<i>II.5.4 EP4</i>	65
II.6 PGE2 et inflammation	67
<i>II.6.1 PGE2 et réaction de phase aiguë</i>	69
II.6.1.a Fièvre	69
II.6.1.b Hyperalgésie	69
II.6.1.c Tuméfaction	70
II.6.1.d Anorexie inflammatoire	70
<i>II.6.2 La mPGES-1 : un médiateur de l'inflammation</i>	71
II.6.2.a Effets pro-inflammatoires	71
II.6.2.b Effets anti-inflammatoires.....	74
II.7 PGE2 et mécanismes liés à l'obésité	76

<i>II.7.1 Inflammation du tissu adipeux</i>	76
<i>II.7.2 Lipolyse</i>	78
<i>II.7.3 Adipogenèse</i>	79
<i>II.7.4 Tissus adipeux bruns et beiges</i>	79
<i>II.7.5 Résistance à l'insuline</i>	80
<i>II.7.6 COX2, prostaglandines et obésité</i>	81
<i>II.7.7 Inhibition pharmacologique de la mPGES-1 et modèle mPGES-1^{-/-}</i> ..	82
OBJECTIFS DE TRAVAIL	85
RÉSULTATS	87
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	119
DISCUSSION	125
PERSPECTIVES	137
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ANNEXES 1	179
ANNEXES 2	183
ANNEXES 3	197
ANNEXES 4	209

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 13-PGR : Δ 13-15-ketoprostaglandine réductase
- 15-PGDH : 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase
- AA : acide arachidonique
- AC : adénylate cyclase
- Adbh5 : Alpha/Beta-Hydrolase Homain Containing Protein 5
- AdPLA2 : adipose-specific phospholipase A2
- AGL : acides gras libres
- AgRP : agouti-related protein
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- AMPK : AMP-activated protein kinase
- ARC : « arcuate nucleus » ; noyau arqué
- ATGL : adipose triglyceride lipase
- BMP2/4/7 : bone morphogenetic protein 2/4/7
- CART : cocaine- and amphetamine-regulated transcript
- CCK : cholécystokinine
- CCL2 : chémokine (C-C motif) ligand 2
- CD68 : cluster de différenciation 68
- C/EBP $\alpha/\beta/\delta$: CAAT/Enhancer binding proteins $\alpha/\beta/\delta$
- Cidea : cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A
- COX1/2 : cyclooxygénase 1/2
- cPGES : cytosomal prostaglandine E synthase
- CPT1A/B : carnitine palmitoyltransférases 1 A/B
- CVD : complexe vagal dorsal
- DAG : diacylglycérol
- DAMP : damage-associated molecular patterns
- EBF2 : early B-cell factor 2
- EE : energy expenditures
- EP : E prostanöide
- EWAT: epididimal white adipose tissue
- FGF : fibroblast growth factor
- GLP-1 : glucagon like protein-1

HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 α
HFD : high-fat diet
HSL : hormone-sensitive lipase
iBAT : interscapular brown adipose tissue
IFN- γ : interféron- γ
IL-1 α /4/5/6/10/12 : interleukine-1 α /4/5/6/10/12
IMC : indice de masse corporelle
iNOS : inducible nitric oxide synthase I
P3 : inositol-1,4,5-trisphosphate
IRF4 : interferon regulatory factor 4
LHA : “lateral hypothalamic area”; hypothalamus latéral
LT_H1/2/17/c : lymphocyte T helper 1/2/17/cytotoxique
LPS : lipopolysaccharide
LXA4 : lipoxine A4
MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1
MGL : monoacylglycerol lipase
MGST : microsomale glutathione S transferase
MMP : métalloprotéinase matricielle
mPGES-1/2 : microsomale Prostaglandine E synthase-1/2
MRP : multidrug-resistant protein
Myf5 : myogenic factor 5
NC : normal chow
NF- κ B : nuclear factor- κ B
NPY : neuropeptide Y
NTS : noyau du tractus solitaire
Pax 7 : paired box 7
Pdgfr α : platelet-derived growth factor receptor α
PGA/B2/D2/E2/F2 α /G2/H2/I2 : prostaglandine A/B2/D2/E2/F2 α /G2/H2/I2
PGC1- α : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1- α
PGT : prostaglandin transporter
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA/C : protéine kinase A/C
PLA2/C : phospholipase A2/C

POMC : pro-opiomélanocortine
PPAR $\alpha/\beta/\delta$: peroxisome proliferator- activated receptor $\alpha/\beta/\delta$
PYY : peptide YY
PRDM16 : PR containing domain 16
PVN : « paraventricular nucleus » ; noyau paraventriculaire
RE : réticulum endoplasmique
RER : respiratory exchange ratio
RWAT : retroperitoneal white adipose tissue
TAE/R : tissu adipeux épidydimal/rétropéritonéal
TG : triglycérides
TGF- β : tumor growth factor- β
TLR4 : toll-like receptor 4
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TXA2 : thromboxane A2
UCP1 : uncoupling protein 1
UPR : unfold protein response
VEGF : vascular endothelial growth factor
VLDL : very low density protein
WT : wild type

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION

CHAPITRE I : L'OBÉSITÉ

<u>Figure 1</u> : Prévalence mondiale de l'obésité	14
<u>Figure 2</u> : Régulation de la balance énergétique	16
<u>Figure 3</u> : Répartition des dépenses énergétiques	19
<u>Figure 4</u> : Rôle d'UCP1 dans la thermogenèse non frissonnante	20
<u>Figure 5</u> : Composition du tissu adipeux blanc	23
<u>Figure 6</u> : Dépôts des tissus adipeux bruns et blancs	24
<u>Figure 7</u> : Morphologie des différents adipocytes	26
<u>Figure 8</u> : Différenciation des adipocytes	31
<u>Figure 9</u> : Mécanismes reliant l'inflammation chronique de bas seuil à l'obésité	32
<u>Figure 10</u> : Réaction inflammatoire pulsatile en réponse aux repas	33
<u>Figure 11</u> : Le tissu adipeux blanc, un organe endocrine	38
<u>Figure 12</u> : Altérations de la lipolyse au cours de l'obésité	42
<u>Figure 13</u> : Inflammation du tissu adipeux liée à l'obésité	49
<u>Figure 14</u> : Inflammation hypothalamique liée à l'obésité	53
<u>Figure 15</u> : Lipotoxicité	55

CHAPITRE II : La mPGES-1, un rôle au-delà de l'inflammation

<u>Figure 16</u> : Biosynthèse des prostanoïdes	60
<u>Figure 17</u> : Voie de dégradation de la PGE2	62
<u>Figure 18</u> : Voie de signalisation de la PGE2	66
<u>Figure 19</u> : Le modèle murin mPGES-1 ^{-/-} et maladies inflammatoires	72
<u>Figure 20</u> : La PGE2 et les cellules de l'immunité	76
<u>Figure 21</u> : La mPGES-1, un lien entre inflammation chronique et l'obésité ?	82

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

<u>Figure suppl. 1</u> : Impact de l'inactivation de la mPGES-1 sur le métabolisme hépatique.	120
--	-----

Figure suppl. 2 : Impact de l'invalidation de la mPGES-1 les taux plasmatiques de lipides . 121

Figure suppl. 3 : Impact de l'invalidation de la mPGES-1 sur l'expression des marqueurs adipocytaires. 122

PERSPECTIVES

Figure 22 : Production de souris invalidées pour la mPGES-1 spécifiquement au niveau du tissu adipeux. 139

AVANT-PROPOS

Mon parcours scolaire et scientifique m'a amené à me passionner pour l'étude de l'obésité, une pathologie en apparence « simple » mais qui est en réalité beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. C'est une des raisons qui m'a poussé à rejoindre la société BIOMEOSTASIS après l'obtention de mon master d'expertise préclinique du médicament. Au cours de mon travail au sein de la société, j'ai rencontré l'équipe du Laboratoire des Neurosciences Cognitives (LNC), anciennement laboratoire PPSN. De fil en aiguille, nous avons noué des liens qui nous ont poussés à établir un projet de recherche commun, portant évidemment sur l'étude de l'obésité, et sur son caractère inflammatoire en particulier. En effet, l'obésité peut être considérée comme une maladie inflammatoire, et la diminution de l'inflammation liée à l'obésité constitue une voie thérapeutique prometteuse. Parmi les nombreux médiateurs de l'inflammation, notre choix s'est porté sur la microsomale prostaglandine E synthase-1, une enzyme inductible responsable de la synthèse de la prostaglandine E2. Je profite de ces quelques lignes pour remercier l'Association National Recherche Technologie (ANRT) d'avoir financé et cru au projet. Le travail qui vous est présenté est donc le fruit de la collaboration entre le LNC où j'ai réalisé mes travaux de thèse, la société Biomeostasis où j'ai été embauché, et l'ANRT. Mon travail au sein de la société m'a permis d'acquérir des connaissances techniques et d'analyse nécessaires à la bonne conduite de ma thèse. En effet, j'ai pu apprendre à gérer des modèles murins d'obésité (induite par un régime gras et génétique), réaliser et analyser des enregistrements de calorimétrie indirecte, réaliser des kits de dosage à l'aide de kits commercialement disponibles, développer mes connaissances en métabolisme énergétique et mettre en place des protocoles expérimentaux. En plus de ces compétences, j'ai également pu me forger ma première expérience professionnelle en découvrant et en pratiquant le métier de chef de projet.

Les résultats de mes recherches sont présentés sous forme d'un article original qui est en révision dans le journal « Frontiers in Physiology ». J'ai contribué à la rédaction de cet article, mais aussi à la réalisation de toutes les expérimentations qui y sont présentées.

En plus de mes études de thèse, j'ai également participé à d'autres travaux qui ont fait l'objet de publication dans des revues scientifiques internationales. Ces travaux m'ont permis d'étudier des mécanismes impliqués dans la régulation centrale de la prise alimentaire, m'apportant ainsi une vision plus complète et une meilleure compréhension de la régulation du métabolisme énergétique. En effet, j'ai pu participer à des travaux étudiant les mécanismes

centraux de la metformine (Rouquet et al., 2014), un agent anti-hyperglycémique et anorexigène utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Ma participation aux travaux de Derghal et al., (2015) m'a permis d'étendre mes connaissances sur la signalisation de la leptine au niveau central, à savoir, son effet sur la régulation de micros-ARN. Enfin, j'ai participé à des travaux étudiant l'effet de gliotransmetteurs sur la prise alimentaire et l'obésité, me permettant ainsi d'explorer une autre facette de la régulation du métabolisme énergétique.

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications :

Pierre, C., Guillebaud, F., Airault, C., Baril, N., Barbouche, Rim., Save, Etienne., Rami, S., Bariohay, B., Dallaporta, M., Troadec, J.D. Invalidation of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) reduces diet-induced low grade inflammation and adiposity. **En revision**. *Frontiers in Physiology*.

Guillebaud, F., Duquenne, M., Djelloul, M., **Pierre, C.**, Roussel, G., Riad S., Morin, F., Jean, A., Tonon, M.C., Gaigé, S., Lebrun, B., Dallaporta, M., Leprince, J., Prevot, V., Troadec J.D. Glial endozepines reverse high fat diet-induced obesity by increasing hypothalamic sensitivity to peripheral leptin. **En révision**. *Cell Metab*.

Derghal, A., Djelloul, M., Airault, C., **Pierre, C.**, Dallaporta, M., Troadec, J.-D., Tillement, V., Tardivel, C., Bariohay, B., Trouslard, J., et al. (2015). Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR. *Front. Cell. Neurosci.* 9.

Rouquet, T., **Pierre, C.**, Gaigé, S., Tardivel, C., Roux, J., Dallaporta, M., Bariohay, B., Troadec, J.D., Lebrun, B. (2014). Acute oral metformin enhances satiation and activates brainstem nesfatinergetic neurons. *Obesity (Silver Spring)*. 22, 2552-2562.

Communications :

The Nutrition Society Summer Conference 2018 Getting energy balance right, University of Leeds, UK. Communication affichée.

Les Journées Francophones De la Nutrition 2015, Marseille, France. Communication affichée.

22nd Annual Meeting of the Doctoral School, 2014, UFR Sciences, site de Luminy. Communication orale.

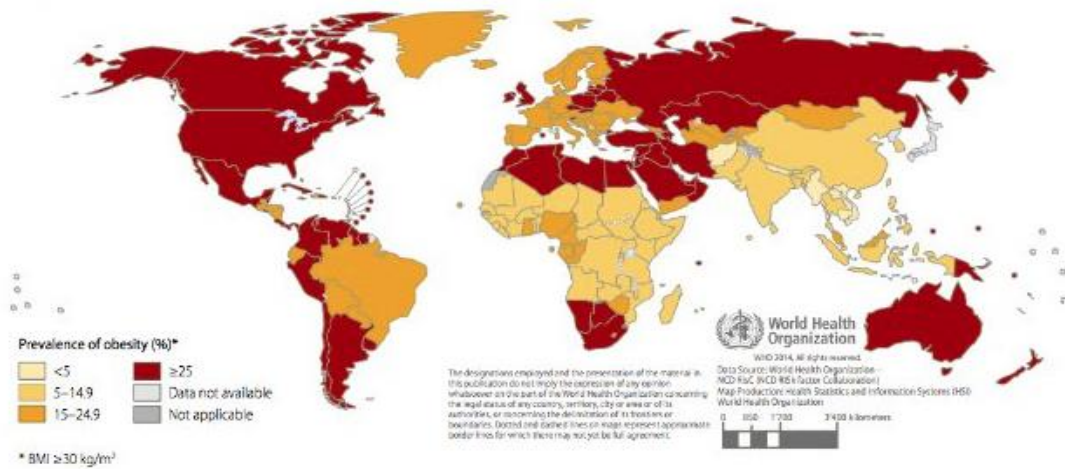
INTRODUCTION

Chapitre I : L'Obésité

I.1 Généralités

L'obésité est reconnue comme une maladie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) depuis 1997 (WHO, 1999). Elle est définie par une accumulation anormale ou excessive de masse adipeuse qui peut avoir des conséquences néfastes sur la santé. Un indice de masse corporelle (IMC = poids (kg)/taille (cm²)) supérieur à 30kg.cm² est utilisé pour définir une personne comme obèse. Cependant, l'IMC n'est pas toujours le meilleur paramètre pour définir l'obésité, en particulier pour la prédiction des risques métaboliques liés à l'obésité. Actuellement à l'échelle mondiale, on estime à plus de 650 millions de personnes le nombre de personnes obèses, et à 2,8 millions le nombre de personnes décédant chaque année du fait de leur surpoids ou de leur obésité (WHO, 2017). Ces nombres ne font qu'augmenter depuis des décennies, que ce soit dans les pays développés ou dans les pays émergents. Cette observation amène l'OMS à utiliser le terme de « pandémie » pour caractériser le développement de cette pathologie (**Figure 1**). Comme un symbole de ce constat, nous venons de basculer dans un monde où il y a désormais plus d'individus obèses que d'individus en insuffisance pondérale (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). A noter qu'il demeure encore de grandes disparités entre les pays pauvres et les pays riches à ce sujet. Ces données sont d'autant plus alarmantes que l'obésité est connue pour augmenter la prévalence des maladies cardiovasculaires, du diabète de type 2, de certains types de cancer, ou encore du syndrome métabolique (Van Gaal et al., 2006; Kahn et al., 2006; Ferguson et al., 2013). L'obésité représente ainsi un enjeu sanitaire et commercial extrêmement important. Les intenses recherches qui ont été menées pour en comprendre les causes, les mécanismes et les conséquences, ont permis de montrer qu'il s'agit d'une maladie complexe et multifactorielle. Malheureusement, les molécules mises sur le marché et les stratégies de prévention mises en place n'ont toujours pas réussi à endiguer sa progression. Ainsi, l'obésité atteint des seuils alarmants dans certains pays, comme aux Etats-Unis où sa prévalence était de 33,6% en 2014. Les causes majeures de l'obésité sont liées aux modes de vies modernes, qui comprennent entre autres : une alimentation trop riche en lipides et en sucres, une diminution de l'activité, le style de vie sédentaire, l'alcool et le stress.

A



B

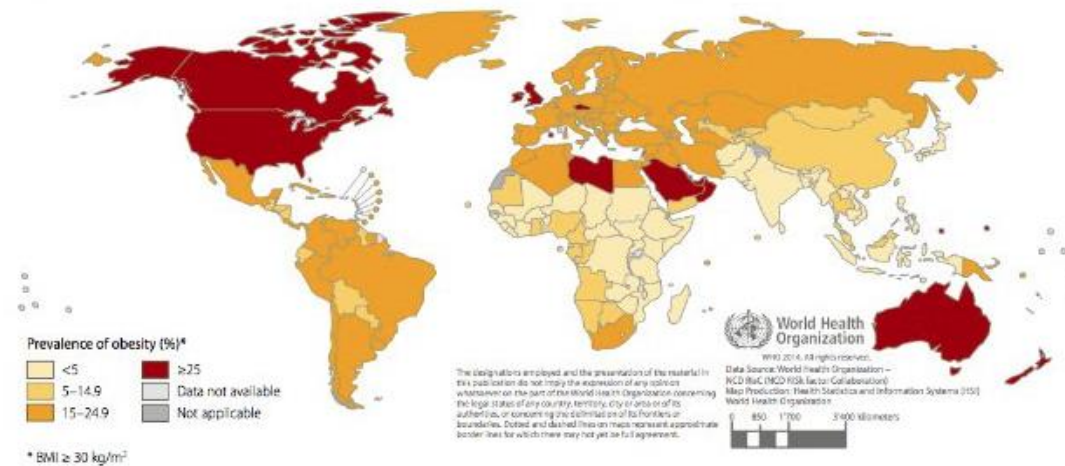


Figure 1 : Prévalence mondiale de l'obésité chez la femme (A) et l'homme adulte en 2014 (B). WHO Report: Obesity pandemic continues, 2015.

I.2 Homéostasie énergétique

I.2.1 Régulation de la prise alimentaire

La consommation et la recherche de nourriture gouvernent notre quotidien et ont pour but d'apporter l'énergie nécessaire à la survie de notre organisme. Pour autant, la fréquence, la quantité et la nature de nos repas sont régulées de façon instinctive. La prise alimentaire s'oppose aux dépenses énergétiques, et ensemble, ces deux composantes participent à une équation complexe appelée « homéostasie énergétique ». L'énergie peut également être stockée pour être réutilisée ultérieurement lors de périodes où la nourriture est limitée. Si le tissu

adipeux assure le stockage des lipides sous forme de triglycérides (TG), le foie et les muscles assurent quant à eux le stockage des glucides. Chez un sujet sain adulte, l'homéostasie énergétique permet le maintien de réserves adipeuses et d'un poids corporel stable sur le long terme. Sa régulation fait intervenir de nombreux signaux qui vont être intégrés par le système nerveux central *via* deux structures, qui sont : l'hypothalamus et le complexe vagal dorsal (CVD), une structure du bulbe rachidien (**Figure 2**). Le but de ce paragraphe n'est pas de décrire l'ensemble de la neuro-circuiterie impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique, mais de fournir une description générale des différents signaux qui y sont impliqués.

L'initiation d'un repas est due essentiellement à des facteurs externes, comme la disponibilité de la nourriture, les aspects visuels, olfactifs et sociétaux, mais également à des signaux internes hormonaux ou métaboliques. Par exemple, la ghréline est une hormone principalement sécrétée par l'estomac (Inui, 2001) en fonction de l'état nutritionnel. Sa production est stimulée lorsque l'estomac se vide (Cummings et al., 2001), et à l'inverse, est inhibée au cours des repas (Tschöp et al., 2001). Une fois produite, la ghréline est libérée dans la circulation sanguine et traverse la barrière hémato-encéphalique pour atteindre l'hypothalamus, où elle produit son effet orexigène en se fixant sur ses récepteurs (Klok et al., 2007). En ce qui concerne la taille et la durée du repas, leur régulation fait principalement intervenir des signaux internes. Parmi eux, les distensions gastriques semblent jouer un rôle majeur dans la sensation de satiété (Janssen et al., 2011). L'effet de satiété peut également être médié par la cholécystokinine (CCK), le « glucagon-like peptid-1 » (GLP-1) et le peptide YY (PYY), trois hormones sécrétées par le système gastro-intestinal en réponse à l'ingestion de nutriments (Gibbs et al., 1973 ; Ross and Dupre, 1978 ; Batterham et al., 2002). Les distensions gastriques, la CCK, le GLP-1 et le PYY exercent leur effet anorexigène en stimulant les afférences vagales qui projettent du système gastro-intestinal jusqu'au au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS), situé dans le CVD (voir pour revues : Janssen et al., 2011 ; Heisler and Lam, 2017). En plus de leur action paracrine sur les afférences vagales, ces hormones gastro-intestinales peuvent être transportées par voie humorale, et exercer leur action anorexigène directement au niveau du NTS, une structure où leurs récepteurs sont exprimés (Imeryüz et al., 1997 ; Sun and Ferguson, 1997 ; Blevins et al., 2008).

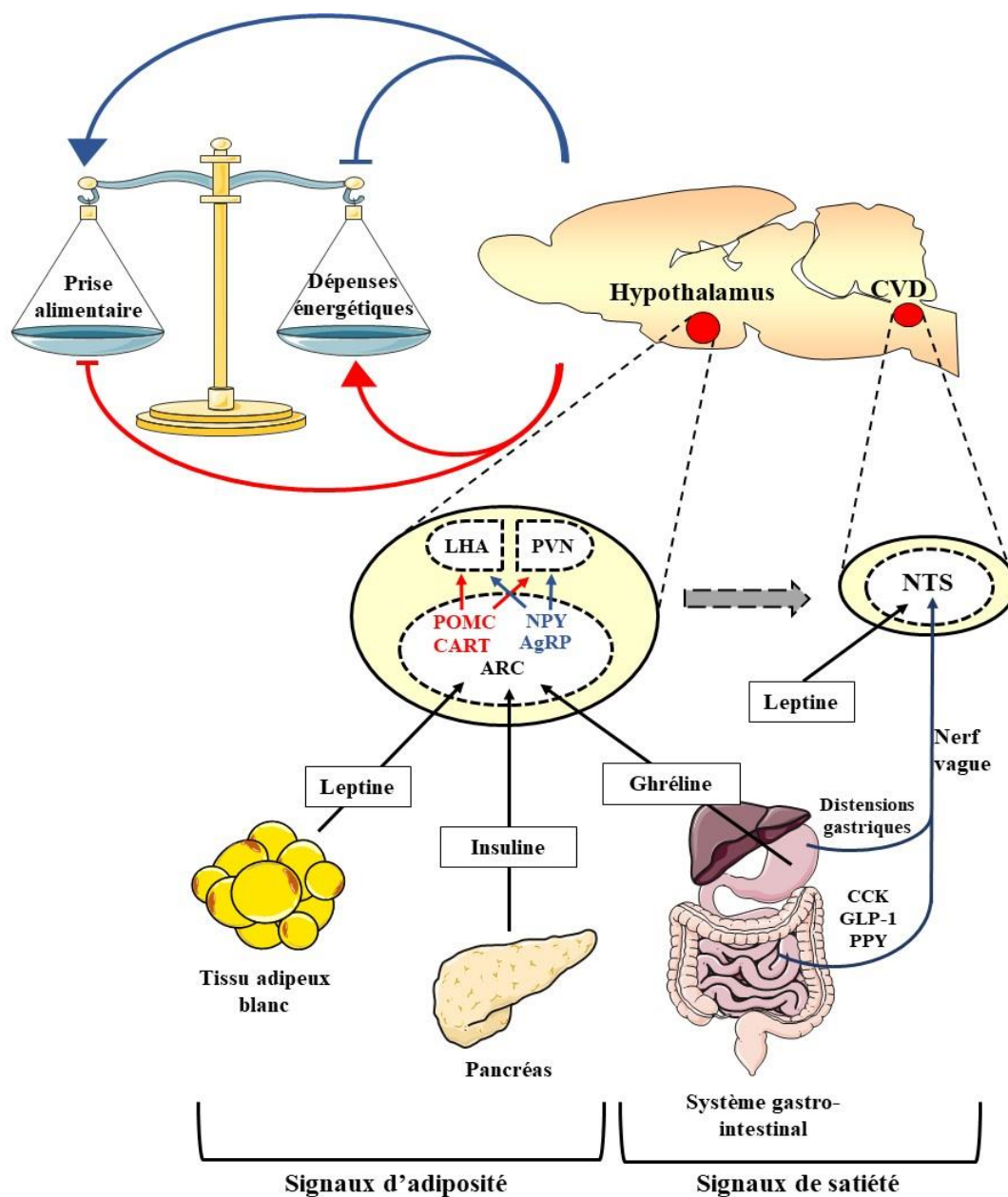


Figure 2 : Régulation de la balance énergétique. Afin de maintenir une adiposité et un poids corporel stable, la prise alimentaire est régulée en fonction des repas et de la masse adipeuse. Il a été proposé qu'en réponse à un repas, le système gastro-intestinal sécrète des signaux de satiété tels que la CCK, le GLP-1 et le PYY. Ces signaux vont alors stimuler les afférences vagales qui atteignent le NTS, une structure du CVD. En plus de ces peptides gastro-intestinaux, les distensions gastriques stimulent les afférences vagales qui innervent le NTS. Celui-ci va ensuite intégrer et traiter ces signaux de façon à favoriser l'arrêt du repas. La réponse de satiété du NTS est modulée par les signaux d'adiposité (agissant à plus long-terme) représentés par la leptine et l'insuline, sécrétées respectivement par le tissu adipeux et les cellules β -pancréatiques. Pour ce faire, ces signaux atteignent l'hypothalamus par la circulation sanguine où ils sont intégrés de façon majoritaire par l'ARC. Plusieurs populations neuronales dites de « premier-ordre » y sont présentes, dont les neurones produisant des neuropeptides anorexigènes (POMC, CART), et des neurones produisant des neuropeptides orexigènes (NPY, AgRP). Les premiers sont stimulés par les signaux d'adiposité, aux contraires des seconds qui sont inhibés. Ces neurones de premier-ordre projettent vers des neurones de « second-ordre » principalement situés dans le PVN et la LHA, qui projettent à leur tour vers le NTS, une structure du CVD. En intégrant et en traitant ces signaux, ils vont donc moduler la réponse des signaux de satiété courts termes. De plus la leptine est capable d'activer directement le NTS. La ghréline sécrétée par l'estomac est intégrée au niveau de l'hypothalamus mais est considéré comme un signal agissant à l'échelle du repas. Au contraire des signaux d'adiposité, elle possède un effet orexigène.

ARC : noyau arqué ; AgRP : agouti-peptide protein ; CART : cocaine- and amphetamine-regulated transcript ; CCK : cholécystokinine ; CVD : complexe vagal dorsal ; GLP-1 : glucagon-like peptide-1 ; LHA : hypothalamus latéral ; NPY : neuropeptide Y ; NTS : noyau du tractus solitaire ; POMC : pro-opiomélanocortine ; PYY : peptide YY ; PVN : noyau paraventriculaire

Les différents signaux décrits ci-dessus ont des effets significatifs principalement à court terme *i.e.* qui agissent à l'échelle du repas. Une régulation fine et efficace de l'homéostasie énergétique nécessite également l'intervention de signaux d'adiposité agissant à plus long terme, et qui sont assurés par l'insuline et la leptine. Ils reflètent en continue le poids corporel et impactent le seuil d'intégration des signaux courts termes. La découverte de la leptine (Zhang et al., 1994) et de son récepteur (Tartaglia et al., 1995) ont permis de poser les bases de la compréhension actuelle de la régulation de la balance énergétique. Cette hormone est synthétisée principalement par le tissu adipeux blanc, et sa production corrèle positivement avec l'augmentation de la masse adipeuse totale et de l'IMC (Schwartz et al., 1996a ; Weigle et al., 1997). La leptine est transportée jusqu'à l'hypothalamus par la circulation sanguine, où elle informe le système nerveux central sur l'état des réserves énergétiques. Elle agit majoritairement sur des neurones dits de « premier-ordre » situé dans le noyau arqué (ARC). Sa fixation sur son récepteur inhibe les neurones exprimant des neuropeptides orexigènes, à savoir : le neuropeptide Y (NPY) et la protéine Agouti (AgRP ; Schwartz et al., 1996b ; Sahu, 1998) et stimule les neurones exprimant les neuropeptides anorexigènes, qui sont : le Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) et la pro-opiomélanocortine (POMC ; Elias et al., 1998 ; Cowley et al., 2001). Ces neurones projettent vers d'autres régions hypothalamiques dites de « second ordre », comme le noyau paraventriculaire (« paraventricular nucleus ; PVN) et l'hypothalamus latéral (« lateral hypothalamic area ; LHA) qui projettent à leur tour vers le NTS (Cone, 2005). En plus de son action directe sur l'hypothalamus, la leptine potentialise l'effet de la CCK et du GLP-1, et diminue l'effet de la ghréline d'autre part (Barrachina et al., 1997 ; Sahu, 1998 (Williams et al., 2009a). De cette façon, la leptine entraîne une diminution de la taille des repas. Elle possède également des récepteurs au niveau du CVD, où elle peut exercer directement son effet anorexigène (Grill et al., 2002 ; Williams et al., 2009b).

L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, après un repas et une élévation de la glycémie (Bagdade et al., 1967). Des injections intraventriculaires d'insuline chez le babouin ont permis de montrer que comme la leptine, l'insuline réduit la prise alimentaire en agissant directement au niveau du cerveau (Woods et al., 1979). Son récepteur est exprimé au sein des neurones NPY/AgRP et POMC/CART de l'ARC (Benoit et al., 2002). De façon comparable à la leptine, la fixation de l'insuline sur son récepteur induit une

diminution de l'expression du peptide orexigène NPY, et une augmentation de l'expression du peptide anorexigène POMC (Sipols et al., 1995 ; Benoit et al., 2002). Si l'insuline semble être impliquée dans des mécanismes similaires à la leptine, en revanche, son effet sur la satiété semble moins important que celui de la leptine (voir pour revue: Woods et al., 2006).

Il est important de noter que la CCK, le GLP-1 et le PYY possèdent des récepteurs au niveau de l'hypothalamus, et leur injection périphérique entraîne une augmentation de l'activité des neurones de l'ARC (Miyasaka et al., 1994 ; Tang-Christensen et al., 2001 ; Batterham et al., 2002), suggérant que ces peptides neuronaux n'agissent pas uniquement au niveau du bulbe rachidien.

1.2.2 Régulation des dépenses énergétiques

Les dépenses énergétiques sont divisées en 4 composantes, qui sont : le métabolisme basal, l'activité physique, la thermogénèse non frissonnante et la thermogénèse induite par la nutrition. Le métabolisme basal correspond aux dépenses énergétiques minimales nécessaires à la survie de l'organisme et représente environ 60% des dépenses énergétiques totales. Il peut être mesuré lorsque l'organisme est à thermoneutralité, en période postprandial et au repos. L'activité physique correspond aux dépenses découlant de la contraction musculaire nécessaire aux mouvements, qu'ils soient volontaires (locomotion) ou involontaires (frisson). Cette « composante » est très variable d'un individu à un autre, et peut représenter entre 10 et 30% des dépenses énergétiques totales. La thermogénèse non frissonnante, est principalement assurée par le tissu adipeux brun. Ce mécanisme détourne le flux de protons de la mitochondrie nécessaire à la synthèse d'ATP pour produire de la chaleur. Enfin, il existe une thermogénèse induite par la nutrition. En effet, la digestion et la métabolisation des aliments ingérés par l'organisme induisent un coût énergétique qui diffère selon le type de nutriment. Environ 5% de l'énergie potentielle contenue dans les lipides est utilisée pour assurer les processus d'absorption, de transport et de stockage. Ce coût est estimé entre 5 et 10 % pour les glucides, et entre 20 et 30% pour les protéines.

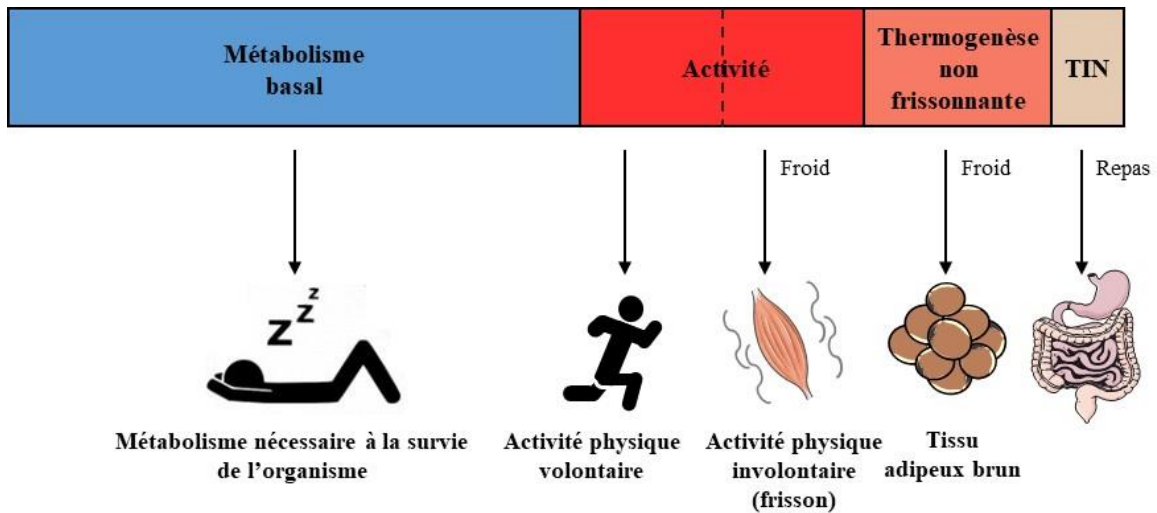


Figure 3 : Répartition des dépenses énergétiques. Les dépenses énergétiques sont la résultante de 4 « composantes » : le métabolisme basal, l'activité, la thermogénèse non frissonnante et la thermogénèse induite par la nutrition (TIN). L'activité physique comprend l'activité physique volontaire (locomotion) et involontaire (frisson). La thermogénèse non frissonnante est quant à elle principalement médiée par le tissu adipeux brun.

En 1981, il fut observé que des lésions du noyau ventro-médial de l'hypothalamus chez le rat engendrent une augmentation du poids et de l'adiposité, malgré une consommation alimentaire identique aux animaux témoins, illustrant pour la première fois le rôle de l'hypothalamus dans la régulation des dépenses énergétiques (Cox and Powley, 1981). Il est notamment impliqué dans la thermogénèse non frissonnante, dont l'effecteur principale est le tissu adipeux brun. Ce tissu est certes beaucoup moins présent chez l'humain que chez les rongeurs, mais reste fonctionnel. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes β -adrénergiques chez le rongeur, ont permis de mettre en évidence l'activation du tissu adipeux brun par le système nerveux sympathique et les catécholamines (Takahashi et al., 1992 ; Tsukazaki et al., 1995). Le froid est un excellent signal pour stimuler la thermogénèse non frissonnante. Le présent paragraphe n'a pas pour objectif de détailler l'ensemble de la neuro-circuiterie impliquée dans la régulation des dépenses énergétiques qui est présentée dans d'excellentes revues (Morrison and Nakamura, 2011 ; Münzberg et al., 2016). Très brièvement, la perception du froid *via* des nerfs sensitifs cutanés est relayée et intégrée au niveau de l'hypothalamus, où des populations de neurones « warm-sensitives » situées dans le noyau pré-optique vont être inhibées. Cela entraîne, entre autres, une augmentation du flux sympathique innervant le tissu adipeux brun, et favorise la libération de noradrénaline. L'activation des récepteurs β -adrénergiques présents à la surface des adipocytes bruns aboutit à la production d' adénosine monophosphate cyclique (AMPC), et à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'augmentation d'expression de la protéine « uncoupling protein 1 » (UCP1 ; Kooijman et al., 2015). C'est à elle que le tissu

adipeux brun doit sa capacité thermogénique (**Figure 4**). Elle est localisée au sein de la membrane interne de la mitochondrie et permet la libération d'énergie sous forme de chaleur, en facilitant le passage de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. En plus de son rôle dans la production de chaleur par le tissu adipeux brun, l'inhibition des neurones « warm-sensitive » est à l'origine de l'activation du frisson des muscles squelettiques.

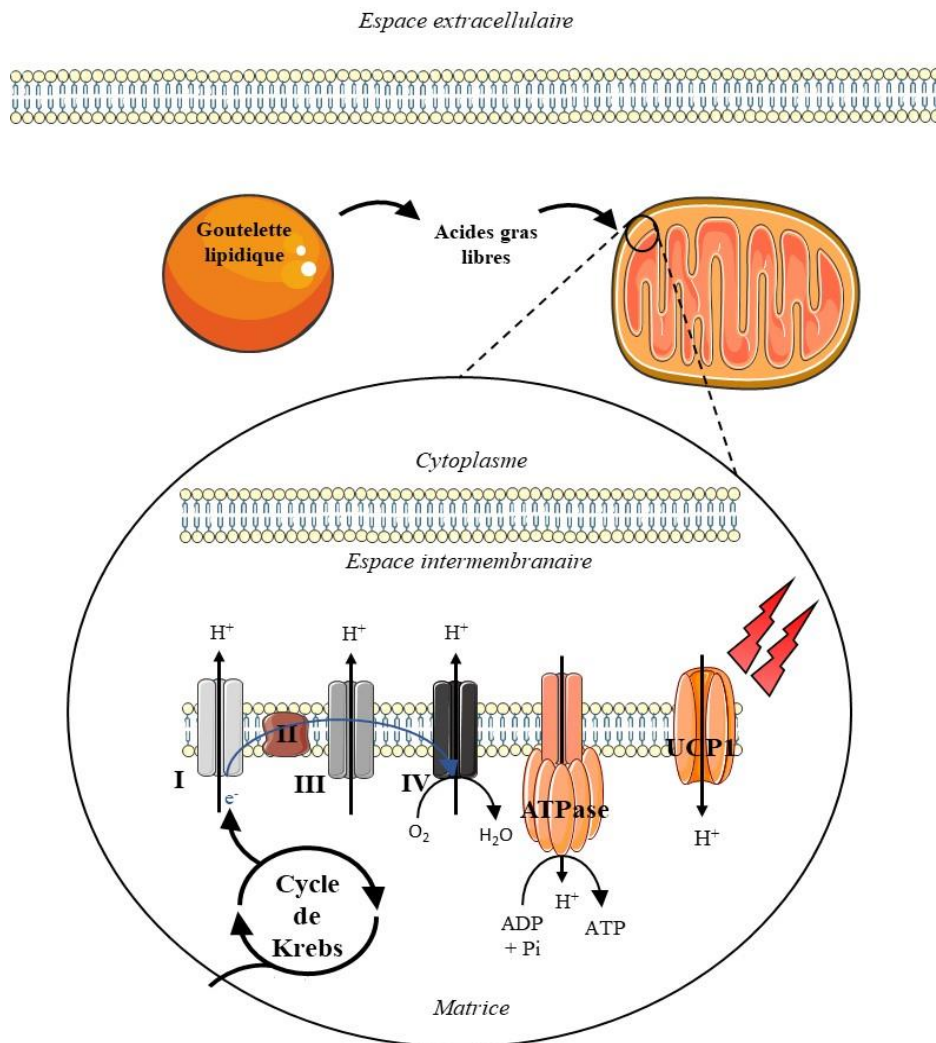


Figure 4 : Rôle d'UCP1 dans la thermogénèse non frissonnante. Le tissu adipeux brun est impliqué dans la thermogénèse non frissonnante et doit sa faculté thermogénique à la protéine UCP1. Les AGL sont libérés par les gouttelettes lipidiques puis transportés au niveau des mitochondries. Leur oxydation dans le cycle de Krebs permet de fournir les électrons nécessaires au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette dernière est composée de différents complexes dont les quatre premiers (notés de I à IV) assurent le transport de protons vers l'espace inter-membranaire mitochondriale, générant ainsi un gradient de protons. Le cinquième membre de la chaîne respiratoire, l'ATPase, utilise ce gradient de protons pour synthétiser de l'ATP. La protéine UCP1 située elle aussi au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, détourne le gradient de protons, non pas pour synthétiser de l'ATP, mais pour générer de la chaleur.

AGL : acides gras libres ; UCP1 : uncoupling protein 1.

Le rôle de la leptine dans la thermogénèse du tissu adipeux brun est sujet à controverse. En effet, une injection périphérique de leptine chez des souris maigres induit une augmentation d'UCP1 au niveau du tissu adipeux brun (Commins et al., 2001). Des injections centrales et périphériques de leptine augmentent également la température corporelle et la température du tissu adipeux brun, lorsque les souris sont exposées à des températures inférieures à la thermoneutralité (Enriori et al., 2011 ; Kaiyala et al., 2015). De plus, certaines populations neuronales hypothalamiques qui innervent le tissu adipeux brun, *via* un relais spinal, possèdent des récepteurs à la leptine (Oldfield et al., 2002 ; Morrison and Nakamura, 2011). Ainsi, il a longtemps été considéré que la leptine induisait une augmentation des dépenses énergétiques en activant directement le tissu adipeux brun. Cependant, certaines données récentes viennent remettre en cause cette théorie. En particulier, des souris maigres et des souris déficientes pour la leptine (souris ob/ob) ne présentent aucune augmentation des dépenses énergétiques après injection périphérique de leptine, en condition de thermoneutralité ou à des températures inférieures à la thermoneutralité (Fischer et al., 2016). Le tissu adipeux brun des souris ob/ob et des souris contrôles contiennent des niveaux d'UCP1 équivalents (Fischer et al., 2016). De façon intéressante, l'injection de leptine conduit à une chute de la température au niveau de la queue, et à une augmentation de la vasoconstriction uniquement chez les souris ob/ob, et non chez les souris contrôles. La queue étant un organe majeur de la thermorégulation chez les rongeurs, les auteurs suggèrent que la leptine soit en réalité impliquée dans la diminution des pertes de chaleur, plutôt que dans l'activation directe du tissu adipeux brun. Quoiqu'il en soit, le rôle de la leptine dans la régulation des dépenses énergétiques reste encore à explorer. En effet, si la leptine n'agit pas directement sur le tissu adipeux brun, il a été montré qu'elle peut agir de façon synergétique avec d'autres hormones comme la « thyrotropin-releasing hormone », pour activer la thermogénèse du tissu adipeux brun (Hermann et al., 2006 ; Rogers et al., 2009). Cet effet ne serait pas médié par l'hypothalamus mais par le bulbe rachidien.

Comme pour la régulation de la prise alimentaire, l'hypothalamus est accompagné du bulbe rachidien dans la régulation des dépenses énergétiques. En revanche, il fait l'objet de beaucoup moins d'études que son partenaire. Une partie des neurones « warm-sensitive » de l'hypothalamus envoient des signaux inhibiteurs au noyau du raphé, situé au niveau du bulbe rachidien (Nakamura, 2011). Le noyau du raphé projette lui-même vers le tissu adipeux brun (Nakamura, 2011). Le GLP-1 figure parmi les signaux qu'il intègre et ayant un impact sur les dépenses énergétiques. Chez l'humain, il induit une augmentation des dépenses énergétiques (Shalev et al., 1997). Des résultats similaires sont observés chez le rat après un traitement

intracérébroventriculaire de GLP-1 (Hwa et al., 1998). Cet effet thermique du GLP-1 est retrouvé chez des rats décérébrés (Osaka et al., 2005) mais pas après des lésions de la moelle épinière, ce qui suggère que son effet sur les dépenses énergétiques est bien médié par le bulbe rachidien.

Il existe d'autres médiateurs capables d'activer la thermogénèse du tissu adipeux brun, comme par exemple les hormones thyroïdiennes. Celles-ci induisent une augmentation de l'expression d'UCP1 et de la consommation d'oxygène d'adipocytes de rats (Martinez-deMena et al., 2015). De plus, l'injection d'une hormone thyroïdienne synthétique augmente le métabolisme basal chez l'humain (Broeders et al., 2016). Une hyperthyroïdie est également associée à une activation importante du tissu adipeux brun, au contraire d'une hypothyroïdie qui est associée au phénomène inverse (Broeders et al., 2016). Les glucocorticoïdes et les endocannabinoïdes sont également connus pour activer le tissu adipeux brun (Kooijman et al., 2015).

Parmi les travaux qui étudient la régulation des dépenses énergétiques, très peu portent sur la régulation de l'activité physique alors qu'elle constitue une des composantes majeures, en particulier l'activité physique volontaire (non essentielle à la survie). Il est clair que le niveau d'activité physique repose en partie sur une composante génétique (de Vilhena e Santos et al., 2012), ce qui engendre chez le rongeur des individus avec une faible ou une forte activité volontaire (mesurable avec des roues d'activité). Des rats sélectionnés pour leur forte activité volontaire présentent des dépenses énergétiques totales augmentées par rapport aux rats sélectionnés pour leur faible activité volontaire, sans modification des dépenses énergétiques basales (Wisløff et al., 2005). De plus, cette augmentation d'activité physique volontaire pourrait conférer une forme de résistance aux risques cardiovasculaires, et peut être liée à une résistance à l'obésité (Gavini et al., 2014). Les orexines sont des neuropeptides synthétisés au niveau de l'hypothalamus, et qui permettent de stimuler spécifiquement l'activité volontaire, notamment en excitant les neurones dopaminergiques (Teske et al., 2014 ; Vittoz and Berridge, 2006).

I.3 Tissu adipeux

I.3.1 Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est le tissu adipeux majoritaire chez l'humain. Il joue un rôle d'isolant thermique et de lieu de stockage des graisses sous forme de TG. Ces TG sont utilisés par l'organisme lorsque les autres sources d'énergie viennent à manquer. Le tissu adipeux blanc est composé essentiellement d'adipocytes blancs, qui présentent une vacuole unique où sont stockés les TG, et peut occuper jusqu'à 90% du volume de la cellule. Le tissu adipeux blanc contient également des pré-adipocytes, des cellules endothéliales, des cellules immunitaires (en particulier des macrophages) et des fibroblastes. Ces derniers synthétisent la matrice extracellulaire nécessaire au maintien et à l'intégrité du tissu (**Figure 5**).

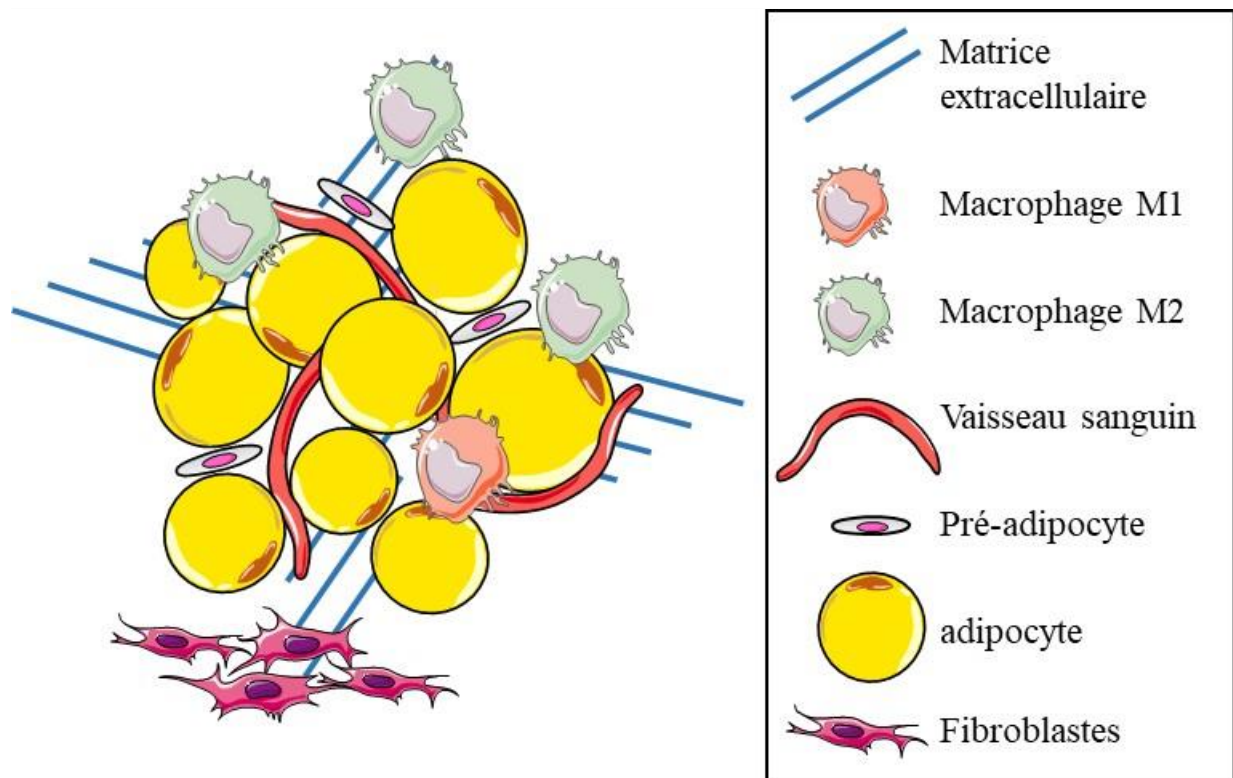


Figure 5 : Composition du tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux blanc est composé en grande majorité d'adipocytes matures qui sont capables de stocker les lipides sous forme de TG dans une vacuole. Des pré-adipocytes pouvant se différencier en adipocytes blancs matures et permettre l'expansion du tissu adipeux, sont également présents. C'est un tissu richement irrigué qui comporte de nombreux vaisseaux sanguins. Enfin, des cellules immunitaires sont infiltrées au niveau du tissu adipeux blanc.

TG : triglycérides

Au sein du tissu adipeux blanc, on distingue le tissu adipeux blanc sous-cutané et le tissu adipeux blanc viscéral (**Figure 6**). Le tissu adipeux blanc viscéral est constitué de plusieurs dépôts : gonadique, rétropéritonéal, mésentérique et ectopique ; tandis que le tissu adipeux

blanc sous-cutané est situé au niveau de l'hypoderme. De plus, par rapport au tissu adipeux sous-cutané, le tissu adipeux viscéral possède des capacités de prolifération moindre, une faible vascularisation et une plus forte infiltration de des cellules immunitaires (Ibrahim, 2010). Ces disparités peuvent s'expliquer par une origine cellulaire différente (Baglioni et al., 2012 ; Chau et al., 2014).

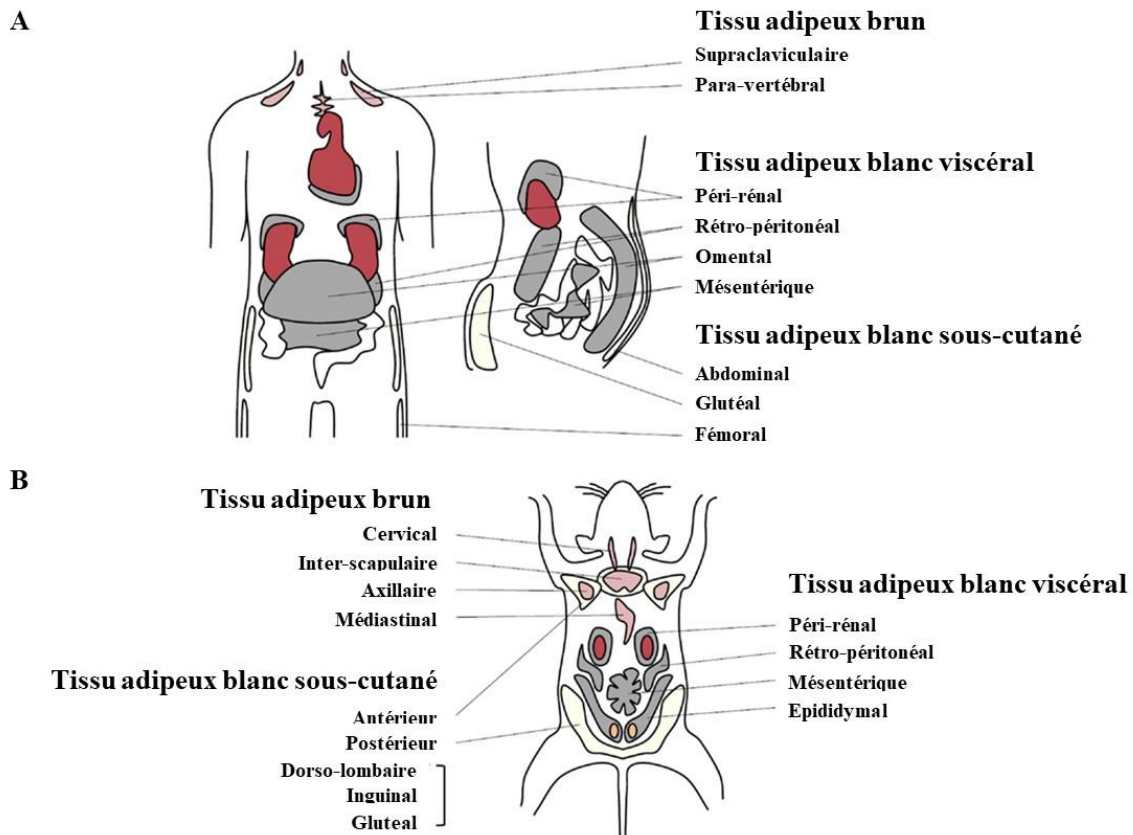


Figure 6 : Dépôts des tissus adipeux blancs et bruns. D'après Choe et al., 2016. (A) Chez l'humain, le tissu adipeux brun est situé surtout au niveau des épaules. Même s'il est peu présent, il est capable de produire de la chaleur grâce à la forte présence de la protéine UCP1. Les tissus adipeux blancs sont présents sous formes viscérales et sous-cutanée. Ils sont caractérisés par une grande capacité à stocker l'énergie sous forme de TG, et sont impliqués dans la synthèse de nombreuses adipokines. Il semble que le tissu adipeux viscéral soit associé aux troubles métaboliques, au contraire du tissu adipeux sous-cutané. **(B)** Chez la souris, le tissu adipeux brun est beaucoup plus présent, et le dépôt majoritaire se situe au niveau interscapulaire. Pour ce qui est des tissus adipeux blancs, la souris possède un dépôt de tissu adipeux epididymal au-dessus des gonades, non présent chez l'humain. A l'inverse, l'humain possède un dépôt important de tissu adipeux omental absent chez la souris.

TG : triglycérides ; UCP1 : uncoupling protein 1

1.3.2 Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun quant à lui est composé d'adipocytes bruns présentant plusieurs petites gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries à l'origine de sa couleur. Le tissu adipeux brun est richement vascularisé et possède une innervation sympathique importante. Ces

caractéristiques histologiques sont à l'origine de propriétés fonctionnelles spécifiques, comme son implication dans la thermogénèse non frissonnante. Très présent chez les animaux hibernants, le tissu adipeux brun leur permet de maintenir une température corporelle à 37°C au réveil. Chez l'humain, il est détecté en grande quantité chez le nouveau-né, et contribue à sa thermorégulation. Bien qu'il régresse de façon importante avec l'âge, il est encore présent et fonctionnel chez l'adulte (Saito et al., 2009 ; Richard et al., 2012). Comme il a été décrit dans le paragraphe *I.2.1*, un stimulus comme le froid induit une augmentation de l'activité du système β 3-adrénérique qui aboutit à la libération de catécholamines au niveau du tissu adipeux brun. Une fois fixé sur leurs récepteurs, elles induisent une augmentation d'AMPc responsable de l'expression de gènes cibles comme UCP1, mais active également d'enzymes impliquées dans la lipolyse. Ces derniers vont i/ activer UCP1 par liaison, et ii/ servir de source d'énergie pour alimenter le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale. Deux mécanismes qui conjointement permettent d'augmenter le niveau d'activité d'UCP1 (Nicholls and Rial, 2016).

I.3.3 Le tissu adipeux beige

Pendant longtemps, les tissus adipeux bruns et blancs ont été considérés comme les deux seuls types de tissu adipeux. Néanmoins, nous savons depuis les travaux de Young et al., (1984), qu'une exposition au froid engendre une augmentation du nombre d'adipocytes bruns au sein de tissu adipeux blanc de souris BALB/c femelles. Ce phénomène appelé « brunisation », ou « browning » d'après le terme anglais, illustre la plasticité du tissu adipeux blanc. Ces adipocytes ainsi générés, appelés adipocytes beiges, présentent des caractéristiques intermédiaires. En effet, ils possèdent des spécificités propres aux adipocytes bruns (multiples gouttelettes lipidiques, quantité importante de mitochondries, expression d'UCP1) mais de façon beaucoup moins marquée que ces derniers (**Figure 7**).

Il semblerait que la formation d'adipocytes beiges soit le résultat à la fois d'une adipogenèse *de novo*, et d'une trans-différenciation d'adipocytes blancs préexistants (García-Alonso and Clària, 2014 ; Sepa-Kishi and Ceddia, 2018). Le tissu adipeux beige possède bien une capacité thermogénique, mais elle contribue de façon modérée à la thermogénèse sans frisson (Shabalina et al., 2013). Toutefois, de façon intéressante, l'augmentation de la brunisation est à l'origine de la résistance à l'obésité décrite chez certains modèles murins (Yang et al., 2015 ; Choi et al., 2016). Le potentiel thérapeutique de ce phénomène est rapidement apparu, et il fait aujourd'hui l'objet d'intenses recherches.

Il est important de noter que de très récentes études tendent à montrer que l'effet thermogénique des adipocytes beiges peut être modulé par des mécanismes indépendants d'UCP1. En effet, l'activation des récepteurs β 3-adrénergiques à la surface des adipocytes blancs conduit à une augmentation de la lipolyse, et donc à la libération d'AGL qui sont soit exportés pour la β -oxydation, soit utilisés pour être ré-estérifiés en TG. Ce dernier mécanisme engendrerait un cycle « futile » hydrolyse/re-synthèse des TG qui favoriserait la formation de multiples gouttelettes lipidiques, mais également la thermogénèse (Sepa-Kishi and Ceddia, 2018).

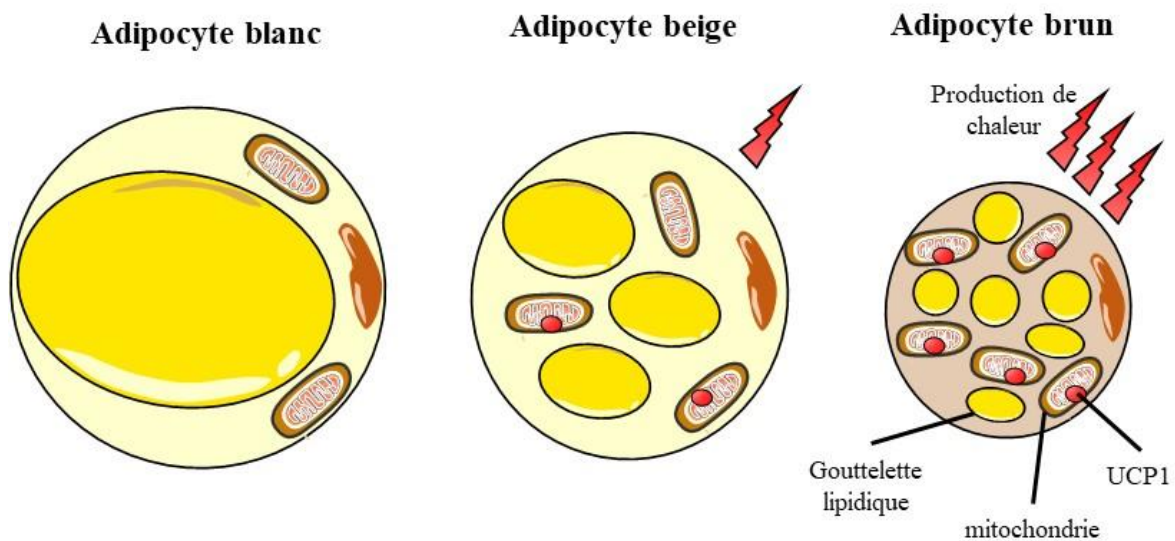


Figure 7 : Morphologie des différents adipocytes. Les adipocytes blancs matures sont caractérisés par une vacuole unique occupant la majorité de l'espace de la cellule et un faible nombre de mitochondries. Les adipocytes bruns sont plus petits, possèdent de nombreuses gouttelettes lipidiques ainsi qu'une forte concentration de mitochondries. C'est dans ces dernières qu'est fortement présente UCP1, une protéine membranaire qui permet aux adipocytes bruns de produire de la chaleur. Les adipocytes beiges sont présents au sein du tissu adipeux blanc, et possèdent des caractéristiques intermédiaires. Ils expriment eux aussi UCP1 mais à une échelle moindre que les adipocytes bruns.

UCP1 : uncoupling protein 1.

1.3.4 Origine des tissus adipeux

Les adipocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses, mais la caractérisation des précurseurs à l'origine des différents tissus adipeux est encore sujet à controverse. Les trois différents types de tissus adipeux ne sont pas originaires des mêmes lignées cellulaires. De façon surprenante, les adipocytes bruns et les myocytes dériveraient d'un progéniteur commun exprimant le facteur myogenic factor 5 (Myf5), au contraire des adipocytes blancs qui eux, dériveraient d'un progéniteur Myf5 négatif (Seale et al., 2008). Ceci a été remis en cause par des travaux montrant que certains adipocytes blancs pouvaient eux aussi être issus de

progéniteurs Myf5 positifs (Sanchez-Gurmaches et al., 2012). Ces derniers résultats sont venus contraster la vision binaire du lignage des adipocytes. Selon la vision actuelle, les progéniteurs adipocytaires seraient caractérisés par une combinaison de différents marqueurs. Parmi eux, on retrouve le « platelet-derived growth factor receptor α » (Pdgfr α) spécifique des adipocytes blancs (Berry and Rodeheffer, 2013), et le facteur de transcription « paired box 7 » (Pax7) spécifique des adipocytes bruns (Wu et al., 2015).

L'origine des adipocytes beiges est plus complexe et reste encore à déterminer. Il était convenu dans un premier temps que les adipocytes beiges et blancs dériveraient d'un même progéniteur Myf 5 négatif, mais il semble qu'une partie au moins des adipocytes beiges dériveraient d'un progéniteur commun aux myocytes lisses, exprimant le marqueur Myh11⁺ (Wu et al., 2015).

1.3.5 Adipogenèse

L'adipogenèse est constituée de deux phases distinctes, la première étant la phase de détermination pendant laquelle les cellules pluripotentes perdent leur potentiel de différenciation pour s'engager dans une lignée cellulaire et devenir un adipoblaste. Les mécanismes exacts impliqués dans la détermination des progéniteurs multipotents ne sont pas encore bien déterminés, notamment à cause du fait que la grande majorité des études qui portent sur l'adipogenèse utilisent des lignées cellulaires immortalisées (3T3-L1, 3T3-F442A), et donc déjà engagées dans une voie adipocytaire. Néanmoins, l'utilisation de cellules multipotentes C3H10T1/2 a montré que l'ajout exogène des « bone morphogenic protein » 2 et 4 (BMP2/4) permet l'engagement vers la voie adipocytaire (Huang et al., 2009). Ces facteurs de croissance ont été nommés ainsi en raison de leur capacité à induire la formation d'os et de cartilage.

La deuxième phase est une phase de différenciation, où les adipoblastes se différencient en pré-adipocytes, puis en adipocytes. Elle est mieux caractérisée et fait appel à de nombreux facteurs de transcription qui induisent l'expression de gènes spécifiques des adipocytes matures.

1.3.5.a Différenciation des adipocytes blancs

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les adipocytes blancs et une partie des adipocytes beiges dérivent des mêmes progéniteurs. Pour ceux-ci, c'est l'étape de différenciation qui va

permettre d'aboutir aux deux lignées distinctes. Le « fibroblast growth factor 10 » (FGF10) a été proposé comme étant un facteur responsable de la différenciation des adipoblastes Myf5 négatif en pré-adipocytes blancs car les embryons de souris FGF10^{-/-} présentent une altération importante du tissu adipeux blanc (Asaki et al., 2004).

Interviennent ensuite différents facteurs de transcription qui seront exprimés tout au long de la vie de l'adipocyte, à savoir : les « CAAT/Enhancer binding proteins » (C/EBP) et le récepteur activé par les « peroxisome proliferator- activated receptor » (PPAR γ ; **Figure 8**). A noter que PPAR γ a la particularité de former un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes X en présence d'un co-activateur. Des études *in vivo* ont montré que des souris invalidées pour C/EBP β ou C/EBP δ présentent une altération importante de l'adipogenèse en comparaison avec les souris témoins, mais expriment des taux similaires de C/EBP α et de PPAR γ (Tanaka et al., 1997). De façon intéressante, lorsque des fibroblastes embryonnaires issus de ces souris C/EBP β ^{-/-} et C/EBP δ ^{-/-} sont cultivés dans un milieu adipogénique, les facteurs de transcription C/EBP α et PPAR γ ne sont pas ou très peu exprimés. L'ensemble de ces résultats montrent que, *in vitro*, les expressions de C/EBP α et de PPAR γ nécessitent l'activation préalable de C/EBP β et C/EBP δ . En revanche, *in vivo*, les expressions de C/EBP α et de PPAR γ peuvent être induites par d'autres signaux non présents dans le milieu de culture (par exemple les ligands β -adrénergiques) mais ne peuvent à eux seuls induire une adipogenèse efficace (Tanaka et al., 1997). PPAR γ participe au maintien du métabolisme lipidique et à la fonction endocrine du tissu adipeux (Chawla et al., 1994), tandis que C/EBP α jouerait un rôle la sensibilité à l'insuline (Wu et al., 1999). En agissant ensemble, ces deux facteurs conduisent donc à des changements d'expressions géniques caractéristiques des adipocytes blancs matures. De plus, PPAR γ et C/EBP β sont capables d'induire l'expression de l'un et de l'autre, générant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive permettant le maintien de l'état différencié (Rosen et al., 2002 ; Rosen et al., 2000).

I.3.5.b Différenciation des adipocytes bruns

Le facteur BMP7 permet la différenciation de fibroblastes multipotents en pré-adipocytes bruns (Tseng et al., 2008; **Figure 8**). A la naissance, les souris qui n'expriment pas BMP7 montrent une chute importante de la masse adipeuse brune ainsi qu'une expression quasi inexistante d'UCP1 (Tseng et al., 2008).

Le facteur « early B-cell factor 2 » (EBF2) intervient très tôt dans la différenciation des adipocytes bruns (Wang et al., 2014) et permettrait le recrutement de PPAR γ (Seale, 2015). Ce dernier, en plus d'être impliqué dans la différenciation du tissu blanc, l'est également dans la différenciation du tissu adipeux brun. Des traitements avec des agonistes de PPAR γ améliorent la différenciation des adipocytes bruns (Petrovic et al., 2008), la biogenèse mitochondriale et le potentiel thermogénique du tissu adipeux brun (augmentation de la consommation d'oxygène et de l'expression d'UCP1, et diminution du quotient respiratoire) de souris génétiquement obèses (Sell et al., 2004 ; Rong et al., 2007). Le facteur « PR domain-containing protein 16 » (PRDM16) est une protéine avec un motif à doigt de zinc qui possède une activité histone méthyl-transférase, qui interagit directement avec PPAR γ (Seale et al., 2008) et C/EPB β (Kajimura et al., 2009), mais aussi avec la sous-unité 1 du complexe médiateur (Harms et al., 2015). Ce dernier est un complexe multiprotéique indispensable au recrutement de la machinerie transcriptionnelle. PRDM16 est très fortement exprimé dans le tissu adipeux brun de souris comparé au tissu adipeux blanc (Seale et al., 2008). Si l'inactivation de PRDM16 ne semble pas altérer le développement embryonnaire du tissu adipeux brun, en revanche, chez la souris adulte cela entraîne une forte diminution de l'expression des marqueurs du tissu adipeux brun, ainsi qu'une altération de la thermogénèse induite par le froid (Harms et al., 2014). Fait intéressant, PRDM16 réprime également le programme génétique spécifique du tissu adipeux blanc et du muscle (Kajimura et al., 2008 ; Seale et al., 2008). Il a donc été suggéré que PRDM16 n'était pas indispensable au développement du tissu adipeux brun, mais au maintien de ses fonctions.

I.3.5.c Différenciation des adipocytes beiges

En plus de leurs effets sur les cellules souches mésenchymateuses, les BMP sont également impliqués dans l'engagement vers la voie des adipocytes beiges (Huang et al., 2009 ; **Figure 8**). Ce qui fut confirmé par la suite puisque BMP4 (Gustafson et al., 2015) et BMP7 (Okla et al., 2015) permettent la différenciation des précurseurs adipogéniques en pré-adipocytes beiges. La différenciation des pré-adipocytes beiges fait appel à de nombreux facteurs de transcription intervenant dans la différenciation des adipocytes bruns, comme EBF2 (Wang et al., 2014). Une certaine partie des précurseurs adipocytaires présents au sein du tissu adipeux blanc peuvent se différencier en adipocytes beiges lorsqu'ils sont traités avec un agoniste de PPAR γ (Petrovic et al., 2010). L'intervention de PPAR γ dans la différenciation des adipocytes blancs, bruns et beiges, lui vaut d'être considéré comme le facteur majoritaire de la différenciation adipocytaire

(Seale, 2015 ; Poulos et al., 2016). En ce qui concerne PRDM16, s'il n'est pas nécessaire au développement du tissu adipeux brun, il est en revanche indispensable à la formation des adipocytes beiges. La délétion spécifique de PRDM16 au niveau adipocytaire engendre une chute d'UCP1 et des gènes mitochondriaux au sein du tissu adipeux blanc sous-cutané, une diminution des dépenses énergétiques et favorise la prise de poids pendant un régime enrichi en graisses, par rapport aux souris témoins (Cohen et al., 2014).

I.3.5.d Activations des adipocytes bruns/beiges

L'augmentation du potentiel thermogénique des adipocytes bruns et beiges semble faire appel à des facteurs différents de ceux intervenant dans leur différenciation. Par exemple, le facteur « peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α » (PGC1- α) qui comme son nom l'indique, augmente l'activité transcriptionnelle de PPAR γ , n'est pas nécessaire à la différenciation du tissu adipeux brun, mais contrôle l'expression des gènes impliqués dans la thermogenèse lors d'une exposition au froid (Uldry et al., 2006 ; Fisher et al., 2012). PGC1- α est un gène clé dans la biogenèse et le métabolisme mitochondrial (Austin and St-Pierre, 2012). Plus récemment, il a été montré que la surexpression du facteur de transcription « interferon regulatory factor 4 » (IRF4) améliore la tolérance au froid et les dépenses énergétiques chez la souris (Kong et al., 2014). IRF4 stimule non seulement l'expression de PGC1- α , mais interagit directement avec IRF4 pour lui permettre de transcrire ses gènes cibles (Kong et al., 2014).

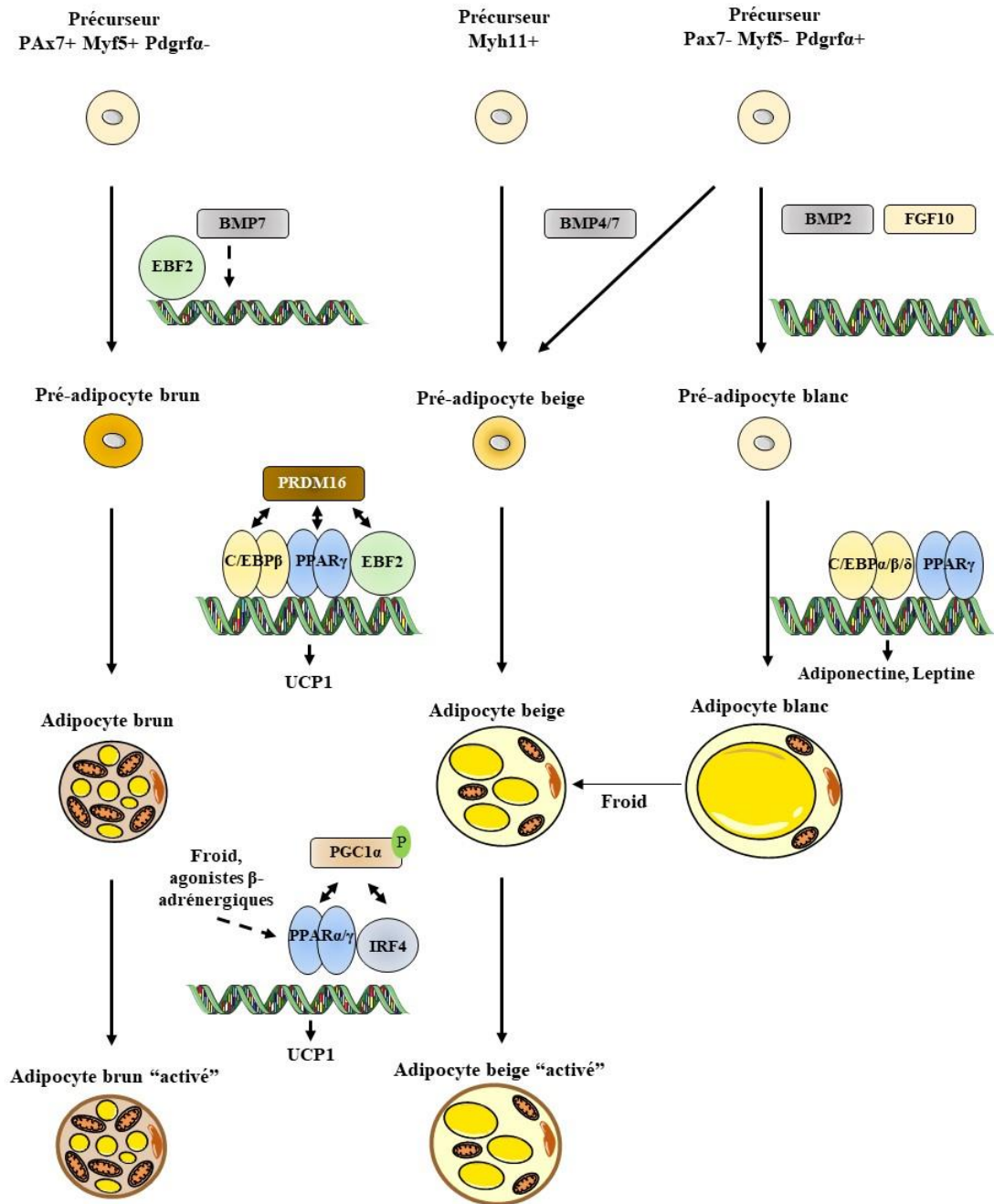


Figure 8 : Différenciation des tissus adipeux. D'après Seale et al., 2008. Le tissu adipeux brun dérive d'une population de précurseurs Pax7⁺ Myf5⁺ Pdgfra⁻. Les facteurs de transcription comme EBF2 et BMP7 marquent l'engagement vers la différenciation en pré-adipocyte brun. Ensuite, PRDM16, C/EBPβ, PPAR_γ et EBF2 induisent l'expression de gènes spécifiques du tissu adipeux brun pendant le processus de différenciation. La stimulation β-adrénérgique et l'exposition au froid active fortement l'expression de facteurs de transcription induisant l'expression de gènes thermogéniques. PGC1-α semble jouer un rôle important dans le recrutement de PPARα/γ et d'IRF4 pour l'activation de gènes thermogéniques. Le tissu adipeux blanc dérive lui d'une population de précurseurs Pax7⁻ Myf5⁻ Pdgfra⁺. Des facteurs comme le FGF10 et le BMP2 initient l'engagement vers la différenciation en pré-adipocytes blancs. Interviennent ensuite les facteurs de transcription C/EBPα/β/δ et PPAR_γ, nécessaires à l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et le maintien des fonctions du tissu adipeux blanc. Les adipocytes beiges proviennent également de populations de précurseurs Pax7⁻ Myf5⁻ Pdgfra⁺, mais sont orientés vers la voie adipocytaire beige par l'expression de facteurs tels que les BMP4 et 7. A noter qu'une partie des adipocytes beiges dérivent d'une autre population de précurseurs exprimant le facteur Myh11. La suite de leur différenciation fait appel aux mêmes facteurs que ceux impliqués dans la différenciation des adipocytes bruns. Une partie des adipocytes blancs peuvent se trans-différencier en adipocytes beiges après une exposition au froid.

BMP4/7 : bone morphogenetic 4/7 ; C/EBP $\alpha/\beta/\delta$: CAAT/Enhancer binding proteins $\alpha/\beta/\delta$; EBF2 : early B-cell factor 2 ; FGF10 : fibroblast growth factor 10 ; IRF4 : interferon regulatory factor 4 ; Myf5 : myogenic factor 5 ; Pdgfra : platelet-derived growth factor receptor α ; PGC1- α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α ; PPAR α/γ : peroxisome proliferator activated-receptor α/γ ; PRDM16 : PR containing domain16 ; UCP1 : uncoupling protein 1.

I.4 L'obésité : une maladie inflammatoire

I.4.1 Inflammation liée aux nutriments

L'inflammation dite « classique » correspond à une réponse non frissonnante du corps en réponse aux blessures et aux agressions extérieures. Elle s'accompagne de signes cardinaux, qui sont : rougeurs, œdème, chaleur et douleur. C'est une réaction rapide et intense, avec des effets bénéfiques lorsqu'elle est de court-terme. Il est clair aujourd'hui que l'obésité est également caractérisée par une réaction inflammatoire, mais qui diffère fortement de l'inflammation classique. Tout d'abord, l'origine n'est due ni à un agent pathogène, ni à une blessure, mais à une prise excessive de nutriments. Ensuite, ce sont les cellules impliquées dans le métabolisme énergétiques, en particulier les adipocytes, qui interviennent dans l'initiation et le maintien de la réaction inflammatoire. Une autre caractéristique de l'inflammation liée à l'obésité, est qu'elle se met en place de façon chronique à un niveau de bas seuil, et ne semble ne pas se résoudre dans le temps (Hotamisligil, 2006). Enfin, cette inflammation n'est pas localisée à un endroit précis de l'organisme, mais a lieu au niveau de structures centrales et d'organes périphériques, tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux, de sorte qu'elle est parfois appelée « inflammation métabolique ». En conséquence, cette inflammation généralisée peut conduire à des comorbidités sévères si elle persiste dans le temps (Guillemot-Legrès and Muccioli, 2017). Si le signal à l'origine de l'inflammation métabolique reste encore à déterminer, il existe plusieurs mécanismes pouvant l'expliquer (**Figure 9**).

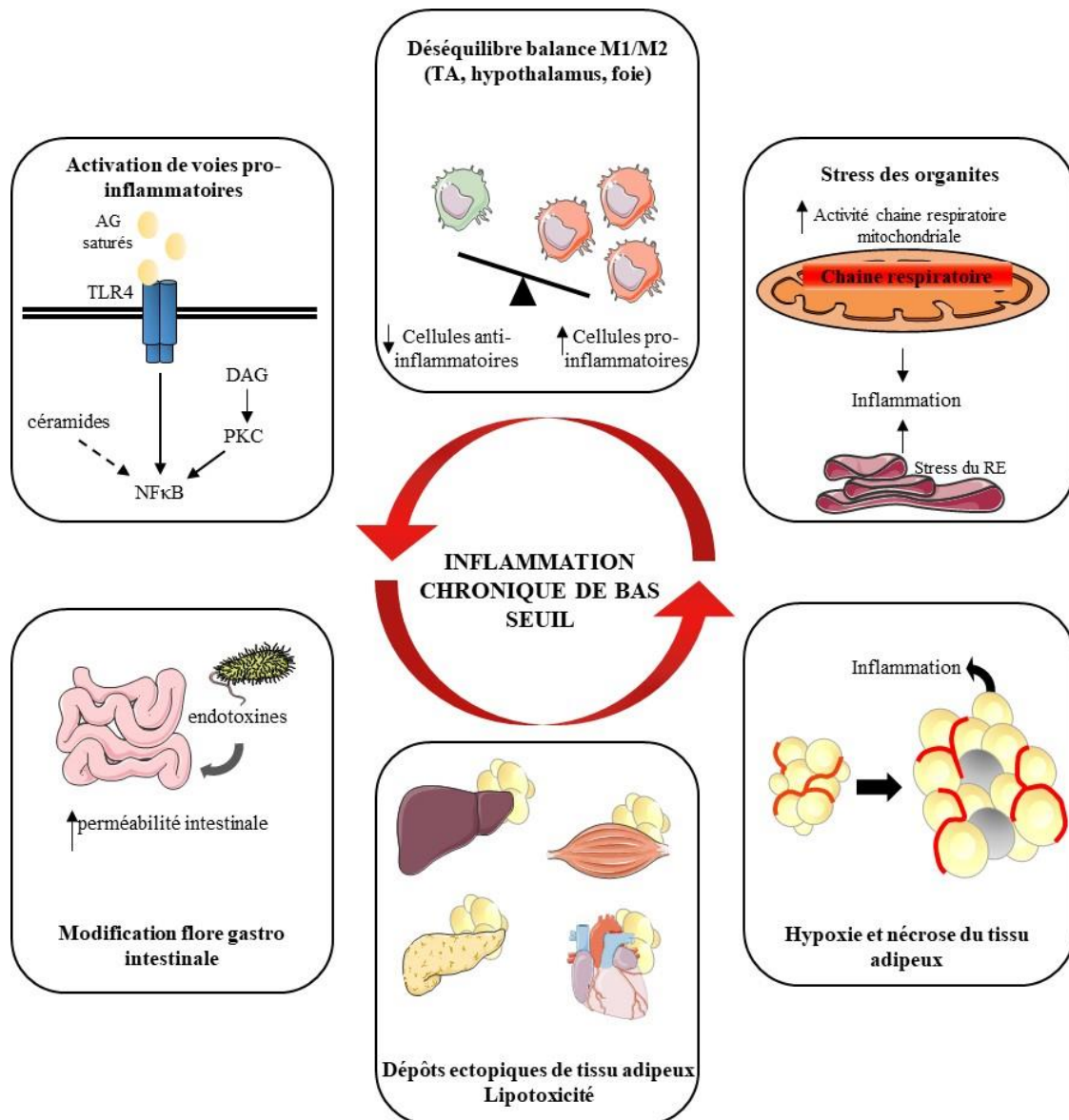


Figure 9 : Mécanismes reliant l'inflammation chronique de bas seuil à l'obésité La surnutrition/obésité est caractérisée par un afflux excessif de nutriments, en particulier de lipides, qui engendrent différents mécanismes contribuant au développement de l'inflammation chronique de bas seuil. Tout d'abord, l'excès de nutriments entraîne une augmentation importante de la production de dérivés réactifs de l'oxygène, *via* l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, contribuant ainsi au stress mitochondrial. De plus, les acides gras saturés peuvent se lier aux TLR4, présents à la surface des cellules immunitaires (macrophages, microglie, neutrophiles, ...) et d'ainsi activer la voie pro-inflammatoire NF-κB. L'augmentation de la lipolyse caractéristique de l'obésité favorise l'accumulation de DAG et de céramides, pouvant contribuer l'activation de voies pro-inflammatoires, et au stress du réticulum endoplasmique. Le surplus de lipides est stocké par le tissu adipeux blanc, entraînant son hypertrophie/hyperplasie, des nécroses et des hypoxies locales. Le foie, le tissu adipeux, les muscles et des structures centrales comme l'hypothalamus sont caractérisés par une augmentation significative de l'infiltration de cellules immunitaires pro-inflammatoires. Lorsque le surplus de lipides est trop important pour être pris en charge par le tissu adipeux blanc, des dépôts ectopiques de tissu adipeux se forment au niveau d'organes périphériques, entraînant des fibroses locales, favorisant leur dysfonctionnement et l'apparition de comorbidités liées à l'obésité. Enfin, la flore intestinale est modifiée par les régimes riches en graisses, en augmentant la perméabilité intestinale et en favorisant l'absorption d'endotoxines.

DAG : diacylglycéril ; NF-κB : nuclear factor-κB ; PKC : phosphokinase C ; RE : réticulum endoplasmique ; TA : tissu adipeux ; TLR4 : toll like receptor 4.

Selon Gregor et Hotamisligil (2011), les nutriments pourraient être eux-mêmes de nature inflammatoire, puisque issus du « non soi » (Gregor and Hotamisligil, 2011). Chez un sujet sain, les repas seraient associés à un pic d'inflammation rapidement résolu après leur métabolisation. Dans un contexte d'obésité, l'afflux excessif et permanent de nutriments mènerait à un rapprochement de ces pics sans que ceux-ci n'aient eu le temps de se résoudre complètement. Ceci aurait pour conséquence d'augmenter le niveau général d'inflammation au fur et à mesure des expositions avec les nutriments, jusqu'à dépasser un seuil critique où les cellules immunitaires seraient recrutées (**Figure 10**). A partir de ce moment, la dysfonction des cellules intervenant dans le métabolisme énergétique devient critique.

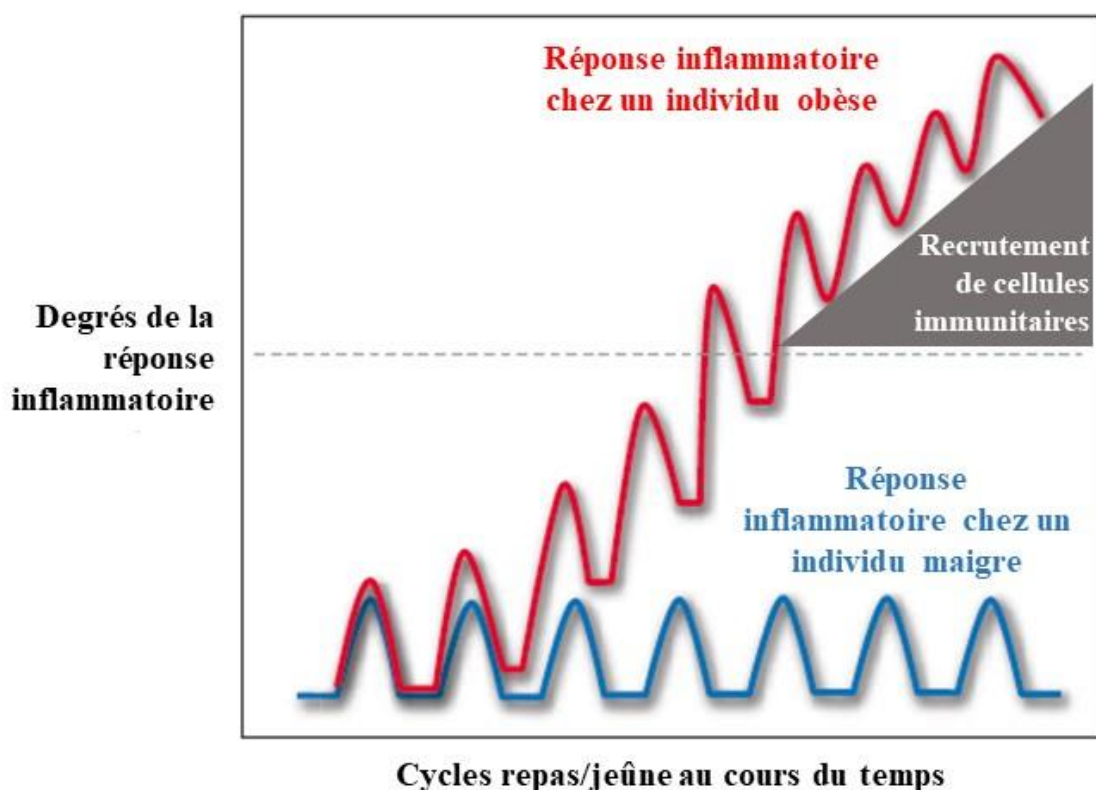


Figure 10 : Réponse inflammatoire pulsatile en réponse aux repas. Chez le sujet sain, les repas induiraient de faibles réponses inflammatoires au niveau des cellules impliquées dans le métabolisme énergétique (adipocytes, hépatocytes, cellules musculaires), et seraient rapidement résolues lors des périodes de jeûnes espaçant les repas. Une alimentation riche en graisses et/ou l'excès de nutriments caractéristique de l'obésité, vont sur le long terme induire une réponse inflammatoire de plus en plus importante, qui ne sera plus résolue de façon efficace. Au-delà d'un certain seuil, l'inflammation induirait le recrutement de cellules immunitaires au niveau des organes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et favoriserait leur dysfonction.

Une autre théorie serait que les nutriments, lorsqu'ils sont en excès, activent les voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire. Par exemple, les acides gras saturés peuvent se fixer sur le « toll like receptor 4 » (TLR4) situés à la surface des cellules

hématopoïétiques. Celui-ci entraîne l'activation du facteur de transcription « nuclear factor- κ B » (NF- κ B), responsable de la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Könner and Brüning, 2011). De plus, l'absence d'expression de TLR4 au niveau des cellules hématopoïétiques chez des souris transgéniques, entraîne une diminution importante des marqueurs de l'inflammation au sein du tissu adipeux, ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline lorsqu'elles sont nourries avec un régime enrichi en graisses (Saber et al., 2009). Néanmoins, cette diminution de l'inflammation périphérique n'empêche pas ces souris de devenir obèses.

1.4.2 Microbiote intestinal

Il est difficile de déterminer le nombre exact de bactéries composant la flore intestinale (ou microbiote), mais une étude récente l'évalue à environ $3,8 \times 10^{13}$, soit un peu plus que le nombre de cellules dans le corps humain, estimé à environ $3,0 \times 10^{13}$ (Sender et al., 2016). En plus de leur très grand nombre, l'organisation des écosystèmes bactériens se révèle être très complexe, et les connaissances dans ce domaine sont encore peu nombreuses. Selon certains auteurs, il pourrait être considéré comme un organe endocrine (Clarke et al., 2014). En effet, le microbiote est responsable de la synthèse d'un nombre important de molécules jouant un rôle essentiel dans la fonction de la muqueuse intestinale, d'organes périphériques et du système nerveux central ; à tel point qu'il peut être considéré comme un organe vital (Evans et al., 2013).

Il est aujourd'hui évident que le microbiote intestinal intervient dans la régulation de la réponse inflammatoire. L'intestin représente une porte d'entrée pour les antigènes d'origines microbiennes et alimentaires. Il a donc développé une immunité digestive particulièrement efficace, composée d'une barrière intestinale (paroi intestinale et mucus), de cellules immunitaires et du microbiote intestinal. En effet, des souris élevées en absence de micro-organismes dites « germ-free » ont une réponse immunitaire altérée après injection de lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi externe des bactéries Gram négatif (Clarke et al., 2014). Un régime alimentaire riche en graisses modifie profondément la flore intestinale et les différents métabolites qu'elle produit, menant à une augmentation des LT_H1 et des lymphocytes T cytotoxiques (LTc), ainsi qu'à une diminution de la production de peptides antimicrobiens et de cytokines anti-inflammatoires (voir pour revue Winer et al., 2017). Il en résulte une augmentation de la perméabilité intestinale chez les individus obèses, qui favorise l'absorption d'endotoxines comme le LPS (Cani et al., 2007 ; Genser et al., 2016).

De façon intéressante, les souris germ-free présentent une chute drastique de la masse adipeuse malgré une augmentation de la prise alimentaire (Bäckhed et al., 2004). Ce phénotype est reversé lorsque le système gastro-intestinal des souris germ-free est colonisé avec des micro-organismes issus de souris témoins. L'utilisation de ces souris nouvellement colonisée a mis en évidence que le microbiote est impliqué dans l'absorption de monosaccharides depuis la lumière intestinale, conduisant à une augmentation de la synthèse *de novo* de lipides. En 2006, d'élégants travaux ont montré que le transfert du microbiote de souris obèses à des souris axéniques non obèses, entraîne une accumulation de graisse (Turnbaugh et al., 2006). De façon intéressante, cette accumulation s'avère plus importante que lorsque ce transfert s'effectue à des souris minces. L'ensemble de ces résultats, bien que parcellaires, démontrent l'implication de la flore intestinale dans le développement de l'obésité (Turnbaugh et al., 2006).

I.5 Altérations du tissu adipeux lors de l'obésité

Si beaucoup d'organes, dont le foie, le muscle et le pancréas sont caractérisés par une inflammation chronique au cours de l'obésité, il semble que l'inflammation du tissu adipeux joue un rôle central dans le développement de cette pathologie (Wellen and Hotamisligil, 2003). C'est pourquoi je m'attarderai surtout sur les altérations du tissu adipeux.

I.5.1 Altérations cellulaires

Chez l'humain, il existe une corrélation positive entre le diamètre des adipocytes et l'IMC (Tchernof and Després, 2013). De plus, de nombreux travaux montrent que l'augmentation de la taille des adipocytes est étroitement liée aux complications métaboliques. Cependant, les différents dépôts adipeux ne présentent pas les mêmes caractéristiques en termes d'expansion et de plasticité. En effet, le tissu adipeux viscéral se différencie préférentiellement par hypertrophie, alors que le tissu adipeux sous-cutané se différencie préférentiellement par hyperplasie (Joe et al., 2009). En accord avec ces résultats, des essais clonogéniques et des études de marquage *in vivo* au Brdu ont révélé que le tissu adipeux sous-cutané présente environ huit fois plus de précurseurs adipocytaires que le tissu adipeux viscéral (Pellegrinelli et al., 2016). Ces précurseurs adipocytaires issus du tissu adipeux sous-cutané sont également capables de se différencier plus facilement, et plus rapidement que ceux issus du tissu adipeux viscéral, en réponse à des facteurs pro-adipogéniques comme BMP2 ou BMP4 (Joe et al., 2009). En conséquence, les adipocytes viscéraux atteignent plus rapidement leur expansion maximale,

qui coïncide avec l'augmentation de la mort cellulaire et de l'inflammation du tissu (Pellegrinelli et al., 2016), ce qui explique en partie pourquoi l'adiposité viscérale est fortement associée aux complications métaboliques (Snijder et al., 2003 ; Wang et al., 2005). Une autre raison pouvant l'expliquer, est la proximité des dépôts adipeux viscéraux avec la veine porte, qui transporte les lipides et les cytokines pro-inflammatoires issus de ce tissu directement vers le foie. L'exposition du foie à ces facteurs favorise la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline (Item and Konrad, 2012). A l'inverse, l'adiposité sous-cutanée est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline et à une amélioration de la tolérance au glucose (Stanford et al., 2015). A noter que le tissu adipeux sous-cutané peut être séparé en tissu adipeux superficiel, délimité par la peau et une couche membraneuse (fascia de Scarpa), et en tissu adipeux profond, qui se trouve au-delà de cette couche membraneuse (Kelley et al., 2000). Chez l'humain, le tissu adipeux sous-cutané profond possède des caractéristiques proches du tissu adipeux viscéral et est associé à une résistance à l'insuline, contrairement au tissu adipeux sous-cutané superficiel (Kelley et al., 2000 ; Marinou et al., 2014).

1.5.2 Altérations du métabolisme du tissu adipeux

1.5.2.a Altérations de la sécrétion d'adipokines

Comme il a été dit précédemment, le tissu adipeux n'est plus considéré comme un simple organe de stockage des lipides, mais comme un tissu possédant une fonction endocrine majeure, produisant des cytokines impliquées dans la régulation de nombreux mécanismes (**Figure 11**). L'obésité induit une profonde modification de la sécrétion de ces adipokines. Le paragraphe suivant n'ayant pas vocation à décrire l'ensemble des adipokines dont l'expression est modifiée dans un contexte d'obésité, je me concentrerai sur les adipokines les plus importantes.

Leptine. La production de leptine étant proportionnelle à la masse adipeuse totale chez l'humain et chez la souris, son taux plasmatique augmente naturellement de façon très importante chez des sujets obèses (Lin et al., 2005 ; Brydon, 2011). En plus de son rôle dans l'homéostasie énergétique décrit précédemment (voir paragraphe **I.2**), la leptine exerce une activité pro-inflammatoire. Tout d'abord, elle est impliquée dans le chimitoaxisme des neutrophiles (Caldefie-Chezet et al., 2003), et la production de cytokines pro-inflammatoires lors d'inflammations aiguës (Bulló et al., 2003). En ce qui concerne l'immunité adaptative, la leptine active la différenciation des L_TH1 et des L_TH17, et à l'inverse, inhibe la différenciation des L_TH2 (Lord et al., 1998 ; Reis et al., 2015). Les individus obèses sont caractérisés par une

élévation importante et significative des taux plasmatiques de leptine chez le rongeur (Handjieva-Darlenska and Boyadjieva, 2009 ; Choi et al., 2015), et chez l'humain (Bulló et al., 2003 ; Brydon, 2011), qui aboutit à un phénomène de résistance à la leptine. Ainsi, la leptine n'exerce plus son rôle physiologique et contribue à la dérégulation de la balance énergétique. Cette résistance à la leptine caractéristique des individus obèses s'explique par i) une diminution de l'expression du récepteur de la leptine au niveau d'organes comme l'hypothalamus et le foie (Liu et al., 2007) ii) l'inhibition de la signalisation de la leptine par des cytokines pro-inflammatoires et les TG (Yamaguchi et al., 1998 ; Banks et al., 2018) iii) une diminution du transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (Banks et al., 2006).

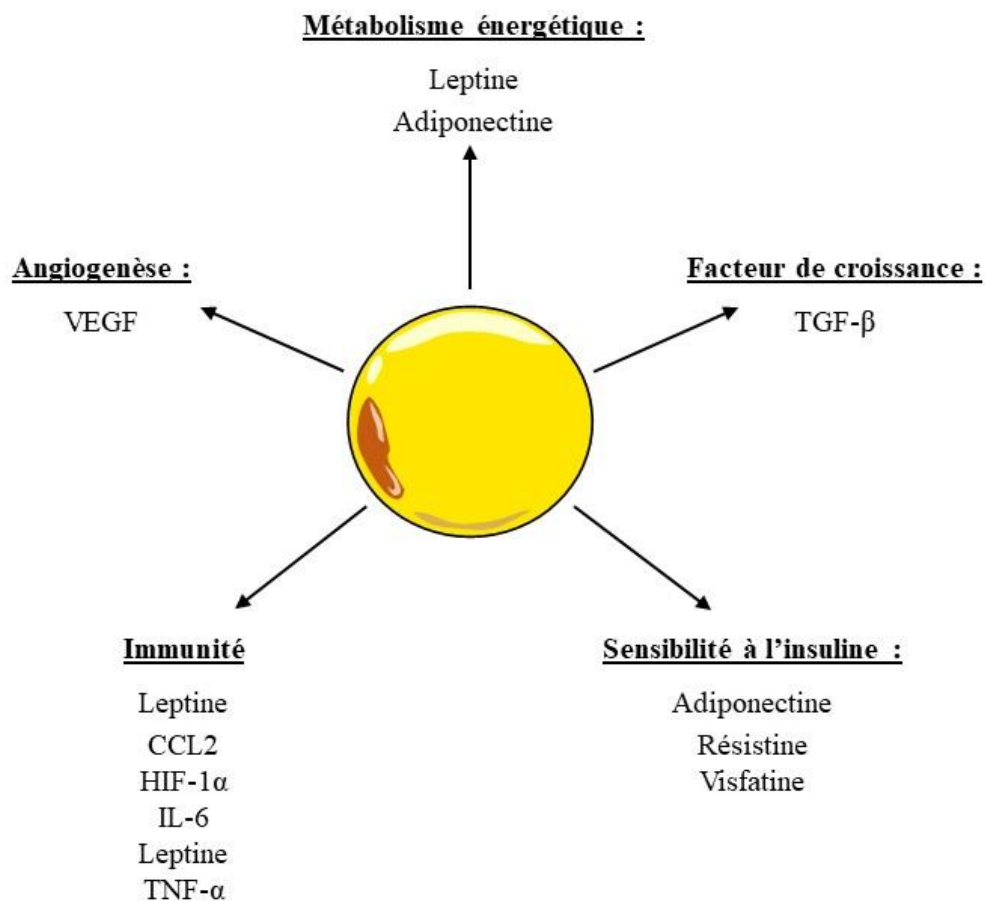


Figure 11 : Le tissu adipeux blanc, un organe endocrine. En plus de stocker de l'énergie sous forme de TG, le tissu adipeux blanc est un organe endocrine sécrétant de nombreuses substances aux fonctions variées, appelées adipokines. Parmi elles, il y a notamment des facteurs de croissance, des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des médiateurs de l'angiogenèse et des hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique ou dans la sensibilité à l'insuline.

CCL2 : chémokine (C-C motif) ligand 2 ; HIF-1α : hypoxie factor-1α ; IL-6 : interleukine-6 ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; TG : triglycérides ; TGF-β : tumor-growth factor-β ; TNF-α : tumor necrosis factor α

Adiponectine. Cette adipokine est principalement sécrétée par le tissu adipeux blanc, mais également par les cellules endothéliales et les cellules musculaires squelettiques (Delaigle et al., 2004). Son récepteur « adiponectin receptor 1 » (AdipoR1) est exprimée préférentiellement au niveau du muscle, tandis que le récepteur AdipoR2 est exprimé préférentiellement au niveau du foie (Yamauchi et al., 2003). La fixation de l'adiponectine sur ses récepteurs aboutit à l'activation de l'« AMP-activated protein kinase » (AMPK) et de PPAR α (Yamauchi et al., 2002 ; Yamauchi et al., 2003). L'AMPK est une enzyme clé dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique, et PPAR α un facteur de transcription fortement exprimé au niveau hépatique et musculaire où il est impliqué dans la β -oxydation. L'activation combinée de ces acteurs aboutit à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Maeda et al., 2002 ; Yamauchi et al., 2003). De plus, elle possède des propriétés anti-inflammatoires, notamment en inhibant la voie NF- κ B dans de nombreux types cellulaires (voir pour revue : Fantuzzi, 2013). En conséquence, des souris transgéniques n'exprimant pas l'adiponectine présentent une forte augmentation de la concentration plasmatique de « tumor necrosis factor- α (TNF- α), et sont insulino-résistantes (Maeda et al., 2002). La sécrétion d'adiponectine étant inhibée par différents signaux inflammatoires, son expression est fortement diminuée chez les sujets obèses, que ce soit chez l'humain ou chez le rongeur (Kern et al., 2003 ; Landrier et al., 2017). L'adiponectine joue également un rôle dans la régulation de la taille des adipocytes qui n'est pas encore complètement compris. En effet, la surexpression d'adiponectine chez un modèle murin transgénique engendre à la fois, une augmentation de la masse adipeuse, et une diminution de la taille des adipocytes (Kim et al., 2007). Si des souris invalidées pour l'adiponectine présentent bien une atrophie de la masse adipeuse, celle-ci ne se développe qu'avec l'âge (Nakanishi et al., 2011).

TNF- α . Le TNF- α est la première adipokine dont l'expression fut décrite comme étant corrélée avec l'obésité (Hotamisligil et al., 1995). Son augmentation au sein du tissu adipeux chez des sujets obèses a été démontré à maintes reprises (Gao et al., 2015 ; Chen et al., 2016) Le TNF- α intervient également dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline (Hotamisligil et al., 1994) et dans l'augmentation de l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que la chémokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) et l'interleukine-6 (IL-6), *via* l'activation de la voie NF- κ B (Lê et al., 2011). Son invalidation permet de diminuer la résistance à l'insuline chez des souris transgéniques nourries avec un régime enrichi en graisses (Uysal et al., 1997). Le TNF- α peut aussi activer la lipolyse des adipocytes *via* une augmentation de la production d'AMPc (Zhang et al., 2002).

CCL2. Découverte en 1999 chez l'humain, elle est aussi connue sous le nom de « macrophage chimioattractant protein 1 » (MCP1 ; Van Coillie et al., 1999). Elle est produite par de nombreux types cellulaires dont les adipocytes, mais les macrophages représentent la source principale de CCL2 (Deshmane et al., 2009). Elle exerce un fort pouvoir chémoattractant sur les macrophages, et joue un rôle essentiel dans leur infiltration au sein du tissu adipeux (Kanda et al., 2006). Un régime gras chez la souris entraîne une forte augmentation de l'expression de CCL2 dans le tissu adipeux (Gao et al., 2015). En accord avec ces résultats, l'inactivation du récepteur de CCL2 réduit la prise alimentaire et ralentie le développement de l'obésité chez la souris (Weisberg et al., 2003). En parallèle, les taux d'adiponectine de ces souris sont augmentés, et la sensibilité à l'insuline est améliorée.

Visfatine. La visfatine est une adipokine qui a été découverte récemment (Fukuhara et al., 2005). En se fixant sur le même récepteur que l'insuline, mais à un site différent, elle mime ses effets sans entrer en compétition avec elle. Si le tissu adipeux représente une source importante de visfatine, d'autres cellules comme les leucocytes, les hépatocytes et les macrophages, sont capables d'en produire (Stastny et al., 2012). Dans un contexte d'obésité, son expression est augmentée dans le tissu adipeux viscéral (Pagano et al., 2006) et inchangée dans le tissu adipeux sous-cutané (Fukuhara et al., 2005). Le taux de visfatine est fortement augmenté chez des patients atteints de diabète de type 2 (Chen et al., 2006). De plus, chez des individus non diabétiques, son expression corrèle positivement avec les taux de TG et l'infiltration des macrophages au niveau adipocytaire, mais ne corrèle pas avec l'obésité (Berndt et al., 2005). La visfatine semble donc jouer principalement un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline, plutôt que dans le développement de l'obésité en elle-même.

Résistine. La résistine fut découverte en 2001 (Steppan et al., 2001), et a été nommée ainsi en raison de son association avec la résistance à l'insuline (« resist to insulin »). En effet, les taux circulants de résistine sont augmentés chez des modèles murins d'obésité génétique ou induite par l'alimentation, et à l'inverse, sont diminués lors d'un traitement à la rosiglitazone, un composé anti-diabétique. Un traitement de souris non obèses avec la résistine altère la tolérance au glucose et la sensibilité de l'insuline (Steppan et al., 2001). Il est important de noter que la résistine murine est principalement sécrétée par les adipocytes (Rajala et al., 2002), au contraire de la résistine humaine qui est faiblement exprimée par les adipocytes (Janke et al., 2002). D'ailleurs, l'expression de la résistine humaine ne corrèle pas avec la résistance à l'insuline (Janke et al., 2002). Ces différences de fonction et d'expression sont expliquées par

la faible homologie de séquences (59%) entre le gène de la résistine humaine et celui de la souris, ainsi que par des régions promotrices différentes (Ghosh et al., 2003). Chez l'humain, la résistine a surtout été décrite pour ses propriétés pro-inflammatoires. En particulier, elle est capable d'activer la voie NF- κ B et de stimuler la production d'IL-6 et de TNF- α (Bokarewa et al., 2005).

I.5.2.b Altérations de la lipolyse

Au sein des adipocytes blancs, la lipolyse fait intervenir 3 différentes lipases (**Figure 12**), à savoir :

- i/ l' « adipose triglyceride lipase » (ATGL) qui hydrolyse les TG en diacylglycérol.
- ii/ l' « hormon sensitive lipase » (HSL) qui hydrolyse le diacylglycérol en monoacylglycérol.
- iii/ la « monoglyceride lipase » (MGL) qui clive le monoacylglycérol en glycérol et en acide gras non estérifié.

Les catécholamines sont des modulateurs majeurs de la lipolyse (voir pour revue Jaworski et al., 2007). Les récepteurs adrénergiques (α -AR et β -AR) présents chez le rongeur sont couplés à une sous-unité Gas stimulant la lipolyse, alors que chez l'humain, ils peuvent être couplés à une sous-unité Gas, ou à une sous-unité G α i inhibitrice de la lipolyse. Ainsi chez l'humain, l'effet des catécholamines sur la lipolyse dépend de la balance entre les sous-unités Gas et G α i présentes sur la membrane des adipocytes. L'activation de la phosphokinase A (PKA) qui peut en résulter va induire l'activation par phosphorylation de l'HSL et de la périlipine (PLN). Cette dernière est une protéine liée à la « α / β hydrolase domain-containing protein » (Abhd5), aussi connue sous le nom de « comparative gene identification-58 » (CGI-58), une protéine activatrice de l'ATGL. La phosphorylation de la PLN conduit d'une part, à la libération d'Abhd5 et à l'activation de l'ATGL (Granneman et al., 2009), et d'autre part, à la translocation de l'HSL à la surface de la gouttelette lipidique

L'inactivation de l'ATGL ou de l'HSL dans des modèles murins transgéniques entraîne une forte diminution de la lipolyse et limite le taux de d'AGL circulants, orientant le métabolisme énergétique vers l'utilisation du glucose. Il en résulte une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (Park et al., 2005 ; Haemmerle et al., 2006). En revanche, l'inactivation de l'ATGL entraîne une augmentation des taux de TG sanguins favorisant leur dépôt ectopique au niveau du cœur, et entraînant une mort prématurée.

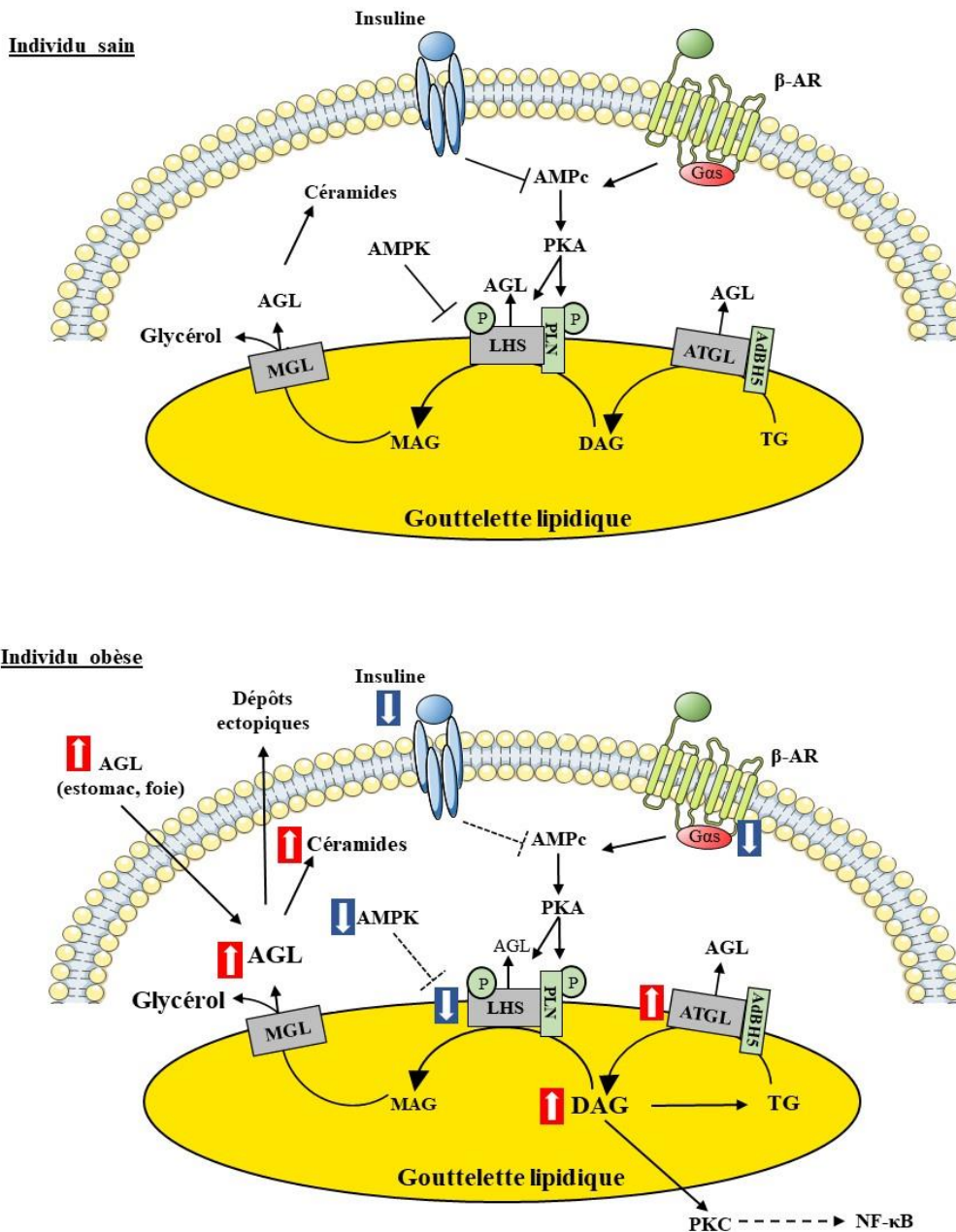


Figure 12 : Altérations des voies de la lipolyse au cours de l'obésité. La lipolyse est un processus biochimique responsable de l'hydrolyse des TG stockés dans les gouttelettes lipidiques. Les TG sont successivement hydrolysés en DAG par l'ATGL, puis en MAG par l'HSL, et enfin en AGL et en glycérol par la MGL. La lipolyse est activée par l'augmentation de la production d'AMPc, provoquée entre autres par la fixation des catécholamines sur les récepteurs β -adrénergiques. A l'inverse, la production d'AMPc peut être inhibée par la fixation de l'insuline sur son récepteur. L'AMPc active la PKA qui va ensuite phosphoryler la PLN. Cette dernière est ancrée à la surface de la gouttelette lipidique et réprime la lipolyse en séquestrant AdbH5. Une fois phosphorylé, la PLN libère AdbH5 qui va activer l'ATGL, et va également se lier à l'HSL, permettant son ancrage à la surface de la gouttelette lipidique. L'HSL peut être inhibée par l'AMPK. Les individus obèses sont caractérisés par une altération de la lipolyse qui résulte d'un remaniement complexe des différents acteurs de la lipolyse. Premièrement l'activation de la lipolyse est diminuée, mais en parallèle, les signaux antilypolitiques (insuline et AMPK) sont eux aussi diminués. Il en résulte une forte augmentation de l'activité de l'ATGL et une diminution de l'activité de l'HSL qui favorise l'accumulation de DAG, qui contribue à l'activation de NF- κ B. L'accumulation d'AGL est également favorisée par le transport d'AGL provenant de la périphérie. De plus, l'accumulation d'AGL favorise la formation de céramides, capables d'inhiber la voie de la signalisation à l'insuline.

Adbh5 : Alpha/Beta-Hydrolase Homain Containing Protein 5 ; AGL : acides gras libres ; AMPc : AMP cyclique ; AMPK : AMP-activated protein kinase, ATGL : adipose triglyceride lipase ; DAG : diacylglycérol ; HSL : hormone-sensitive lipase ; MAG : monoacylglycérol ; MGL : monoglyceride lipase ; NF- κ B : nuclear factor- κ B ; PK : protéine kinase ; PLN : périlipine ; TG : triglycérides

L'accumulation d'AGL favorise également la formation de céramides (Vegiopoulos et al., 2017) qui résultent de la liaison entre un acide gras et une sphingosine. Ils jouent un rôle structurel dans la formation des membranes lipidiques, mais interviennent également dans l'activation de voie de signalisation pro-inflammatoires, et inhibent la signalisation de l'insuline (Chaurasia and Summers, 2015). Ainsi, les taux plasmatiques de céramides sont significativement augmentés chez les souris nourries avec un régime enrichi en graisses (Boini et al., 2010), et chez les individus obèses et diabétiques (Haus et al., 2009). En accord avec ces résultats, leur inhibition améliore la sensibilité à l'insuline et confère un effet anti-inflammatoire (Shoelson et al., 2006 ; Holland et al., 2007 ; Schmitz-Peiffer, 2010).

De façon intéressante, l'activité de l'ATGL et la production de glycérol sont augmentées dans les adipocytes blancs de souris rendues obèses avec un régime enrichi en graisses (Gaidhu et al., 2010). Si ces données semblent indiquer que la lipolyse est augmentée chez les animaux obèses, la réalité est néanmoins plus complexe. En effet *in vitro*, des adipocytes de souris obèses mis en culture avec de l'adrénaline présentent une diminution de la lipolyse, par rapport à des adipocytes de souris contrôles (Gaidhu et al., 2010). Ceci révèle que, même si la lipolyse induite par les catécholamines est diminuée, la lipolyse globale est quant à elle augmentée chez les animaux obèses. Des observations similaires ont été réalisées chez l'humain (Jocken and Blaak, 2008). L'explication réside dans la levée des effets antilipolytiques exercés par l'insuline et l'AMPK. En effet, les individus obèses présentent une forte résistance à l'insuline et une diminution de l'activité de l'AMPK (Gaidhu et al., 2010 ; Lindholm et al., 2013). A noter que si l'effet antilipolytique de l'insuline est bien caractérisé, le rôle de l'AMPK dans la lipolyse a longtemps été controversé (voir pour revue Watt and Steinberg, 2008). Cependant, l'utilisation récente de souris transgéniques invalidées pour l'AMPK au niveau des adipocytes a permis de montrer que l'AMPK stimule la lipolyse en condition basale, et à l'inverse, inhibe la lipolyse lors de traitement avec des agonistes des récepteurs adrénergiques. L'AMPK exercerait donc un effet antilipolytique en « condition stimulée » (Kim et al., 2016).

Des travaux ont étudié de façon plus précise l'effet de l'obésité sur l'activité des différentes enzymes impliquées dans la lipolyse. De façon surprenante, l'activité de l'ATGL est augmentée alors que celle de l'HSL est fortement diminuée dans un contexte d'obésité

(Large et al., 1999 ; Gaidhu et al., 2010 ; Petridou et al., 2017), ce qui favorise l'accumulation de DAG. Par ailleurs, la diminution de l'activité de l'AMPK, et des expressions de PPAR α et de PGC1- α chez ces individus obèses entraîne une diminution de l'oxydation des lipides au niveau des mitochondries (Gaidhu et al., 2010 ; Luo et al., 2016). En conséquence, l'accumulation de DAG combinée à une capacité oxydative limitée favorise l'estérification des acides gras. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'augmentation de la lipolyse associée à l'obésité favorise le stockage des acides gras au sein des adipocytes et donc leur hypertrophie. Le DAG étant un puissant activateur de la PKC, elle-même à l'origine de l'activation de la voie NF- κ B, l'accumulation de DAG liée à l'obésité contribue à l'augmentation de l'inflammation (Timmers et al., 2008).

I.5.2.c Altérations des tissus adipeux brun/beiges

Un régime gras induit d'une part, l'augmentation de l'inflammation du tissu adipeux brun (Alcalá et al., 2017), et d'autre part, l'augmentation progressive des dépôts de graisses ectopiques et de l'hypertrophie des adipocytes bruns, aussi appelé phénomène de « whitening » (Gao et al., 2015; Alcalá et al., 2017). De façon surprenante, l'impact d'un régime riche en graisses sur l'expression d'UCP1 varie d'une étude à l'autre, à tel point qu'il est difficile d'établir un consensus. En fonction de l'étude considérée, l'expression d'UCP1 est soit augmentée (So et al., 2011 ; García-Ruiz et al., 2015 ; Yamazaki et al., 2016 ; Alcalá et al., 2017), soit diminuée (Nasteska et al., 2014 ; Choi et al., 2015). Le même constat peut être fait sur l'expression d'UCP1 au sein du tissu adipeux beige. L'augmentation d'UCP1 au sein des tissus adipeux bruns et beiges peut sembler surprenante puisque cette augmentation est associée à une certaine résistance au développement de l'obésité, et à une amélioration du statut énergétique (Poher et al., 2015 ; Schneider et al., 2016). Néanmoins, Fromme et Klingenspor ont répertorié les résultats de nombreux travaux étudiant l'impact de l'obésité sur l'expression d'UCP1 des tissus adipeux bruns et beiges chez le rongeur (Fromme and Klingenspor, 2011). Tout d'abord, ils observent que la souche animale, la durée et le temps de régime sont à prendre en considération, et peuvent expliquer en partie les résultats disparates de la littérature. Néanmoins, une majorité d'études montrent que plus un régime gras est court, plus l'expression d'UCP1 au sein du tissu adipeux brun a tendance à être augmentée par rapport aux souris témoins, ce qui pourrait constituer un mécanisme visant à enrayer la progression de l'obésité. A l'inverse, plus les régimes gras sont longs, plus les différences d'expression d'UCP1 avec les souris contrôles diminuent. L'expression d'UCP1 au sein du tissu adipeux brun est parfois

même diminuée chez les souris nourries avec un régime gras. En revanche, il semble qu'une majorité d'études montrent une diminution de l'expression d'UCP1 au sein du tissu adipeux beige après un régime gras.

Le même constat peut être fait avec les dépenses énergétiques. Selon les études, elles peuvent être significativement diminuées (Choi et al., 2015 ; Nasteska et al., 2014), ou significativement augmentées (Kirchner et al., 2012 ; García-Ruiz et al., 2015), voire inchangées (So et al., 2011 ; Shahid et al., 2016). A noter que concernant les dépenses énergétiques, le mode de calcul employé peut modifier de manière non négligeable l'interprétation des résultats obtenus. En effet, elles peuvent être rapportées à la masse maigre de l'animal (masse en $\text{kg}^{0.75}$), ou à la masse totale (masse en kg). Le premier mode de calcul considère que la masse grasse est métaboliquement inactive et n'intervient pas, ou très peu, dans les dépenses énergétiques. A l'inverse, le deuxième mode de calcul considère que les masses grasses et maigres interviennent dans les dépenses énergétiques à un même niveau que les autres tissus. Le débat dans la communauté scientifique sur la prise en compte ou non de la masse grasse est un sujet épineux et continue de faire débat, sans qu'aucun consensus n'ait clairement émergé.

Fait intéressant, lorsque la respiration mitochondriale du tissu adipeux brun de souris obèses atteint sa capacité maximale, cela engendre un stress oxydatif important. Celui-ci peut inhiber la fixation d'AGL sur UCP1, fixation qui est nécessaire à son bon fonctionnement (Nicholls and Rial, 2016). En conséquence, une augmentation d'UCP1 n'est pas forcément synonyme d'une augmentation de la capacité thermogénique.

1.5.3 Plasticité et inflammation

1.5.3.a Chez l'individu sain

Les lipides apportés en excès par l'alimentation sont stockés afin d'être mobilisés lors de période de jeûne, mais également pour protéger les autres tissus de leur effet lipotoxique. Lors d'un régime hyperlipidique de court terme (quelques jours), une augmentation rapide du diamètre des adipocytes (hypertrophie) et une augmentation du nombre d'adipocytes à partir des précurseurs déjà présents (hyperplasie) sont observées chez les rongeurs (Kleemann et al., 2010 ; Jeffery et al., 2015) et chez l'humain (Muir et al., 2016). A l'inverse, lors d'une mise à jeun prolongée, les adipocytes sont capables de réduire fortement leur taille (Kleemann et al., 2010). Le tissu adipeux fait donc preuve d'une grande plasticité qui lui est indispensable pour

maintenir l'homéostasie énergétique, en cas d'excès ou de privation de nourriture. Cette plasticité implique des régulations et modifications hormonales, cellulaires et tissulaires (Crewe et al., 2017). En condition non pathologique, ces modifications font appel à une réaction inflammatoire contrôlée et transitoire.

En effet, l'augmentation du volume adipocytaire entraîne une légère hypoxie qui se traduit par une augmentation d'expression du facteur « hypoxia inducible factor-1 α » (HIF-1 α). Ce dernier constitue un signal majeur dans le recrutement de cellules immunitaires au sein du tissu adipeux, les macrophages en particulier (Lee et al., 2014). Lors de régimes enrichis en graisses de courte durée, les monocytes infiltrés dans le tissu adipeux se différencient en macrophages pro-inflammatoires (M1) mais surtout en macrophages anti-inflammatoires (M2) (Lee et al., 2011 ; Ji et al., 2012). Les macrophages M1 initient la réparation du tissu en phagocytant les lipides et les débris des adipocytes nécrotiques grâce à l'exocytose d'enzymes lysosomales (Strissel et al., 2007 ; Coats et al., 2017). L'expression du « tumor necrosis factor- α (TNF- α) et de HIF-1 α par les adipocytes, et la sécrétion de l'interféron gamma (IFN- γ) par les LTH1, participent à la polarisation des macrophages en macrophages M1 (He and Carter, 2015). Le remplacement des cellules mortes par de nouvelles nécessite dans un premier temps une dégradation de la matrice extracellulaire. Cette étape est assurée par les macrophages M1, et dans une moindre mesure, par les macrophages M2, grâce à la synthèse de métalloprotéinases matricielles (MMP ; Foey, 2015). La dégradation de la matrice extracellulaire facilite l'hypertrophie/hyperplasie du tissu adipeux et l'angiogenèse, indispensable pour fournir les quantités appropriées d'oxygène et de nutriments au tissu adipeux en expansion. L'angiogenèse est aussi régulée par de nombreux facteurs, comme HIF-1 α , mais aussi par le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) qui est synthétisé par les adipocytes et les macrophages M2 (Hesketh et al., 2017).

La réparation complète du tissu adipeux nécessite une étape de résolution de l'inflammation et une étape de fibrose. Cette dernière consiste en la synthèse de matrice extracellulaire et à la formation d'un nouveau tissu conjonctif. Ces étapes sont principalement assurées par les macrophages M2 *via* la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (interleukines-10 et -12 (IL-10/12) et arginase), et de molécules impliquées dans la réparation tissulaire comme le TGF- β (Song et al., 2000). Le TGF- β permet l'attraction et la prolifération des fibroblastes du tissu adipeux, principaux effecteurs de la fibrogenèse (Hinz et al., 2007). Les LTH2 et les éosinophiles participent au maintien d'un niveau important de macrophages M2 au sein du tissu adipeux d'individus non-obèses, grâce à la production d'IL-4, (Wu et al.,

2011 ; Lackey and Olefsky, 2016 ; **Figure 13**). Les lymphocytes T régulateurs sont également présents en forte quantité au sein du tissu adipeux d'individus sains (Feuerer et al., 2009). Ces derniers ont la particularité de pouvoir inhiber d'autres populations de lymphocytes T et d'activer les macrophages M2 (Cipolletta, 2014). Leur présence est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de l'inflammation du tissu adipeux (Cipolletta, 2014).

La plasticité des différents tissus adipeux est également nécessaire à la thermogénèse non frissonnante. Comme il a déjà été évoqué, le froid permet de stimuler la brunisation du tissu adipeux blanc, et d'augmenter les capacités thermogéniques du tissu adipeux brun. Cette exposition au froid induit également l'augmentation de l'infiltration des macrophages M2 au sein des tissus adipeux blancs et bruns. Une fois activés, ces macrophages vont eux-mêmes sécréter des catécholamines et participer à la thermogénèse non frissonnante (Nguyen et al., 2011). L'infiltration des macrophages M2 et l'expression de marqueurs de la thermogénèse non frissonnante sont significativement diminués chez des souris transgéniques présentant une perturbation de la signalisation de l'IL-4 (Nguyen et al., 2011). La différenciation des macrophages M2 au cours d'une exposition au froid serait stimulée par l'adiponectine (Hui et al., 2015). L'ensemble de ces résultats montrent que les macrophages M2 sont nécessaires à la thermogénèse non frissonnante.

I.5.3.b Chez l'individu obèse

Les AGL exerçant un effet chémoattractant puissant sur les macrophages, il a été proposé que ces derniers permettent de phagocyter une partie des AGL libérés par les adipocytes, contribuant ainsi à la diminution de leur effet lipotoxique (Kosteli et al., 2010 ; Red Eagle and Chawla, 2010 ; Hu et al., 2016). Néanmoins, la lipolyse et la libération d'AGL étant fortement augmentées dans un contexte d'obésité, cela favorise l'infiltration excessive de macrophages au sein du tissu adipeux et au développement d'une inflammation chronique (Xu et al., 2003 ; Weisberg et al., 2003). De plus, le niveau d'infiltration des macrophages corrèle avec le niveau d'adiposité des animaux. En fait, plus que l'augmentation de l'infiltration des macrophages, c'est le défaut dans la polarisation des macrophages qui participe de façon importante à l'inflammation du tissu adipeux. Comme il a été dit précédemment, les macrophages du tissu adipeux sont présents sous une forme M1 pro-inflammatoire, ou sous une forme M2 anti-inflammatoire. Hors, l'obésité est associée à un déséquilibre de la balance M1/M2 en faveur des macrophages M1, qui représentent une source importante de sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires (He and Carter, 2015) contribuant à la dysfonction générale du tissu adipeux (Ouchi et al., 2011). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce défaut dans la balance M1/M2. Tout d'abord, l'augmentation croissante de l'hypertrophie et de la nécrose des adipocytes favorise l'infiltration et l'activation des macrophages M1 qui se charge de phagocyter les débris cellulaires. Il a également été montré lors de co-cultures que la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires des macrophages entraîne une augmentation de la lipolyse des adipocytes, libérant ainsi des AGL qui stimule la production de facteurs pro-inflammatoires par les macrophages (Suganami et al., 2005). De plus, ces effets corrèlent avec la taille des adipocytes. Ce dialogue n'a pas été démontré *in vivo*, mais il pourrait contribuer à l'augmentation de l'inflammation et à la dysfonction du tissu adipeux dans un contexte d'obésité. La présence d'IL-6 peut notamment activer la prolifération des L_TH17, qui vont synthétiser de l'IL-17, une cytokine capable d'inhiber l'adipogenèse et d'activer les macrophages M1 (Ahmed and Gaffen, 2010 ; Choe et al., 2016). De plus, l'activation importante des L_TH1 et des neutrophiles au sein du tissu adipeux d'individus obèses participe également au déséquilibre de la balance M1/M2 (**Figure 13**).

Les signaux inflammatoires ne sont pas les seuls effecteurs à pouvoir orienter la polarisation des macrophages. Le métabolisme cellulaire, et en particulier la glycolyse et la β -oxydation, jouent également un rôle significatif (Jha et al., 2015). En effet, différentes études montrent que les macrophages M1 adoptent un métabolisme cellulaire particulier connu sous le nom d'effet Warburg (Tannahill et al., 2013). Initialement décrit dans les cellules cancéreuses (Crozier, 1924), « l'effet Warburg » se caractérise par une utilisation accrue de la glycolyse anaérobie au détriment de la respiration cellulaire et du cycle de Krebs, et ce, même en présence d'oxygène. Bien qu'ayant un rendement énergétique plus faible, l'oxydation incomplète du glucose en lactate permet de réorienter des produits initialement utilisés dans le cycle de Krebs vers d'autres voies métaboliques. Dans le cas des macrophages M1, la perturbation du cycle de Krebs permet de réorienter le citrate vers la synthèse d'acides gras, nécessaire aux fonctions de phagocytose et de la prolifération des macrophages (Jha et al., 2015). Par exemple, l'accumulation de succinate inhibe les prolyl-hydroxylases, conduisant ainsi à la stabilisation d'HIF-1 α , puis à la sécrétion d'IL-1 β (Tannahill et al., 2013). De plus, les macrophages M1 présentent une utilisation accrue du cycle des pentoses phosphates, qui permet la synthèse de ribose, d'acides aminés et de nucléotides, eux aussi indispensables à la prolifération des macrophages. Le cycle des pentoses phosphates permet également la production de NADPH qui peut être utilisé par la NADPH oxydase pour la génération de dérivés réactifs de l'oxygène

(O'Neill et al., 2016). En revanche, les macrophages M2 présentent un métabolisme orienté vers la phosphorylation oxydative, et génèrent de l'énergie via l'oxydation des acides gras. Cela leur permet entre autres, d'utiliser le glucose ou la glutamine pour synthétiser de l'UDP-GlcNAc, indispensable pour la N-glycosylation des récepteurs comme CD2016 et CD301, qui sont exprimés à la surface des macrophages M2 (Jha et al., 2015).

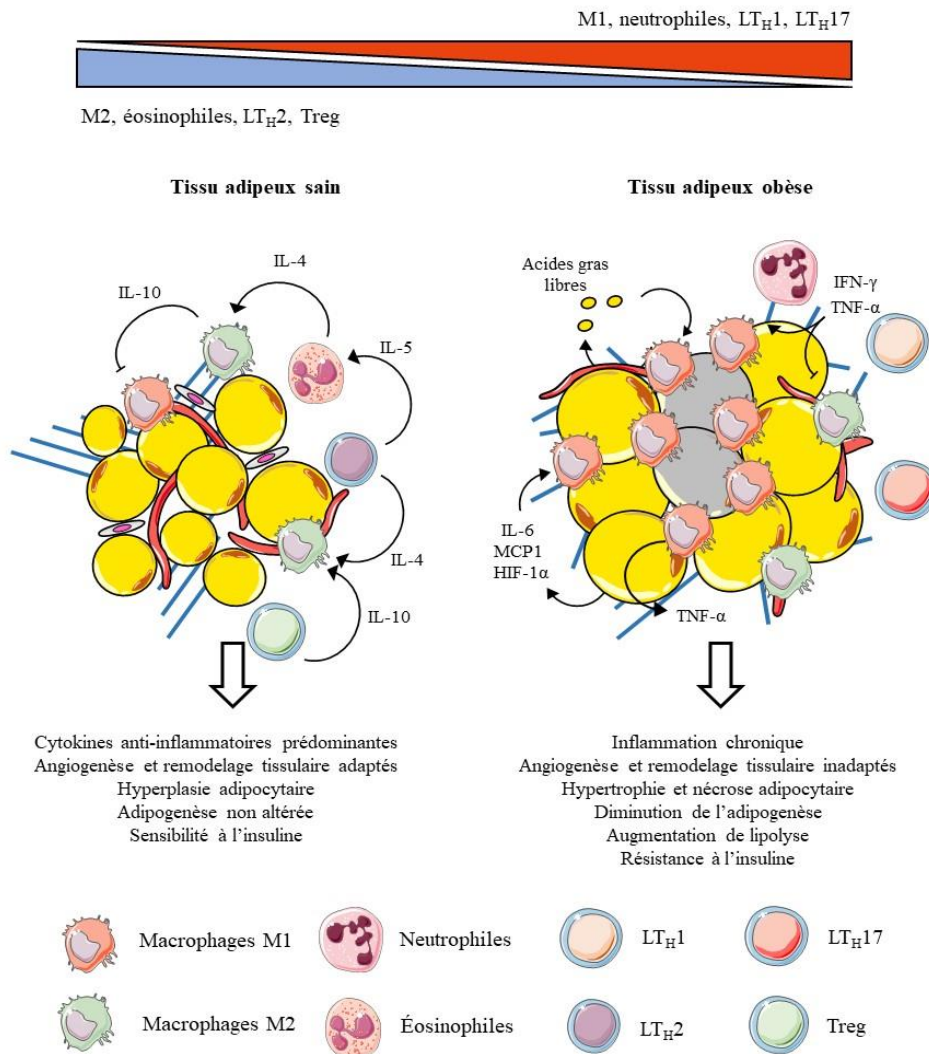


Figure 13 : Inflammation du tissu adipeux liée à l'obésité. Le tissu adipeux d'individus sain est caractérisé par une forte présence des cellules immunitaires anti-inflammatoires. Parmi elles figurent les LT_H2 qui sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-5 activant les macrophages M2 et les éosinophiles, respectivement. Les éosinophiles participent aussi à l'activation des macrophages M2 en produisant de l'IL-4. Une fois activés, les macrophages M2 sécrètent de l'IL-10 aux effets anti-inflammatoires, notamment en inhibant les macrophages M1. Les Treg participent également à l'inhibition de l'inflammation, notamment en activant les macrophages M2. A l'inverse, l'hypertrophie adipocytaire liée à l'obésité entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes, qui activent les macrophages M1. De plus, les neutrophiles, les LT_H1 et les LT_H17 fortement présents au sein du tissu adipeux d'individus obèses, sécrètent un pool de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α , IL17) inhibant les macrophages M2 et activant les macrophages M1. Cette inflammation chronique favorise la dysfonction générale du tissu adipeux, c'est-à-dire, une altération de la lipolyse, une angiogenèse, un remodelage tissulaire inadaptée et une altération de la sécrétion d'adipokines.

HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 α ; IFN- γ : interféron- γ ; IL-4/5/6/10 : interleukine-4/5/6/10 ; LT_H : lymphocyte T helper ; TNF- α : tumor necrosis α . Treg : lymphocyte T régulateur

Comme il a été décrit dans le paragraphe I.5.3.a, la fibrose est une étape nécessaire à la réparation du tissu adipeux lors d'une inflammation aiguë. Dans un contexte d'inflammation chronique la fibrose devient constante et favorise la formation d'un tissu cicatriciel (Braga et al., 2015). Ce processus fait intervenir le TGF- β , un facteur fibrotique majeur (Keophiphath et al., 2009), qui voit son expression augmentée de façon significative chez les souris obèses en comparaison avec des souris maigres (Samad et al., 1997), et contribue de façon importante à la fibrose du tissu adipeux (Vila et al., 2014). La fibrose se caractérise par une surproduction de la matrice extracellulaire, comme en atteste l'augmentation du collagène au sein du tissu adipeux blanc observée chez les rongeurs et les humains obèses (Henegar et al., 2008 ; Khan et al., 2009). D'ailleurs, le tissu adipeux de souris invalidées pour le gène du collagène VI, un type de collagène retrouvé chez l'humain et la souris, présente une meilleure expansion pendant un régime gras en comparaison avec des souris témoins (Khan et al., 2009). De plus, la culture d'adipocytes dans un milieu inflammatoire favorise la surexpression de gènes de la matrice extracellulaire (Keophiphath et al., 2009). Ces résultats peuvent sembler surprenants puisque le TGF- β est principalement sécrété par les macrophages M2 aux propriétés anti-inflammatoires. Néanmoins, même s'ils sont en minorité par rapport aux macrophages M1, ils restent activés dans le tissu adipeux d'individus obèses et participent à la prolifération des fibroblastes et à la formation d'une matrice extracellulaire inadéquate (Braga et al., 2015).

Le rôle de l'angiogenèse dans l'obésité reste encore flou en raison des nombreuses études contradictoires. Le blocage du VEGF-A par des anticorps anti-VEGF-A permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline de souris obèses sans toutefois modifier leur adiposité (Wu et al., 2014). Par ailleurs les taux circulants de VEGF-A chutent après la chirurgie bariatrique de patients obèses (García de la Torre et al., 2008). Ces résultats pourraient suggérer un effet délétère du VEGF-A. Or, la surexpression de VEGF-A protège les souris de l'obésité induite par un régime gras (Elias et al., 2012) alors que des souris VEGF^{-/-} présentent une inflammation et une hypoxie accrue du tissu adipeux (Sung et al., 2013). En réalité, il semble que le tissu adipeux d'individus obèses soit caractérisé par une angiogenèse désorganisée et inadaptée (Crewe et al., 2017). Les mécanismes exacts de cette angiogenèse pathologique ne sont pas encore connus, mais il apparaît fort probable qu'elle soit favorisée par la fibrose et l'inflammation chronique.

1.6 Inflammation hypothalamique

L'inflammation associée à l'obésité ne se limite pas aux seuls organes périphériques, mais s'étend jusqu'à certaines structures centrales. Parmi elles, l'hypothalamus fait l'objet d'une attention particulière en raison de son rôle majeure dans la régulation de la balance énergétique. L'inflammation centrale chez les individus obèses fut mise en évidence pour la première fois en 2005 au niveau de l'hypothalamus de rat (De Souza et al., 2005). Cette inflammation est en partie due à la nature même de l'hypothalamus. En effet, il fait partie des organes circumventriculaires qui permettent le passage des molécules circulantes grâce à une vascularisation riche, et à la présence de capillaires fenestrés, donc dépourvus de barrière hémato-encéphalique. En conséquence, les organes circumventriculaires constituent une porte d'entrée pour les signaux inflammatoires et les cellules immunitaires (Buller, 2001 ; Schulz and Engelhardt, 2005). L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires venant de la périphérie va affecter l'hypothalamus et le système nerveux en général, en contribuant à sa propre inflammation et à son dysfonctionnement (McColl et al., 2014; **Figure 14**).

L'inflammation hypothalamique présente quelques similarités avec l'inflammation du tissu adipeux. Elle se traduit par une activation de signaux pro-inflammatoires comme NF- κ B, entraînant la production de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 (De Souza et al., 2005 ; Thaler et al., 2012). Elle s'accompagne également d'une diminution de la sensibilité à la leptine et à l'insuline (De Souza et al., 2005). En accord avec ces résultats, l'injection intracérébroventriculaire de TNF- α inhibe la phosphorylation d'acteurs de la voie de signalisation de la leptine et de l'insuline (IRS, STAT3), ainsi que leurs effets anorexigènes au niveau de l'hypothalamus (Romanatto et al., 2007). Les acides gras saturés sont également des acteurs majeurs de l'inflammation hypothalamique, en raison de leur capacité à se fixer sur le récepteur TLR4. Ainsi, les souris déficientes pour TLR4 présentent une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisses. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique du TLR4 produit le même résultat chez le rongeur (Milanski et al., 2009).

Les premiers signes de l'inflammation centrale se développent avant même l'apparition de l'obésité, voire même avant l'inflammation périphérique, puisque la consommation d'un régime gras pendant une seule journée suffit à induire une inflammation hypothalamique chez le rongeur (Thaler et al., 2012). Cette inflammation se traduit par une activation et une accumulation de la microglie, ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6). De façon intéressante, cette inflammation est transitoire et diminue rapidement après la 1^{ère} semaine de régime gras, grâce à la mise en place de

mécanismes de protection neuronale (Thaler et al., 2012). Ces mécanismes incluent le développement des astrocytes qui jouent un rôle neuroprotecteur important, mais également l'autophagie et l'activation des macrophages résidents du système nerveux central, la microglie. En revanche, au-delà d'une certaine période, dépendante de la nature du régime et de l'espèce, l'inflammation hypothalamique réapparaît et s'accompagne de dégâts neuronaux (Moraes et al., 2009 ; Thaler et al., 2012). Si les mécanismes précédemment cités sont neuroprotecteurs à court terme, ils deviennent néfastes à long terme. Le développement anormal et excessif des astrocytes (astrocytose) et l'activation de la microglie, engendrent la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont être directement perçues par les cellules neuronales, contribuent ainsi à la résistance centrale à la leptine (Argente-Arizón et al., 2015). En plus de son rôle dans le métabolisme énergétique, la leptine participe à la régulation de l'inflammation innée et non frissonnante, et exerce des effets pro-inflammatoires (La Cava and Matarese, 2004). En outre, elle est capable *in vitro* d'activer les cellules microgliales de rat et leur production d'IL-1 β et de TNF- α (Pinteaux et al., 2007 ; Lafrance et al., 2010). Les dégâts neuronaux engendrés par l'obésité se traduisent entre autres par une diminution significative des neurones POMC, et des taux de transcrits de POMC au niveau de l'ARC (Thaler et al., 2012 ; Souza et al., 2016). Il y a donc un déséquilibre entre signaux orexigènes et anorexigènes qui conduit à une balance énergétique positive (Rahman et al., 2018), et favorise le développement de l'obésité. L'inflammation hypothalamique liée à l'obésité a également été mise en évidence chez l'humain (Thaler et al., 2012).

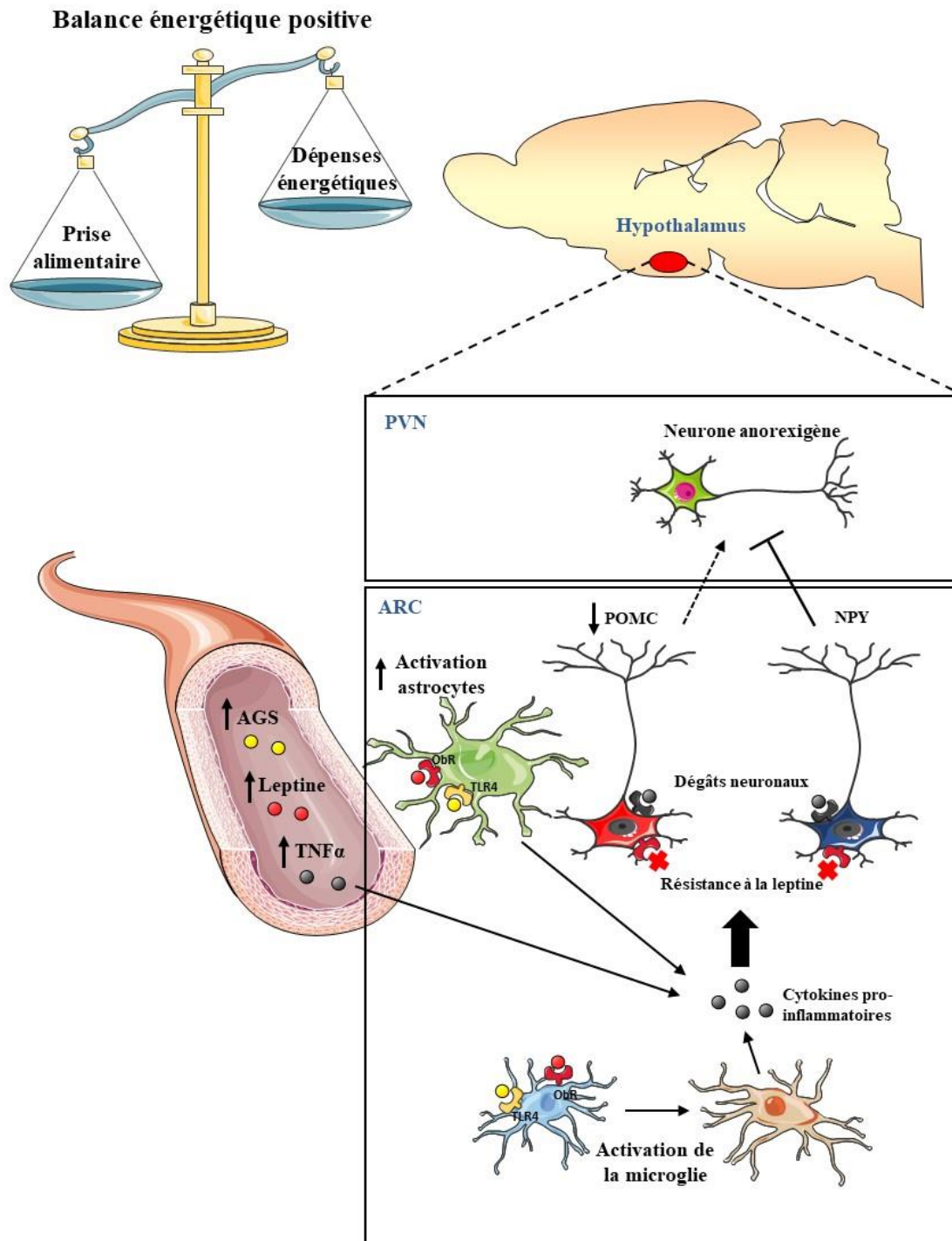


Figure 14 : Inflammation hypothalamique liée à l'obésité. L'augmentation des taux circulants d'AGS qui parviennent jusqu'à l'ARC induisent une activation locale de la microglie et des astrocytes en se fixant sur les TLR4, induisant ainsi une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α en particulier. La leptine peut également contribuer à ce processus en se fixant sur son récepteur (ObR) qui est exprimé à la surface des cellules microgliales et astrocytaires. En traversant la barrière hématoencéphalique, les cytokines pro-inflammatoires provenant de la périphérie participent elles aussi à l'inflammation de l'ARC, en engendrant des dégâts neuronaux et favorisant la résistance à la leptine au niveau des neurones POMC et NPY. Ensemble, ces deux mécanismes aboutissent à une diminution de la sécrétion du neuropeptide anorexigène POMC et à une balance énergétique positive.

AGS : acide gras saturés ; ARC : noyau arqué, NPY : neuropeptides Y ; ObR : récepteur à la leptine ; POMC : pro-opiomélanocortine ; PVN : noyau paraventriculaire ; TNF- α : tumor necrosis α ; TLR4 : toll like receptor.

I.7 Lipotoxicité

Lorsque l'accumulation d'espèces lipidiques est telle qu'elle ne peut plus être stockée sous forme d'énergie, elle produit des altérations métaboliques dans l'ensemble de l'organisme (**Figure 15**). Ce mécanisme physiopathologique s'appelle la lipotoxicité. Comme il a été exposé dans le paragraphe précédent, l'augmentation de lipides circulants contribue à l'inflammation hypothalamique et au déséquilibre de la balance énergétique. Il a été montré que l'augmentation prolongée des acides gras circulants entraîne la défaillance et l'apoptose des cellules β -pancréatiques chez le rongeur et chez l'humain (Lupi et al., 2002 ; Robertson et al., 2004). Cette défaillance du pancréas est elle-même à l'origine du diabète de type 2 associé à l'obésité. De la même manière, l'accumulation d'acides gras saturés, de DAG et de céramides favorisent le développement de la stéatose hépatique, contribue à l'élévation de la glycémie (Alkhoury et al., 2009 ; Gorden et al., 2011) et altèrent la sensibilité de l'insuline au niveau des muscles squelettiques (Adams et al., 2004 ; Timmers et al., 2008 ; Martins et al., 2012). Il a également été montré que l'accumulation de palmitate, de céramides et de cholestérol est associée à l'athérosclérose, une maladie artérielle chronique caractérisée par des dépôts lipidiques ectopiques (Zilversmit, 1975 ; Gao et al., 2012 ; Aburasayn et al., 2016 ; Xu et al., 2016b). A l'instar du tissu adipeux, ces lipides exercent des effets cytotoxiques en activant des voies pro-inflammatoires comme la voie NF- κ B, en augmentant le stress oxydatif et mitochondrial, et en activant des voies pro-apoptotiques (Alkhoury et al., 2009 ; Véret et al., 2014).

Une autre conséquence importante de la lipotoxicité est le stress du réticulum endoplasmique (RE). En plus d'être impliqué dans les modifications post-traductionnelles des protéines, le RE est également un site majeur de la synthèse des phospholipides et du métabolisme lipidique. En effet, de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique y sont exprimées (Han and Kaufman, 2016), dont, entre autres, les lipines et les « diacylglycerol acyltransférases » impliquées dans la formation de TG, ainsi que les cyclooxygénases et la microsomale prostaglandine E synthase-1, des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique (Mbonye et al., 2006 ; Sjögren et al., 2013). Les acides gras saturés et les céramides sont capables d'induire le stress du RE au niveau du foie, du pancréas et du muscle (Wei et al., 2006 ; Boslem et al., 2012 ; Han and Kaufman, 2016 ; Bandet et al., 2018). Le RE contient des « unfold protein response » (UPR) qui détectent les protéines avec un repliement anormal. Lorsque ces dernières s'accumulent au sein du RE, les UPR fixées au niveau de la membrane du RE sont libérées dans le cytoplasme, où elles entraînent l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'inflammation, l'apoptose, et l'inhibition

de la traduction protéique (Han and Kaufman, 2016 ; Lebeaupin et al., 2018). Ainsi, le stress du RE engendre une altération du métabolisme lipidique dans l'ensemble de l'organisme.

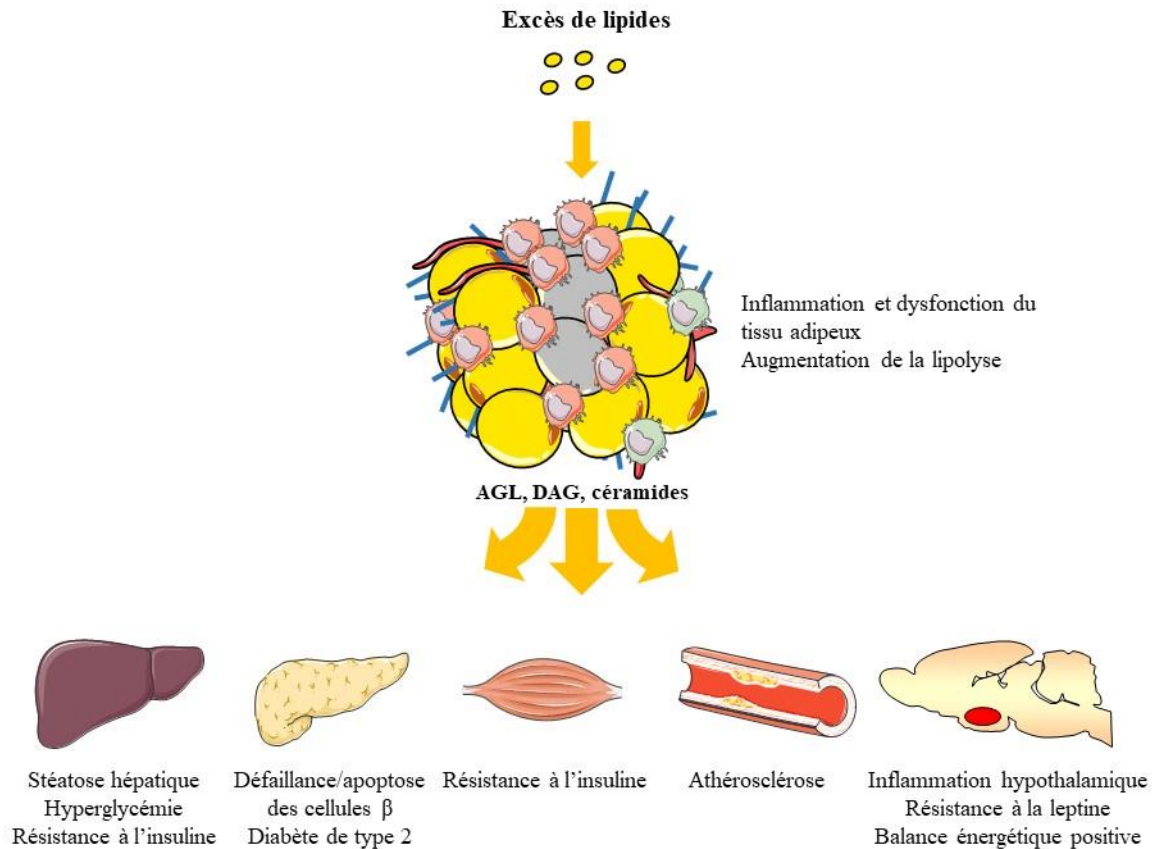


Figure 15 : Lipotoxicité. L'excès chronique de lipides contribue à l'inflammation et à la dysfonction du tissu adipeux. Ce dernier est alors caractérisé par une lipolyse accrue qui favorise la formation d'AGL, de DAG et de céramides. Lorsque leur accumulation devient trop importante pour être stockés sous forme d'énergie, ces lipides atteignent les organes périphériques et le système nerveux central, favorisant ainsi le développement de stéatose hépatique, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.

AGL : acides gras libres ; DAG : diacylglycérol.

Chapitre II : La mPGES-1, un rôle au-delà de l'inflammation

Les prostanoïdes appartiennent aux eicosanoïdes (du grec eikosi = vingt), une des classes les plus importantes de lipides médiateurs. Ils sont appelés ainsi car ils sont synthétisés à partir d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbones. L'acide arachidonique (AA) constitue le principal précurseur des prostanoïdes (produits de la voie de la cyclo-oxygénase), mais également des leucotriènes, des lipoxines et des hépoxilines (produits de la voie lipoxigénase). Les prostanoïdes, comprennent le thromboxane A2 (TXA2), la prostacycline (PGI2) et les PG. Ils sont produits par une large variété de cellules et de tissus, et sont libérés dès leur production. Rapidement dégradés, les prostanoïdes agissent principalement comme médiateurs autocrines et paracrines. Ils ont un large éventail de bioactivités et sont impliqués dans le fonctionnement du système nerveux, cardiovasculaire, gastro-intestinal, rénal, reproducteur, endocrinien, respiratoire et immunitaire (Narumiya, 2007 ; Pecchi et al, 2009).

II.1 Découverte

En 1930, Kurzork et Lieb (1930) montrent que le sperme humain est capable, selon les cas, de provoquer des contractions ou des relaxations de fibres utérines. Plus tard, Goldblatt (1935) et Euler (1935) en isolèrent la PG et montrèrent qu'elle est capable de provoquer la contraction de muscles lisses et de diminuer la pression artérielle. La PG fut nommée ainsi car l'on pensait qu'elle était synthétisée par la prostate. Même si par la suite il fut montré que cela était faux, le terme de PG fut conservé. Les premières PG furent isolées entre 1957 et 1960 par Bergström et Sjövall qui les appelèrent PGE et F (Bergström and Sjövall, 1957 ; Bergström and Sjövall, 1960).

II.2 Biosynthèse des prostanoïdes

L'acide linoléique dihomogamma et l'AA sont à l'origine des PGE de type 1 et des PGE de type 2, respectivement (Dobryniewski et al., 2007). Il existe également des PG de type 3 qui sont issues du métabolisme de l'acide eicosapentaénoïque (Yang et al., 2014). La PGE2 est produite par la plupart des types cellulaires (Nasrallah et al., 2016), et la première étape de leur voie de biosynthèse est assurée par la phospholipase A2 (PLA2) qui hydrolyse les phospholipides membranaires pour libérer l'AA (**Figure 16**). Ce dernier peut être pris en charge soit par les

lipoxines, soit par les cyclooxygénases (COX) 1 et 2. COX1 et COX2 vont alors transformer successivement l'AA en prostaglandine G2 (PGG2), puis en prostaglandine H2 (PGH2). COX1 est une enzyme constitutive qui permet d'assurer la synthèse basale de PGH2, ainsi que le maintien de l'homéostasie dans de nombreux tissus, tandis que l'expression de COX2 est induite par des cytokines et des facteurs de croissance. Ensuite, différentes synthèses vont prendre en charge la PGH2 pour synthétiser l'ensemble des prostanoïdes (Smith, 1989, Pecchi et al, 2009) qui sont : la PGE2, la PGD2, la PGI2, la PGF2 α , et le TXA2.

La purification de PGE synthase (PGES) a été décrite pour la première fois en 1977, mais celle-ci ne fut que partielle car l'enzyme était décrite comme hautement instable, son temps de demi-vie n'étant que de 30 minutes à 25°C dans du tampon phosphate (Ogino et al., 1977). Il a été également décrit que l'ajout de glutathion améliore l'activité de l'enzyme. De par son homologie avec la Microsomale Glutathione S Transferase-1, l'équipe de Jakobson isola en 1999 une PGES humaine. Elle fut exprimée dans un système bactérien, dont la fraction membranaire fut récupérée et incubée en présence de PGH2 et de glutathion, ce qui entraîna une forte production de PGE2. Des *Northern blots* ont montré que les ARN de cette PGES sont fortement exprimés au niveau de cellules cancéreuses A549, et que leur production de PGE2 est fortement augmentée lorsqu'elles sont incubées avec la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Jakobsson et al., 1999). Le caractère inductible de cette PGES fut confirmé par la suite par différents travaux (Forsberg et al., 2000 ; Sampey et al., 2005), et c'est en 2002 que la mPGES-1 fut finalement complètement purifiée, et confirmée comme glutathion-dépendante (Ouellet et al., 2002). Si la mPGES-1 est exprimée dans la plupart des tissus, son expression reste faible en condition basale (Psarra et al., 2017). Il se trouve que les expressions de la mPGES-1 et de COX2 sont souvent régulées de la même manière, de sorte que l'on parle de couplage entre ces deux enzymes (Jakobsson et al., 1999 ; Murakami et al., 2000 ; Díaz-Muñoz et al., 2010). En effet, NF- κ B induit leur expression commune en se fixant sur leurs promoteurs (Díaz-Muñoz et al., 2010). De plus, l'IL-1 β favorise leur colocalisation au sein de trophoblastes humains (Premyslova et al., 2006). Cependant, l'inactivation de COX1 chez la souris entraîne une chute drastique de la production de PGE2 au niveau des glandes mammaires, contrairement aux souris contrôles (Chandrasekharan et al., 2005). Ces résultats remettent en cause un couplage exclusif entre la COX2 et la mPGES-1, qui dépendrait du tissu en question.

La c-PGES fut quant à elle identifiée en 2000 à partir du cytosol de cerveau de rats. Elle est exprimée de façon constitutive dans de nombreux types cellulaires et organes, tels que le foie, les testicules, le cerveau, l'estomac, la rate, et le cœur. Il a aussi été montré que la

production de PGE2 par des cellules HEK293 est beaucoup plus importante lorsqu'elles sont cotransfectées avec COX1, plutôt qu'avec COX2. (Tanioka et al., 2000). L'activité de la c-PGES est donc couplée préférentiellement à celle de COX1.

Watanabe et al., se sont intéressés aux PGES présent dans la partie microsomale d'organes de rats (Watanabe et al., 1997). Tandis que les PGES présent au niveau des reins et des organes génitaux ont une activité glutathion-dépendante, les PGES présent au niveau du cœur, de l'utérus et de la rate, ont une activité glutathion-indépendante. Ils en conclurent qu'il devait exister deux types de PGES. Cette enzyme fut par la suite purifiée à partir de cœur de bœuf (Watanabe et al., 1999), et étant différente de celle découverte par Jakobsson, elle fut nommée mPGES-2. Même si elle n'est pas glutathion-dépendante, il fut montré que son activité peut être quand même stimulée par différents réactifs thioliques (Tanikawa et al., 2002).

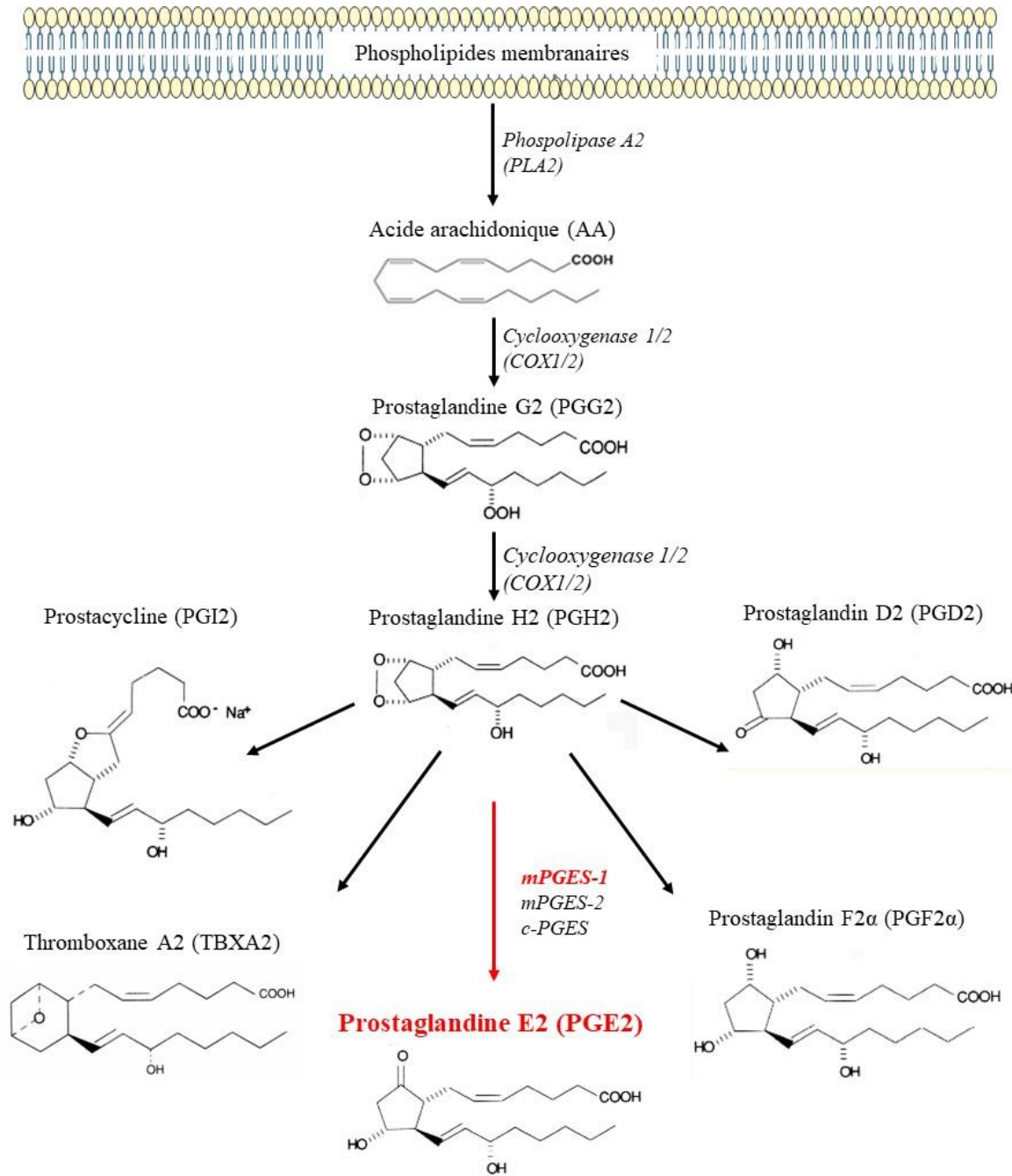


Figure 16. Biosynthèse des prostanoïdes. Les phospholipides membranaires sont transformés en AA par la PLA2, lui-même transformé successivement en PGG2 puis en PGH2 par COX1 et 2. La PGH2 est ensuite prise en charge par différentes synthases pour synthétiser l'ensemble des prostanoïdes, à savoir : les PGD2/E2/F2α/I2, et le TXA2. L'étape finale de la synthèse de la PGE2 est catalysée par 3 synthases différentes : les m-PGES-1 et 2 et la c-PGES.

AA : acide arachidonique ; COX1/2 : cyclo-oxygénase 1/2 ; cPGES : cytosomale prostaglandin E synthase ; mPGES-1/2 : microsomale prostaglandin E synthase-1/2 ; PG : prostaglandine ; PLA2 : phospholipase A2 ; TXA2 : thromboxane A2.

II.3 Voies de dégradation de la PGE2

II.3.1 Voie enzymatique :

La PGE2 est dégradée par la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (15-PGDH), en 15-kétoPGE2 (**Figure 17**). Cette enzyme existe sous deux formes, à savoir, la 15-PGDH de type I qui est NAD⁺ dépendante, et qui a pour substrat les PGs (Jarabak and Fried, 1979), et la 15-PGDH de type II, qui est NAD⁺ et NADP⁺ dépendante, et est capable d'oxyder un plus large éventail de substrats (Jarabak and Fried, 1979). Cette dernière, de par sa moindre spécificité, et de son affinité plus faible pour les PG, n'est pas considérée comme jouant un rôle important dans la dégradation des PG (Tai et al., 2002). La 15-PGDH est une enzyme ubiquitaire, sauf au niveau du cerveau où son expression chute après la naissance (Krunic et al., 2000). Pour être dégradée, la PGE2 présente au niveau du cerveau doit donc être transportée jusqu'au niveau du plexus choroïde, afin de rejoindre des cellules exprimant la 15-PGDH (Krunic et al., 2000). Il existe une régulation réciproque entre COX2 et la 15-PGDH. Le blocage ou la surexpression de l'une de ces deux enzymes, affecte de façon inversement proportionnelle l'expression de l'autre enzyme. Cependant, les mécanismes exacts qui régissent l'expression de COX2 et de la 15-PGDH restent encore à déterminer (Krunic et al., 2000).

Les 15-kétoPGE2 sont ensuite dégradées en 15-keto-13,14-dihydroprostaglandine par la Δ 13-15-ketoprostaglandine réductase (13-PGR), réduisant ainsi l'activité biologique de la PGE2. Cette enzyme est NADPH dépendante. Plus récemment, une nouvelle PG réductase, nommée PGR-2, a été découverte. Elle est exprimée uniquement à la fin du stade de différenciation de cellules 3T3-L1 en adipocytes matures, et est fortement exprimée dans le tissu adipeux de souris. De façon intéressante, l'expression constitutive de PGR-2 au sein de cellules 3T3-L1 inhibe la différenciation en adipocytes, notamment en diminuant l'expression de gènes cibles de PPAR γ , sans altérer directement son expression. Il est apparu que ce sont en réalité les 15-kétoPGE2, et non les PGE2 elles-mêmes, qui sont des ligands de PPAR γ , et qui sont capables d'induire l'adipogenèse *in vivo*. Il reste encore à savoir si les 15-kétoPGE2 sont capables d'induire l'adipogenèse de façon PPAR γ dépendante avec des concentrations produites *in vivo*. En effet, il est techniquement assez difficile de doser ce métabolite au niveau du tissu adipeux (Chou et al., 2007).

1.3.2 Voie non enzymatique :

Caractérisées par leur faible $\frac{1}{2}$ vie, les PG peuvent être spontanément transformées en cyclopentenone PG, par déshydratation leur anneau cyclopentane (**Figure 17**). Cette dégradation d'abord mise en évidence *in vitro*, a ensuite été confirmée *in vivo*. Dans le cas de la PGE2, cela aboutit à la formation de PGA2, qui fut découverte dans le plasma séminal humain en 1966 (Hamberg and Samuelsson, 1966). La PGA2 peut elle-même être convertie en PGB2 à la suite d'une isomérisation d'une liaison double (Amin, 1989), ou en 15-déoxy Δ 13-15-PGA2 après déshydratation (Petrova et al., 1999). De façon intéressante, ces métabolites sont reconnus pour avoir des effets biologiques, qui sont même parfois plus importants que ceux des PG dont ils sont issus (Straus and Glass, 2001). Les cyclopentenone PG sont essentiellement transportées par diffusion.

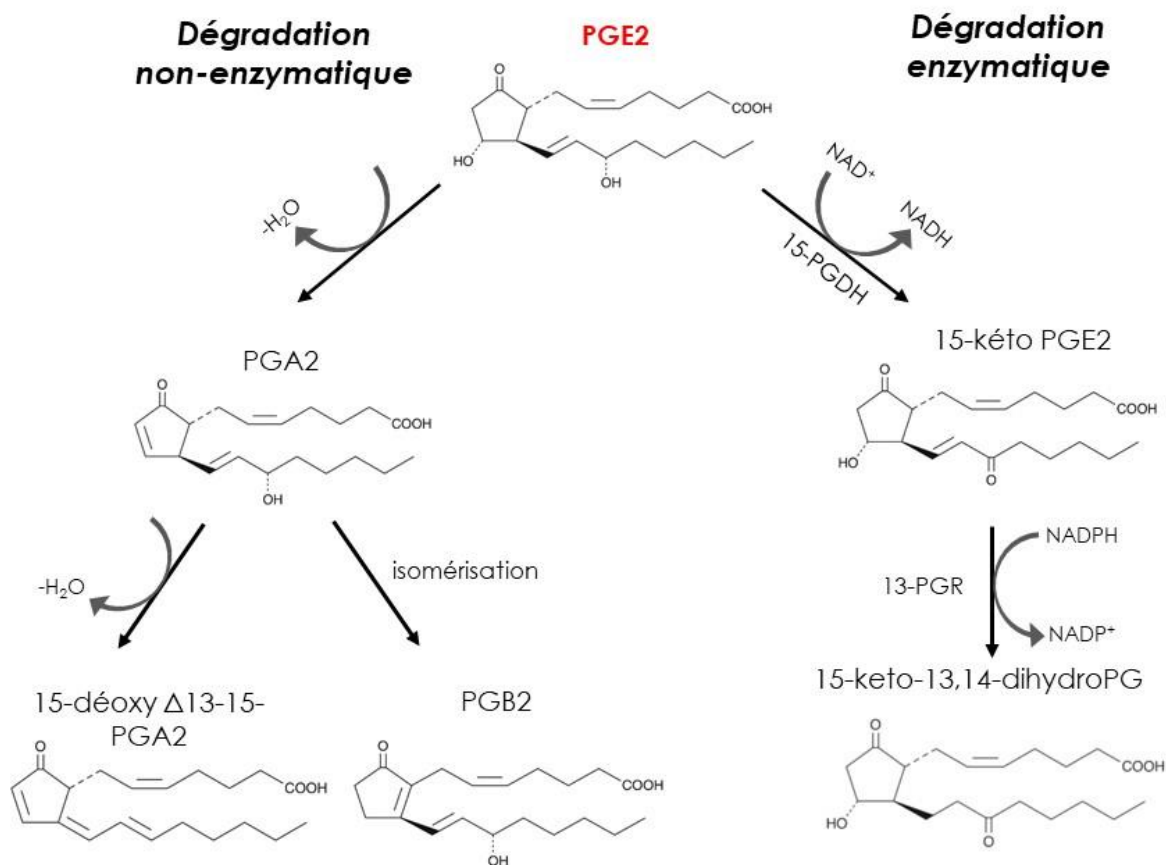


Figure 17 : Voies de dégradation de la PGE2. La PGE2 est dégradée par la 15-PGDH en 15-kétoPGE2, elle-même dégradée en 15-kéto-13,14-dihydroPG par la 13-PGR. Parallèlement à cette dégradation enzymatique, la PGE2 est spontanément déshydratée en PGA2. Par la suite, la PGA2 peut être déshydratée en 15-déoxy Δ 13-15-PGA2, ou être transformée en PGB2 par isomérisation.

13-PGR : Δ 13-15-ketoprostaglandine réductase ; 15-PGDH : 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase ; PGA2/B2/E2 : prostaglandine A2/B2/E2

II.4 Transport de la PGE2

Des travaux réalisés sur des œufs de Xénope ont montré que les PG peuvent diffuser au travers des membranes cellulaires (Baroody and Bito, 1981). L'électronégativité du milieu intracellulaire et la forme principalement anionique de la PGE2 favoriseraient son passage vers le milieu extracellulaire. Les PG peuvent également diffuser à travers des jonctions serrées, mais à un taux très faible (Schuster, 2002). Parallèlement, des travaux ont été menés pour rechercher d'éventuels transporteurs spécifiques des PG. Les premiers transporteurs des PG (PGT) ont été découverts en 1995 chez le rat (Kanai et al., 1995). Il s'agit d'échangeurs d'anions/lactate capables de transporter activement les molécules de la famille des PG à l'exception du TXA2. Le flux de lactate étant généralement dirigé vers le milieu extracellulaire, les PGT transporteraiement majoritairement les PG sous forme anionique vers le milieu intracellulaire, en échange d'une molécule de lactate (Schuster et al., 2015). Ces transporteurs sont indispensables à la dégradation des PGE2 (Kochel and Fulton, 2015). Ceci implique également que le transport des PG serait en parti dépendant des taux de lactate et de la glycolyse (Schuster, 2002). Ces transporteurs sont exprimés dans de très nombreux organes, tel que les reins, le foie, l'estomac, le cerveau, les gonades et les intestins (Schuster, 1998 ; Schuster, 2002).

Les PGT ne sont cependant pas les seuls transporteurs des PG. Les transporteurs de la famille des « multispecific anion transporter » peuvent également transporter les PG en échange d'alpha kéto-glutarate. Cependant, cette capacité de transport reste à confirmer chez l'humain (Schuster, 2002). Ils participent essentiellement à l'influx des PG, tous comme les PGT.

Enfin, les multidrug-resistant protein (MRP) constituent la dernière famille de transporteurs identifiée comme étant capable de transporter les eicosanoïdes. Il existe plusieurs isoformes de MRP, et parmi celles-ci, seule MRP4 semble spécifique des PGE1/2. De façon intéressante, MRP4 assure leur transport vers le milieu extracellulaire, contrairement aux autres transporteurs décrits ci-dessus (Reid et al., 2003).

II.5 Voies de signalisation

La classification des récepteurs des prostanoïdes en 5 classes différentes (DP, EP, IP, FP, TP) fut proposée en 1982 par Kennedy et collaborateurs (Kennedy et al., 1982). La PGE2 se fixe sur les récepteurs aux prostanoïdes E (EP) qui sont divisés en 4 types (EP1, EP2, EP3, et EP4). Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires liés à des protéines G et diffèrent de par leurs voies de signalisation intracellulaires (**Figure 18**). Le nombre de ces récepteurs expliquent les larges effets des PGE2. Les récepteurs EP sont exprimés dans une large variété de tissus (cf. tableau 1).

II.5.1 EP1

Lors de sa proposition de classification des récepteurs des prostanoïdes, Kennedy observa qu'une partie seulement des récepteurs aux PGE sont bloqués par l'inhibiteur SC-1920 (Kennedy et al., 1982). Les récepteurs bloqués par SC-1920 furent appelés EP1, tandis que les autres furent appelés EP2. Plus tard, des travaux sur la trachée de cochon d'inde, montrèrent qu'EP1 est impliqué dans la constriction des muscles lisses (Coleman and Kennedy, 1985). L'ADNc humain fut cloné en 1993 (Funk et al., 1993). EP1 est couplé à une protéine Gq, et la fixation de la PGE2 sur EP1 entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC), qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol trisphosphate (IP3 ; Dey et al., 2006). Par la suite, l'augmentation d'IP3 entraîne la libération de calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique (RE).

II.5.2 EP2

Après la mise en évidence d'EP2 par Kennedy (Kennedy et al., 1982), des travaux complémentaires ont montré qu'à l'inverse d'EP1, EP2 entraîne la relaxation des muscles lisses de trachée de porc et de veines jugulaires de lapin (Lawrence and Jones, 1992). EP2 est couplé à une protéine Gs, et sa liaison avec la PGE2 entraîne l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui catalyse la transformation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce dernier activant la protéine kinase A (PKA) (Dey et al., 2006 ; Markovič et al., 2017).

II.5.3 EP3

Le récepteur EP3 est exprimé dans de très nombreux tissus, et se distingue des autres récepteurs par l'existence de plusieurs isoformes obtenues par épissage alternatif. Chez l'humain, il existe au moins 8 variants différents, alors que chez la souris, 3 variants nommés α , β et γ , ont été identifiés (Irie et al., 1993 ; Sugimoto et al., 1993). Ces isoformes diffèrent seulement de par leurs extrémités C-terminales. EP3 α et EP3 β interagissent tous les deux avec une protéine G α i inhibant l'activité de l'AC. Quant à l'isoforme EP3 γ , elle peut être couplée à une protéine G α i ou à une protéine G α s, activant l'AC. Une autre différence entre les variants d'EP3 est que l'inhibition de la production d'AMPc induite par EP3 α et EP3 γ est agoniste-indépendante, alors que celle d'EP3 β est agoniste-dépendant (Hasegawa et al., 1996 ; Negishi et al., 1996). Enfin, les isoformes EP3 α et EP3 β peuvent également être couplés à une protéine G12/13, activant la GTPase Rho (Hatae et al., 2002).

II.5.4 EP4

Tout comme EP2, EP4 entraîne l'augmentation de la production d'AMPc via l'activation d'une protéine G α s. Cependant, il existe plusieurs différences notables entre EP2 et EP4. En effet, dans des conditions d'expression similaires, la production d'AMPc intracellulaire induite par EP4 est plus faible que celle induite par EP2 (Fujino et al., 2003). En plus de la production d'AMPc, EP4 est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation de la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K ; Fujino et al., 2005).

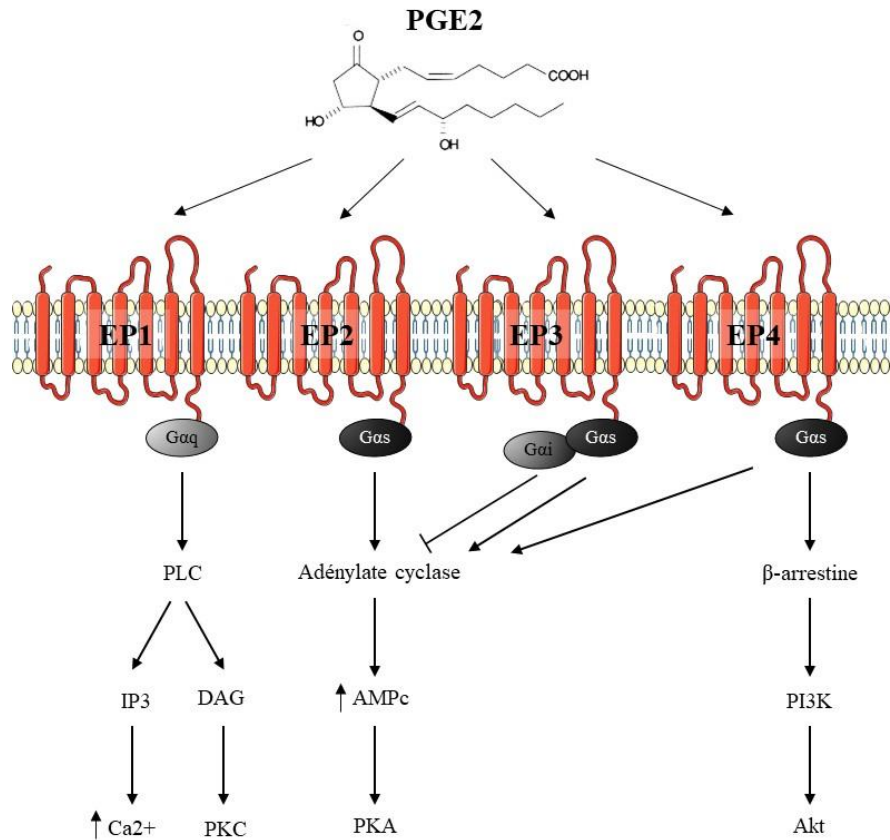


Figure 18: Voies de signalisation de la PGE2. La PGE2 est un médiateur lipidique dont les effets biologiques sont médiés par 4 récepteurs couplés aux protéines G, nommés EP1, EP2, EP3 et EP4. EP1 est couplé à une protéine Gq, EP2 et EP4 à une protéine Gas, et EP3 à une protéine Gai. A noter qu'EP3 possède 3 variants (α , β , γ) chez la souris, et qu'en fonction de ce variant, EP3 peut être couplé à une protéine Gas (EP3 γ). La fixation de la PGE2 sur EP1 induit l'activation de la PLC responsables du clivage du PIP2 en IP3 et en DAG, entraînant respectivement l'augmentation de calcium intracellulaire et l'activation de la PKC. EP2 et EP4 activent tous les deux l'AC, responsable de la production d'AMPc. Une fois produit, l'AMPc active la PKA. EP4 est également capable d'activer la voie Akt/ β -caténine. Enfin, EP3 inhibe ou active l'AC en fonction de la protéine G à laquelle il est couplé. A noter que dans la plupart des cas, EP3 est associé à une inhibition de l'AC.

AMPc : AMP cyclique ; DAG : diacylglycérol ; IP3 : inositol-1,4,5-trisphosphate ; PGE2 : prostaglandine E2 ; PI3K : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase ; PIP2 : phosphatidyl-inositol 4,5 ; PKA/C : phospho kinase A/C. PLC : phospholipase C.

II.6 PGE2 et inflammation

Si les prostanoïdes dans leur ensemble participent aux mécanismes inflammatoires, la PGE2 joue un rôle prépondérant. En effet, la PGE2 est le prostanoïde le plus abondant chez l'humain et le rongeur dans la plupart des tissus. De plus, de tous les prostanoïdes, la PGE2 est le représentant qui possède le plus de récepteurs, et dont les effets sont les plus diversifiés. Les effets pléiotropiques de la PGE2 sont résumés dans le **Tableau 1**. La PGE2 semble également avoir un rôle plus important dans le développement et le métabolisme du tissu adipeux. Par exemple, elle est la PG la plus exprimée au niveau du tissu adipeux de souris obèses, les autres PG étant présentes à des concentrations trop faibles pour se fixer sur leur récepteurs (Jaworski et al., 2009). Le stroma du tissu adipeux contient de nombreuses cellules pluripotentes qui expriment à leur surface l'ensemble des récepteurs des différentes prostanoïdes. Les récepteurs les plus fortement exprimés sont EP2 et EP3 (Shen et al., 2016). La PGE2 est également la PG exerçant l'effet chémoattractant le plus puissant sur les macrophages du tissu adipeux (Hu et al., 2016). Enfin, comme il le sera expliqué plus en détails dans la suite du manuscrit, la PGE2 intervient dans plusieurs mécanismes qui sont dérégulés au cours de l'obésité. Pour toutes ces raisons, la PGE2 nous apparaît comme étant le meilleur candidat pour faire le lien entre inflammation et obésité, même s'il apparaît évident que le rôle des autres prostanoïdes n'est pas à négliger. C'est pourquoi je focaliserai sur les effets de la PGE2 dans la suite du manuscrit.

Tissu/Cellule	Récepteur	Effet	Article
Astrocytes	- EP	- Induction de NF- κ B	- Wang et al., 2016
Lymphocytes	- EP2/4	- Différenciation des LT _H 1/17	- Yao et al., 2009
Macrophages	- EP4	- Activation M2	- Luan et al., 2015
		- Activation migration	- Hu et al., 2016
Microglie	- EP2	- Potentialise la production de nitrite induit par l'IFN γ , induction de NF- κ B	- Nagano et al., 2017
	- EP3	- Inhibition de la signalisation de l'insuline	- Henkel et al., 2009
Foie	- EP	- Inhibition de la lipolyse et de la production de VLDL. Favorise l'accumulation des TG.	- Henkel et al., 2012
	- EP3	- Inhibition production d'insuline	- Tran et al., 2002
Tissu adipeux	- EP3 α/γ	- Inhibition de la lipolyse	- Xu et al., 2016
	- EP3	- Inhibe la différenciation des pré-adipocytes	- Xu et al., 2016
	- EP4	- Inhibe la différenciation des 3T3-L1	- Tsuboi et al., 2004
	- EP	- Inhibition de MCP1, IL-1 β - Activation de la « brunisation »	- Garcia-Alonso et al., 2016
Vaisseaux sanguins	- EP1	- Stimule l'angiogenèse des cellules endothéliales - Vasoconstriction, stimule l'effet de l'angiotensine	- Zhang et al., 2011 - Guan et al 2007
	- EP2	- Vasodilatation	- Kennedy et al., 1999
	- EP3	- Vasoconstriction en injection locale et centrale	- Kondo et al., 1979 ; Kobayashi et al., 2011
	- EP4	- Vasodilatation	- Hristovska et al., 2007
Poumons	- EP1	- Bronchoconstriction	- Säfholm et al., 2015
	- EP3	- Progression tumorale - Bronchoconstriction	- Bazzani et al., 2017 - Säfholm et al. 2015
	- EP4	- Inhibition de l'inflammation - Migration des cellules cancéreuses. - Bronchodilatation	- Birrell et al., 2015 - Kim et al., 2010 - Säfholm et al., 2015
Reins	- EP1	- Inhibition de la vasopressine à forte concentration de PGE2 au niveau du segment ascendant	- Liu et al., 2000
	- EP2	- Augmente la réabsorption d'eau au niveau du tube collecteur cortical	- Li et al., 2009
	- EP3	- Inhibition de la réabsorption de l'eau au niveau du tube rénal collecteur - Inhibition de la vasopressine à faible concentration de PGE2 au niveau du segment ascendant	- Tamma et al., 2003 - Liu et al., 2000
Système gastro-intestinal	- EP2	- Relaxation des muscles circulaires du colon	- Martinez-Cutillas et al., 2014
	- EP3	- Stimule la sécrétion du mucus intestinal	- Takeuchi et al., 2010
	- EP4	- Réparation de l'épithélium intestinal - Stimule la sécrétion du mucus intestinal - Relaxation des muscles circulaires du colon	- Miyoshi et al., 2017 - Takeuchi, 2010 - Martinez-Cutillas et al., 2014

Tableau 1 : Effets pléiotropiques de la PGE2.

CCL2 : chémokine (C-C motif) ligand 2 ; IFN- γ : interféron- γ ; IL-1 β : interleukin-1 β ; LT_H1/17 : lymphocytes T helper 1/17 ; NF- κ B : nuclear factor- κ B ; PGE2 : prostaglandine E2 ; TA : tissu adipeux

II.6.1 PGE2 et réaction de phase aiguë

L'injection de LPS chez le rongeur peut activer le système immunitaire en se fixant sur les TLR (Anderson, 2000). La production de la PGE2 est augmentée de façon précoce après l'injection de LPS, à la fois au niveau périphérique (Ivanov et al., 2002), et central (Sehic et al., 1996), où elle participe à la régulation de tous les symptômes majeurs de la réaction de phase aiguë, décrits ci-après.

II.6.1.a Fièvre

De nombreuses études montrent que l'administration centrale de PGE2 est capable d'induire la fièvre chez le rongeur (Oka et al., 1997 ; Ushikubi et al., 1998). Ainsi, des souris transgéniques mPGES-1^{-/-} ne présentent pas de fièvre suite à l'injection périphérique de LPS, contrairement aux souris contrôles (Engblom et al., 2003). Cet effet semble être relayé par son récepteur EP3, puisque des souris EP3^{-/-} ne développent pas de fièvre à la suite d'une injection de PGE2, au contraire des souris EP1^{-/-} et EP2^{-/-} (Ushikubi et al., 1998). A noter que l'étude n'a pu être réalisée sur les souris EP4^{-/-}, puisque ce modèle présente une forte mortalité néonatale. De plus, ces souris EP3^{-/-} ne présentent pas non plus d'augmentation de la température corporelle après l'injection de LPS, et ce, malgré la production d'IL-1 β et d'IL-6 par leurs macrophages. Cependant, des travaux d'Oka et collaborateurs menés chez le rat montrent qu'EP1 pourrait également jouer un rôle dans l'induction de la fièvre. Son inhibition par l'injection d'antagonistes au niveau des ventricules latéraux, bloque l'augmentation de la température rectale induite par l'administration centrale de PGE2 (Oka et al., 1997). L'application de PGE2 sur des tranches de cerveau de rats inhibe le taux d'activation de neurones « warm-sensitive » au niveau de l'aire pré-optique ventromédiale de l'hypothalamus et de l'organe vasculaire de la lame terminale (Matsuda et al., 1992 ; Ranelis and Griffin, 2003), régions connues pour jouer un rôle dans l'induction de la fièvre (Oka, 2004).

II.6.1.b Hyperalgésie

La PGE2 est également un médiateur bien connu de la douleur. De nombreuses études montrent que l'injection plantaire de PGE2 induit une augmentation de l'hyperalgésie chez le rongeur (mesuré par la vitesse de retrait de la patte suite à un stimulus mécanique) comparé à l'injection de véhicule (Khasar et al., 2008 ; St-Jacques and Ma, 2014 ; Pinho-Ribeiro et al., 2016). Les récepteurs EP1 et EP4 semblent jouer un rôle important dans la médiation de la douleur liée à l'inflammation. Pour preuve, des antagonistes d'EP1 et d'EP4 bloquent l'induction de la

douleur induite par la PGE2 (Khasar et al., 1995 ; St-Jacques and Ma, 2014). L'hyperalgésie induite par la PGE2 est également bloquée lorsqu'elle est co-injectée avec des inhibiteurs de la PKA ou de la PKC ϵ (St-Jacques and Ma, 2014). D'autres études soulignent également l'importance d'EP1 et d'EP4 dans ce mécanisme (Lin et al., 2006 ; Clark et al., 2008 ; St-Jacques and Ma, 2014). Cependant, la PGE2 n'est pas la seule PG à jouer un rôle important dans l'induction de l'hyperalgésie (Murata et al., 1997). En effet, la co-inhibition PGE2/PGI2 chez le rat est plus efficace que l'inhibition d'une seule des deux PG, pour diminuer la douleur induite par l'injection d'adjuvant au niveau de la patte (Sugita et al., 2016).

II.6.1.c Tuméfaction

La PGE2 est impliquée dans l'apparition des rougeurs et œdèmes induits lors de la phase aiguë de l'inflammation (Funk, 2001). Chez la souris, ces effets sont médiés par les récepteurs EP2 et EP4, puisque les administrations locales de PGE2, d'agonistes d'EP2 et d'EP4, induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire, de la vasodilatation des vaisseaux sanguins et du flux sanguin (Omori et al., 2014). En revanche, ces effets ne sont pas observés lors d'administration locale d'agonistes d'EP1 et d'EP3. Au contraire, l'agoniste EP3 provoque une diminution de la perméabilité de la barrière endothéliale (Omori et al., 2014). D'autres travaux ont confirmé le rôle vasodilatateur des récepteurs EP2 et EP4 (Kennedy et al., 1999 ; Hristovska et al., 2007), ainsi que le rôle vasoconstricteur d'EP1 et EP3. Ces derniers agiraient en synergie avec l'angiotensine II pour induire la contraction vasculaire (Guan et al., 2007 ; Kraemer et al., 2016).

II.6.1.d Anorexie inflammatoire

Lors d'une inflammation aiguë, une réduction de la prise alimentaire est observée à la fois chez l'humain et l'animal. Elle permet de rediriger l'énergie impliquée dans la digestion et l'activité liée à la recherche de nourriture, vers la défense contre les infections et les blessures (Exton, 1997). Elle permet également une diminution de la disponibilité des nutriments nécessaires à la multiplication bactérienne (Weinberg, 1984). L'anorexie inflammatoire observée chez des souris suite à l'injection de LPS ou d'IL1- β est abolie chez des souris invalidées pour le gène de la mPGES-1 (Pecchi et al., 2006 ; Elander et al., 2007), démontrant le rôle indispensable de cette enzyme et de son produit de synthèse dans ce mécanisme.

II.6.2 mPGES-1 : un médiateur de l'inflammation

II.6.2.a Effets pro-inflammatoires

Comme il a été décrit précédemment, la production de la PGE2 peut être induite par des signaux pro-inflammatoires, mais en retour elle peut être à l'origine de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, l'ajout de PGE2 *in vitro* entraîne l'induction de l'expression de l'IFN γ au niveau de la microglie (Nagano et al., 2017), et d'astrocytes (Wang et al., 2016). Ces effets pourraient s'expliquer par l'activation du facteur de transcription NF- κ B. *In vitro*, la PGE2 induit l'expression de NF- κ B au niveau de chondrocytes (Wang et al., 2010), d'astrocytes (Wang et al., 2016), de macrophages (Lee et al., 2013), d'adipocytes (Chan et al., 2016) et de la microglie (Nagano et al., 2017). NF- κ B est un hétérodimère composé des sous-unités p50 et p60, qui sont circonscrites dans le cytoplasme par l'inhibiteur I κ B. Lors d'un stimulus pro-inflammatoire, I κ B est phosphorylé puis dégradé, ce qui permet la libération de NF- κ B et sa translocation au noyau où il peut induire l'expression de gènes cibles tels que COX2, TNF- α et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS ; Huang et al., 2003). L'inflammation ne se résume pas qu'à l'activation des cellules pro-inflammatoires, mais implique aussi leur recrutement sur le site de l'inflammation. La PGE2 participe à ce processus en exerçant un chimiotaxisme sur les macrophages, qui s'avère être plus important que celui exercé par les AGL (Hu et al., 2016).

La mPGES-1 et la PGE2 interviennent dans le développement de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes (**Figure 19**), et leurs inhibitions constituent des cibles thérapeutiques privilégiées. Les maladies auto-immunes sont caractérisés par une forte activation des L_{TH1} et L_{TH17} (Damsker et al., 2010). Même s'il n'est pas question ici de faire une revue détaillée des rôles et de la régulation des différents lymphocytes, il est important de noter que les L_{TH1} sont impliqués dans la défense contre les agents pathogènes intracellulaire, notamment en recrutant et en activant les macrophages, les neutrophiles, et les L_{Tc} sur le site de l'inflammation. Les L_{TH17}, découverts plus récemment, permettent de recruter les monocytes et les neutrophiles sur le site de l'inflammation, et sont fortement impliqués dans les pathologies auto-immunes (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). Parmi celles-ci figure l'encéphalomyélite auto-immune induite (ou sclérose en plaques), où il a été montré que la PGE2 est la seule PG dont l'expression est augmentée au niveau de cellules de la moelle épinière, l'expression des autres PG étant diminuée (Kihara et al., 2009). De plus, lors de l'induction de la sclérose en plaques par l'injection d'un peptide de la glycoprotéine de myéline d'oligodendrocytes, des souris mPGES-1^{-/-} développent des symptômes beaucoup moins

sévères que les souris mPGES-1^{+/+}, et sont caractérisées par une diminution importante de la production d'INF- γ et d'IL-17 au niveau des ganglions lymphatiques, respectivement marqueur des L_TH1 et des L_TH17. La production excessive de PGE2 serait assurée par la microglie et les cellules dendritiques, et exercerait ses effets sur les L_TH1 et L_TH17 *via* les récepteurs EP1, EP2 et EP4 (Kihara et al., 2009). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes nécessaires à la réponse immunitaire, et peuvent activer les L_TH, les L_Tc et les lymphocytes B. Conformément à ces résultats, d'autres travaux ont montré que la fixation de la PGE2 sur ses récepteurs EP2 et EP4, active la différenciation des L_TH0 en L_TH1/17 (Nagamachi et al., 2007 ; Yao et al., 2009).

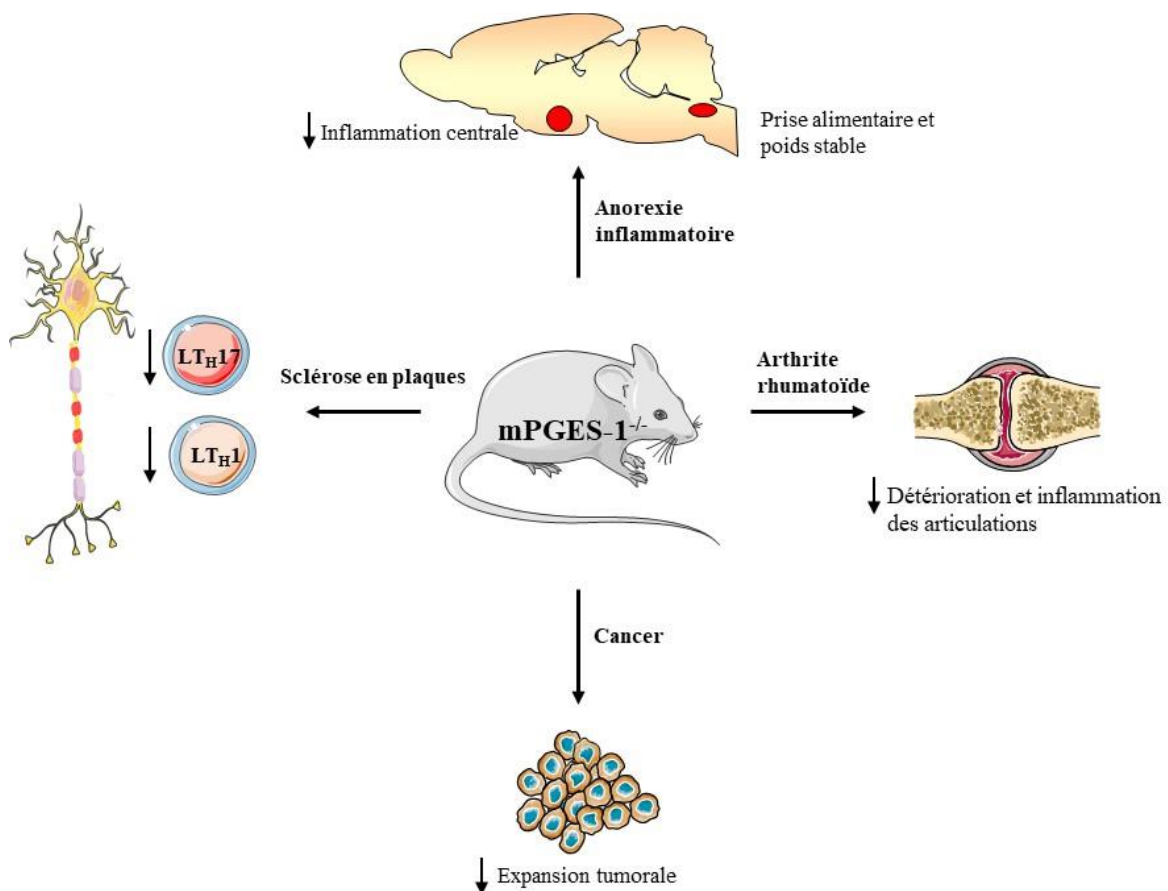


Figure 19 : Le modèle murin mPGES-1^{-/-} et maladies inflammatoires. L'invalidation de la mPGES-1 dans un modèle transgénique murin a permis de montrer que la mPGES-1 est impliquée dans le développement de maladies inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, l'anorexie inflammatoire, et certains cancers.

mPGES-1 : microsomale prostaglandine synthase-1 ; L_TH1/17 : lymphocyte T helper 1/17

Les rôles de la mPGES-1 et de la PGE2 ont également été largement décrits dans le développement l'arthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune affectant les articulations

synoviales. La PGE2 est en effet fortement sécrétée au niveau du fluide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Egg et al., 1980). Encore une fois, le modèle murin mPGES-1^{-/-} se montre d'une importance particulière, puisqu'il est protégé contre le développement de l'arthrite rhumatoïde induite par l'injection de collagène de type 2 (Trebino et al., 2003). La production excessive de PGE2 au niveau du fluide synovial favoriserait l'activation des cellules dendritiques via les récepteurs EP2 et EP4, et orienterait la réponse immunitaire vers une activation des LT_H17 (Jia et al., 2014)

La PGE2 et la mPGES-1 font également l'objet d'un nombre croissant de travaux dans la cancérogénèse. Même si l'ensemble des prostanoïdes sont impliqués dans ce processus, la PGE2 semble jouer un rôle centrale et déterminant (Wang and DuBois, 2010). Il a notamment été montré que la PGE2 améliore la survie et le pouvoir invasif de cellules cancéreuses pancréatiques (Ito et al., 2004), colorectales (Poligone and Baldwin, 2001) et pulmonaires (Yang et al., 2006). De plus, la PGE2 possède un effet pro-angiogénique qui favorise l'expansion tumorale, mais il semble que le récepteur impliqué dépend du type de cancer considéré (Spinella et al., 2004 ; Finetti et al., 2008 ; Zhang and Daaka, 2011). En accord avec ces résultats, il a été montré que des souris mPGES-1^{-/-} sont caractérisées par une croissance tumorale moindre et une diminution des signes de douleurs (Isono et al., 2011 ; Olesch et al., 2015).

L'expression de la mPGES-1, et non des autres PGES, est significativement augmentée au niveau d'artères cérébrales après l'induction d'un anévrisme chez le rat (Aoki et al., 2011). De la même façon, l'expression de COX2, et non de COX1, est augmentée de façon significative dans cette pathologie. Les souris mPGES-1^{-/-} sont résistantes à la formation d'anévrisme aortique induit par l'angiotensine, en raison d'une diminution du stress oxydatif au niveau de la paroi aortique (Wang et al., 2008). En accord avec ces résultats, l'inhibition pharmacologique de COX2 et l'invalidation du récepteur EP2 permettent de diminuer la formation d'anévrisme. De plus, des rats EP2^{-/-} présentent une diminution de l'expression de NF-κB, d'iNOS et de CCL2 au niveau des parois vasculaires touchées par l'anévrisme (Aoki et al., 2011). Les mêmes résultats sont également observés sur des cellules endothéliales humaines dont l'expression du récepteur EP2 est inhibée à l'aide de siRNA. Dans cette pathologie, il semble donc que l'axe mPGES-1/PGE2/EP2 soit impliqué dans l'activation de NF-κB au niveau de cellules endothéliales, induisant ainsi la production de CCL2 et l'infiltration des macrophages.

II.6.2.b Effets anti-inflammatoires

Cependant, l'action de la PGE2 est plus complexe qu'il n'y paraît, puisque qu'elle est également impliquée dans la résolution de l'inflammation (**Figure 20**). Pour preuves, l'incubation de macrophages avec des PGE2 augmente l'expression de marqueurs de macrophages M2 *via* la voie AMPc/CREB (Luan et al., 2015). Le chimiotaxisme de la PGE2 sur les macrophages peut alors favoriser l'induction d'une réponse anti-inflammatoire. De façon intéressante, ce rôle dans la polarisation des macrophages constituerait un mécanisme d'échappement des tumeurs au système immunitaire (Rong et al., 2016). Si l'effet immuno-activateur de la PGE2 sur les lymphocytes T est très bien décrit dans la littérature, il n'en reste pas moins qu'il existe de nombreuses données contradictoires. D'excellentes revues décrivent cette ambivalence de la PGE2, et il en ressort que sa concentration, le stade de l'inflammation, l'expression des différents récepteurs EP et des voies de signalisation associées, sont capitales pour déterminer le rôle de la PGE2 dans ces cellules (Kalinski, 2012 ; Sreeramkumar et al., 2012). De la même manière que pour les lymphocytes T, l'effet de la PGE2 sur les cellules dendritiques est plus contrasté. Il semblerait son action dépend du stade de différenciation des cellules dendritiques (De Keijzer et al., 2013). Tandis que la PGE2 activerait leurs différentes fonctions, à savoir la migration, la présentation d'antigènes, et l'activation des lymphocytes T, elle inhiberait également leur différenciation à des stades plus précoces (Spaggiari et al., 2009).

Des travaux utilisant des souris mPGES-1^{-/-} ont montré que l'inhibition de la mPGES-1 inhibe le développement de l'arthrite induite par injection de collagène (Kojima et al., 2008), notamment en inhibant la production d'auto-anticorps anti-collagène. De façon intéressante, les auteurs ont voulu outrepasser cet effet sur la production d'anticorps, en injectant directement des anticorps anti-collagène à des souris mPGES-1^{-/-}. Cela a abouti à des résultats inverses sur le développement de l'arthrite (Frolov et al., 2013), à savoir, une augmentation du score de l'arthrite et une augmentation de l'infiltration des neutrophiles au niveau articulaire. Ces résultats suggèrent un effet inhibiteur de la PGE2 sur les neutrophiles, qui n'était pas visible dans le 1^{er} modèle d'arthrite car masqué par des effets pro-inflammatoires plus importants. Ces études mettent en lumière que les effets pro- et anti-inflammatoires de la PGE2 peuvent être concomitants, et que le résultat observé est en réalité la résultante de ces deux effets.

Une autre clé dans la compréhension du rôle de la PGE2 dans l'inflammation, se situe dans l'étude des métabolites de la PGE2. En effet, les propriétés anti-inflammatoires des PG proviennent en partie de leurs métabolites, en particulier ceux de la PGD2 et de la PGJ2. Ces molécules ont la capacité d'activer le facteur de transcription PPAR γ , inhibant ainsi la voie

de signalisation NF- κ B et la production de médiateurs pro-inflammatoire comme IL-1 β , TNF- α et iNOS (Lawrence et al., 2002). Des résultats similaires ont été observés avec la PGA2, un métabolite de la PGE2 qui inhibe directement la kinase IKK, empêchant ainsi la libération de NF- κ B (Rossi et al., 2000) et d'iNOS (Storer et al., 2005) au niveau de la microglie et des astrocytes. De ce fait, la dégradation spontanée de la PGE2 en métabolites aux propriétés anti-inflammatoires favoriserait la résolution de l'inflammation, et constituerait un rétrocontrôle négatif. Une récente étude montre que les cyclopentenones-PG ont un effet ténu sur l'inhibition de la prolifération astrocytaires et microgliales quand elles agissent seuls, mais présentent un effet plus significatif lorsqu'elles agissent de façon combinée (Chistyakov et al., 2018). A noter que la PGA2 a été décrite comme pouvant stimuler la différenciation et la maturation de cellules dendritiques humaines *in vitro* (Thurnher et al., 2005), suggérant un rôle pro-inflammatoire potentiel de cette molécule. La PGE2 régule également l'expression d'autres membres de la famille des eicosanoïdes. En effet, l'augmentation de la production de PGE2 lors de la réaction inflammatoire induite par le TNF- α (Levy et al., 2001) contribue d'une part, à l'inhibition de la production de leucotriènes B4 (Levy et al., 2001) qui sont impliqués dans l'activation des neutrophiles (Borgeat and Naccache, 1990); et d'autre part, à la stimulation de la production de la lipoxine A4 qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Kieran et al., 2004; Chan and Moore, 2010).

La mort cellulaire peut entraîner un relargage dans le milieu extracellulaire de composants intracellulaires appelés « damage-associated molecular patterns » (DAMP). Ces molécules sont normalement masquées au sein de la cellule saine, mais sont passivement relarguées ou activement exposées par les cellules nécrotiques. Elles permettent ainsi l'activation d'une réponse inflammatoire nécessaire à la réparation tissulaire. La liste croissante de ces molécules comprend entre autres, les « heat-shock protein », l'adénosine triphosphate, l'acide urique et les AGL (Garg et al., 2015). Il existe un lien entre DAMP et obésité, puisque le relargage de DAMP lors de la mort d'adipocytes d'individus obèses peut contribuer à l'inflammation du tissu adipeux (Sun et al., 2012). Cependant, comme dans tout processus inflammatoire physiologique, il existe des mécanismes de contre-régulation. En effet, la PGE2 est relarguée de façon importante par des cellules nécrotiques, et inhibe la sécrétion de TNF- α induite par les DAMP chez une lignée de macrophage RAW 264.7 (Hangai et al., 2016).

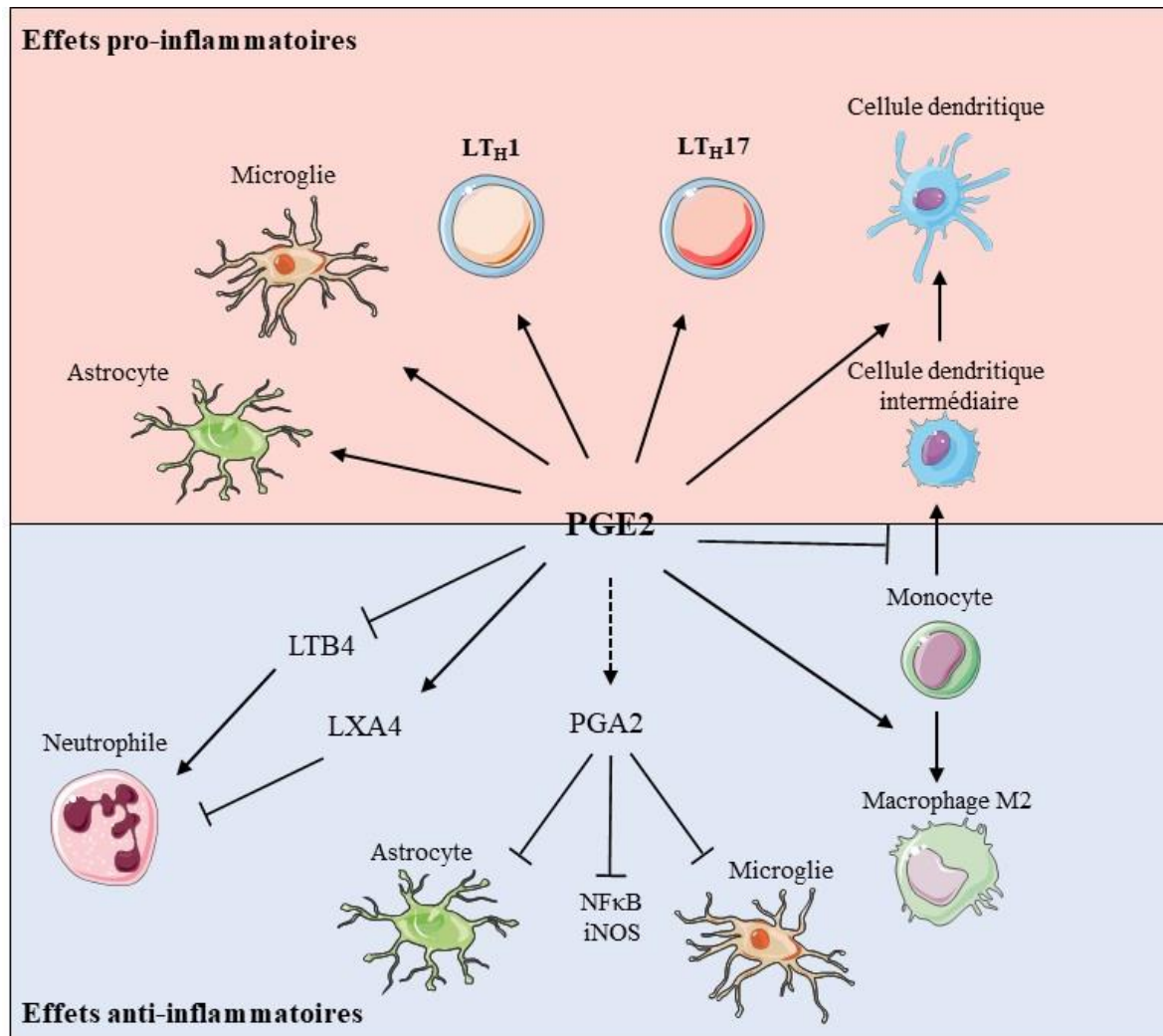


Figure 20 : La PGE2 et les cellules de l'immunité. La PGE2 est un médiateur de l'inflammation qui possède des propriétés pro-inflammatoires, notamment en activant directement les L_{TH}1, les L_{TH}17, la microglie et la différenciation des cellules dendritiques intermédiaires en cellules dendritiques matures. Cependant, son rôle est plus complexe puisqu'elle possède également des propriétés anti-inflammatoires en orientant la polarisation des macrophages en macrophages M2. Ses effets anti-inflammatoires peuvent être également médiés de façon indirecte. En effet, la PGE2 se dégrade spontanément en PGA2, une cyclopenténone capable d'inhiber le développement astrocytaire et microgliale *via* l'inhibition de la voie NF-κB. Enfin, la PGE2 entraîne l'activation de LTB4 et de LXA4, inhibant ainsi l'activité des neutrophiles.

LXA4 : lipoxine A4 ; LTB4 : leucotriène B4 ; L_{TH} 1/17 : lymphocytes T helper 1/17 ; NF-κB : nuclear factor-κB ; PGE2 : prostaglandine E2

II.7 PGE2 et mécanismes liés à l'obésité

II.7.1 Inflammation du tissu adipeux

Comme il a été décrit précédemment, la PGE2 est induite dans des conditions inflammatoires, et voit son expression augmentée dans plusieurs pathologies inflammatoires. L'obésité étant aujourd'hui considérée comme une maladie inflammatoire, les travaux de la littérature se sont attachés à étudier la régulation de la production de la PGE2 dans un contexte d'obésité. Il a

ainsi été montré que des rats rendus obèses à l'aide d'une alimentation riche en sucres et en graisses, présentent une augmentation significative de la production de la PGE2 au niveau du sérum et du tissu adipeux blanc, en comparaison avec des rats contrôles (Iyer et al., 2012). De plus, chez l'humain, la production de PGE2 est augmentée au sein du tissu adipeux blanc d'individus obèses (García-Alonso et al., 2016). De façon intéressante, un traitement à la PGE2 d'explants de tissu adipeux d'individus obèses entraîne une forte diminution des marqueurs pro-inflammatoires (MCP1, IL-6) et des marqueurs de la fibrose (TGF- β , collagène α 1 ; García-Alonso et al., 2016). Dans ce cas précis, il semble que l'augmentation de la production de la PGE2 vise à enrayer l'inflammation et la fibrose du tissu adipeux, sans toutefois y parvenir. Il y a fort à parier que d'autres signaux pro-inflammatoires viennent masquer les effets anti-inflammatoires de la PGE2. Cet effet anti-inflammatoire de la PGE2 passerait probablement par sa capacité à orienter la polarisation des macrophages en macrophages M2 *via* son récepteur EP4 (Luan et al., 2015). De plus, des souris EP4^{-/-} présentent une augmentation significative de l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux blanc à l'issue d'un régime gras, et le traitement avec un agoniste d'EP4 limite son inflammation *in vivo* (Tang et al., 2015).

La PGE2 semble également être impliquée dans la production de la leptine. En effet, un traitement à la PGE2 stimule la production de leptine d'explants de tissu adipeux sous-cutané d'humains obèses (Fain et al., 2001). Cependant, l'inactivation du récepteur EP3 chez la souris engendre une augmentation importante et significative des taux de leptine plasmatique par rapport aux souris EP3^{+/+} après 20 semaines de régime gras (Ceddia et al., 2016). Ces résultats suggèrent que le récepteur EP3 contribue à l'inhibition de la production de la leptine. Cependant, à la vue des résultats obtenus par Fain et al., il est possible que les récepteurs EP2 et/ou EP4, qui ont une action antagoniste à EP3, aient également un rôle à jouer dans la régulation de la leptine. En plus d'être caractérisées par une forte augmentation du taux de leptine après un régime gras, les souris EP3^{-/-} développent spontanément un phénotype obèse et une forte inflammation du tissu adipeux blanc (Xu et al., 2016a). Il se pourrait donc que le récepteur EP3 contribue à diminuer l'inflammation et le dysfonctionnement du tissu adipeux liée à l'obésité, contribuant de façon indirecte à la diminution de la production de leptine.

II.7.2 Lipolyse

En, 1963, des travaux menés sur des explants de tissu adipeux épидидymal (TAE) de rats, ont montré que la PGE1 et la PGE2 inhibent la lipolyse induite par la noradrénaline (diminution de la libération de glycérol et d'acide gras libres), illustrant pour la première fois l'effet antilipolytique des PGE (Steinberg et al., 1963). Parmi les PG, la PGE1 est celle qui montre l'effet antilipolytique le plus efficace (Steinberg, 1967). Cependant, l'effet antilipolytique de la PGE2 a lui aussi été exploré. Il repose sur l'inhibition de l'AC chez l'humain et le rat (Richelsen et al., 1984 ; Richelsen and Pedersen, 1987), et sur le fait que la PGE2 est libérée par des adipocytes en réponse à des agents lipolytiques (Shaw et al., 1968). La PGE2 interviendrait donc dans une boucle de rétro-contrôle négatif afin d'assurer l'homéostasie lipidique. Cette inhibition de l'AC suggère fortement l'implication d'EP3 dans la régulation de la lipolyse par les PGE2, ce qui fut démontrée par la suite (Strong et al., 1992 ; Ceddia et al., 2016). Toutefois de façon contre-intuitive, une lipolyse accrue au niveau du tissu adipeux blanc est souvent associée à un phénotype obèse. C'est le cas de souris EP3^{-/-} qui présentent une lipolyse augmentée, mais qui développent une obésité spontanée sous régime standard (Xu et al., 2016). Le phénotype obèse des souris EP3^{-/-} est également plus sévère que celui de souris EP3^{+/+} après 20 semaines d'un régime enrichi en graisses (Ceddia et al., 2016). De plus, la résistance à l'insuline, le poids corporel, la masse adipeuse, l'infiltration des macrophages et la nécrose au niveau du TAE des souris EP3^{-/-} sont significativement augmentés par rapport aux souris EP3^{+/+} (Ceddia et al., 2016). En revanche, les effets de l'inactivation du récepteur EP3 sur la prise alimentaire sont moins clairs et différent selon les études. Ceddia et al., (2016) n'observent pas de différence de prise alimentaire, alors que Sanchez-Alavez et al., (2007) observent une augmentation de la prise alimentaire et de l'activité pendant la phase sombre. La différence de régime utilisé entre les deux études peut expliquer ces résultats contradictoires. En accord avec l'ensemble de ces résultats, les taux d'expression d'ARNm et de la protéine EP3 sont significativement diminués chez les souris déficientes pour le récepteur de la leptine (db/db) et les modèles d'obésité induite (Xu et al., 2016a).

Cependant, le rôle exact de la PGE2 dans les mécanismes conduisant à l'obésité n'est pas encore clairement défini. En effet, d'autres travaux apportent un éclairage différent. Par exemple, l'inactivation spécifique de la PLA2 du tissu adipeux (AdPLA2, la phospholipase majoritaire du tissu adipeux) présentent une adiposité moindre, ainsi qu'une résistance à l'obésité par rapport aux souris contrôles (Jaworski et al., 2009). L'inactivation de l'AdPLA2 induit également une diminution de 90% du taux de PGE2, et une augmentation de 50%

d'AMPc au sein du TAE. Cette augmentation d'AMPc semble être due à la diminution de la fixation de la PGE2 sur EP3, puisque EP3 est présent à des taux 10 à 30 fois plus importants que les autres récepteurs EP. Les effets observés ne seraient pas dus non plus aux autres PG puisqu'elles sont présentes à des taux trop faibles pour l'activation de leurs récepteurs. En accord avec ces résultats, l'expression de l'AdPLA2 est significativement augmentée chez des souris rendues obèses à l'aide d'un régime gras (Gaidhu et al., 2010). Contrairement aux travaux de Ceddia et al., la diminution de l'axe PGE2/EP3/AMPc semble être impliquée dans la résistance à l'obésité.

II.7.3 Adipogenèse

La PGE2 est capable d'inhiber la différenciation de pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes matures grâce à son récepteur EP4 et à l'augmentation de la production d'AMPc (Tsuboi et al., 2004), suggérant un effet anti-adipogénique de la PGE2. Parmi les 3 différentes PGES, seule l'inhibition de la mPGES-1 à l'aide de siRNA bloque l'effet anti-adipogénique de la PGE2 sur les pré-adipocytes 3T3-L1 (Fujimori et al., 2012). *In vitro*, la régulation de l'adipogenèse par la PGE2 est donc spécifique de la mPGES-1. Le récepteur EP3 est lui aussi impliqué dans l'effet anti-adipogénique de la PGE2, puisque des antagonistes EP3 facilitent la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1. De plus, des fibroblastes embryonnaires issus de souris EP3^{-/-} ont une capacité de différenciation plus importante par rapport à ceux de souris contrôles EP3^{+/+} (Xu et al., 2016a). Cet effet anti-adipogénique passe par l'inhibition de la production d'AMPc par les variants EP3 α et EP3 γ et non EP β .

II.7.4 tissu adipeux brun et beiges

L'induction de l'expression d'UCP1 au niveau du tissu adipeux blanc au cours d'une exposition au froid est bloquée chez des animaux COX2^{-/-}, et pendant un traitement avec un inhibiteur de COX2 (Madsen et al., 2010). Ces résultats furent confirmés par l'utilisation de souris surexprimant COX2 qui présentent un recrutement accru *de novo* d'adipocytes bruns au sein du tissu adipeux blanc (Vegiopoulos et al., 2010). L'ajout de PGE2 exogène diminue la différenciation de pré-adipocytes blancs en adipocytes beiges, et à l'inverse, augmente leur différenciation en adipocytes bruns matures (García-Alonso et al., 2013). De plus, l'inhibition de la mPGES-1 par siRNA diminue la différenciation de pré-adipocytes blancs en adipocytes beiges (García-Alonso et al., 2013). En accord avec ces résultats, la PGE2 induit

l'augmentation de l'expression d'UCP1 au sein du tissu adipeux beige *via* ses récepteurs EP3 et EP4 (Madsen et al., 2010). Ces travaux suggèrent fortement que la mPGES-1 et la PGE2 sont impliquées dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Cette action de la PGE2 et de la mPGES-1 serait médiée par l'inhibition de l'expression de PPAR γ (García-Alonso and Clària, 2014). Si le mécanisme exact reste à déterminer, il pourrait être dû à la capacité de la PGE2 à augmenter la production d'AMPc, qui est un activateur de la brunisation.

En plus de la brunisation, la PGE2 exerce également son effet sur les neurones warm-sensitives situés au niveau de l'aire préoptique de l'hypothalamus qui expriment le récepteur EP3. L'inhibition des neurones warm-sensitives qui s'en suit entraîne alors l'activation du tissu adipeux brun (Tupone et al., 2014).

II.7.5 Résistance à l'insuline

En 1974, il fut mis en évidence pour la première fois que la PGE2 inhibe la sécrétion d'insuline *in vivo* (Robertson, 1974). En effet, l'infusion de PGE2 (et de PGE1 également) chez le chien anesthésié diminue le taux d'insuline circulant, ainsi que la réponse à l'insuline après une injection de glucose. Par la suite, il a été montré que l'inhibition de COX2 sur des cellules pancréatiques de rats entraîne une chute de leur production de PGE2, et bloque l'effet inhibiteur de l'IL-1 β sur la sécrétion d'insuline (Tran et al., 1999). Cet effet de la PGE2 est médié par son récepteur EP3 puisqu'un traitement avec un agoniste d'EP3 induit une diminution de la sécrétion d'insuline de cellules pancréatiques (Tran et al., 2002). Cependant, un traitement avec un agoniste du récepteur EP4 chez des souris db/db améliore de façon significative la sensibilité à l'insuline (Yasui et al., 2015). Si le récepteur EP3 agit directement sur la production de l'insuline, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline induit par le récepteur EP4 serait due à sa capacité à activer les macrophages M2 et à diminuer l'inflammation du tissu adipeux. Ces résultats soulignent une fois de plus le rôle complexe de la PGE2 qui, même si elle inhibe directement la sécrétion d'insuline, peut avoir l'effet inverse dans un contexte d'obésité en diminuant l'inflammation du tissu adipeux.

La PGE2 n'agit pas seulement sur la sécrétion d'insuline, mais également au niveau de ses organes cibles, le foie en particulier. *In vitro*, la PGE2 inhibe directement la voie de signalisation de l'insuline au niveau d'hépatocytes (Henkel et al., 2009 ; Henkel et al., 2012). Cependant, l'effet de la PGE2 semble plus complexe qu'il n'y paraît, car tout comme l'insuline,

elle favorise l'incorporation de glucose sous forme de TG au niveau des hépatocytes (Henkel et al., 2012).

II.7.6 COX2, prostaglandines et obésité

Comme nous l'avons vu, COX2 est une enzyme qui intervient en amont de la voie de synthèse de la PGE2 (**Figure 16**). Son expression est fortement augmentée lors de maladies inflammatoires chroniques telles que le cancer, l'arthrite, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (Ricciotti and FitzGerald, 2011). De façon intéressante, COX2 semble être impliquée dans l'obésité, qui est associée à une inflammation chronique. Pour preuves, l'expression d'ARNm de COX2 est augmentée au niveau du TAE enflammés de souris obèses (Chan et al., 2016). De plus, des explants de tissu adipeux blanc sous-cutané d'individus obèses présentent une augmentation significative de l'activité de COX2 (Fain et al., 2001). L'expression de COX2 est également augmentée de façon significative au niveau du tissu adipeux mammaire de femmes obèses (Subbaramaiah et al., 2012). En accord avec ces résultats, un traitement avec un inhibiteur de COX2 (celecoxib) améliore la sensibilité à l'insuline, restaure les taux plasmatique de leptine et diminue l'inflammation du TAE de rats obèses (Hsieh et al.). En conséquence, l'inhibition de COX2 pourrait constituer un moyen efficace pour traiter l'inflammation chronique liée à l'obésité. Malheureusement, l'inhibition de COX2 par des composés entraîne de nombreux effets secondaires (Nussmeier et al., 2005). Cela s'explique par le fait que COX2 est impliquée dans la synthèse de nombreuses autres molécules.

Concernant les PG, l'hypothèse de leur possible implication dans l'obésité a été émise au milieu des années 70 (Curtis-Prior, 1975), après qu'il ait été proposé que l'aspirine, qui inhibe la synthèse des PG, protège de l'hypertension artérielle et des infarctus en limitant le surpoids. Un autre argument était qu'en inhibant la lipolyse du tissu adipeux, les PG empêchent la libération d'acides gras, qui au lieu d'être utilisés par l'organisme pour fournir de l'énergie, sont stockés et favorise la prise de poids. Il est même évoqué dès cette époque un intérêt thérapeutique d'inhiber les PG. Depuis ? Malgré la découverte de nouveaux indices qui auraient pu étayer cette thèse (**Figure 21**), force est de constater que le lien entre PGE2 et obésité n'a pas encore été clairement établi, et fait l'objet de peu de recherches.

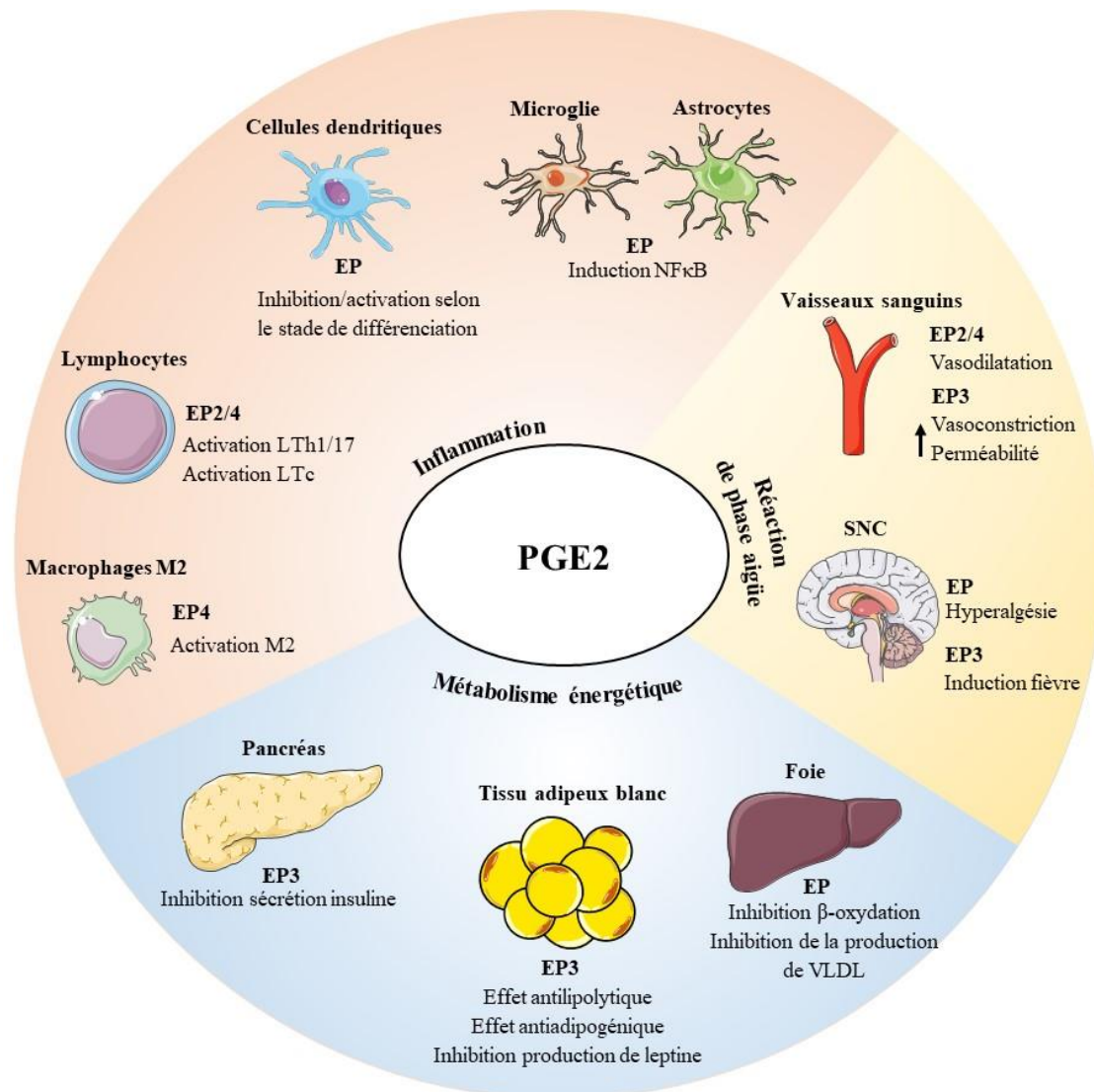


Figure 21 : La PGE2, un lien entre inflammation chronique et obésité ? La PGE2 intervient dans l'ensemble du processus inflammatoire, à savoir : la réaction de phase aigüe, l'inflammation innée et l'inflammation adaptative. En plus de ces rôles, la PGE2 intervient dans la régulation de l'adipogenèse, la sécrétion de l'insuline et le métabolisme hépatique ; des mécanismes dérégulés au cours de l'obésité. De ce fait, la PGE2 pourrait représenter un lien potentiel entre l'inflammation et les troubles métaboliques associés à l'obésité.

NF-κB : nuclear factor- κB ; PGE2 : prostaglandine E2 ; SNC : système nerveux central ; VLDL : very low density protein

II.7.7 Inhibition pharmacologique de la mPGES-1 et modèle mPGES-1^{-/-}

L'attention s'est donc reportée sur les médiateurs dont l'expression est contrôlée par COX2, et en particulier la PGE2. En effet, l'augmentation de l'expression de COX2 dans les maladies inflammatoires chroniques est très souvent accompagnée d'une augmentation de la production de la PGE2. Comme il a été décrit dans le paragraphe II.7.1.a, l'inhibition de la PGE2 constitue un moyen efficace pour diminuer les symptômes des maladies inflammatoires

chroniques. Ce rôle de la PGE2 pourrait sembler contradictoire avec le fait que la PGE2 possède à la fois des propriétés pro- et anti-inflammatoires. Néanmoins, il semble que ses effets pro-inflammatoires priment dans le cadre de ces pathologies.

La mPGES-1 synthétisant de façon spécifique la PGE2 lors de stimuli pro-inflammatoires, des inhibiteurs de la mPGES-1 ont commencé à voir le jour. Si le premier fut décrit en 2001, le développement de ces inhibiteurs est encore très récent et aucun d'entre eux n'est arrivé sur le marché (Psarra et al., 2017). Qui plus est, les inhibiteurs de la mPGES-1 utilisés au stade clinique doivent être les mêmes que ceux utilisés au cours des études pré-cliniques. Or, jusqu'à présent, aucun des inhibiteurs de la mPGES-1 développés n'étaient efficaces à la fois chez le rongeur et chez l'humain (Ding et al., 2018). La toute première étude décrivant une famille d'inhibiteurs remplissant ces conditions n'a été publiée que très récemment, en mars 2018 (Ding et al., 2018). Par conséquent, l'utilisation du modèle transgénique murin mPGES-1^{-/-} revêt d'un intérêt particulier pour étudier le rôle de cette enzyme et de son produit, la PGE2. Si ce modèle a bien été utilisé pour démontrer l'implication de la mPGES-1 dans le cancer (Olesch et al., 2015), l'arthrite (Trebino et al., 2003) et la sclérose en plaques (Kihara et al., 2009) et les modifications de la prise alimentaire en condition inflammatoire (Pecchi et al., 2006), il n'a pas été utilisé pour étudier son rôle éventuel dans le développement de l'obésité.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

La découverte de l'inflammation chronique liée à l'obésité fut une découverte majeure dans la compréhension de cette pathologie. Elle est intimement liée au développement de la maladie et de ses co-morbidités. Si l'inflammation se développe au niveau du système nerveux central et des organes périphériques, l'inflammation du tissu adipeux semble jouer un rôle crucial. En plus d'être le lieu de stockage des lipides, il est capable de sécréter une grande variété d'adipokines régulant l'ensemble des mécanismes impliqués dans le métabolisme énergétique. Son inflammation chronique engendre une lipolyse accrue et une dérégulation de la sécrétion des adipokines, entraînant ainsi une augmentation de la lipotoxicité et une dérégulation du métabolisme énergétique qui impactent l'ensemble de l'organisme. La PGE2 est un médiateur bien connu de l'inflammation, mais intervient également dans la régulation du métabolisme du tissu adipeux. L'étape terminale de la voie de synthèse de la PGE2 est assurée par la mPGES-1 dont l'expression est augmentée dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Cependant, son rôle dans l'obésité reste encore très peu étudié à ce jour. L'ensemble de ces observations nous ont conduit à établir comme hypothèse que la mPGES-1 joue un rôle dans le développement de l'inflammation chronique liée à l'obésité. Pour répondre à cette hypothèse, nous nous sommes fixés comme objectifs de travail :

1) De caractériser l'expression de la mPGES-1 dans un modèle d'obésité induite par un régime gras (la composition des régimes est indiquée en Annexe 1) au sein d'organes périphériques (foie et tissu adipeux), et de structures centrales (hypothalamus et CVD) qui voient leurs fonctions altérées au cours de l'obésité.

2) D'étudier l'impact de l'inactivation de la mPGES-1 chez un modèle de souris transgénique sur le développement de l'obésité induite par régime gras.

3) D'étudier l'impact de l'inactivation de la mPGES-1 chez un modèle de souris transgénique dans la thermogénèse non frissonnante induite par une exposition au froid.

RÉSULTATS

L'invalidation de la microsomale prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) diminue l'inflammation de bas seuil et l'adiposité induite par un régime gras

Invalidation of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) reduces diet-induced low-grade inflammation and adiposity

Pierre Clément, Guillebaud Florent, Airault Coraline, Baril Nathalie, Barbouche Rim, Save Etienne, Stéphanie Rami, Bariohay Bruno, Dallaporta Michel, and Troadec Jean Denis

Frontiers in Physiology (accepté)

INVALIDATION OF MICROSOMAL PROSTAGLANDIN E SYNTHASE-1 (mPGES-1) REDUCES DIET-INDUCED LOW-GRADE INFLAMMATION AND ADIPOSITY.

Pierre Clément^{1&2}, Guillebaud Florent¹, Airault Coraline¹, Baril Nathalie³, Barbouche Rim¹, Save Etienne¹, Stéphanie Rami¹, Bariohay Bruno², Dallaporta Michel¹, Troadec Jean Denis^{1*}

¹ Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Neurosciences Cognitives UMR 7291, Marseille, France

² Biomeostasis CRO, La Penne/Huveaune, France

³ Aix Marseille Université, CNRS, Fédération de Recherche 3C FR 3512, Aix-Marseille Université, Marseille, France

Running title: Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

Number of words: 5702

Number of figures: 9

*** Correspondance:**

Jean-Denis Troadec, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, UMR CNRS 7291, Université Aix-Marseille, Faculté des Sciences et Techniques de St Jérôme, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France. j-d.troadec@univ-amu.fr; Tel: +33 4 91 28 89 48

Keywords: Obesity, High-fat diet, mPGES-1, prostaglandins, PGE2, adipose tissue.

Abstract

Chronic low-grade inflammation is known to be linked to obesity, and to occur in the early stages of the disease. This mechanism is complex and involves numerous organs, cells, and cytokines. In this context, inflammation of white adipose tissue seems to play a key role in the development of obesity. Because of its properties, prostaglandin E2 (PGE2), an emblematic inflammatory mediator, has been proposed as an actor linking inflammation and obesity. Indeed, PGE2 is involved in mechanisms that are dysregulated in obesity such as lipolysis and adipogenesis. Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) is an enzyme which specifically catalyzes the final step of PGE2 biosynthesis. Interestingly, mPGES-1 invalidation dramatically alters the production of PGE2 during inflammation. In the present work, we sought to determine whether mPGES-1 could contribute to inflammation associated with obesity. To this end, we analyzed the energy metabolism of mPGES-1 deficient mice (mPGES-1^{-/-}) and littermate controls, fed with a high-fat diet. Our data showed that mPGES-1^{-/-} mice exhibited resistance to diet-induced obesity when compared to wild-type littermates. mPGES-1^{-/-} mice fed with a high-fat diet, showed a lower body weight gain and a reduced adiposity, which were accompanied by a decrease in adipose tissues inflammation. We also observed an increase in energy expenditures in mPGES-1^{-/-} mice fed with a high-fat diet without any changes in activity and browning process. Altogether, these data suggest that mPGES-1 inhibition may prevent diet-induced obesity.

Introduction

The rapid increase in the worldwide prevalence of the metabolic syndrome, including obesity and diabetes, is a major public health problem for decades (World Health Organization technical report, 2000). Faced with such an epidemic, the therapeutic options remain limited and inefficient, notably because of a lack of a complete understanding of the mechanisms underlying the obesity development (Bariohay et al, 2011). Among these, chronic low-grade inflammation seems to be of particular interest. Indeed, obesity is strongly associated with an increase in pro-inflammatory signals production, including many cytokines and lipid mediators. In the long term, these effectors become deleterious and maladaptive, by creating health impairments, such as dyslipidemia, cardiovascular diseases, and type-2 diabetes (Ferguson et al., 2013). Interestingly chronic low-grade inflammation appears to be instrumental in the development of obesity since inflammation-linked signals can be detected after the first days of high-fat feeding (Thaler et al., 2012; Elgazar-Carmon et al., 2008). In accordance, the blocking of certain signaling systems downstream of these cytokines is able to prevent the appearance of obesity conventionally observed in mice subjected to a high calorie diet (Hotamisligil, 2006; Thaler et al., 2012; Guillemot-Legrin and Muccioli, 2017).

Prostaglandin E2 (PGE2) has been proposed to belong to the many factors contributing to the uncontrolled inflammation observed in obese individuals (González-Pérez and Claria, 2010). PGE2 is a member of the eicosanoid family, which is derived from arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acid and is ubiquitously expressed in mammals (Pecchi et al, 2009). The last step of PGE2 production is catalyzed by three different PGE synthases (PGES). The cytosolic PGES, and the microsomal PGES-2 are constitutively expressed, while the microsomal PGES-1 (mPGES-1) has been shown to catalyze the formation of PGE2 in response to inflammatory cytokines (Pecchi et al, 2009), and is preferentially coupled with cyclo-oxygenase 2 (COX-2). We have contributed with others to show that mPGES-1 is essential for behavioral changes observed during acute or subacute inflammation (Engblom et al., 2003; Pecchi et al., 2006; 2008; 2009). Interestingly, Héту and Riendeau (2007) reported that mPGES-1 expression was downregulated in white adipose tissue (WAT) of obese mice. Emergent data indicates that PGE2 production is modified during obesity but the precise contribution of PGE2 in the development of obesity and associated complications is ambiguous. Indeed, PGE2 was shown to exert an anti-lipolysis effect in humans and mice (Richelsen et al., 1987; Ceddia et al., 2016) and thus proposed to facilitate adipose tissue lipid accumulation. Consistently, many works have considered the contribution of COX-2-derived PGs in obesity development, and evaluated the benefit of pharmacological or genetic COX-2 inhibition on diet-induced obesity (Hsieh et al., 2010; Chan et al., 2016; Rossi et al, 2018). COX-2 and PGE2 receptor-3 (EP3) inhibitors reversed obesity-induced adipose tissues inflammation and obesity-linked complications (Chan et al., 2016). Moreover, loss of PGs production in adipose tissue by deletion of adipocyte phospholipase (AdPLA) was shown to increase lipolysis, and AdPLA^{-/-} mice were shown to be resistant to diet-induced obesity (Jaworski et al., 2009). Otherwise, PGE2 was shown to exert an anti-adipogenic effect *via* its EP3 receptor (Xu et al., 2016). In accordance, EP3^{-/-} mice develop a more robust obese phenotype when fed with a high-fat diet (HFD; Sanchez-Alavez et al., 2007; Ceddia et al., 2016). Surprisingly, the role of mPGES-1 throughout the development of obesity remains poorly studied while mPGES-1 has been shown to specifically catalyze PGE2 formation in response to inflammatory cytokines (Pecchi et al, 2009).

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

In this context, the aim of this study was to decipher the role PGE₂ in chronic low-grade inflammation associated with obesity development by specially targeting mPGES-1. To this end, we took advantage of mPGES-1 deficient mice (Trebino et al., 2003) fed with a HFD and examined the effects of mPGES-1 deletion on body weight (BW) gain, energy expenditures (EE), adiposity development and adipose tissues inflammation.

Materials and Methods

Impact of high-fat diet on mPGES-1 expression

Experiments were performed on C57BL/6 male mice at five weeks of age (Charles River, France). Following receipt, animals were fed with standard diet (AO4, SAFE UAR, France) and water *ad libitum* for one week. Then, animals were given free access to either normal chow (NC, n=10) or a HFD (energy content: 60% from fat ssniff® EF acc. D12492 (I) mod diet, ssniff Spezialdiäten GmbH, Germany; n=11) for 10 weeks.

Impact of mPGES-1 deletion on obesity development

Experiments were performed on adult male mice of the DBA/11ac J strain, with deletion of the PTGES-1 gene, which encodes mPGES-1 enzyme (Pfizer, Trebino et al., 2003). mPGES-1^{-/-} (KO) mice and wild-type (WT) mice were obtained from heterozygote mating. At 10-12 weeks of age, mice were given free access to NC and water available *ad libitum* for one week (from Day-7 to Day-1). Then, 7 WT and 6 KO mice were fed with NC, while 8 WT and 6 KO mice were fed with a HFD for 14 weeks (from Day 1 to Day 96). BW and food intake (FI) were measured twice a week. Cumulative FI was evaluated by subtracting the weight of the remaining food at the end of a defined period of time, to the pre-weighted quantity of food delivered at the beginning of this period. Semi-fasting glycaemia (4 h of fasting) was measured at 5, 10 and 14 weeks of feeding, with an ACCU-CHEK® Performa glucometer (Roche diagnostics, Meylan, France). This short-term fasting procedure was performed to normalize the metabolic status of the mice before the glycaemia assay. EE and total physical activity were measured at Day-2 (D2), D43 and D70 during three consecutive days by indirect calorimetry. Magnetic Resonance Imaging (MRI) acquisition was performed at D85.

Cold exposure experiments

Body core temperature was measured using implantable telemetry devices (ETA-F10, Data Sciences International, DSI, St. Paul, MN), and data acquisition was performed using Dataquest A.R.T. software (version 4.31; DSI). WT (n=8) and KO (n=7) mice fed with NC were anesthetized with Isoflurane (2%) and telemetry devices were inserted in the abdominal cavity. Then, animals were individually housed, and allowed to recover for 10 days. Following this recovery period, animals were exposed to cold (8°C +/- 2°C) during three consecutive days. The body core temperature was continuously assessed at an interval of 30 seconds, every 5 minutes. At the end of cold exposure, animals were euthanized by cervical dislocation before immediate tissue collection.

Organ samples

Animals were fasted during 4 hours, and then, anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg; Imalgén 1000, Merial, France) and Xylazine (10 mg/kg; Rompun, Bayer Santé, France), to be euthanized by cardiac puncture. Hypothalamus, dorsal brainstem (i.e. dorsal vagal complex, DVC), liver, epididymal white adipose tissue (EWAT),

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

retroperitoneal white adipose tissue (RWAT), interscapular brown adipose tissue (iBAT) and blood were immediately collected and frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C for later analysis.

Measurement of energy expenditures and total physical activity

BW and FI were daily measured, before the onset of the light phase. Oxygen consumption (VO₂), and carbon dioxide production (VCO₂) were measured using the Oxylet Physiocage System (Panlab/Harvard apparatus, Cornella, Spain) and the software suite METABOLISM (V2.2.01, Panlab). The respiratory exchange ratio (RER) was calculated as VCO₂/VO₂ and EE was calculated according to the formula $EE [kcal/(day.kg)] = VO_2 \times 1.44 \times [3.815 + (1.232 \times RER)]$. Mice were singly housed and habituated to the metabolic chambers for 24 h before data collection for 48 h. Calorimetric analyses were performed at three time points during the feeding period (a time line depicting the protocol used is given in Figure 2A). The mean values of VO₂, VCO₂, RER, and EE obtained during D1, D45 and D72 were compared to baseline data obtained for each animal at the beginning of the experiment (D-1) and were expressed in fold changes. Comparisons of EE were also conducted on light and dark phases. In addition, total physical activity was continuously measured.

Quantitative PCR

Total RNA was extracted from frozen organ using TRI Reagent[®] (Sigma–Aldrich) according to the manufacturer's instructions. RT was realized using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase in the presence of random hexamer primers (Promega). Gene expression analysis by real time PCR was performed using the LightCycler[®] 480 System (Roche Applied Science). The equivalent of 20 or 40 ng initial RNA was subjected to PCR amplification with a 10 µL final volume using specific 0.5 µM primers and SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The generation of specific PCR products was confirmed by melting-curve analysis. U6 and Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) were used as internal reference gene.

In vivo Magnetic Resonance Imaging acquisition

Experiments were performed on a 70/16 pharماسcan spectrometer (BRUKER Biospin, Ettlingen, Germany) equipped with a 7-Teslas magnet and 16-cm horizontal bore size. A linear birdcage coil with 38-mm inner diameter was used for signal transmission and reception. To perform *in vivo* anatomical magnetic resonance images at D85, mice were fasting overnight and then anesthetized using a mixture of air (2 L/min) and isoflurane, 3 % for induction into a hermetic cage, and 2 % for maintenance *via* a nose-cone of a head-holder device. Two sets of 22 to 26 coronal contiguous T1-weighted images (slice thickness=1 mm) were acquired on the front and on the back part of the mice body with a turbo- RARE sequence (TE=7.5 ms, TR from 850 to 1200 ms depending on the slices number, rare factor=4, 1 average) using a 50 mm Field Of View and 256 X 256 matrix. A pressure probe monitored mice respiration. Analyses of adiposity were performed as previously described (Ke et al., 2015) with Image J Software (NIH, USA).

Histological analysis

EAT was immediately fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at 4 °C overnight and rinsed in 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.4). EAT were cryoprotected in 30 % sucrose solution and frozen in OCT (Cell Path, UK). 8 µm coronal sections were prepared

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

using a cryostat (Leica, CM3050). Images were acquired using a 10-fold lens with a DMX 1200 camera (Nikon) coupled to ACT-1 software. At least 150 adipocytes were counted for each mouse. Cell surfaces were obtained by dividing the number of cells by the surface of the observed area (0.075 mm²).

SDS-PAGE and Western blot analysis

Adipose tissues were homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris pH 8.0, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors cocktail (Sigma, France) then maintained under constant agitation in ice for 1 hour. Extracts were centrifuged at 12 000 g for 20 min at 4°C to remove tissue debris. Protein concentration was performed with BCA Protein Assay Kit (Novagen). Soluble protein extracts (30 µg) were separated by 15 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). Blots were blocked for 30 min at room temperature with 2 % casein in PBS-T and incubated 2 hours at room temperature with rabbit polyclonal antibody against mPGES-1 (18 kDa) at 1:1000 dilution (Oxford BioMedical Research, USA) mPGES-1 (18 kDa) at 1:1000 dilution (Oxford BioMedical Research, USA) and with mouse monoclonal antibody against GAPDH (36 kDa) at 1:10000 dilution (proteintech, USA). Blots were then incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit peroxidase conjugated secondary antibodies at 1:1000 dilution (Dako) and with anti-mouse IgG (Fab specific)-peroxidase at 1:10000 dilution (Sigma) and visualized using the colorimetric system TMB-Blotting (Thermoscientific, France). Bands were quantified by densitometry using Image J software (NIH, USA).

Analysis of plasma samples

Plasma were immediately separated by centrifugation (3000 g, 15 min, 4 °C). Plasma leptin levels were measured using ELISA (EUROBIO, France) according to the manufacturer instructions.

Statistical analysis

All results are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Statview (version 5.0.1.0, Statview Software) with repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons for daily FI and BW gain. Significant difference was assessed by a One-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's test for comparison between 4 groups. Comparison between two groups was performed using unpaired 2-tailed Student's t-test. Pearson correlation analysis was used to quantify relationships between variables of interest. P values less than 0.05 were considered significant.

Results

mPGES-1 expression is decreased in mice fed with a high-fat diet

To investigate the impact of obesity on mPGES-1 expression, 5-week-old C57BL/6 male mice were fed with NC or a HFD for 10 weeks. As expected, BW of HFD-animals was increased by 17.5% when compared with NC-animals (Figure 1A). As shown in Figure 1B and 1C, mRNA expression of mPGES-1 was significantly decreased in liver and WAT, without modification of COX-2 mRNA expression. The decrease in mPGES-1 expression was confirmed at the protein level by western blot analysis in EWAT (Figure 1F). At the brain level, mRNA expression was evaluated within two central structures involved in the regulation of appetite *i.e.* the hypothalamus and DVC. While any differences were observed in the hypothalamus (Figure 1D), a small but significant decrease in mPGES-1 mRNA

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

expression was detected in the DVC (Figure 1E). These data confirmed and deciphered previous results showing a decreased mPGES-1 expression in adipose tissue of HFD-fed mice (Hétu and Riendeau, 2007). The specific mPGES-1 decreased expression, observed in key metabolic organs led us to characterize the sensitivity of mPGES-1^{-/-} mice to develop diet-induced obesity.

mPGES-1^{-/-} mice are resistant to high-fat diet induced obesity

To explore the impact of mPGES-1 deletion on obesity development, mPGES-1^{-/-} mice and control littermates were fed either with NC or a HFD for 14 weeks. In order to follow the evolution of the obese phenotype, we performed several measures of BW, FI, semi-fasted glycaemia and EE throughout the diet period. A MRI acquisition was also performed after 12 weeks of diet. A time line depicting the protocol used is given in Figure 2A. As shown in Figure 2B and C, no differences in BW gain were observed between WT and KO mice when fed with NC. As expected, WT-HFD mice presented a rapid increase in BW gain, which was significant from D2 to the end of diet period. Notably, the final BW of WT-HFD mice was significantly increased by 9 % compared with WT-NC mice (Figure 2 B and C). During the first weeks of diet, KO mice fed with a HFD exhibited similar BW gain than WT-HFD mice. But thereafter, their BW gain increased slower and became significantly lower than those of WT-HFD mice after ten weeks (Figure 2A and B). Interestingly, there was no significant difference in final BW between KO-HFD mice and mice fed with NC, indicating a resistance to HFD-induced obesity. Despite a similar BW gain, the FI of KO-NC mice trended to be lower, or, was punctually significantly lower (D26, 61, 92, and 96) than those of WT-NC mice (Figure 2D). Similar results were observed between WT-HFD and KO-HFD mice (Figure 2E). Consequently, the cumulative FI of KO-NC and KO-HFD mice was slightly but significantly lower compared with WT-NC mice. Nevertheless, there was no statistical difference in cumulative FI between WT-HFD and KO-HFD mice (Figure 2F). Therefore, the phenotype of KO-HFD cannot be entirely explained by a lower FI. However, the feed conversion ratio of KO-HFD mice was significantly higher than WT-HFD mice (Figure 2G) showing that mPGES-1^{-/-} mice are less efficient than their littermates, to convert energy from fat for growth. The resistance to diet-induced obesity observed in KO mice was not accompanied by an improvement of glycaemia profile. Indeed, both WT-HFD and KO-HFD presented a similar increase in semi-fasted glycaemia measured at three points of the feeding period *i.e.* D33, 57, and 96 (Figure 2H).

Deletion of mPGES-1 reduced HFD-induced adiposity

To assess the development of adiposity in WT and KO mice fed with a HFD, we performed MRI acquisitions on animals after 12 weeks of diet. As expected, WT-HFD mice exhibited a significant increase in total, abdominal and subcutaneous adiposity, when compared with their control (Figure 3A and B). Interestingly, HFD-fed KO mice exhibited a significant lower total adiposity than WT-HFD mice (Figure 3A and B). This result was consistent with the reduced BW gain observed in KO mice during HFD feeding (Figure 3B and C). There was a strong linear association and correlation between the final BW and the total adiposity according to genotype and feeding status ($p < 0.001$, $R^2 = 0.82$; Figure 3C). Abdominal adipose tissue is composed of different fat depots, including mesenteric, epididymal, perirenal and ectopic adipose tissues. Thus, in complement of MRI analysis, EWAT and RWAT were dissected and weighted at the term of the feeding period (*i.e.* 14 weeks). We observed that the weight of EWAT and RWAT of KO-HFD mice was significantly lower than of WT-HFD mice (Figure

3D). In contrast, the mass of iBAT was increased by HFD feeding, without any difference between KO and WT mice (Figure 3D). As adipocyte hypertrophy is strongly correlated with adipocyte dysfunction (Goossens and Blaak, 2015), we then performed histological analysis on EWAT. As expected, a 14-weeks HFD induced a hypertrophy of WT and KO adipocytes, but, this hypertrophy was significantly lower in KO mice when compared with WT mice (Figure 3E, F and G). In accordance with these results, the strong increases in both plasma leptin concentration and leptin mRNA expression observed in WT-HFD, were lessened in KO-HFD (Figure 3H and I). It should be noted that mRNA adiponectin expression was significantly increased in RWAT of HFD fed animals, but no difference was observed between WT and KO mice. Finally, the leptin mRNA expression was strongly and positively correlated with the weight of EWAT (Figure 3J) or RWAT (data not shown).

HFD-induced inflammation of adipose tissues was reduced in mPGES-1^{-/-} mice.

In order to examine whether decrease in adiposity observed in KO-HFD mice was associated with a decrease in inflammation, we analyzed the expression of pro-inflammatory markers by real-time PCR. As expected, the mRNA expression of pro-inflammatory macrophage infiltration markers (CD68, and CCL2) were significantly increased in iBAT, EWAT, and RWAT of WT mice fed with a HFD for 14 weeks, compared with WT-NC mice (Figure 4A-C). Interestingly, in KO-HFD mice, the increase in inflammation markers expression was totally blunted for CD68 (Figure 4A and B) or partially reversed for CCL2 in WAT (Figure 4A and 4B). Similarly, CCL2 mRNA expression was totally blunted in iBAT of KO-HFD (figure 4C). The expression of inflammatory markers *i.e.* CD68 mRNA expression was positively and significantly correlated with EWAT weight (Figure 4D, $R^2=0.423$, $p<0.001$) and total adiposity (Figure 4E, $R^2=0.33$, $p=0.015$).

Energy expenditures of mPGES-1^{-/-} mice are improved during HFD feeding

We then performed indirect calorimetry to assess VO_2 , VCO_2 , RER and EE in WT and KO mice. A first measurement was carried out for all animals under standard diet. This measurement served as an internal reference for each animal and was referred as Day 0 (D0, Figure 5A). A longitudinal study was then carried out with measurements made at different times of the fat diet protocol (D1, 45 and 72, Fig. 5A). The choice of these time points was based on preliminary results obtained from a pilot experiment (data not shown). These points constitute crucial transitions during the feeding period, namely D1: beginning of HFD supply; D45: WT-HFD and KO-HFD began to show a difference in BW gain; D72: WT-HFD and KO-HFD showed a significant difference in BW gain. For each mouse, in addition to the raw data (Fig. 5B-D), we made a ratio between the individual base values acquired at D0 and the different measurements obtained at D1, D45 and D72 (Fig. 6A-C). These results expressed in fold change illustrate the evolution of the different parameters during the fat diet. Switching animals from the control diet to a HFD induced an increase in VO_2 and a decreased in VCO_2 regardless of genotype considered (Figure 5B and C). These effects were observed from the first day of HFD feeding and were lessened at D45. On the other hand at D72, both VO_2 and VCO_2 were reduced in WT-HFD compared with WT-NC, while only VCO_2 was decreased in KO-HFD when compared with KO-NC (Figure 5C and 6B). Consequently, VO_2 measured during nighttime was significantly higher in HFD-KO than in HFD-WT (Figure 6A). In agreement with a HFD feeding and a preferential oxidation of lipid substrates, RER of HFD-mice no longer showed a clear day/night cycle and was comprised between 0.7 and 0.8 whatever the genotype and the time points considered (Figure 5D and 6C). KO-HFD mice

exhibited a slight and significant decrease in RER fold-change at D1 and D45 when compared with WT-HFD, but not at D72 (Figure 6C). EE analysis revealed a gradual and time-dependent decrease in EE of WT-HFD and KO-HFD-mice (Figure 7A). Indeed, EE of KO-HFD mice were increased at D45 compared to their respective controls. The same increase was observed for WT-HFD, but it was not significant. These increases in EE were mainly due to increases in total physical activity (Figure 8A and B). Next, at D72, the EE of WT-HFD were significantly lesser than WT-NC (Figure 7A and B). Interestingly, this reduction in EE was less noticeable in KO-HFD mice that maintained a higher level of EE at D72 especially during the nighttime (Figure 7A and B). It should be noted that a strong and negative correlation was visible between BW gain and EE (Figure 7C, $R^2=0.505$, $p<0.001$). The EE difference observable between WT and KO mice fed with a HFD was not explained by changes in total physical activity (Figure 8A and B).

Invalidation of mPGES-1 does not enhance thermogenesis during cold exposure

Given the higher EE level observed in KO-HFD mice when compared to WT-HFD mice (Figure 7), we asked for a higher thermogenesis in KO mice revealed by HFD feeding. Moreover, during HFD feeding, numerous studies have reported that conversion of white adipocyte into brown adipocyte, a process known as browning, can impact EE (see for review Abdullahi and Jeschke, 2016). Chronic cold exposure was reported to exacerbate BAT thermogenesis and browning of WAT. Therefore, we analyzed the body core temperature and mRNA expression of browning markers in WAT and BAT of WT and KO mice after an exposition to cold (8°C, Figure 9A). No differences in body core temperature were observed between WT and KO mice, at room temperature (23°C) and under cold exposure (Figure 9A). In accordance, mRNA expression of both UCP1 and all browning markers tested were not significantly modified in RWAT, EWAT and BAT of KO mice compared with WT mice (Figure 9B).

Discussion

Chronic low-grade inflammation was reported to play a pivotal role in the pathogenesis of obesity (Hotamisligil et al., 2006). Thus, targeting inflammation appears as an attractive strategy to counter the burden of obesity and its associated comorbidities (Hardwick et al., 2013; Wang et al., 2016). Among potential targets, PGE2 appears of particular interest since previous works have reported their contribution to the uncontrolled inflammation observed in obese individuals (González-Pérez and Claria, 2010). Accordingly, therapeutic strategies that specifically target enzymes catalysing the production of PGE2 could be useful. Surprisingly, the mPGES-1 involvement in obesity-associated dysfunctions was not reported. The only clues that link mPGES-1 to obesity are rare and rely on a few studies reporting modulations of mPGES-1 expression during obesity. Moreover, these data are somewhat conflicted. Indeed, a liver mPGES-1 mRNA increase was reported in mice fed with a standard diet and water containing 30% of fructose for 8 weeks (Henkel et al., 2012). Otherwise, a down-regulation of mPGES-1 expression was observed in the EWAT of obese mice fed with a HFD (Héту and Riendeau, 2007). Conversely, García-Alonso and colleagues described, in the human omental WAT of obese individuals, an increase in PGE2 expression due to an increase in COX-2 expression, without any changes in mPGES-1 expression (García-Alonso et al., 2016). The discrepancy in reported results can be explained by the use of different species, tissues and energy sources. Consistently with the study of Héту and Riendeau, we showed here a decrease

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

in mPGES-1 expression in WAT of HFD-fed mice. Moreover, we observed that mPGES-1 mRNAs were also reduced in liver and DVC of HFD-fed mice. As DVC is a dorsal brainstem structure involved in satiety control, it suggests an alteration of mechanism of FI control. Contrariwise, no modification of mPGES-1 mRNA expression was observed within the hypothalamus. This is quite surprising since the hypothalamus not only plays a key role in the regulation of energy balance, but was also reported to be subjected to inflammation during HFD feeding (Thaler et al., 2012). It is important to note that, the decreases in mPGES-1 expression reported here were not associated with a modification in COX-2 expression. The specific modulation of mPGES-1 during HFD-feeding questioned about a potential instrumental role of this enzyme in the mechanisms leading to obesity. Therefore, it appears that the use of mPGES-1^{-/-} mice would be of particular benefit, to shed light upon the possible role of mPGES-1 and PGE2 in obesity development. This animal model, characterized by a strong reduction of PGE2 production in inflammatory conditions (Trebino et al., 2003) was previously used to demonstrate the role of PGE2 and mPGES-1 in behavioural changes observed during acute inflammation (Elander et al., 2007; Siljehav et al., 2012).

The main result of the present study was the description of mPGES-1^{-/-} mice resistance to HFD-induced weight gain and development of adiposity. Indeed, after 14 weeks of fat diet, KO animals were not overweight compared to animals under low fat diet. In accordance, the adiposity of the KO mice was greatly reduced compared with the WT mice. Our results are to be compared to those of Jarworski and colleagues (2009) who reported that deletion of AdPLA2, which catalyses the production of arachidonic acid, led to a lean phenotype in mice fed with a HFD for 15 weeks. However, AdPLA deletion doesn't specifically downregulate PGE2 production because it is involved in numerous biosynthesis pathways. Conversely, others have described that EP3^{-/-} mice spontaneously developed an obese phenotype when fed with NC (Sanchez-Alavez et al., 2007; Xu et al., 2016). As EP3 is one the 4 different PGE2 receptors (EP1-4), it suggests that PGE2 exerts anti-lipolytic and anti-adipogenic action in WAT that through EP3. In our model of invalidation of PGE2 production, we find that mice exhibited a lean phenotype under HFD feeding, suggesting that EP2 and EP4 which had antagonistic effects to EP3, may also play a major role in the development of obesity. It should be noted that HFD-induced weight gain and development of adiposity observed in the DBA/11ac J mice strain used here, were lesser than those classically reported for other mice strains. The DBA/11ac J strain is not widely used in energetic metabolism studies and among the few data from the literature, it was reported that these mice were less susceptible to fat diet-induced BW gain (Wei et al., 2017). This is coherent with the moderate weight gain and the absence of hyperphagia observed here in HFD-fed DBA/11ac J mice. Despite this poor sensitivity to HFD-induced obesity, the deletion of mPGES-1 contributed to decrease adiposity.

We reported also a reduced macrophages infiltration in WAT of KO-HFD when compared with HFD-WT. Here, we showed that the increase in mRNA expression of pro-inflammatory macrophages (M1) infiltration markers was completely abolished in WAT of KO-HFD mice. This observation is critical since the balance impairment between M1, and anti-inflammatory macrophages (M2) was reported to trigger adipose tissue inflammation, and dysfunction throughout obesity (Wellen and Hotamisligil, 2003; Xu et al., 2003). This result is consistent with a previous work showing that PGE2 through their EP3 receptor, are involved in the release of pro-inflammatory cytokines within WAT (Chan et al., 2016).

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

Conversely, PGE₂ was also reported to shift macrophages polarization from M1 to M2 profile (Luan et al., 2015), mainly through EP4 (Yasui et al., 2015). These latest results are in contradiction with the reduced WAT inflammation described here within mPGES-1 KO mice, and we suggest that PGE₂ pro-inflammatory action within the WAT is superior to its anti-inflammatory effect, during obesity development. Obesity is associated with an increased level of leptin prevailing in the expanding WAT. We showed here that deletion of mPGES-1 partially blunted both HFD-induced increase in plasmatic leptin levels, and WAT leptin mRNA expression. In accordance with these results, PGE₂ is known to induce leptin secretion from rat adipocytes (Fain et al., 2000). But, this time again, the results of the literature are contradictory and EP3^{-/-} mice exhibited an increase in leptin circulating levels (Sanchez-Alavez et al., 2007). Altogether, these results suggest that PGE₂-induce leptin release is not entirely controlled by EP3 receptor. Moreover, leptin is involved in both innate and adaptive immunity (La Cava and Matarese, 2004), suggesting a potential role of leptin in obesity-mediated inflammation (Tilg and Moschen, 2006). In accordance, leptin-deficient (*ob/ob*) and leptin receptor-deficient (*db/db*) mice have been shown less macrophagic infiltration and inflammatory gene expression in WAT, despite of a very significant increase in weight gain and adiposity (Xu et al., 2003). We cannot exclude that the reduction of adipose tissue inflammation observed in HFD-KO was partly due to the decreased leptin expression.

The weight gain curves showed that KO and WT animals evolved identically during the first 3 weeks of fat diets. Only after this delay, the weights of the KO animals begin to become significantly lower than WT mice after 8/10 weeks. From this moment, HFD-fed KO transgenic model began to have a lower BW gain than WT-HFD mice, and their final BW was comparable to mice fed with NC at the end of the diet period. This advocated for a gradual implementation of resistance to HFD-induced obesity in mPGES-1^{-/-} mice. In accordance, we observed that EE of HFD-mice varied with time of diet. First, EE tend or are significantly increased after 7 weeks of diet. One possible explanation is that increase in EE can contribute to counteract the increase in adiposity, and to regulate the excess of circulating fatty acids (Li et al., 2015). However, after 12 weeks of diet, EE of WT mice were importantly reduced during dark phase, unlike KO mice which conserved stables EE. The development of HFD-induced obesity consists of distinct phases of inflammation (Williams et al., 2014; Bai and Sun, 2015; Le Thuc et al., 2017). After a rapid induction of central and peripheral inflammatory markers (1-3 days), a second later phase appears after several weeks of HFD feeding (~8 weeks). This second phase of inflammation in peripheral tissues, and especially in the WAT, causes a more intractable and persistent inflammation which is probably linked to lipid overload and lipotoxicity. In the light of the results we obtained, we proposed that the deletion of mPGES-1-derived PGE₂ limits the inflammatory reactions that intervene during excessive lipid storage and growth of WAT. A similar profile was described for AdPLA2^{-/-} mice fed with a HFD that exhibited no difference in BW during the first 7-8 weeks of diet when compared with WT littermates (Jarworski et al., 2009). Interestingly, recent works have showed that anti-inflammatory treatments, especially those targeting macrophage polarization, lead to reduced BW gain (Kodama et al., 2015) and adiposity (Bashir et al., 2016; Toita et al., 2016; Tsai et al., 2018), in mice fed with a HFD. On the other hand, inflammation of adipose tissue is strictly linked to obesity development (Rogerio and Calder (2018). Thus, we cannot exclude that the lower body weight and adiposity observed in the HFD-fed KO mice, due to the maintenance of energy expenditure at a higher level, could explain the reduction of adipose tissue inflammation (Wensveen et al., 2015).

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

Here, we showed that the cumulative FI of KO-HFD mice was not different from those of WT-HFD mice, whatever the period of feeding considered. This was quite surprising since hypothalamus inflammation was reported to take place during obesity development and to contribute to overeating (Le Thuc et al., 2017). Our results suggest that mPGES-1-derived PGE2 does not contribute significantly to the inflammation at this level. Non-shivering thermogenesis, a mechanism mainly driven by BAT, is well known to increase EE (Saito, 2013). This BAT function is associated with the strong expression of UCP1 within mitochondria, which disperses energy through heat production. Recent evidence has demonstrated that WAT can adopt a brown-like adipose tissue phenotype known as browning of WAT. This browning process is a potential new target for treating obesity and explains the resistance of different mice strains to diet-induced obesity (Wan et al., 2012; Schneider et al., 2016) by increasing non-shivering thermogenesis and enhancing EE (Yang et al., 2015; Choi et al., 2016). Some studies highlighted that PGE2 can activate the trans-differentiation of white adipocytes, into brown adipocytes, in both human and mice (García-Alonso et al., 2013; García-Alonso et al., 2016). As described in previous studies (So et al. 2011; García-Ruiz et al., 2015), we observed here that iBAT weight was increased in HFD mice but without any differences between WT and KO mice. The increase in BAT mass can be promoted by ectopic fat deposition, leading to its inflammation and whitening (Gao et al., 2015). We also observed an increase in UCP1 mRNA expression in both iBAT and RWAT of mice fed with HFD. This could be a clue for an increased thermogenesis in response to lipid overload. However, this increase was similar in both genotypes. So, it seems unlikely that the increased EE observed in HFD-KO mice was associated with an increased browning of WAT, in the absence of mPGES-1-derived PGE2. To confirm this point, WT and KO mice were exposed to cold, which is a very effective protocol to boost browning and non-shivering thermogenesis. No difference between WT and KO mice was observed in body core temperature and browning markers expression.

To conclude, we showed that the invalidation of mPGES-1 and the concomitant PGE2 decrease resulted in a less weight gain under HFD, and a moderate development of adiposity. We suggest that the absence of mPGES-1 prevents inflammation of WAT, inflammation known to contribute to the development of obesity and associated co-morbidities. We believe that a specific inhibition of mPGES-1 could constitute a therapeutic avenue against obesity that deserves to be tested.

Funding Statement: This work was supported by funding obtained from the Aix-Marseille Université and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Acknowledgments:

The authors acknowledge Elise Courvoisier for their support in qPCR experiments (plateforme Analyse et Valorisation de la Biodiversité, Marseille). The authors also thank the Fédération de Recherche 3C for the access to their NMR spectrometer.

Author Contributions Statement

PC, GF, AC, BN, RB and RS performed experiments. PC, GF, AC, BN, BR, RS, SE, BB, DM and TJD designed the study and analyzed data. PC and TJD wrote the paper.

Conflict of Interest Statement

Pierre Clément and Bariohay Bruno were employed by company Biomeostasis CRO. All other authors declared no conflict of interest.

Ethical Statement

The protocols for the present study were authorized by the French Ministry, and approved by the Ethics Committee for animal experimentation of Marseille n°14, under the title “Obésité induite par un régime enrichi en graisse. Rôle de la prostaglandine E synthase microsomale (mPGES1)” with TROADEC Jean-Denis and BARIOHAY Bruno as main investigators (reference number APADIS#1955-2015092816241948, dated 10.27.2015).

References

- Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2016). White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends Endocrinol Metab.* 27, 542-552. doi: 10.1016/j.tem.2016.06.006.
- Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., and Khan, F. (2016). Amelioration of obesity-associated inflammation and insulin resistance in c57bl/6 mice via macrophage polarization by fish oil supplementation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 33, 82–90. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.011
- Bai, Y., and Sun, Q. (2015). Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes Rev.* 16, 127-136. doi: 10.1111/obr.12242.
- Bariohay, B., Roux, J.A., Bonnet, M.S., Dallaporta, M., Troadec, J.D. (2011). An update in the management of obesity: the weight of CNS targets. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 6, 164-180. doi: 10.2174/157488911796958048.
- Ceddia, R.P., Lee, D., Maulis, M.F., Carboneau, B.A., Threadgill, D.W., Poffenberger, G., et al. (2016). The PGE2 EP3 Receptor Regulates Diet-Induced Adiposity in Male Mice. *Endocrinology.* 157, 220–232. doi: 10.1210/en.2015-1693.
- Chan, P.C., Hsiao, F.C., Chang, H.M., Wabitsch, M., Hsieh, P.S. (2016). Importance of adipocyte cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 3 signaling in the development of obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *FASEB J.* 30: 2282-2297. doi: 10.1096/fj.201500127.
- Choi, W.H., Ahn, J., Jung, C.H., Jang, Y.J., Ha, T.Y. (2016). β -Lapachone Prevents Diet-Induced Obesity by Increasing Energy Expenditure and Stimulating the Browning of White Adipose Tissue via Downregulation of miR-382 Expression. *Diabetes.* 65, 2490-2501. doi: 10.2337/db15-1423.
- Elander, L., Engstrom, L., Hallbeck, M., Blomqvist, A. (2007). IL-1beta and LPS induce anorexia by distinct mechanisms differentially dependent on microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* 292, 258-267. doi: 10.1152/ajpregu.00511.2006.

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

- Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res.* 49, 1894-1903. doi: 10.1194/jlr.M800132-JLR200.
- Engblom, D., Saha, S., Engström, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.J., et al. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci.* 6, 1137-1138. doi:10.1038/nm1137.
- Fain, J.N., Leffler, C.W., Bahouth, S.W., Rice, A.M., and Rivkees, S.A. (2000). Regulation of leptin release and lipolysis by PGE₂ in rat adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 62, 343 -350. doi: 10.1016/S0090-6980(00)00088-5.
- Ferguson, R.D., Gallagher, E.J., Scheinman, E.J., Damouni, R., LeRoith, D. (2013). The Epidemiology and Molecular Mechanisms Linking Obesity, Diabetes, and Cancer. *Vitam. Horm.* 93, 51–98. doi: 10.1016/B978-0-12-416673-8.00010-1.
- Gao, M., Ma, Y., Liu, D. (2015). High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS One.* 10:e0119784. doi:10.1371/journal.pone.0119784.
- García-Alonso, V., López-Vicario, C., Titos, E., Morán-Salvador, E., González-Pérez, A., Rius, B., et al. (2013). Coordinate Functional Regulation between Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) in the Conversion of White-to-brown Adipocytes. *J Biol Chem.* 288, 28230–28242. doi: 10.1074/jbc.M113.468603.
- García-Alonso, V., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Rius, B., Lopategi, A., López-Vicario, C., Jakobsson, P.J., et al. (2016). Prostaglandin E₂ Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis. *PLoS One.* 11:e0153751. doi: 10.1371/journal.pone.0153751.
- García-Ruiz, E., Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Ceresi, E., Oliver, P., Palou, A. (2015). The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 39, 1619-1629. doi: 10.1038/ijo.2015.112.
- Goossens, G.H., and Blaak, E.E. (2015). Adipose Tissue Dysfunction and Impaired Metabolic Health in Human Obesity: A Matter of Oxygen? *Front Endocrinol.* 6:55. doi: 10.3389/fendo.2015.00055.
- González-Pérez, A., and Clària, J. (2010). Resolution of adipose tissue inflammation. *ScientificWorldJournal.* 10, 832-856. doi: 10.1100/tsw.2010.77.
- Guillemot-Legrís, O., and Muccioli, G.G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci.* 40, 237-253. doi: 10.1016/j.tins.2017.02.005.
- Hardwick, J.P., Eckman, K., Lee, Y.K., Abdelmegeed, M.A., Esterle, A., Chilian, W.M., et al. (2013). Eicosanoids in metabolic syndrome. *Adv Pharmacol.* 66, 157-266. doi: 10.1016/B978-0-12-404717-4.00005-6.

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

- Henkel, J., Frede, K., Schanze, N., Vogel, H., Schürmann, A., Spruss, A., et al. (2012). Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE₂-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis. *Lab Invest.* 92, 1597-1606. doi: 10.1038/labinvest.2012.128. Epub 2012 Sep 10.
- Hétu, P.O., and Riendeau, D. (2007). Down-regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in adipose tissue by high-fat feeding. *Obesity (Silver Spring)*. 15, 60-68. doi: 10.1038/oby.2007.514.
- Hsieh, P.S., Lu, K.C., Chiang, C.F., Chen, C.H. (2010). Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. *Eur J Clin Invest.* 40, 164-171. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02239.x.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444, 860–867. doi:10.1038/nature05485.
- Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., et al. (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high fat feeding or leptin deficiency. *Nat. Med.* 15, 159–168. doi: 10.1038/nm.1904.
- Ke, J.Y., Kliewer, K.L., Hamad, E.M., Cole, R.M., Powell, K.A., Andridge, R.R., et al. (2015). The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutr Metab.* 12:1. doi: 10.1186/1743-7075-12-1.
- Kodama, K., Toda, K., Morinaga, S., Yamada, S., and Butte, A.J. (2015). Anti-CD44 Antibody Treatment Lowers Hyperglycemia and Improves Insulin Resistance, Adipose Inflammation, and Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 64, 867–875. doi: 10.2337/db14-0149
- La Cava, A., and Matarese, G. The weight of leptin in immunity. (2004). *Nature reviews Immunology*. 4, 371–379. doi:10.1038/nri1350.
- Le Thuc, O., Stobbe, K., Cansell, C., Nahon, J.L., Blondeau, N., Rovère, C. (2017). Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Front. Endocrinol (Lausanne)*. 8:197. doi: 10.3389/fendo.2017.00197.
- Li, J., Zhao, W.G., Shen, Z.F., Yuan, T., Liu, S.N., Liu, Q., et al. (2015). Comparative proteome analysis of brown adipose tissue in obese C57BL/6J mice using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *PLoS One*. 10:e0119350. doi: 10.1371/journal.pone.0119350.
- Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H., Huang, X.F. (2000). Development of high fat diet induced obesity and leptin resistance in C57BL/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24, 639-646. doi: 10.1038/sj.ijo.0801209.
- Luan, B., Yoon, Y.-S., Le Lay, J., Kaestner, K.H., Hedrick, S., Montminy, M. (2015). CREB pathway links PGE₂ signaling with macrophage polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15642–15647. doi: 10.1073/pnas.1519644112.

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

- Nasteska, D., Harada, N., Suzuki, K., Yamane, S., Hamasaki, A., Joo, E., et al. (2014). Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions. *Diabetes*. 63, 2332-2343. doi: 10.2337/db13-1563.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Thirion, S., Salvat, C., Berenbaum, F., Jean, A., et al. (2006). Involvement of central microsomal prostaglandin E synthase-1 in IL-1 β -induced anorexia. *Physiol Genomics*. 25, 485-492. doi: 10.1152/physiolgenomics.00306.2005.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., Troadec, J.D. (2008). mPGES-1 knock-out mice are resistant to cancer-induced anorexia despite the absence of central mPGES-1 up-regulation in wild-type anorexic mice. *J Neuroimmunol*. 199, 104-114. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.012.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., Troadec, J.D. (2009). Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol Behav*. 97, 279-292. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.040.
- Richelsen, B., and Pedersen, S.B. (1987). Antilipolytic Effect of Prostaglandin E₂ in Perfused Rat Adipocytes. *Endocrinology*. 121, 1221-1226. doi: 10.1210/endo-121-4-1221.
- Rogero, M.M. and Calder, P.C. (2018) Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*.10, E432. doi: 10.3390/nu10040432.
- Rossi, E.L., Khatib, S.A., Doerstling, S.S., Bowers, L.W., Pruski, M., Ford, N.A., et al. (2018). Resveratrol inhibits obesity-associated adipose tissue dysfunction and tumor growth in a mouse model of postmenopausal claudin-low breast cancer. *Mol Carcinog*. 57, 393-347. doi: 10.1002/mc.22763.
- Saito, M. (2013). Brown Adipose Tissue as a Regulator of Energy Expenditure and Body Fat in Humans. *Diabetes Metab J*. 37, 22-29. doi: 10.4093/dmj.2013.37.1.22.
- Sanchez-Alavez, M., Klein, I., Brownell, S.E., Tabarean, IV., Davis, C.N., Conti, B., et al. (2007). Night eating and obesity in the EP3R-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 3009-3014. doi: 10.1073/pnas.0611209104.
- Schneider, K., Valdez, J., Nguyen, J., Vawter, M., Galke, B., Kurtz, T.W., et al. (2016). Increased Energy Expenditure, Ucp1 Expression, and Resistance to Diet-induced Obesity in Mice Lacking Nuclear Factor-Erythroid-2-related Transcription Factor-2 (Nrf2). *J Biol Chem*. 291, 7754-7766. doi: 10.1074/jbc.M115.673756.
- Siljehav, V., Olsson Hofstetter, A., Jakobsson, P.J., Herlenius, E. (2012). mPGES-1 and prostaglandin E₂: vital role in inflammation, hypoxic response, and survival. *Pediatr Res*. 72, 460-467. doi: 10.1038/pr.2012.119.
- So, M., Gaidhu, M.P., Maghdoori, B., Ceddia, R.B. (2011). Analysis of time-dependent adaptations in whole body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis*. 10:99. doi: 10.1186/1476-511X-10-99.

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

- Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 122, 153-162. doi: 10.1172/JCI59660.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6, 772–783. doi:10.1038/nri1937.
- Toita, R., Kawano, T., Murata, M., and Kang, J.-H. (2016). Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice. *Biomaterials* 110, 81–88. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.018.
- Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., et al. (2003). Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci.* 100, 9044-9049. doi: 10.1073/pnas.1332766100.
- Tsai, V.W., Zhang, H.P., Manandhar, R., Lee-Ng, K.K.M., Lebhar, H., Marquis, C.P., Husaini, Y., Sainsbury, A., Brown, D.A., and Breit, S.N. (2018). Treatment with the TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 reduces the adiposity and corrects the metabolic dysfunction of mice with diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 42, 561–571. doi: 10.1038/ijo.2017.258.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1785–1788. doi: 10.1172/JCI200320514.
- Wan, M., Easton, R.M., Gleason, C.E., Monks, B.R., Ueki, K., Kahn, C.R., et al. (2012). Loss of Akt1 in mice increases energy expenditure and protects against diet-induced obesity. *Mol Cell Biol.* 32, 96-106. doi: 10.1128/MCB.05806-11.
- Wang, W., Yang, J., Yang, H., Sanidad, K.Z., Hammock, B.D., Kim, D., et al. (2016). Effects of high-fat diet on plasma profiles of eicosanoid metabolites in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 127, 9-13. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2016.11.003.
- Wei, W., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., Suijkerbuijk, M., Kops, N., Bos, P.K., Verhaar, J.A.N., Zuurmond, A.-M., Dell'Accio, F., and van Osch, G.J.V.M. (2017). High fat diet accelerates cartilage repair in DBA/1 mice. *J. Orthop. Res.* 35, 1258–1264.
- Wensveen, F.M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T., Polić, B. (2015) The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur J Immunol.* 45, 2446-56. doi: 10.1002/eji.201545502.
- Williams, L.M., Campbell, F.M., Drew, J.E., Koch, C., Hoggard, N., Rees, W.D., et al. (2014). The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. *PLoS One.* 9:e106159. doi: 10.1371/journal.pone.0106159.
- World Health Organization. (2000). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation. http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/

Reduced diet-induced adiposity in mPGES-1 ^{-/-} mice

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-1830. doi: 10.1172/JCI200319451.

Xu, H., Fu, J.-L., Miao, Y.F., Wang, C.J., Han, Q.F., Li, S., et al. (2016). Prostaglandin E2 receptor EP3 regulates both adipogenesis and lipolysis in mouse white adipose tissue. *J. Mol. Cell Biol.* 8, 518-529. doi: 10.1093/jmcb/mjw035.

Yasui, M., Tamura, Y., Minami, M., Higuchi, S., Fujikawa, R., Ikedo, T., et al. (2015). The Prostaglandin E2 Receptor EP4 Regulates Obesity related Inflammation and Insulin Sensitivity. *PLoS One.* 10:e0136304. doi: 10.1371/journal.pone.0136304.

Yang, Y.R., Jang, H.J., Choi, S.S., Lee, Y.H., Lee, G.H., Seo, Y.K., et al. (2015). Obesity resistance and increased energy expenditure by white adipose tissue browning in *Oga*(+/-) mice. *Diabetologia.* 58, 2867-2876. doi: 10.1007/s00125-015-3736-z.

Figure 1. TIF

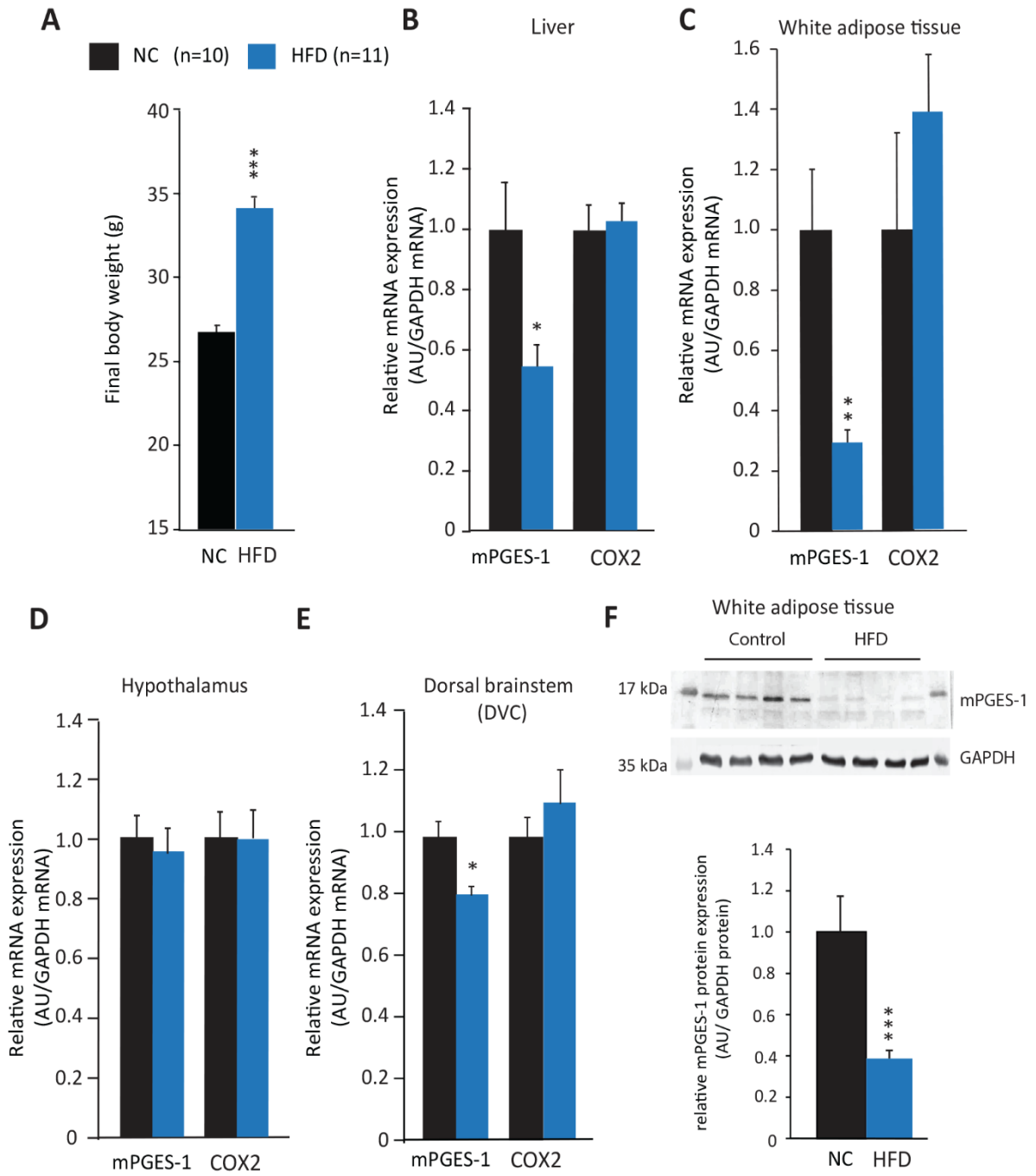


Figure 2. TIF

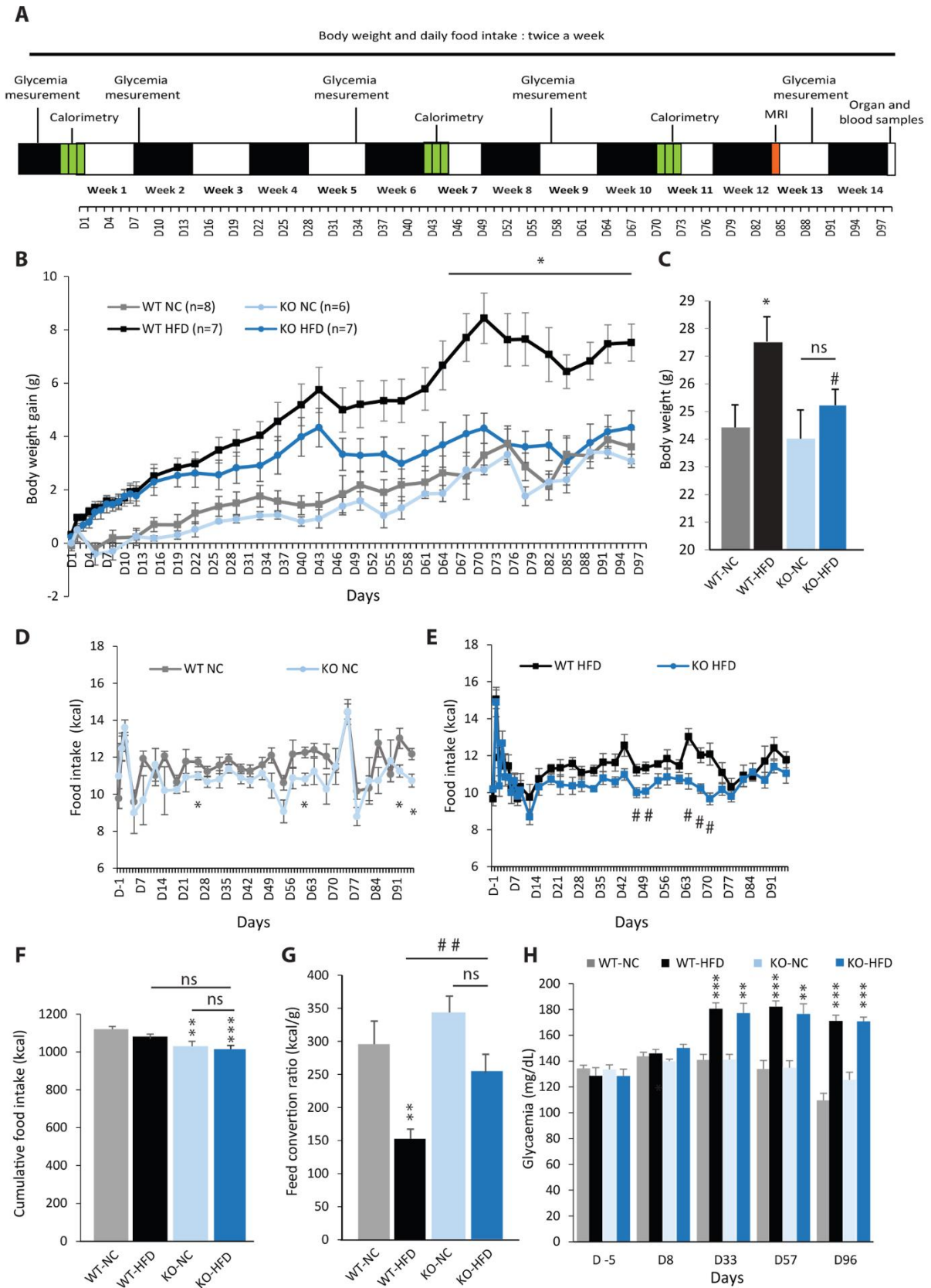


Figure 3. TIF

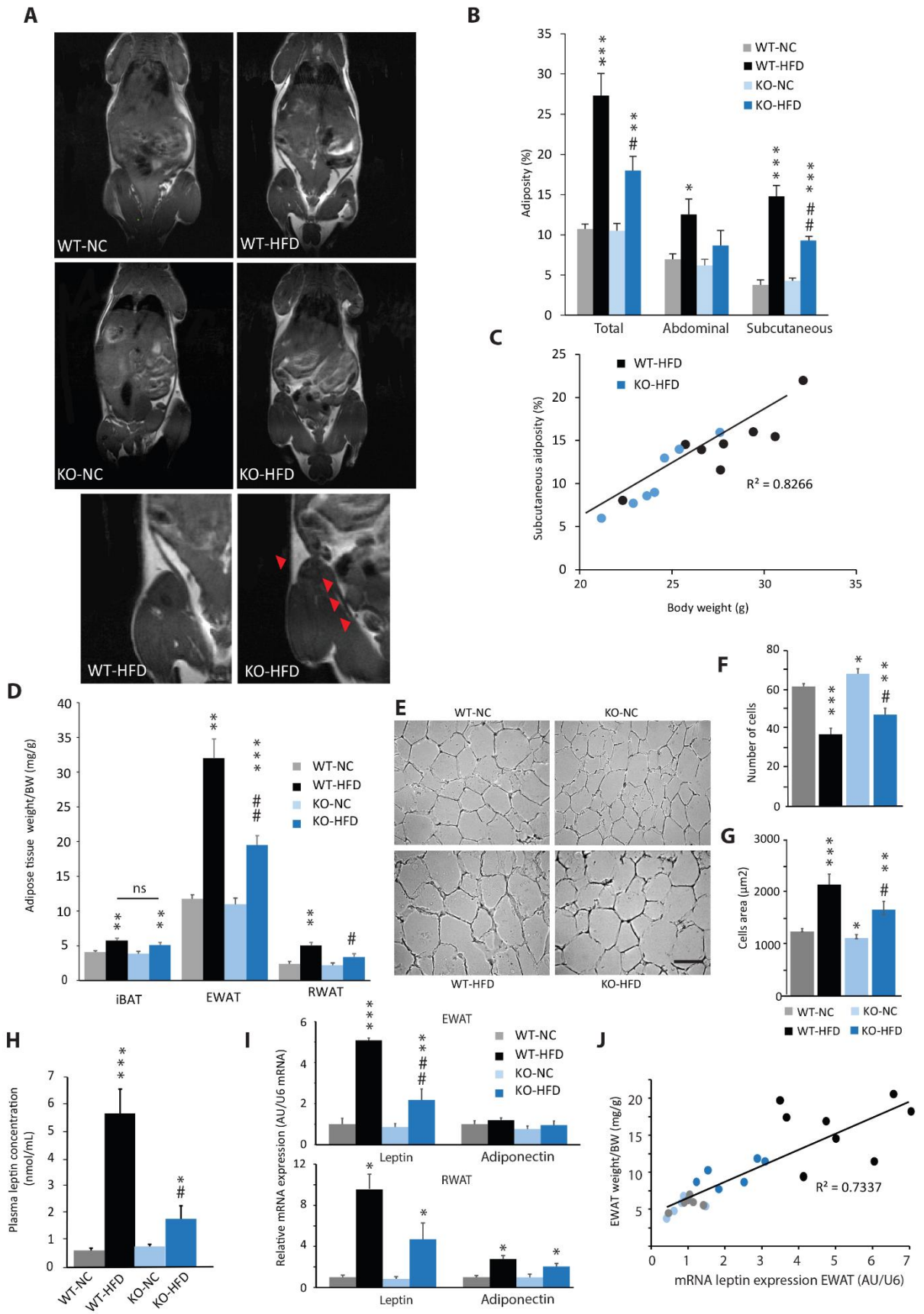


Figure 4. TIF

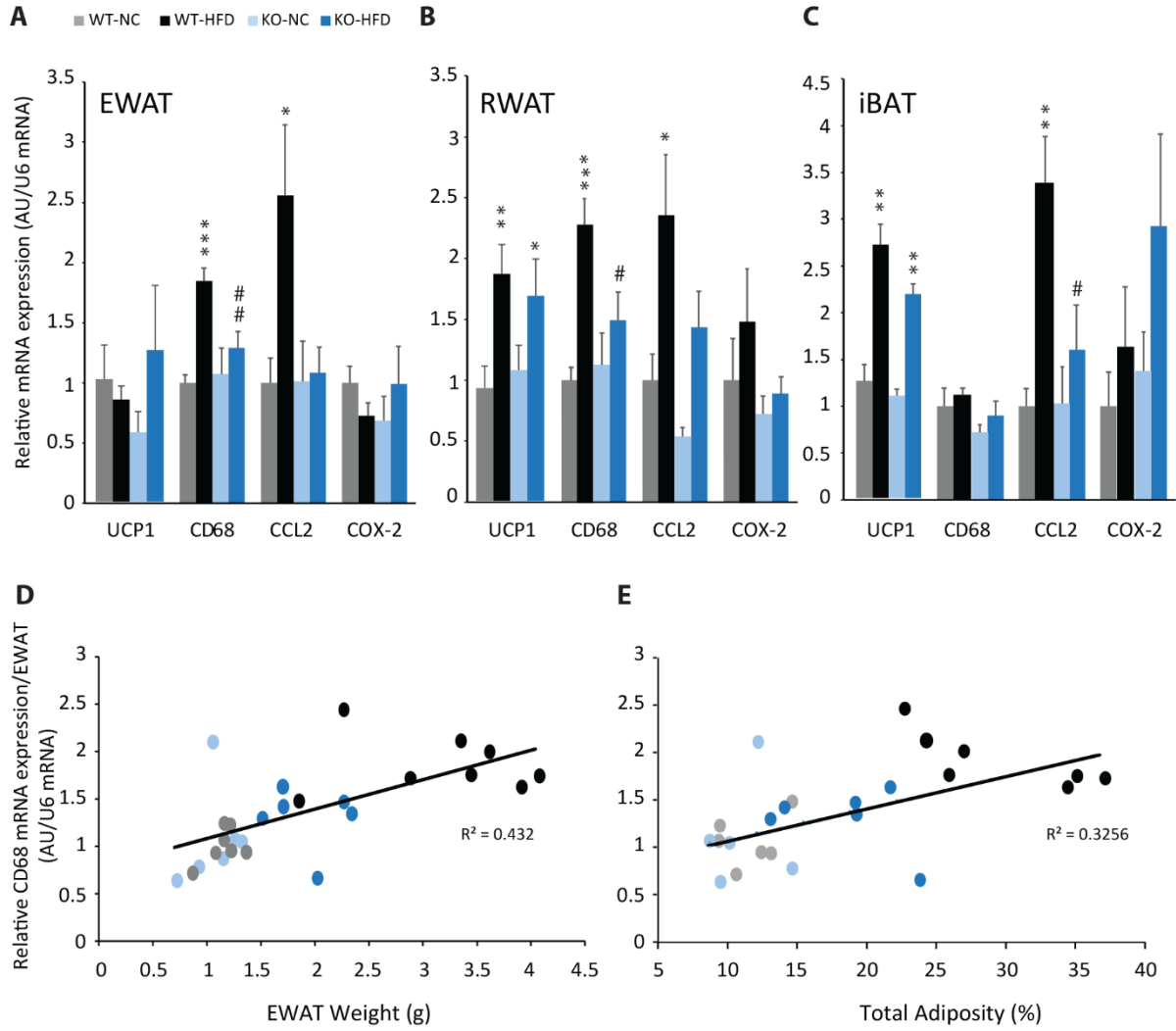


Figure 5. TIF

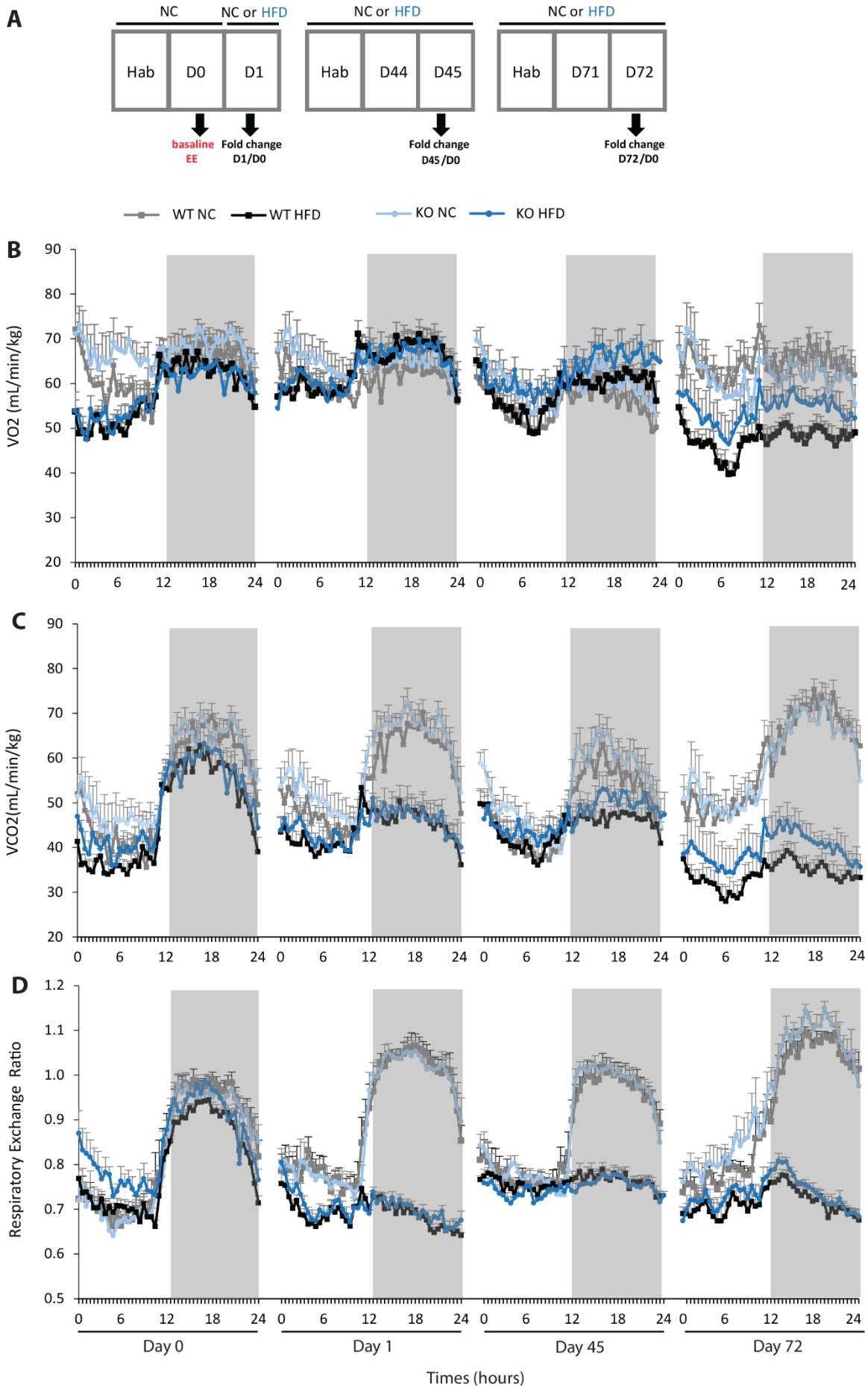


Figure 6. TIF

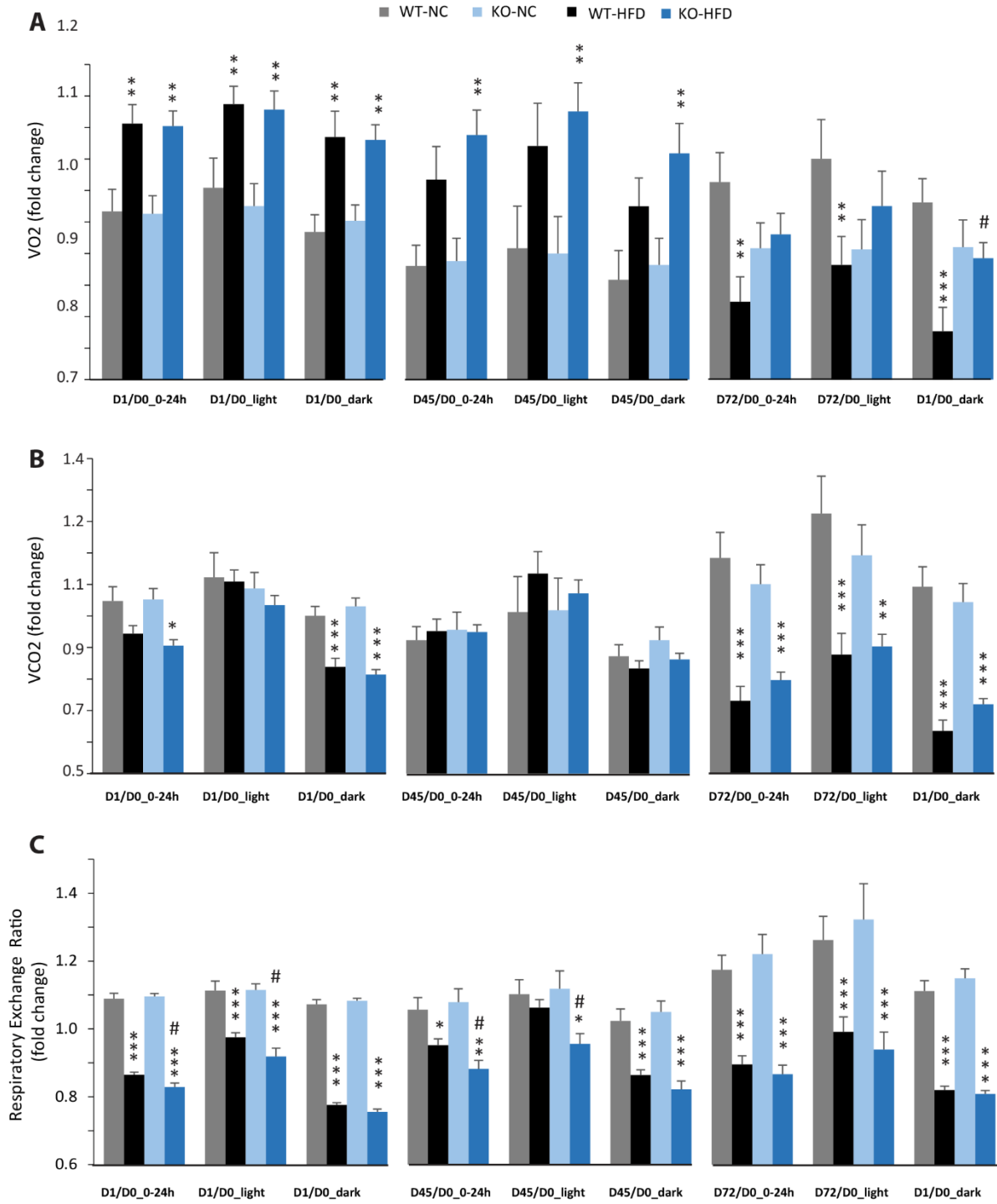


Figure 7. TIF

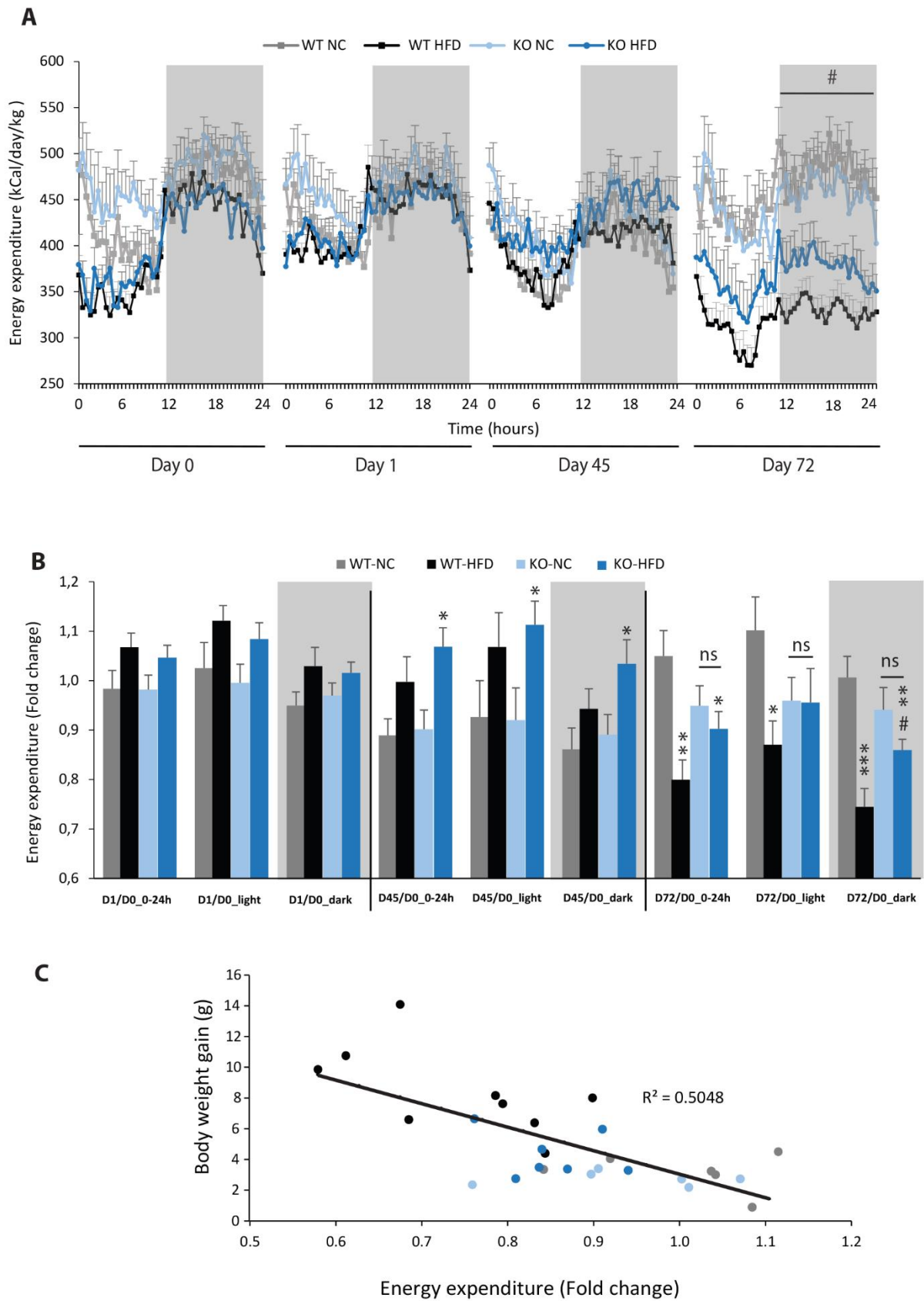


Figure 8. TIF

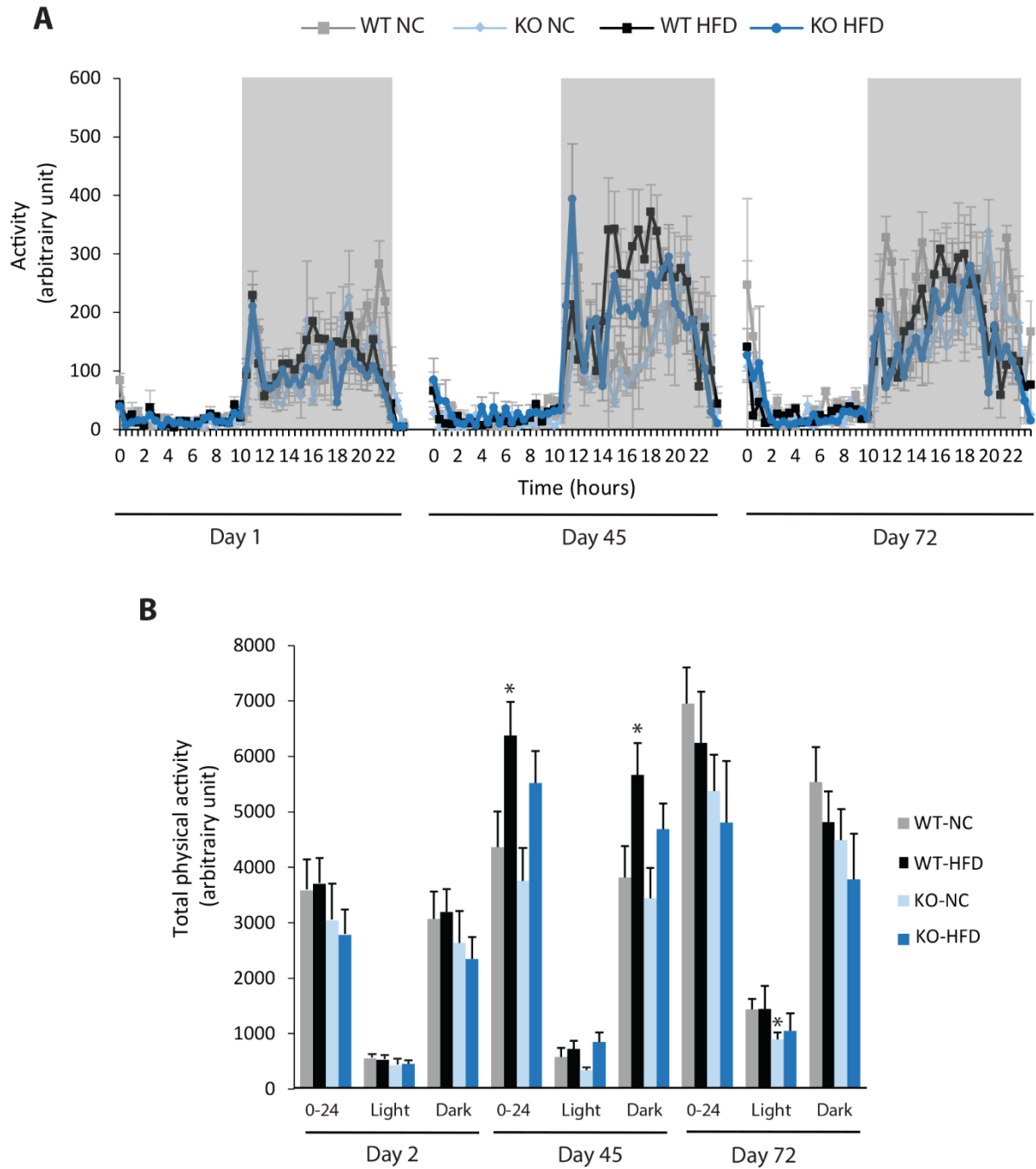
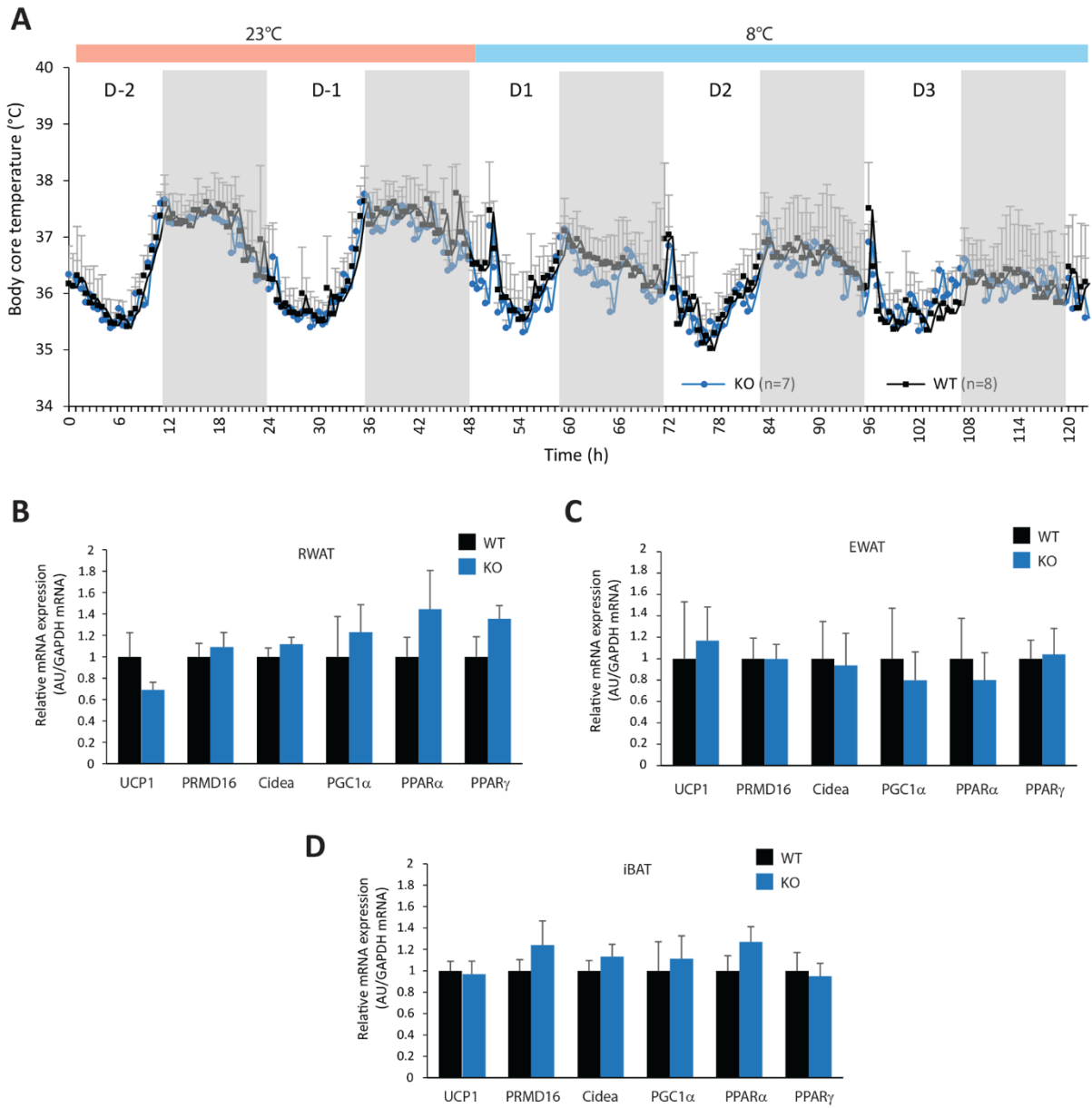


Figure 9. TIF



Figures legends

Figure 1: mPGES-1 expression is reduced in diet-induced obesity model

A: Final BW (g) of C57BL/6 mice fed either with normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD) for 10 weeks. **B-E:** Real-time PCR analysis of mPGES-1 and COX-2 mRNA expression in the liver (**B**), white adipose tissue (**C**), hypothalamus (**D**) and brainstem (**E**) in NC- and HFD-fed mice. **F:** Western blot analysis of mPGES-1 expression within the white adipose tissue of NC- and HFD-fed mice. First and last lanes: 17kDa weight ladder. Data shown are mean \pm SEM; *, significantly different from NC; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Figure 2: mPGES-1 KO mice are resistant to diet-induced weight gain

A: Time line illustrating the measurements performed during the feeding period. **B:** BW gain (g) and final BW (**C**) of WT type and mPGES-1^{-/-} mice fed either with normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD) for 14 weeks. **D, E:** Daily food intake (kcal) of WT type and mPGES-1^{-/-} mice fed either with NC or HFD. Cumulative food intake (**F**, kcal) and feed conversion ratio (**G**, kcal/g) of WT type and mPGES-1^{-/-} mice calculated at the end of 14 weeks. **H:** Fasting glycaemia (mg/dL) measured for all groups at different time points of the feeding period. Data shown are mean \pm SEM; *, significantly different from WT-NC; #, significant difference between WT-HFD and KO-HFD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; same statistical parameters apply to # symbol; ns, not significant.

Figure 3: Reduced adiposity in HFD-fed mPGES-1 KO mice

A: Coronal MRI analysis of WT and KO mice fed with normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD) for 14 weeks. Slice of representative mice are shown. Detail images focus on reduced subcutaneous adiposity (arrowheads) in HFD-fed mPGES-1 KO mice compared with HFD-fed WT mice. **B:** Quantification of total, visceral and subcutaneous adiposities (%) of 14-week-fed WT and KO mice. **C:** Correlation analysis was performed on the body weight and subcutaneous adiposity of HFD-fed WT and KO mice ($R^2=0.82$). **D:** Weights (g/BW) of interscapular brown adipose tissue (iBAT), epididymal white adipose tissue (EWAT) and retroperitoneal white adipose tissue (RWAT), in WT and KO mice fed either with NC or a HFD for 14 weeks. **E:** Representative photomicrographs of EWAT histology in WT and KO mice fed either with NC or a HFD. Quantification of adipocytes number per surface unit (**F**) and adipocytes area (**G**, μm^2) in EWAT of WT and KO mice fed either with NC or HFD. **H:** Dosage of plasmatic leptin (nmol/mL) in all experimental groups. **I:** Real-time PCR analysis of leptin and adiponectin mRNA expression in EWAT and RWAT from WT and KO mice fed either with NC or HFD. **J:** Correlation analysis was performed on the body weight and subcutaneous adiposity of WT and KO mice fed either with NC or a HFD ($R^2=0.73$). Data shown are mean \pm SEM. *, significantly different from WT-NC; #, significant difference between WT-HFD and KO-HFD; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; same statistical parameters apply to # symbol. ns, not significant. Scale bar: 100 μm .

Figure 4: mPGES-1 invalidation reduces HFD-induced adipose tissues inflammation

Real-time PCR analysis of UCP1, CD68, CCL2 and COX-2 mRNA expression in EWAT (**A**), RWAT (**B**) and iBAT (**C**) of WT and KO fed either with normal chow (NC) or a high fat diet (HFD). Correlation analysis were performed on the CD68 mRNA expression and EWAT weight (**D**, $R^2=0.432$) and CD68 mRNA expression and total adiposity (**E**, $R^2=0.325$). Data shown are mean \pm SEM; *, significantly different from NC; #, significant difference between

WT-HFD and KO-HFD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; same statistical parameters apply to # symbol.

Figure 5: Calorimetry measurements of VO_2 , VCO_2 and RER during HFD feeding.

A: Time line illustrating the protocol used for calorimetry measurements. WT and KO mice fed with either normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD) were subjected to indirect calorimetry to assess VO_2 (**B**, mL/min/kg), VCO_2 (**C**, mL/min/kg) and RER (**D**). Data shown are mean \pm SEM.

Figure 6: Modulation of VO_2 , VCO_2 and RER during HFD feeding, impact of mPGES-1 deletion.

Calorimetric analyses were performed at three time points during the feeding period. Each set of analysis comprised 3 days of monitoring; mean values were compared to baseline data obtained for each animal at the beginning of the experiment (D0) and expressed in fold changes for VO_2 (**A**), VCO_2 (**B**) and RER (**C**). Data shown are mean \pm SEM. *, significantly different from NC; #, significant difference between WT-HFD and KO-HFD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ same statistical parameters apply to # symbol.

Figure 7: mPGES-1^{-/-} mice maintained their energy expenditure during HFD feeding.

Energy expenditures (EE, kcal/day/kg) of WT and KO mice fed with either normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD) were calculated from data obtained by indirect calorimetry. Data were acquired at three different time points (**A**; D1, D45 and D72). Mean total EE for light phase, dark phase and the entire day were compared to baseline data obtained for each animal at the beginning of the experiment and expressed in fold changes (**B**). A quantification of daytime and nighttime EE revealed significant differences between WT-HFD and KO-HFD mice. **C:** Correlation analysis was performed on energy expenditures and body weight of WT and KO mice fed either with NC or HFD ($R^2=0.503$). Data shown are mean \pm SEM. *, significantly different from WT-NC; #, significant difference between WT-HFD and KO-HFD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; same statistical parameters apply to # symbol ns, not significant.

Figure 8: Deletion of mPGES-1 did not modify total physical activity

A: Monitoring of physical activity for all groups at three different time points (D1, D45 and D72). **B:** Quantification of total daily (0-24h), daytime and nighttime physical activity. Data shown are mean \pm SEM; * significantly different from WT-NC; *, $P < 0.05$.

Figure 9: mPGES-1 invalidation does not increase adipocytes browning

A: Monitoring of body core temperature ($^{\circ}C$) of WT and KO mice exposed at $23^{\circ}C$ during two days and at $8^{\circ}C$ the three following days. **B:** Real-time PCR analysis of UCP 1 and adipocytes differentiation related genes in the EWAT (**B**), RWAT(**C**) and iBAT (**D**) in WT and KO mice exposed to cold. Data shown are mean \pm SEM.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

A la suite de ces résultats, nous avons voulu explorer plus largement l'impact de l'inactivation de la mPGES-1 au cours de l'obésité. Cela a donné lieu à des résultats non publiés qui vous sont présentés ci-après.

Dans un premier temps, nous avons pesé les foies de l'ensemble de nos animaux. Nous avons ainsi observé que le poids du foie des souris KO est augmenté de façon significative par rapport aux souris WT, qu'elles soient nourries avec un régime standard, ou un régime gras (**Figure supplémentaire 1A**). A l'instar du tissu adipeux, nous avons ensuite mesuré l'expression d'ARNm de marqueurs pro-inflammatoires par PCR en temps réelle au niveau du foie (**Figure supplémentaire 1B**). Comme attendu, l'expression d'ARNm de TNF- α est augmentée de façon significative chez les souris WT-HFD par rapport aux souris WT-NC. De manière intrigante, l'expression de ce marqueur est fortement et significativement augmentée chez les souris KO-NC par rapport aux souris WT-NC et WT-HFD, mais pas par rapport aux souris KO-HFD. Concernant les marqueurs de l'infiltration des macrophages, nous n'avons pas observé de modification de l'expression de CD68 entre les différents groupes. En revanche, l'expression d'ARNm de CCL2 est diminuée de façon significative à la fois chez les souris WT-HFD et KO-HFD, en comparaison avec les souris nourries avec un régime standard. Enfin, nous avons mesuré l'expression des carnitine palmitoyltransférases 1a et b (CPT1a/b), deux enzymes essentielles à l'oxydation des acides gras, et de PPAR α , un facteur de transcription nécessaire à la β -oxydation des acides gras. L'expression d'ARNm de ce dernier n'est pas modifiée entre les différents groupes d'animaux. Concernant CPT1a et CPT1b, leurs expressions d'ARNm au niveau du foie des souris WT-HFD et KO-HFD sont significativement augmentées en comparaison avec leurs contrôles respectifs (WT-NC et KO-NC). L'expression de ces deux enzymes n'est pas modifiée entre les souris WT et KO, qu'elles soient nourries avec un régime standard ou avec un régime gras.

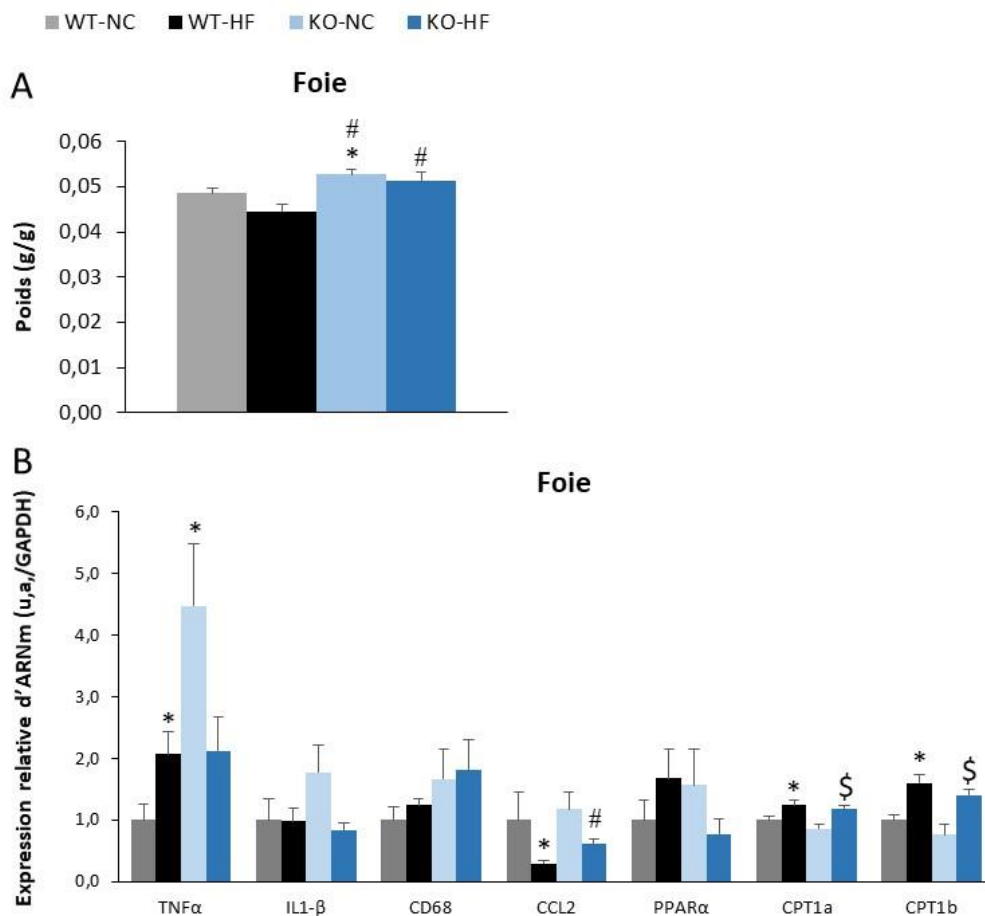


Figure supplémentaire 1 : Impact de l'inactivation de la mPGES-1 sur le métabolisme hépatique. (A) Poids du foie des souris WT et KO nourries avec un régime standard (NC) ou un régime riche en graisses (HFD) pendant 14 semaines. (B) Analyse par PCR en temps réel de l'expression d'ARNm de TNF α , IL-1 β , CD68, CCL2, PPAR α , CPT1a et CPT1b au niveau du foie de souris WT et KO nourries soit avec un régime standard (NC) ou un régime riche en graisses (HFD) pendant 14 semaines. Une ANOVA une voie suivie d'un test de Fisher post-hoc ont été utilisés pour évaluer les différences significatives entre les groupes. Les valeurs de $P > 0,05$ sont considérées comme significatives. Toutes les données sont représentées comme la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne. *, significativement différent vs WT-NC ; #, significativement différent vs WT-HFD ; \$, significativement différent vs KO-NC ; *, $P < 0,05$; les mêmes paramètres statistiques sont utilisés pour les autres symboles.

CCL2 : chémokine (C-C motif) ligand 2 ; CD68 : cluster de différenciation 68 ; CPT1a/b : carnitine palmitoyltransférases 1 a/b, IL-1 β : interleukine-1 β ; PPAR α peroxisome proliferator- activated receptor α ; TNF- α : tumor necrosis factor- α

De façon à explorer un peu plus l'effet de l'inactivation de la mPGES-1 sur le métabolisme lipidique, nous avons mesuré les taux plasmatiques d'AGL et de TG de nos animaux (**Figure supplémentaire 2A-B**). De manière étonnante, 14 semaines de régime gras n'ont pas d'impact sur les taux plasmatiques d'AGL et de TG, que ce soit chez les souris WT et les souris KO. En

revanche, il semble que l'invalidation de la mPGES-1 entraîne une augmentation significative des taux plasmatiques de TG, quel que soit le régime utilisé.

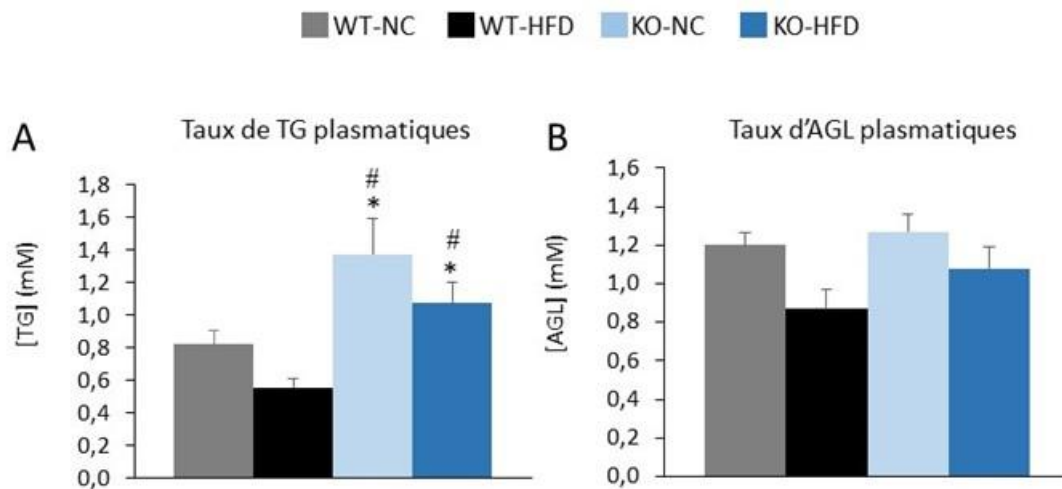


Figure supplémentaire 2 : Impact de l'invalidation de la mPGES-1 sur les taux de lipides circulants. (A) Concentration plasmatique de TG et (B) et d'AGL des souris WT et KO nourries avec un régime standard (NC) ou un régime riche en graisses (HFD) pendant 14 semaines. Une ANOVA une voie suivie d'un test de Fisher post-hoc ont été utilisés pour évaluer les différences significatives entre les groupes. Les valeurs de $P > 0,05$ sont considérées comme significatives. Toutes les données sont représentées comme la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne. *, significativement différent vs WT-NC ; #, significativement différent vs WT-HFD ; #, $P < 0.05$. AGL : acides gras libres ; TG : triglycérides.

En plus de l'expression d'UCP1 au sein des différents tissus adipeux, nous avons également quantifié l'expression d'autres marqueurs des tissus adipeux bruns et beiges (**Figure supplémentaire 3A-C**). L'expression de PGC1- α n'est pas modifiée entre les différents groupes d'animaux, quel que soit le tissu adipeux observé. De façon similaire à l'expression d'UCP1, l'expression de "cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A" (cidea), est significativement augmentée chez les souris WT-HFD par rapport aux souris WT-NC, au sein des tissus adipeux bruns et rétro-péritonéaux. Nous observons la même tendance entre les souris KO-HFD et KO-NC, mais les différences ne sont pas significatives. Enfin, les tissus adipeux bruns et rétro-péritonéaux des souris KO-HFD sont également caractérisés par une diminution significative de l'expression d'ARNm de PPAR γ par rapport aux souris WT-HFD.

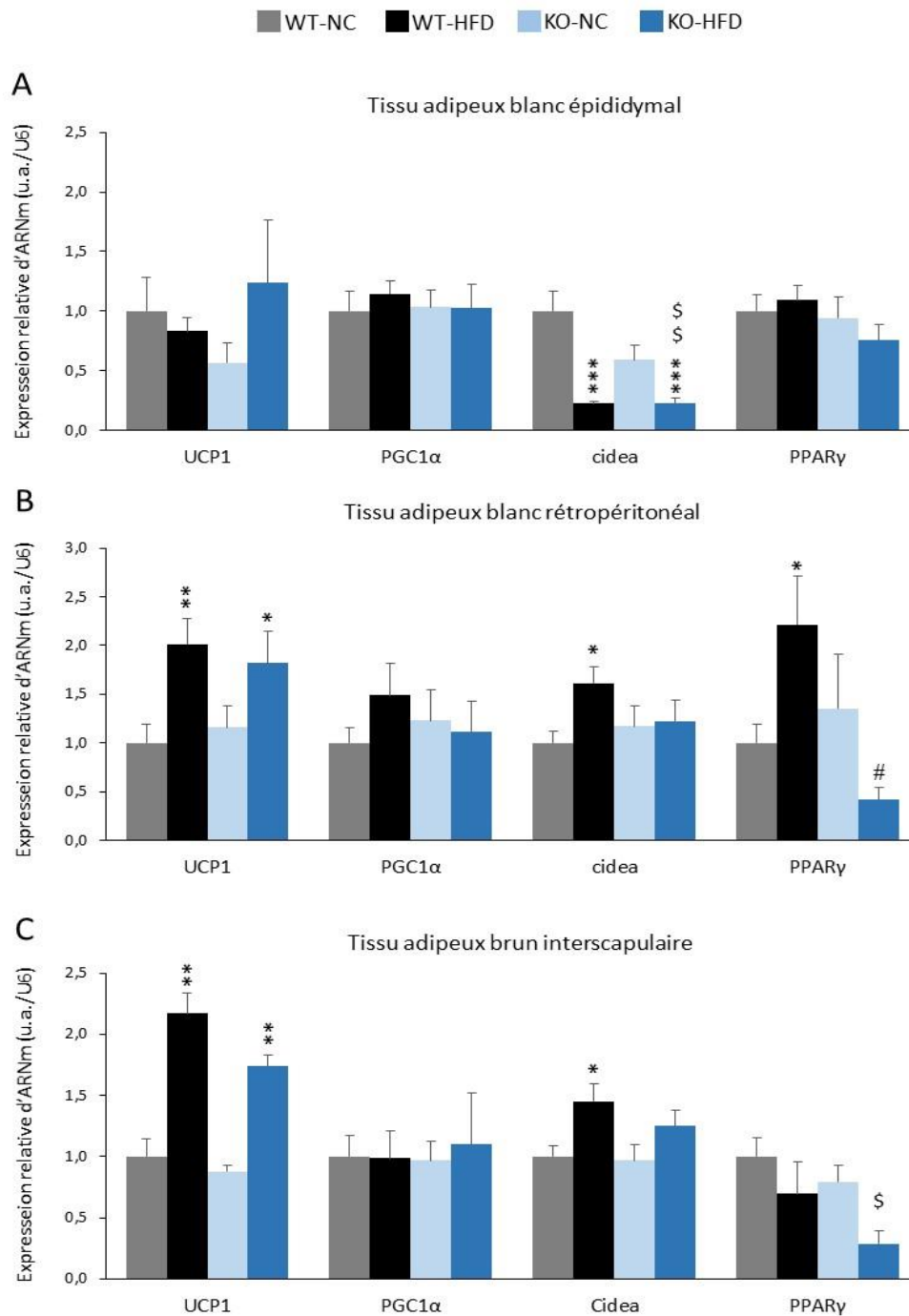


Figure supplémentaire 3 : Impact de l'inactivation de la mPGES-1 sur les marqueurs adipocytaires. (A) Expression d'ARN d'UCP1, de PGC1α, Cidea et de PPARγ au sein du tissu adipeux blanc épидidymal, (B) du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal, (C) et du tissu adipeux brun interscapulaire de souris WT et KO nourries avec un régime standard (NC) ou un régime riche en graisses (HFD) pendant 14 semaines. Une ANOVA une voie suivie d'un test de Fisher post-hoc ont été utilisés pour évaluer les différences significatives entre les groupes. Les valeurs de $P > 0,05$ sont considérées comme significatives. Toutes les données sont représentées comme la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne. *, significativement différent vs WT-NC ; #, significativement différent vs WT-HFD ; \$, significativement différent vs KO-NC ; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; les mêmes paramètres statistiques sont utilisés pour les autres symboles.

Cidea: cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A ; PGC1α : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α ; PPARγ : peroxisome proliferator- activated receptor γ ; UCP1: uncoupling protein 1.

DISCUSSION

Si l'implication de la mPGES-1 dans les pathologies inflammatoires fait l'objet de nombreux travaux, la question de son implication dans l'obésité est reléguée au second plan. De plus, les quelques données éparses disponibles à ce sujet sont contradictoires. Pour preuve, l'expression d'ARNm de la mPGES-1 est significativement augmentée au niveau du foie de souris nourries avec une nourriture standard, mais dont l'eau de boisson est complétée avec du sucre 30% (Henkel et al., 2012). En revanche, son expression est significativement diminuée au niveau du TAE de souris rendues obèses par un régime enrichi en graisses (Hétu and Riendeau, 2007). Enfin chez l'humain, la production de la PGE2 est significativement augmentée au niveau du tissu adipeux omental en comparaison avec des individus sains (García-Alonso et al., 2016). Dans ce dernier cas cependant, l'augmentation de la PGE2 résulte d'une augmentation de l'expression de COX2 et non de la mPGES-1. Cette hétérogénéité de résultats peut être expliquée par les différences dans les protocoles, les espèces (ou souches) et les régimes alimentaires utilisés, ainsi que dans les organes étudiés. Par conséquent, le rôle éventuel de la mPGES-1 dans le développement de l'obésité n'est pas encore clairement établi. Pour étudier cette question, nous avons d'abord choisi d'utiliser des souris C57BL/6 nourries avec un régime enrichi en graisse. Ce modèle classiquement utilisé dans la littérature est couramment utilisé pour étudier l'obésité. Il a pour avantage que le développement de l'obésité est proche de la pathologie humaine. De la même façon que Hétu et Riendeau (2007), nous avons observé une diminution significative de la mPGES-1 aux niveaux transcrit et protéique dans le tissu adipeux. La diminution de l'expression de la mPGES-1 pourrait contribuer à limiter l'augmentation de la lipolyse et de l'adipogenèse induite par l'excès de lipides. Notre observation va plus loin car nous avons montré que son expression est également diminuée dans le foie et le CVD de souris obèses. De plus, dans notre modèle l'expression d'ARNm de COX2 n'est pas modifiée, ce qui suggère une régulation spécifique de la mPGES-1. Cependant, nous n'avons pas observé de modification de son expression au niveau de l'hypothalamus, fait surprenant puisque cette structure centrale est fortement sujette à l'inflammation chronique au cours de l'obésité (Schulz and Engelhardt, 2005 ; Thaler et al., 2012). Je tiens ici à préciser que notre objectif primaire était d'évaluer la contribution de la mPGES-1 à l'inflammation centrale liée à l'obésité. Malgré les résultats observés sur le CVD, l'absence de régulation de la mPGES-1 au sein de l'hypothalamus nous a conduit à focaliser notre travail sur les tissus périphériques, et plus

particulièrement le tissu adipeux. La diminution spécifique de l'expression de la mPGES-1 au niveau d'organes voyant leurs fonctions altérées lors de l'obésité, nous a amené à utiliser le modèle murin mPGES-1^{-/-} pour éclaircir la question de son rôle dans cette pathologie. En effet, de façon surprenante, ce modèle transgénique n'a jamais été soumis à un régime gras. Son utilisation est renforcée par la pauvre pharmacologie disponible pour cibler cette enzyme, notamment par l'absence d'inhibiteur de la mPGES-1 commercialement disponible (Psarra et al., 2017), et l'absence d'inhibiteur efficace à la fois chez l'humain et le rongeur (la première famille réunissant les deux qualités a été décrite pour la première fois en mars 2018 ; Ding et al., 2018).

Nous montrons que l'invalidation de la mPGES-1 chez la souris entraîne une résistance à l'augmentation de l'adiposité induite par un régime enrichi en graisses. De façon intéressante, à la fin de l'étude, le poids corporel des souris KO-HFD n'est pas significativement différent de celui des souris KO-NC et WT-NC. Ce résultat pourrait être interprété comme une résistance totale à l'obésité des souris KO. Toutefois nous modulerons quelque peu cette affirmation, puisque le pourcentage d'adiposité totale obtenu grâce aux acquisitions IRM montre que cette résistance est en réalité partielle. La diminution d'adiposité des souris KO-HFD s'accompagne d'une diminution de la taille des adipocytes du tissu adipeux blanc épидидymal. Cette diminution pourrait être en partie due à une diminution de l'adipogenèse, comme le suggère la diminution significative de l'expression de PPAR γ au sein du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal, et du tissu adipeux brun. Nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus avec un modèle murin d'invalidation de la PLA2 dans le tissu adipeux (AdPLA2^{-/-}) nourri avec un régime gras (45% de lipides). Ces souris présentent une chute drastique de la production de la PGE2, ainsi qu'une diminution significative de la masse adipeuse après 15 semaines de régime, par rapport à des souris contrôles issues de la même souche (Jaworski et al., 2009). La PGI2 voit également son expression diminuée de façon significative dans ce modèle, mais elle est présente en trop faible concentration pour pouvoir se fixer sur son récepteur, qui n'est d'ailleurs pas détecté au sein du tissu adipeux. Parmi les récepteurs des PG exprimés au sein du tissu adipeux des souris contrôles, EP3 est détecté à des niveaux beaucoup plus importants qu'EP2 et EP4, tandis que les autres (EP1, le récepteur de la PGI2 et le récepteur de la PGD2) ne sont pas détectés. L'ensemble de ces résultats, combinés avec le fait que la PGE2 est la PG la plus exprimée au niveau du tissu adipeux, ont conduits les auteurs à conclure que le phénotype des souris AdPLA2^{-/-} est dû majoritairement à la diminution de la production de la PGE2 (Jaworski et al., 2009). Cependant, la PLA2 n'est pas seulement impliquée dans la voie de synthèse des PG,

mais de l'ensemble des eicosanoïdes. Parmi eux, les leucotriènes voient leur expression augmentée au sein du tissu adipeux de souris obèses (Horrillo et al., 2010), et sont également impliquées dans l'inflammation du tissu adipeux (Mothe-Satney et al., 2012). En effet, les leucotriènes inhibent l'absorption des AGL par les adipocytes (Horrillo et al., 2010). Il est donc possible que le phénotype des souris AdPLA2^{-/-} ne résulte pas uniquement d'une diminution de l'activité de l'axe PGE2/EP3. Pour preuve, des souris invalidées pour le récepteur EP3 (EP3^{-/-}) ne développent pas de résistance à l'obésité, mais à l'inverse, développent de façon spontanée une augmentation significative de l'adiposité, une hyperphagie, une inflammation du tissu adipeux blanc et une insulino-résistance (Sanchez-Alavez et al., 2007 ; Xu et al., 2016). Plus précisément, les récepteurs EP3 α et EP3 γ semblent être impliqués dans les effets antilipolytiques et anti-adipogéniques de la PGE2, tandis que le récepteur EP3 β est impliqué dans l'inhibition de NF- κ B (Xu et al., 2016a). La levée conjointe des effets des trois isoformes d'EP3 contribue donc au développement de l'obésité. Dans notre modèle, la chute de la production de la PGE2 impacte les effets de l'ensemble de ces récepteurs. Sachant que les récepteurs EP2 et EP4 ont un effet antagoniste à EP3, cela suggère que ces récepteurs jouent également un rôle au cours de l'obésité. S'il y a bien une diminution de l'adiposité totale et de l'adiposité sous-cutanée des souris KO-HFD par rapport aux souris WT-HFD, il ne semble pas y avoir de différence d'adiposité viscérale entre ces deux groupes. Cependant, pour la bonne conduite des acquisitions IRM, les souris ont été préalablement mises à jeun pendant 12h. Or, il est connu que la mise à jeun impacte préférentiellement le tissu adipeux viscéral plutôt que le tissu adipeux sous-cutané (Ding et al., 2016). Ainsi, l'absence de différence d'adiposité viscérale entre souris KO-HFD et WT-HFD pourrait être une résultante de la mise à jeun. Ceci semble être confirmé par la diminution significative du poids du TAE et du TAR, deux tissus adipeux viscéraux, chez les souris KO-HFD par rapport aux souris WT-HFD.

Il est important de noter que le modèle DBA/1 est très peu utilisé dans la littérature pour l'étude du métabolisme énergétique. Parmi les quelques données éparses disponibles, et en accord avec nos résultats, il a tout de même été montré que ces souris présentent bien une augmentation de poids corporel lorsqu'elles sont nourries avec un régime enrichi en graisses (Wei et al., 2017). Les auteurs ont tout d'abord montré qu'un tel régime permet d'améliorer la réparation du cartilage sur le court terme chez ces souris, alors qu'ils cherchaient à démontrer l'hypothèse inverse. Compte tenu de ces résultats surprenants, ils ont alors examiné les modifications métaboliques de leur modèle, et notamment dans un contexte de régime enrichi en graisses. Ils ont alors observé que l'augmentation du poids corporel induite par le régime

gras n'était associée à aucune modification de la glycémie et de l'insulinémie. Une autre étude a montré qu'un régime gras de 8 semaines n'entraînait qu'une légère augmentation des taux de TG plasmatiques (Stylianou et al., 2008). Compte tenu de ces résultats et de l'effet antilipolytique de la PGE2, nous avons quantifié les taux de TG et d'AGL circulants de nos animaux. De façon surprenante, nous n'avons pas détecté d'élévation des taux de TG plasmatiques chez les souris WT-HFD en comparaison avec les souris WT-NC, comme cela peut être classiquement observé chez des souris C57Bl/6. Le fond génétique des souris DBA/1 n'est peut-être pas étranger au fait que les souris WT et KO ne présentent pas d'élévation du taux de TG plasmatiques après 14 semaines de régime gras. En revanche, nous avons observé une augmentation significative des taux de TG plasmatiques des souris KO par rapport aux souris WT, quel que soit le type de régime. L'inhibition de la production de VLDL par la PGE2 (Henkel et al., 2012), et donc du transport de TG, pourrait fournir une explication à nos observations. Pour ce qui est des taux d'AGL plasmatiques, nous n'avons pas mesuré de différences significatives entre l'ensemble des groupes, mais que leur augmentation ne soit pas systématique à la suite d'un régime HFD (Huang et al., 2007 ; Fujii et al., 2008 ; Park et al., 2011).

La résistance à l'augmentation de l'adiposité induite par une alimentation riche en graisses chez les souris mPGES-1^{-/-} s'accompagne d'une diminution de l'infiltration des macrophages pro-inflammatoires au sein des tissus adipeux blancs viscéraux. Ce résultat s'avère intéressant car un déséquilibre de la balance des macrophages M1/M2, en faveur des macrophages M1, contribue au dysfonctionnement du tissu adipeux caractéristique de l'obésité (Wellen and Hotamisligil, 2003 ; Sun et al., 2012). Nos résultats sont cohérents avec le fait que l'inhibition d'EP3 sur des cellules 3T3-L1 engendre une diminution de l'expression de CCL2 et d'IL-6 (Chan et al., 2016). En revanche il a été montré que la PGE2 active les macrophages M2 (Luan et al., 2015) en se fixant sur son récepteur EP4 (Yasui et al., 2015) et exercerait un effet anti-inflammatoire sur le tissu adipeux (García-Alonso et al., 2016). Il semble donc que l'effet de la PGE2 sur l'inflammation du tissu adipeux ne soit pas encore complètement compris. Comme nous en avons discuté dans l'introduction, les effets pro- et anti-inflammatoires de la PGE2 peuvent être concomitants, mais ses effets anti-inflammatoires peuvent être masqués par des effets pro-inflammatoires plus marqués dans le cadre de pathologies inflammatoires (Frolov et al., 2013). Compte tenu de nos résultats et des travaux de la littérature, nous proposons que ce soit également le cas au cours de l'obésité induite par un régime gras. A noter que, contrairement à nos observations, Wei et ses collaborateurs n'ont

pas mis en évidence d'élévation de l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux blanc de souris DBA/1 nourries avec un régime gras (Wei et al., 2017), et vont même jusqu'à suggérer que cette souche est résistante à l'obésité. L'ensemble de nos travaux viennent modérer ce constat, même si les différentes durées de régime utilisées (8 semaines pour Wei et al., vs 14 semaines dans notre étude) contribuent probablement à expliquer en partie ces résultats divergents.

L'inflammation du tissu adipeux des souris WT-HFD s'accompagne également d'une hypertrophie adipocytaire qui n'est pas observable chez les souris KO-HFD. De plus, le taux de leptine plasmatique des souris WT-HFD est augmenté de façon importante et significative par rapport aux souris WT-NC, mais est partiellement restauré chez les souris KO-HFD. Cela suggère donc que l'inactivation de la mPGES-1 limite la dysfonction du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité, et par conséquent, le développement même de la pathologie. De façon cohérente avec ces observations, l'ajout exogène de PGE2 sur des explants de tissu adipeux blanc d'individus obèses stimule leur production de leptine (Fain et al., 2001). En revanche, les souris EP3^{-/-} présentent une élévation significative des taux circulants de leptine (Ceddia et al., 2016). A la vue de nos résultats, il est possible que l'effet de la PGE2 sur la sécrétion de la leptine ne soit pas uniquement médié par EP3. Néanmoins, il est également possible que la diminution de l'inflammation du tissu adipeux et de l'adiposité contribue à restaurer de façon indirecte les taux circulants de leptine. En plus de son effet sur la prise alimentaire et les dépenses énergétiques, la leptine exerce également des effets pro-inflammatoires et est impliquée dans l'immunité innée et adaptative (La Cava and Matarese, 2004) suggérant un rôle potentiel dans l'inflammation liée à l'obésité (Tilg and Moschen, 2006). Nous ne pouvons donc pas exclure que la diminution de l'inflammation du tissu adipeux des souris KO-HFD résulte en partie d'une diminution de la production de leptine.

Comme l'inflammation liée à l'obésité ne se limite pas au seul tissu adipeux, nous nous sommes également intéressés au foie des souris mPGES-1. Or le poids du foie des animaux KO-HFD est significativement augmenté par rapport aux souris WT-HFD. L'augmentation du poids du foie dans des modèles d'obésité induite est souvent corrélée à une augmentation des dépôts ectopiques de graisses, et à une augmentation de la lipolyse pouvant favoriser l'apparition d'une stéatose hépatique (Li et al., 2008 ; Jaworski et al., 2009 ; Liu et al., 2016). De manière surprenante, certaines données de la littérature montrent un effet délétère de la PGE2 sur la stéatose hépatique. En particulier, elle contribuerait au développement de stéatose hépatique en inhibant la synthèse de VLDL, de l'expression de l'ATGL et de la carnitine

palmitoyltransférase 1 (CPT1; Henkel et al., 2012). Cette dernière permet le passage des acyl-CoA du cytoplasme vers l'espace inter-membranaire mitochondrial, et est indispensable à l'oxydation des acides gras. En outre, les rongeurs rendus obèses à l'aide d'un régime gras présentent une diminution de l'expression de CPT1 au niveau hépatique (Henkel et al., 2012 ; Xu et al., 2015), CPT1 favorisant l'accumulation lipidique et l'apparition de la stéatose hépatique. Étonnamment, dans notre cas il semble que les expressions d'ARNm de CPT1a et b soient significativement augmentées chez les souris HFD, quel que soit le génotype. De plus, nous n'avons pas observé de différence d'expression de ces marqueurs entre les animaux WT et KO. Ces résultats ne corrélaient pas avec ceux d'Henkel et al., qui montrent une inhibition de CPT1 induite par la PGE2 (Henkel et al., 2012). Néanmoins, cet effet de la PGE2 a été démontré uniquement dans un contexte *in vitro* et non *in vivo*. De plus, il semble qu'il y ait des contradictions concernant l'effet de l'axe COX2/mPGES-1/PGE2 sur la stéatose hépatique. En effet, des souris surexprimant COX2 de façon spécifique au niveau du foie montre une élévation des taux de PGE2, ainsi qu'une résistance à l'apparition de la stéatose hépatique (Francés et al., 2015). Des injections intraveineuses de PGE2 chez la souris diminuent le niveau de fibrose hépatique, mécanisme étroitement lié à la stéatose hépatique (Francés et al., 2015). Ces résultats suggèrent donc un effet protecteur de la PGE2 sur le foie. Pour ajouter plus de complexité, il a été montré que les souris mPGES-1^{-/-} présentent une meilleure régénération hépatique, ainsi qu'une augmentation de l'infiltration de macrophages anti-inflammatoires, après une atteinte hépatique aigüe (Nishizawa et al., 2018). Cet effet délétère de la PGE2 serait médié par son récepteur EP4, puisque des résultats similaires ont été obtenus avec un modèle de souris transgénique EP4^{-/-}, et avec un traitement avec un inhibiteur d'EP4.

L'obésité et la stéatose hépatique étant associées à une augmentation de l'inflammation hépatique, nous avons mesuré l'expression d'ARNm des marqueurs pro-inflammatoires au niveau du foie de nos animaux transgéniques. De façon intrigante, les expressions du TNF- α et de l'IL-1 β sont significativement augmentées chez les souris KO-NC par rapport aux souris WT-NC. En revanche, après 14 semaines de régime gras, nous n'avons pas observé de différence d'expression de ces cytokines entre les deux génotypes. Il semble donc que les différences d'inflammation hépatique entre souris WT et KO présentent à l'état basal, disparaissent au cours du développement de l'obésité. Nous n'avons pas non plus observé de différences d'expression des marqueurs de l'infiltration des macrophages au niveau du foie entre les deux génotypes. Cependant, il existe d'autres cellules immunitaires au sein du foie susceptibles d'intervenir dans son inflammation, comme les cellules de Kupffer et les cellules

stellaires. D'ailleurs, très récemment une approche de ciblage spécifique a permis de montrer que l'action anti-fibrogénique de la PGE2 serait médiée par l'activation d'epac-1 au niveau des cellules hépatiques stellaires, entraînant une diminution de leur activation (Schippers et al., 2017). Conformément à ces résultats, la PGE2 inhibe l'expression des micros ARN miR-23a et miR-28 au niveau des cellules hépatiques stellaires de souris, et entraîne la diminution de leur prolifération et de leur apoptose.

Après nous être intéressé au phénotype global des souris KO-HFD, nous avons examiné de façon plus précise comment celui-ci se met en place au cours du temps. Il se trouve que la résistance à l'adiposité induite par un régime gras observée chez les souris KO ne se met pas en place en début du régime. En effet, leur gain de poids corporel évolue de façon identique aux souris WT-HFD durant les 3 premières semaines de régimes. Ce n'est qu'après cette période que le gain de poids corporel des souris KO-HFD commencent à diminuer de façon progressive pour atteindre une différence significative à partir de 9 semaines de régimes, qui se maintient et s'amplifie jusqu'à son terme. De façon similaire aux souris KO-HFD, les souris AdPLA2^{-/-} nourries avec un régime gras ne présentent pas de différence de poids corporel pendant les 7-8 premières semaines de régime (Jaworski et al., 2009). En plus du gain de poids corporel, les dépenses énergétiques des souris évoluent également en fonction du temps de régime. Les dépenses énergétiques des souris WT-HFD et KO-HFD sont augmentées après 7 semaines de régime par rapport aux souris WT-NC et KO-NC, sans qu'il y ait de différence entre les génotypes. Une explication possible serait que l'augmentation des dépenses énergétiques en réponse à un régime gras contribue à enrayer l'augmentation d'adiposité, et à réguler l'excès de lipides circulants (Li et al., 2015). En revanche, après 12 semaines de régime les souris WT-HFD arborent des dépenses énergétiques significativement plus faibles que les souris WT-NC et les souris KO-HFD, qui conservent des dépenses énergétiques stables. Ce résultat est renforcé par la corrélation négative entre le gain de poids corporel et les dépenses énergétiques de nos souris. Comme nous l'avons vu en introduction (paragraphe I.5.2.c), l'effet d'un régime gras sur les dépenses énergétiques fait encore débat, et la très grande majorité des études ne comportent qu'une seule mesure des dépenses énergétiques, en fin ou en début de régime (Kirchner et al., 2012 ; Nasteska et al., 2014 ; Choi et al., 2015 ; Nie et al., 2016 ; Shahid et al., 2016). Nos travaux contribuent à renforcer le fait que la période à laquelle sont faites ces mesures est déterminant dans l'interprétation des résultats. C'est également la raison pour laquelle nous avons mesuré les dépenses énergétiques de nos animaux avant le début du régime, de façon à les comparer avec les dépenses énergétiques mesurées en cours de régime. Si la

résistance à l'augmentation de l'adiposité des souris KO-HFD n'est pas expliquée par une diminution de la prise alimentaire sur l'ensemble du régime, la conservation de dépenses énergétiques stables en fin de régime peut cependant y contribuer. En plus des dépenses énergétiques, les enregistrements de calorimétrie indirecte nous ont permis d'analyser l'évolution du « respiratory exchange ratio » (RER). Comme attendu, le RER des souris WT-HFD et KO-HFD reste assez linéaire tout au long du régime, que ce soit en phase diurne ou en phase nocturne. Ces résultats indiquent que ces souris oxydent préférentiellement des lipides, et illustrent bien l'impact du régime gras sur le métabolisme énergétique. De manière intéressante, le RER des animaux KO-HFD est légèrement, mais significativement, diminué par rapport aux souris WT-HFD après 1 et 45 jours de régime. Ceci suggère que les souris KO oxyde plus de lipides que les souris WT lorsqu'elles sont nourries avec un régime gras, ce qui est cohérent avec le rôle antilipolytique de la PGE2. En revanche, il n'y a plus de différence de RER entre ces deux groupes après 72 jours de régime.

Les évolutions conjointes du gain de poids corporel et des dépenses énergétiques illustrent le fait que l'obésité est caractérisée par différentes phases d'inflammation (Thaler et al., 2012 ; Williams et al., 2014 ; Bai and Sun, 2015 ; Le Thuc et al., 2017). L'inflammation se met en place très rapidement au niveau central et périphérique (de un à trois jours de régime gras) pour ensuite diminuer. La deuxième phase d'inflammation intervient après une période de temps qui varie en fonction de la souche animale et du type de régime utilisé. A la différence de la première phase, la deuxième ne semble pas se résoudre et c'est elle qui est associée aux dysfonctionnements des organes altérés dans un contexte d'obésité, en particulier le tissu adipeux. Elle est notamment due à la lipotoxicité. Nous proposons donc que la diminution de la production de la PGE2 due à l'inactivation de la mPGES-1, limite l'inflammation du tissu adipeux liée à l'excès de la circulation et du stockage des lipides. De façon intéressante, des travaux récents ont montré que des traitements anti-inflammatoires, en particulier ceux ciblant la polarisation des macrophages, permettent de réduire le poids corporel (Kodama et al., 2015), et l'adiposité (Bashir et al., 2016 ; Toita et al., 2016 ; Tsai et al., 2018), chez des souris nourries avec un régime riche en graisses. D'un autre côté, nous ne pouvons exclure que les diminutions du poids corporel et de l'adiposité des souris KO-HFD soient à l'origine de la réduction de l'inflammation du tissu adipeux (Wensveen et al., 2015).

Nous nous sommes également attachés à déterminer l'origine des différences de dépenses énergétiques observées pendant la période nocturne entre les souris WT-HFD et KO-

HFD après 10 semaines de régime. Premièrement, notre étude ne permet d'impliquer une différence de métabolisme basal. En effet, celui-ci ne peut être mesuré qu'en absence d'activité, à jeun et en condition de thermoneutralité, ce qui ne correspond pas à nos modalités de mesure. L'activité physique totale contribue certainement à l'augmentation des dépenses énergétiques des souris KO-HFD par rapport aux souris KO-NC, observées après 1 et 45 jours de régime (Figure 6). Nous observons les mêmes tendances concernant les souris WT-HFD, mais les différences ne sont pas significatives. De manière intéressante, après 72 jours de régime, l'activité physique totale ne contribue pas à l'augmentation des dépenses énergétiques observées chez les souris KO-HFD par rapport aux souris WT-HFD. Compte tenu de ces résultats, nous nous sommes naturellement intéressés au tissu adipeux brun, principal effecteur de la thermogenèse non frissonnante, et contribuant lui aussi aux dépenses énergétiques. Nous n'avons pas observé de différence d'expression d'ARNm des marqueurs de l'activation du tissu adipeux brun entre les deux génotypes nourris avec un régime gras. Cependant, l'expression de CCL2 dans le tissu adipeux brun des souris WT-HFD est significativement augmentée par rapport aux souris WT-NC, signe d'une inflammation accrue. Or, l'inflammation du tissu adipeux brun est un facteur pouvant entraîner la diminution de la fixation d'AGL à UCP1, donc à son bon fonctionnement, favorisant ainsi la diminution des dépenses énergétiques (Nicholls and Rial, 2016). En revanche, et de façon surprenante, l'expression d'ARNm d'UCP1 est significativement augmentée chez les souris WT-HFD et KO-HFD, en comparaison des souris WT-NC et KO-NC, ce qui ne corrèlent pas avec les mesure de dépenses énergétiques. Compte tenu de l'effet de la PGE2 dans le phénomène de brunisation (García-Alonso and Clària, 2014 ; García-Alonso et al., 2016), et de l'implication de ce mécanisme dans les dépenses énergétiques et la résistance à l'obésité (Yang et al., 2015 ; Choi et al., 2016), nous avons également quantifié l'expression de ses marqueurs au sein des TAE et TAR. De la même manière que pour le tissu adipeux brun, les souris WT-HFD et KO-HFD ne présentent pas de différence d'expression des marqueurs du tissu adipeux beige, mais l'inflammation des TAE et TAR des souris WT-HFD est plus importante par rapport à tous les autres groupes d'animaux. La question de l'altération de la capacité thermogénique de ces tissus, malgré la non-modification de l'expression d'UCP1 se pose également. A noter, que nous avons observé qu'un régime gras induit une augmentation de l'expression des marqueurs de la brunisation au niveau du TAR, à l'inverse du TAE qui ne présente aucune augmentation d'expression des marqueurs étudiés. Une explication possible réside dans le fait que le TAR possède une innervation sympathique plus importante que le TAE (Giordano et al., 2005). Ces résultats intrigants nous ont poussés à exposer au froid les souris WT et KO, un protocole plus à même de stimuler la thermogenèse non frissonnante chez

le rongeur. Les résultats obtenus ont montré que les deux génotypes ne présentent aucune différence en termes de température corporelle et d'activation des tissus adipeux bruns et beiges, durant l'exposition au froid. En résumé, il semble peu probable que l'augmentation des dépenses énergétiques des souris KO-HFD soit due à une augmentation de l'activité thermogénique des tissus adipeux bruns et beiges.

Si le phénotype que nous observons est dû en partie à l'absence de la mPGES-1 et à la chute de la production de la PGE2 en condition inflammatoire, il a cependant été montré que le modèle mPGES-1^{-/-} est caractérisé par une augmentation de l'expression des autres PG, la PGI2 en particulier (Wang et al., 2006 ; Wu et al., 2009). Il semble que cette dernière exerce des effets anti-inflammatoires puisque des analogues de la PGI2 inhibe la différenciation *in vitro* des lymphocytes T et des cellules dendritiques, et stimule chez la souris la production de l'IL-10 (Zhou et al., 2007). De plus, la PGI2 exerce une action anti-fibrotique (Lovgren et al., 2006) une action antilipolytique (Chatzipanteli et al., 1992), et favorise la conversion des adipocytes blancs en adipocytes beiges (Vegiopoulos et al., 2010 ; Pisani et al., 2014). Il est donc possible que l'augmentation de la production de la PGI2 au sein du modèle mPGES-1^{-/-} puisse partiellement contribuer au phénotype observé.

En conclusion, nous avons montré que l'invalidation de la mPGES-1, et de la diminution de la production de la PGE2 en condition inflammatoire qui en découle, entraîne une diminution du poids corporel et de l'adiposité totale après un régime gras. Ceci s'accompagne d'une diminution de l'expression des marqueurs de l'infiltration des macrophages, et d'un maintien de dépenses énergétiques stables. Nous suggérons que l'absence de la mPGES-1 permet de prévenir l'inflammation et le dysfonctionnement du tissu adipeux blanc liée à l'obésité, et donc d'enrayer la progression de la maladie. De ce fait, l'inhibition de la mPGES-1 pourrait constituer une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'obésité.

PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a permis de démontrer pour la première fois que l'inactivation de la mPGES-1 dans un modèle murin permet de retarder le développement de l'obésité induite par l'alimentation, notamment en limitant l'inflammation du tissu adipeux. Au vu de la nécessité de trouver une solution thérapeutique au problème de l'obésité, la mPGES-1 pourrait constituer une nouvelle cible potentielle pour traiter la maladie. Le MK-886 est un composé anti-inflammatoire qui inhibe la « 5-Lipoxygénase-activating protein », une protéine de la même famille que la mPGES-1. La découverte de sa capacité à inhiber également la mPGES-1 humaine, marqua le début de la recherche dans le développement d'inhibiteurs de la mPGES-1 (Mancini et al., 2001). Par la suite, de nombreux inhibiteurs de la mPGES-1 furent basés sur la structure moléculaire du MK-886 (Riendeau et al., 2005 ; Bahia et al., 2014). Malheureusement, si beaucoup de composés développés inhibent efficacement la mPGES-1 *in vitro*, ils possèdent en revanche des propriétés pharmacocinétiques pauvres, qui résultent notamment de leur forte liaison avec des protéines sériques et une faible biodisponibilité (Bahia et al., 2014). Néanmoins, le fort intérêt thérapeutique de ces molécules a contribué à accroître de façon considérable la recherche de nouveaux candidats potentiels (Psarra et al., 2017). Très peu de composés ont atteint le stade de la recherche clinique et aucun n'est encore arrivé sur le marché (Psarra et al., 2017), mais il existe désormais des inhibiteurs puissants à la fois chez l'humain et chez le rongeur, rendant possible leur utilisation dans des modèles précliniques en vue de tests chez l'humain (Ding et al., 2018). Il serait donc intéressant d'utiliser ces inhibiteurs chez un modèle murin d'obésité induite, afin de tester l'effet d'une inhibition pharmacologique de la mPGES-1 sur l'inflammation chronique liée à l'obésité. Dans un premier temps, le traitement serait réalisé de manière préventive. En plus de répondre à la première hypothèse, ceci permettrait de confirmer et comparer les résultats obtenus avec notre modèle murin transgénique. A la suite de ces résultats, il pourrait être envisagé de réaliser un traitement secondairement à la mise en place de l'obésité, dans le but d'investiguer un potentiel effet curatif de l'inhibition de la mPGES-1. Comme nous l'avons évoqué dans la discussion, il existe très peu de travaux étudiant le métabolisme énergétique de la souche murine DBA/1, qui serait peut-être moins apte à développer une obésité induite par un régime gras (Wei et al., 2017). Si les souris WT-HFD présentent bien une augmentation significative du poids corporel, de l'adiposité et de l'inflammation du tissu adipeux après un régime gras de 14 semaines, ces augmentations sont plus modestes que celles observées classiquement. Par conséquent, il

pourrait être intéressant d'inhiber la mPGES-1 de façon pharmacologique chez une souche développant plus facilement une obésité induite par l'alimentation, comme par exemple la souche C57Bl/6.

La mPGES-1 étant produite par une grande variété de types cellulaires, il est difficile de déterminer le rôle exact des différents tissus et organes dans le phénotype que nous avons observé. Nous avons d'ailleurs vu *via* l'étude de KO global que le phénotype peut être très complexe. Une perspective intéressante serait alors de développer un modèle murin où la mPGES-1 serait invalidée de façon tissu-spécifique. A la vue de nos résultats et du rôle majeur du tissu adipeux au cours du développement de l'obésité, l'invalidation de la mPGES-1 dans ce tissu constituerait une piste de recherche intéressante. Pour ce faire, il faudrait d'abord acquérir des souris floxées pour la mPGES-1, qui ont déjà été décrites dans la littérature (Chen et al., 2013). Ensuite, nous nous attacherons à acquérir des souris exprimant la CRE recombinase spécifiquement au niveau du tissu adipeux. De telles souris ont également été décrites dans la littérature et sont disponibles au sein des laboratoires Jackson (Eguchi et al., 2011 ; Jeffery et al., 2014). Dans ce modèle, la CRE recombinase est sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine. En croisant ces deux souches, nous pourrions ainsi obtenir à terme des souris mâles reproductrices invalidées pour la mPGES-1 au niveau du tissu adipeux (**Figure 22**). Mais en dehors du tissu adipeux, qu'en est-t-il des autres organes ? Comme il en a été discuté, le rôle de l'axe mPGES-1/PGE2 dans le métabolisme du foie, la fibrose et la stéatose hépatique reste encore à préciser. Il a déjà été montré qu'une surexpression de COX2 au niveau hépatique entraîne une résistance à l'obésité induite (Francés et al., 2015). Si la production de la PGE2 est bien augmentée dans ce modèle, l'expression des autres prostanoïdes n'a pas été évaluée. Il est donc possible que le phénotype ne soit pas simplement dû à l'augmentation de la PGE2. L'invalidation spécifique de la mPGES-1 au niveau du foie permettrait de répondre de façon claire à cette question. Nous opterions pour la même stratégie utilisée pour l'invalidation de la mPGES-1 au sein du tissu adipeux. En effet des souris exprimant la CRE recombinase au niveau du foie sont disponibles dans le commerce (Fernandez-Marcos et al., 2012 ; El Ouaamari et al., 2013).

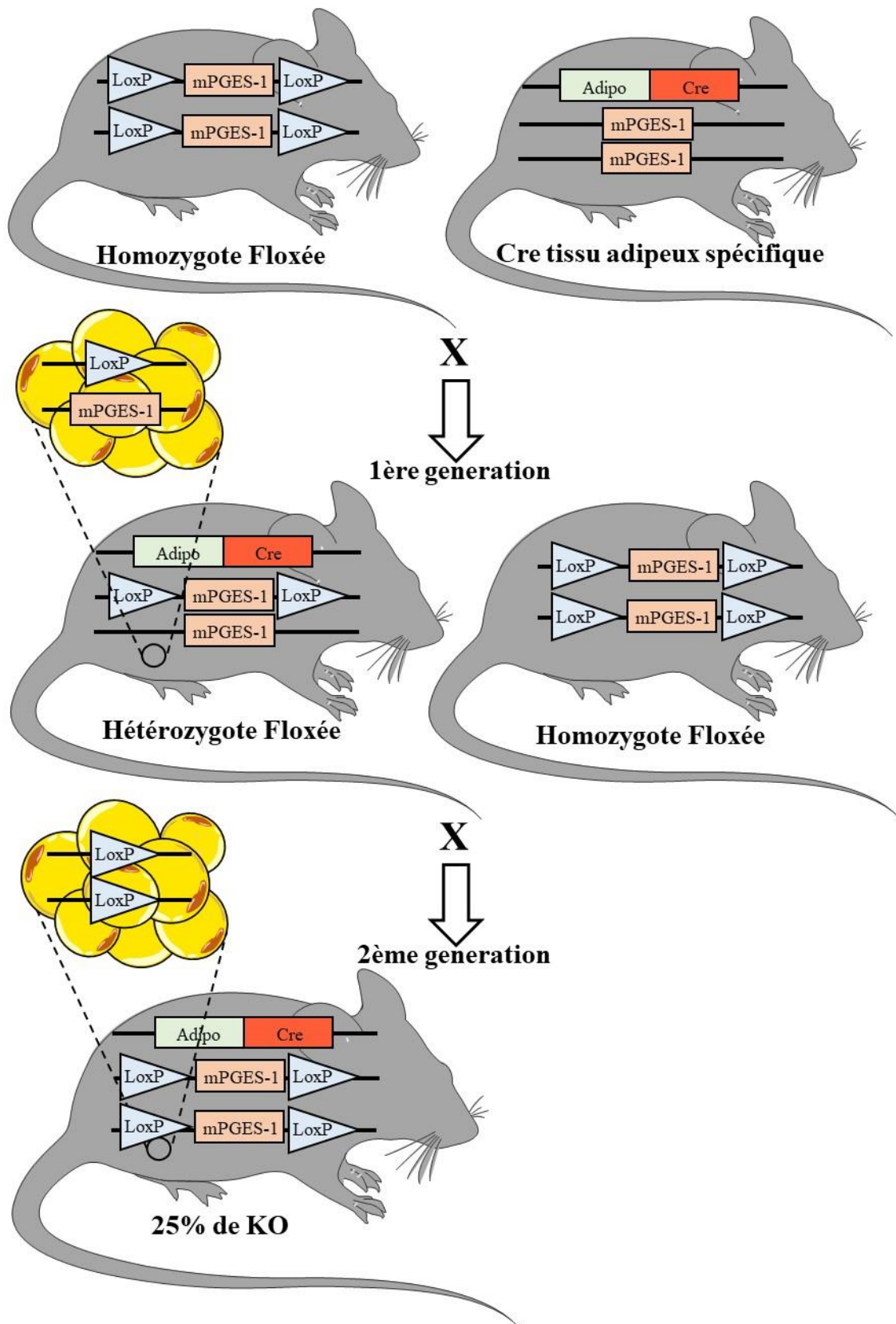


Figure 22 : Production de souris invalidées pour la mPGES-1 spécifiquement au niveau du tissu adipeux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aburasayn, H., Al Batran, R., and Ussher, J.R. (2016). Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *311*, E423-435.
- 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.
- Ahmed, M., and Gaffen, S.L. (2010). IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 449–453.
- Alcalá, M., Calderon-Dominguez, M., Bustos, E., Ramos, P., Casals, N., Serra, D., Viana, M., and Herrero, L. (2017). Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci. Rep.* *7*, 16082.
- Alkhoury, N., Dixon, L.J., and Feldstein, A.E. (2009). Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are Created Equal. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 445–451.
- Amin, M. (1989). Simultaneous determination of prostaglandins (PG) E₂, A₂ and B₂ and stability studies of PGE₂ in pharmaceutical preparations by ion-pair reversed phase HPLC. *Pharm. Acta Helv.* *64*, 45–50.
- Anderson, K.V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 13–19.
- Aoki, T., Nishimura, M., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Furuyashiki, T., Kataoka, H., Kitaoka, S., Ishibashi, R., Ishibazawa, A., Miyamoto, S., et al. (2011). PGE₂-EP₂ signalling in endothelium is activated by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF- κ B. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 1237–1249.
- Argente-Arizón, P., Freire-Regatillo, A., Argente, J., and Chowen, J.A. (2015). Role of Non-Neuronal Cells in Body Weight and Appetite Control. *Front. Endocrinol.* *6*.
- Asaki, T., Konishi, M., Miyake, A., Kato, S., Tomizawa, M., and Itoh, N. (2004). Roles of fibroblast growth factor 10 (Fgf10) in adipogenesis in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* *218*, 119–128.
- Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J. Cell Sci.* *125*, 4963–4971.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15718–15723.
- Bagdade, J.D., Bierman, E.L., and Porte, D. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest.* *46*, 1549–1557.

- Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Di Franco, A., Borgogni, E., Frontera, S., Nesi, G., Liotta, F., et al. (2012). Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One* 7, e36569.
- Bahia, M.S., Katare, Y.K., Silakari, O., Vyas, B., and Silakari, P. (2014). Inhibitors of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 Enzyme as Emerging Anti-Inflammatory Candidates. *Med. Res. Rev.* 34, 825–855.
- Bai, Y., and Sun, Q. (2015). Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 16, 127–136.
- Bandet, C.L., Mahfouz, R., Véret, J., Sotiropoulos, A., Poirier, M., Giussani, P., Campana, M., Philippe, E., Blachnio-Zabielska, A., Ballaire, R., et al. (2018). Ceramide Transporter CERT Is Involved in Muscle Insulin Signaling Defects Under Lipotoxic Conditions. *Diabetes* 67, 1258–1271.
- Banks, W.A., Farr, S.A., and Morley, J.E. (2006). The effects of high fat diets on the blood–brain barrier transport of leptin: Failure or adaptation? *Physiol. Behav.* 88, 244–248.
- Banks, W.A., Farr, S.A., Salameh, T.S., Niehoff, M.L., Rhea, E.M., Morley, J.E., Hanson, A.J., Hansen, K.M., and Craft, S. (2018). Triglycerides cross the blood–brain barrier and induce central leptin and insulin receptor resistance. *Int. J. Obes.* 42, 391–397.
- Baroody, R.A., and Bito, L.Z. (1981). The impermeability of the basic cell membrane to thromboxane-B₂, prostacyclin and 6-keto-PGF₁α. *Prostaglandins* 21, 133–142.
- Barrachina, M.D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J.Y., and Taché, Y. (1997). Synergistic interaction between leptin and cholecystikinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10455–10460.
- Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., and Khan, F. (2016). Amelioration of obesity-associated inflammation and insulin resistance in c57bl/6 mice via macrophage polarization by fish oil supplementation. *J. Nutr. Biochem.* 33, 82–90.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.
- Bazzani, L., Donnini, S., Finetti, F., Christofori, G., and Ziche, M. (2017). PGE₂/EP3/SRC signaling induces EGFR nuclear translocation and growth through EGFR ligands release in lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget* 8, 31270–31287.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9048–9052.
- Bergström, S., and Sjövall, J. (1957). The isolation of Prostaglandin. *Acta Chem. Scand.* 11, 1086.
- Bergström, S., and Sjövall, J. (1960). The isolation of prostaglandin E from sheep prostate glands. *Acta Chem. Scand.* 14, 1701–1705.

- Berndt, J., Klöting, N., Kralisch, S., Kovacs, P., Fasshauer, M., Schön, M.R., Stumvoll, M., and Blüher, M. (2005). Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 54, 2911–2916.
- Berry, R., and Rodeheffer, M.S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* 15, 302–308.
- Birrell, M.A., Maher, S.A., Dekkak, B., Jones, V., Wong, S., Brook, P., and Belvisi, M.G. (2015). Anti-inflammatory effects of PGE2 in the lung: role of the EP4 receptor subtype. *Thorax* 70, 740–747.
- Blevins, J.E., Chelikani, P.K., Haver, A.C., and Reidelberger, R.D. (2008). PYY(3-36) induces Fos in the arcuate nucleus and in both catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the nucleus tractus solitarius of rats. *Peptides* 29, 112–119.
- Boini, K.M., Zhang, C., Xia, M., Poklis, J.L., and Li, P.-L. (2010). Role of Sphingolipid Mediator Ceramide in Obesity and Renal Injury in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 839–846.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 5789–5795.
- Borgeat, P., and Naccache, P.H. (1990). Biosynthesis and biological activity of leukotriene B4. *Clin. Biochem.* 23, 459–468.
- Boslem, E., Meikle, P.J., and Biden, T.J. (2012). Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Islets* 4, 177–187.
- Braga, T.T., Agudelo, J.S.H., and Camara, N.O.S. (2015). Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front. Immunol.* 6.
- Broeders, E.P.M., Vijgen, G.H.E.J., Havekes, B., Bouvy, N.D., Mottaghy, F.M., Kars, M., Schaper, N.C., Schrauwen, P., Brans, B., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2016). Thyroid Hormone Activates Brown Adipose Tissue and Increases Non-Shivering Thermogenesis - A Cohort Study in a Group of Thyroid Carcinoma Patients. *PLoS ONE* 11.
- Brydon, L. (2011). Adiposity, leptin and stress reactivity in humans. *Biol. Psychol.* 86, 114–120.
- Buller, K.M. (2001). Circumventricular Organs: Gateways to the Brain Role Of Circumventricular Organs In Pro-Inflammatory Cytokine-Induced Activation Of The Hypothalamic– Pituitary–Adrenal Axis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28, 581–589.
- Bulló, M., García-Lorda, P., Megias, I., and Salas-Salvadó, J. (2003). Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes. Res.* 11, 525–531.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., and Vasson, M.P. (2003). Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic. Res.* 37, 809–814.

- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.
- Ceddia, R.P., Lee, D., Maulis, M.F., Carboneau, B.A., Threadgill, D.W., Poffenberger, G., Milne, G., Boyd, K.L., Powers, A.C., McGuinness, O.P., et al. (2016). The PGE2 EP3 Receptor Regulates Diet-Induced Adiposity in Male Mice. *Endocrinology* 157, 220–232.
- Chan, M.M.-Y., and Moore, A.R. (2010). Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 6418–6426.
- Chan, P.-C., Hsiao, F.-C., Chang, H.-M., Wabitsch, M., and Hsieh, P.S. (2016). Importance of adipocyte cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2–prostaglandin E receptor 3 signaling in the development of obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *FASEB J.* 30, 2282–2297.
- Chandrasekharan, S., Foley, N.A., Jania, L., Clark, P., Audoly, L.P., and Koller, B.H. (2005). Coupling of COX-1 to mPGES1 for prostaglandin E2 biosynthesis in the murine mammary gland. *J. Lipid Res.* 46, 2636–2648.
- 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.
- Chau, Y.-Y., Bandiera, R., Serrels, A., Martínez-Estrada, O.M., Qing, W., Lee, M., Slight, J., Thornburn, A., Berry, R., McHaffie, S., et al. (2014). Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat. Cell Biol.* 16, 367–375.
- Chaurasia, B., and Summers, S.A. (2015). Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 26, 538–550.
- Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D., and Lazar, M.A. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135, 798–800.
- Chen, L., Yang, G., Xu, X., Grant, G., Lawson, J.A., Bohlooly-Y, M., and FitzGerald, G.A. (2013). Cell Selective Cardiovascular Biology of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1. *Circulation* 127, 233–243.
- Chen, M.-P., Chung, F.-M., Chang, D.-M., Tsai, J.C.-R., Huang, H.-F., Shin, S.-J., and Lee, Y.-J. (2006). Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 295–299.
- Chen, X., Gong, Q., Wang, C.-Y., Zhang, K., Ji, X., Chen, Y.-X., and Yu, X.-J. (2016). High-Fat Diet Induces Distinct Metabolic Response in Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Knockout Mice. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 36, 580–588.
- Chistyakov, D.V., Grabeklis, S., Goriainov, S.V., Chistyakov, V.V., Sergeeva, M.G., and Reiser, G. (2018). Astrocytes synthesize primary and cyclopentenone prostaglandins that are negative regulators of their proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 204–210.

- 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. *Front. Endocrinol.* 7.
- Choi, M.-S., Kim, Y.-J., Kwon, E.-Y., Ryoo, J.Y., Kim, S.R., and Jung, U.J. (2015). High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes. *Br. J. Nutr.* 113, 867–877.
- Choi, W.H., Ahn, J., Jung, C.H., Jang, Y.J., and Ha, T.Y. (2016). β -Lapachone Prevents Diet-Induced Obesity by Increasing Energy Expenditure and Stimulating the Browning of White Adipose Tissue via Downregulation of miR-382 Expression. *Diabetes* 65, 2490–2501.
- Chou, W.-L., Chuang, L.-M., Chou, C.-C., Wang, A.H.-J., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., and Chang, Z.-F. (2007). Identification of a Novel Prostaglandin Reductase Reveals the Involvement of Prostaglandin E2 Catabolism in Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activation. *J. Biol. Chem.* 282, 18162–18172.
- Cipolletta, D. (2014). Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology* 142, 517–525.
- Clark, P., Rowland, S.E., Denis, D., Mathieu, M.-C., Stocco, R., Poirier, H., Burch, J., Han, Y., Audoly, L., Therien, A.G., et al. (2008). MF498 [N-{{[4-(5,9-Diethoxy-6-oxo-6,8-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-g]quinolin-7-yl)-3-methylbenzyl]sulfonyl}}-2-(2-methoxyphenyl)acetamide], a Selective E Prostanoid Receptor 4 Antagonist, Relieves Joint Inflammation and Pain in Rodent Models of Rheumatoid and Osteoarthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 425–434.
- Clarke, G., Stilling, R.M., Kennedy, P.J., Stanton, C., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2014). Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.* 28, 1221–1238.
- Coats, B.R., Schoenfelt, K.Q., Barbosa-Lorenzi, V.C., Peris, E., Cui, C., Hoffman, A., Zhou, G., Fernandez, S., Zhai, L., Hall, B.A., et al. (2017). Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. *Cell Rep.* 20, 3149–3161.
- Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., et al. (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156, 304–316.
- Coleman, R.A., and Kennedy, I. (1985). Characterisation of the prostanoid receptors mediating contraction of guinea-pig isolated trachea. *Prostaglandins* 29, 363–375.
- Commins, S.P., Watson, P.M., Frampton, I.C., and Gettys, T.W. (2001). Leptin selectively reduces white adipose tissue in mice via a UCP1-dependent mechanism in brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E372–377.
- Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8, 571–578.

- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Cox, J.E., and Powley, T.L. (1981). Intra-gastric pair feeding fails to prevent VMH obesity or hyperinsulinemia. *Am. J. Physiol.* *240*, E566-572.
- Crewe, C., An, Y.A., and Scherer, P.E. (2017). The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis.
- Crozier, W.J. (1924). ON BIOLOGICAL OXIDATIONS AS FUNCTION OF TEMPERATURE. *J. Gen. Physiol.* *7*, 189–216.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* *50*, 1714–1719.
- Curtis-Prior, P.B. (1975). Prostaglandins and obesity. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 897–899.
- Damsker, J.M., Hansen, A.M., and Caspi, R.R. (2010). Th1 and Th17 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1183*, 211–221.
- De Keijzer, S., Meddens, M.B.M., Torensma, R., and Cambi, A. (2013). The Multiple Faces of Prostaglandin E2 G-Protein Coupled Receptor Signaling during the Dendritic Cell Life Cycle. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 6542–6555.
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* *146*, 4192–4199.
- Delaigle, A.M., Jonas, J.-C., Bauche, I.B., Cornu, O., and Brichard, S.M. (2004). Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* *145*, 5589–5597.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* *29*, 313–326.
- Dey, I., Lejeune, M., and Chadee, K. (2006). Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.* *149*, 611–623.
- Díaz-Muñoz, M.D., Osma-García, I.C., Cacheiro-Llaguno, C., Fresno, M., and Iñiguez, M.A. (2010). Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell. Signal.* *22*, 1427–1436.
- Ding, H., Zheng, S., Garcia-Ruiz, D., Hou, D., Wei, Z., Liao, Z., Li, L., Zhang, Y., Han, X., Zen, K., et al. (2016). Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. *Nat. Commun.* *7*.
- Ding, K., Zhou, Z., Hou, S., Yuan, Y., Zhou, S., Zheng, X., Chen, J., Loftin, C., Zheng, F., and Zhan, C.-G. (2018). Structure-based discovery of mPGES-1 inhibitors suitable for

- preclinical testing in wild-type mice as a new generation of anti-inflammatory drugs. *Sci. Rep.* 8, 5205.
- Dobryniewski, J., Szajda, S., Waszkiewicz, N., and Zwierz, K. (2007). [Biology of essential fatty acids (EFA)]. *Przegl. Lek.* 64, 91–99.
- Egg, D., Günther, R., Herold, M., and Kerschbaumer, F. (1980). [Prostaglandins E2 and F2 alpha concentrations in the synovial fluid in rheumatoid and traumatic knee joint diseases]. *Z. Rheumatol.* 39, 170–175.
- Eguchi, J., Wang, X., Yu, S., Kershaw, E.E., Chiu, P.C., Dushay, J., Estall, J.L., Klein, U., Maratos-Flier, E., and Rosen, E.D. (2011). Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab.* 13, 249–259.
- El Ouaamari, A., Kawamori, D., Dirice, E., Liew, C.W., Shadrach, J.L., Hu, J., Katsuta, H., Hollister-Lock, J., Qian, W.-J., Wagers, A.J., et al. (2013). Liver-Derived Systemic Factors Drive b Cell Hyperplasia in Insulin-Resistant States. *Cell Rep.* 3, 401–410.
- Elander, L., Engström, L., Hallbeck, M., and Blomqvist, A. (2007). IL-1beta and LPS induce anorexia by distinct mechanisms differentially dependent on microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R258–267.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375–1385.
- Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., Roca, C., Ramos, D., Pujol, A., Riu, E., et al. (2012). Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 61, 1801–1813.
- Engblom, D., Saha, S., Engström, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.-J., and Blomqvist, A. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat. Neurosci.* 6, 1137–1138.
- Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Rudaz, C.G., and Cowley, M.A. (2011). Leptin Action in the Dorsomedial Hypothalamus Increases Sympathetic Tone to Brown Adipose Tissue in Spite of Systemic Leptin Resistance. *J. Neurosci.* 31, 12189–12197.
- Euler, U.S. (1935). Über die spezifische blutdrucksenkende substanz des menschlichen prostata- und samenblasensekretes. *Klin. Wochenschrift* 14, 1182–1183.
- Evans, J.M., Morris, L.S., and Marchesi, J.R. (2013). The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J. Endocrinol.* 218, R37–47.
- Exton, M.S. (1997). Infection-Induced Anorexia: Active Host Defence Strategy. *Appetite* 29, 369–383.
- Fain, J.N., Leffler, C.W., Cowan, G.S., Buffington, C., Pouncey, L., and Bahouth, S.W. (2001). Stimulation of leptin release by arachidonic acid and prostaglandin E(2) in adipose tissue from obese humans. *Metabolism* 50, 921–928.

- Fantuzzi, G. (2013). Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases. *Cytokine* 64, 1–10.
- Ferguson, R.D., Gallagher, E.J., Scheinman, E.J., Damouni, R., and LeRoith, D. (2013). The Epidemiology and Molecular Mechanisms Linking Obesity, Diabetes, and Cancer. *Vitam. Horm.* 93, 51–98.
- Fernandez-Marcos, P.J., Jenning, E.H., Canto, C., Harach, T., de Boer, V.C.J., Andreux, P., Moullan, N., Pirinen, E., Yamamoto, H., Houten, S.M., et al. (2012). Muscle or liver-specific Sirt3 deficiency induces hyperacetylation of mitochondrial proteins without affecting global metabolic homeostasis. *Sci. Rep.* 2.
- 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.
- Finetti, F., Solito, R., Morbidelli, L., Giachetti, A., Ziche, M., and Donnini, S. (2008). Prostaglandin E2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *J. Biol. Chem.* 283, 2139–2146.
- Fischer, A.W., Hoefig, C.S., Abreu-Vieira, G., de Jong, J.M.A., Petrovic, N., Mittag, J., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2016). Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Rep.* 14, 1621–1631.
- Fisher, ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Foey, A.D. (2015). Macrophage Polarisation: A collaboration of Differentiation, Activation and Pre-Programming? *J. Clin. Cell. Immunol.* 6, 1–15.
- Forsberg, L., Leeb, L., Thorén, S., Morgenstern, R., and Jakobsson, P.-J. (2000). Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett.* 471, 78–82.
- Francés, D.E., Motiño, O., Agrá, N., González-Rodríguez, Á., Fernández-Álvarez, A., Cucarella, C., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., García-Casarrubios, E., Boscá, L., et al. (2015). Hepatic Cyclooxygenase-2 Expression Protects Against Diet-Induced Steatosis, Obesity, and Insulin Resistance. *Diabetes* 64, 1522–1531.
- Frolov, A., Yang, L., Dong, H., Hammock, B.D., and Crofford, L.J. (2013). ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF PROSTAGLANDIN E2: DELETION OF MICROSOMAL PROSTAGLANDIN E SYNTHASE-1 EXACERBATES NON-IMMUNE INFLAMMATORY ARTHRITIS IN MICE. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 89, 351–358.
- Fromme, T., and Klingenspor, M. (2011). Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R1-8.
- Fujii, N., Ho, R.C., Manabe, Y., Jessen, N., Toyoda, T., Holland, W.L., Summers, S.A., Hirshman, M.F., and Goodyear, L.J. (2008). Ablation of AMP-Activated Protein Kinase α 2

- Activity Exacerbates Insulin Resistance Induced by High-Fat Feeding of Mice. *Diabetes* 57, 2958–2966.
- Fujimori, K., Yano, M., and Ueno, T. (2012). Synergistic Suppression of Early Phase of Adipogenesis by Microsomal PGE Synthase-1 (PTGES1)-Produced PGE2 and Aldo-Keto Reductase 1B3-Produced PGF2 α . *PLoS ONE* 7.
- Fujino, H., Xu, W., and Regan, J.W. (2003). Prostaglandin E2 Induced Functional Expression of Early Growth Response Factor-1 by EP4, but Not EP2, Prostanoid Receptors via the Phosphatidylinositol 3-Kinase and Extracellular Signal-regulated Kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 12151–12156.
- Fujino, H., Salvi, S., and Regan, J.W. (2005). Differential Regulation of Phosphorylation of the cAMP Response Element-Binding Protein after Activation of EP2 and EP4 Prostanoid Receptors by Prostaglandin E2. *Mol. Pharmacol.* 68, 251–259.
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., et al. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307, 426–430.
- Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 294, 1871–1875.
- Funk, C.D., Furci, L., FitzGerald, G.A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M.A., Abramovitz, M., Adam, M., and Metters, K.M. (1993). Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J. Biol. Chem.* 268, 26767–26772.
- Gaidhu, M.P., Anthony, N.M., Patel, P., Hawke, T.J., and Ceddia, R.B. (2010). Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 298, C961–C971.
- Gao, D., Pararasa, C., Dunston, C.R., Bailey, C.J., and Griffiths, H.R. (2012). Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 796–806.
- Gao, M., Ma, Y., and Liu, D. (2015). High-Fat Diet-Induced Adiposity, Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis and Hyperinsulinemia in Outbred CD-1 Mice. *PLOS ONE* 10, e0119784.
- García de la Torre, N., Rubio, M.A., Bordiú, E., Cabrerizo, L., Aparicio, E., Hernández, C., Sánchez-Pernaute, A., Díez-Valladares, L., Torres, A.J., Puente, M., et al. (2008). Effects of weight loss after bariatric surgery for morbid obesity on vascular endothelial growth factor-A, adipocytokines, and insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4276–4281.
- García-Alonso, V., and Clària, J. (2014). Prostaglandin E2 signals white-to-brown adipogenic differentiation. *Adipocyte* 3, 290–296.
- García-Alonso, V., López-Vicario, C., Titos, E., Morán-Salvador, E., González-Pérez, A., Rius, B., Párrizas, M., Werz, O., Arroyo, V., and Clària, J. (2013). Coordinate Functional Regulation between Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) in the Conversion of White-to-brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 28230–28242.

- García-Alonso, V., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Rius, B., Lopategi, A., López-Vicario, C., Jakobsson, P.-J., Delgado, S., Lozano, J., and Clària, J. (2016). Prostaglandin E2 Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis. *PLoS ONE* 11.
- García-Ruiz, E., Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Ceresi, E., Oliver, P., and Palou, A. (2015). The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. *Int. J. Obes.* 2005 39, 1619–1629.
- Garg, A.D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R.B., Bravo-San Pedro, J.M., Breckpot, K., Brough, D., Chaurio, R., Cirone, M., et al. (2015). Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front. Immunol.* 6.
- Gavini, C.K., Mukherjee, S., Shukla, C., Britton, S.L., Koch, L.G., Shi, H., and Novak, C.M. (2014). Leanness and heightened nonresting energy expenditure: role of skeletal muscle activity thermogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E635–647.
- Genser, L., Poitou, C., Brot-Laroche, É., Rousset, M., Vaillant, J.-C., Clément, K., Thenet, S., and Leturque, A. (2016). [Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?]. *Med. Sci.* MS 32, 461–469.
- Ghosh, S., Singh, A.K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., and Ehtesham, N.Z. (2003). The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene* 305, 27–34.
- Gibbs, J., Young, R.C., and Smith, G.P. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 84, 488–495.
- Giordano, A., Frontini, A., Murano, I., Tonello, C., Marino, M.A., Carruba, M.O., Nisoli, E., and Cinti, S. (2005). Regional-dependent increase of sympathetic innervation in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 53, 679–687.
- Goldblatt, M.W. (1935). Properties of human seminal plasma. *J. Physiol.* 84, 208–218.
- Gorden, D.L., Ivanova, P.T., Myers, D.S., McIntyre, J.O., VanSaun, M.N., Wright, J.K., Matrisian, L.M., and Brown, H.A. (2011). Increased Diacylglycerols Characterize Hepatic Lipid Changes in Progression of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Comparison to a Murine Model. *PLOS ONE* 6, e22775.
- Granneman, J.G., Moore, H.-P.H., Krishnamoorthy, R., and Rathod, M. (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J. Biol. Chem.* 284, 34538–34544.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breininger, J., and Baskin, D.G. (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143, 239–246.

- Guan, Y., Zhang, Y., Wu, J., Qi, Z., Yang, G., Dou, D., Gao, Y., Chen, L., Zhang, X., Davis, L.S., et al. (2007). Antihypertensive effects of selective prostaglandin E2 receptor subtype 1 targeting. *J. Clin. Invest.* *117*, 2496–2505.
- Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G.G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci.* *40*, 237–253.
- Gustafson, B., Hammarstedt, A., Hedjazifar, S., Hoffmann, J.M., Svensson, P.-A., Grimsby, J., Rondinone, C., and Smith, U. (2015). BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis. *Diabetes* *64*, 1670–1681.
- 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.
- Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1966). Prostaglandins in Human Seminal Plasma PROSTAGLANDINS AND RELATED FACTORS 46. *J. Biol. Chem.* *241*, 257–263.
- Han, J., and Kaufman, R.J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* *57*, 1329–1338.
- Handjieva-Darlenska, T., and Boyadjieva, N. (2009). The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J. Physiol. Biochem.* *65*, 157–164.
- Hangai, S., Ao, T., Kimura, Y., Matsuki, K., Kawamura, T., Negishi, H., Nishio, J., Kodama, T., Taniguchi, T., and Yanai, H. (2016). PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 3844–3849.
- Harms, M.J., Ishibashi, J., Wang, W., Lim, H.-W., Goyama, S., Sato, T., Kurokawa, M., Won, K.-J., and Seale, P. (2014). Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* *19*, 593–604.
- Harms, M.J., Lim, H.-W., Ho, Y., Shapira, S.N., Ishibashi, J., Rajakumari, S., Steger, D.J., Lazar, M.A., Won, K.-J., and Seale, P. (2015). PRDM16 binds MED1 and controls chromatin architecture to determine a brown fat transcriptional program. *Genes Dev.* *29*, 298–307.
- Hasegawa, H., Negishi, M., and Ichikawa, A. (1996). Two Isoforms of the Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype Different in Agonist-independent Constitutive Activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 1857–1860.
- Hatae, N., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. (2002). Prostaglandin Receptors: Advances in the Study of EP3 Receptor Signaling. *J. Biochem. (Tokyo)* *131*, 781–784.
- Haus, J.M., Kashyap, S.R., Kasumov, T., Zhang, R., Kelly, K.R., DeFronzo, R.A., and Kirwan, J.P. (2009). Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes* *58*, 337–343.
- He, C., and Carter, A.B. (2015). The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization. *J. Clin. Cell. Immunol.* *6*.
- Heisler, L.K., and Lam, D.D. (2017). An appetite for life: brain regulation of hunger and satiety. *Curr. Opin. Pharmacol.* *37*, 100–106.

- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., et al. (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* *9*, R14.
- Henkel, J., Neuschäfer-Rube, F., Pathe-Neuschäfer-Rube, A., and Püschel, G.P. (2009). Aggravation by prostaglandin E2 of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Hepatology* *50*, 781–790.
- Henkel, J., Frede, K., Schanze, N., Vogel, H., Schürmann, A., Spruss, A., Bergheim, I., and Püschel, G.P. (2012). Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE2-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis. *Lab. Invest.* *92*, 1597–1606.
- Hermann, G.E., Barnes, M.J., and Rogers, R.C. (2006). Leptin and thyrotropin-releasing hormone: cooperative action in the hindbrain to activate brown adipose thermogenesis. *Brain Res.* *1117*, 118–124.
- Hesketh, M., Sahin, K.B., West, Z.E., and Murray, R.Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Hétu, P.-O., and Riendeau, D. (2007). Down-regulation of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 in Adipose Tissue by High-fat Feeding. *Obesity* *15*, 60–68.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., and Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* *170*, 1807–1816.
- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., et al. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* *5*, 167–179.
- Horrillo, R., González-Pérez, A., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., Ferré, N., Titos, E., Morán-Salvador, E., Deulofeu, R., Arroyo, V., and Clària, J. (2010). 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3978–3987.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* *444*, 860–867.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 4854–4858.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *95*, 2409–2415.
- Hristovska, A.-M., Rasmussen, L.E., Hansen, P.B.L., Nielsen, S.S., Nüsing, R.M., Narumiya, S., Vanhoutte, P., Skøtt, O., and Jensen, B.L. (2007). Prostaglandin E2 Induces Vascular Relaxation by E-Prostanoid 4 Receptor-Mediated Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Hypertension* *50*, 525–530.

- Hsieh, P.-S., Jin, J.-S., Chiang, C.-F., Chan, P.-C., Chen, C.-H., and Shih, K.-C. COX-2-mediated Inflammation in Fat Is Crucial for Obesity-linked Insulin Resistance and Fatty Liver. *Obesity* 17, 1150–1157.
- Hu, X., Cifarelli, V., Sun, S., Kuda, O., Abumrad, N.A., and Su, X. (2016). Major role of adipocyte prostaglandin E2 in lipolysis-induced macrophage recruitment. *J. Lipid Res.* 57, 663–673.
- Huang, H., Song, T.-J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M.D., and Tang, Q.-Q. (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12670–12675.
- Huang, W.-C., Chen, J.-J., and Chen, C.-C. (2003). c-Src-dependent Tyrosine Phosphorylation of IKK β Is Involved in Tumor Necrosis Factor- α -induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. *J. Biol. Chem.* 278, 9944–9952.
- Huang, X., Yang, C., Luo, Y., Jin, C., Wang, F., and McKeehan, W.L. (2007). FGFR4 Prevents Hyperlipidemia and Insulin Resistance but Underlies High-Fat Diet-Induced Fatty Liver. *Diabetes* 56, 2501–2510.
- Hui, X., Gu, P., Zhang, J., Nie, T., Pan, Y., Wu, D., Feng, T., Zhong, C., Wang, Y., Lam, K.S.L., et al. (2015). Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab.* 22, 279–290.
- Hwa, J.J., Ghibaudi, L., Williams, P., Witten, M.B., Tedesco, R., and Strader, C.D. (1998). Differential effects of intracerebroventricular glucagon-like peptide-1 on feeding and energy expenditure regulation. *Peptides* 19, 869–875.
- Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 11, 11–18.
- Imeryüz, N., Yeğen, B.C., Bozkurt, A., Coşkun, T., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., and Ulusoy, N.B. (1997). Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am. J. Physiol.* 273, G920-927.
- Inui, A. (2001). Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 551–560.
- Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1993). Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.* 217, 313–318.
- Isono, M., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Sakagami, H., Uematsu, S., Akira, S., DeClerck, Y.A., Okamoto, H., and Majima, M. (2011). Microsomal prostaglandin E synthase-1 enhances bone cancer growth and bone cancer-related pain behaviors in mice. *Life Sci.* 88, 693–700.
- Item, F., and Konrad, D. (2012). Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. *Obes. Rev.* 13, 30–39.

- Ito, H., Duxbury, M., Benoit, E., Clancy, T.E., Zinner, M.J., Ashley, S.W., and Whang, E.E. (2004). Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* *64*, 7439–7446.
- Ivanov, A.I., Pero, R.S., Scheck, A.C., and Romanovsky, A.A. (2002). Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *283*, R1104-1117.
- Iyer, A., Lim, J., Poudyal, H., Reid, R.C., Suen, J.Y., Webster, J., Prins, J.B., Whitehead, J.P., Fairlie, D.P., and Brown, L. (2012). An Inhibitor of Phospholipase A2 Group IIA Modulates Adipocyte Signaling and Protects Against Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Diabetes* *61*, 2320–2329.
- Jakobsson, P.-J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7220–7225.
- Janke, J., Engeli, S., Gorzelnik, K., Luft, F.C., and Sharma, A.M. (2002). Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes. Res.* *10*, 1–5.
- Janssen, P., Vanden Berghe, P., Verschueren, S., Lehmann, A., Depoortere, I., and Tack, J. (2011). Review article: the role of gastric motility in the control of food intake. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *33*, 880–894.
- Jarabak, J., and Fried, J. (1979). Comparison of substrate specificities of the human placental NAD- and NADP-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenases. *Prostaglandins* *18*, 241–246.
- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R.E., Ahmadian, M., and Sul, H.S. (2007). Regulation of Triglyceride Metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G1–G4.
- Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., Lee, H.-Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Kim, K.-H., et al. (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high fat feeding or leptin deficiency. *Nat. Med.* *15*, 159–168.
- Jeffery, E., Berry, R., Church, C.D., Yu, S., Shook, B.A., Horsley, V., Rosen, E.D., and Rodeheffer, M.S. (2014). Characterization of Cre recombinase models for the study of adipose tissue. *Adipocyte* *3*, 206–211.
- Jeffery, E., Church, C.D., Holtrup, B., Colman, L., and Rodeheffer, M.S. (2015). Rapid Depot-Specific Activation of Adipocyte Precursor Cells at the Onset of Obesity. *Nat. Cell Biol.* *17*, 376–385.
- Jha, A.K., Huang, S.C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., et al. (2015). Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity* *42*, 419–430.

- Ji, Y., Sun, S., Xia, S., Yang, L., Li, X., and Qi, L. (2012). Short term high fat diet challenge promotes alternative macrophage polarization in adipose tissue via natural killer T cells and interleukin-4. *J. Biol. Chem.* 287, 24378–24386.
- Jia, X.-Y., Chang, Y., Sun, X.-J., Dai, X., and Wei, W. (2014). The role of prostaglandin E2 receptor signaling of dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 23, 163–169.
- Jocken, J.W.E., and Blaak, E.E. (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* 94, 219–230.
- Joe, A.W.B., Yi, L., Even, Y., Vogl, A.W., and Rossi, F.M.V. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2563–2570.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846.
- Kaiyala, K.J., Ogimoto, K., Nelson, J.T., Schwartz, M.W., and Morton, G.J. (2015). Leptin signaling is required for adaptive changes in food intake, but not energy expenditure, in response to different thermal conditions. *PLoS One* 10, e0119391.
- Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M.P., Ruas, J.L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M.A., and Spiegelman, B.M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 22, 1397–1409.
- Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J.V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast/brown fat switch through a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex. *Nature* 460, 1154–1158.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 21–28.
- Kanai, N., Lu, R., Satriano, J.A., Bao, Y., Wolkoff, A.W., and Schuster, V.L. (1995). Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268, 866–869.
- 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.
- Kelley, D.E., Thaete, F.L., Troost, F., Huwe, T., and Goodpaster, B.H. (2000). Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 278, E941–E948.
- Kennedy, C.R., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C.D., Magnuson, M.A., Oates, J.A., Breyer, M.D., and Breyer, R.M. (1999). Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat. Med.* 5, 217–220.

- Kennedy, I., Coleman, R.A., Humphrey, P.P., Levy, G.P., and Lumley, P. (1982). Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins* 24, 667–689.
- Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clément, K., and Lacasa, D. (2009). Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 23, 11–24.
- Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 52, 1779–1785.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1575–1591.
- Khasar, S.G., Ouseph, A.K., Chou, B., Ho, T., Green, P.G., and Levine, J.D. (1995). Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat hindpaw? *Neuroscience* 64, 1161–1165.
- Khasar, S.G., Burkham, J., Dina, O.A., Brown, A.S., Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Green, P.G., Reichling, D.B., and Levine, J.D. (2008). Stress Induces a Switch of Intracellular Signaling in Sensory Neurons in a Model of Generalized Pain. *J. Neurosci.* 28, 5721–5730.
- Kieran, N.E., Maderna, P., and Godson, C. (2004). Lipoxins: Potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. *Kidney Int.* 65, 1145–1154.
- Kihara, Y., Matsushita, T., Kita, Y., Uematsu, S., Akira, S., Kira, J. -i, Ishii, S., and Shimizu, T. (2009). Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21807–21812.
- Kim, J.I., Lakshmiathan, V., Frilot, N., and Daaka, Y. (2010). Prostaglandin E2 Promotes Lung Cancer Cell Migration Via EP4- β Arrestin1-c-Src Signaling. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 569–577.
- Kim, J.-Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., et al. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 117, 2621–2637.
- Kim, S.-J., Tang, T., Abbott, M., Viscarra, J.A., Wang, Y., and Sul, H.S. (2016). AMPK Phosphorylates Desnutrin/ATGL and Hormone-Sensitive Lipase To Regulate Lipolysis and Fatty Acid Oxidation within Adipose Tissue. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1961–1976.
- Kirchner, H., Hofmann, S.M., Fischer-Rosinský, A., Hembree, J., Abplanalp, W., Ottaway, N., Donelan, E., Krishna, R., Woods, S.C., Müller, T.D., et al. (2012). Caloric Restriction Chronically Impairs Metabolic Programming in Mice. *Diabetes* 61, 2734–2742.
- Kleemann, R., Erk, M. van, Verschuren, L., Hoek, A.M. van den, Koek, M., Wielinga, P.Y., Jie, A., Pellis, L., Bobeldijk-Pastorova, I., Kelder, T., et al. (2010). Time-Resolved and Tissue-Specific Systems Analysis of the Pathogenesis of Insulin Resistance. *PLOS ONE* 5, e8817.

- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., and Drent, M.L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes. Rev.* 8, 21–34.
- Kobayashi, K., Murata, T., Hori, M., and Ozaki, H. (2011). Prostaglandin E2-prostanoid EP3 signal induces vascular contraction via nPKC and ROCK activation in rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* 660, 375–380.
- Kochel, T.J., and Fulton, A.M. (2015). Multiple Drug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4), Prostaglandin Transporter (PGT), and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (15-PGDH) as Determinants of PGE2 Levels in Cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 0, 99–103.
- Kodama, K., Toda, K., Morinaga, S., Yamada, S., and Butte, A.J. (2015). Anti-CD44 Antibody Treatment Lowers Hyperglycemia and Improves Insulin Resistance, Adipose Inflammation, and Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 64, 867–875.
- Kojima, F., Kapoor, M., Yang, L., Fleishaker, E.L., Ward, M.R., Monrad, S.U., Kottangada, P.C., Pace, C.Q., Clark, J.A., Woodward, J.G., et al. (2008). Defective generation of a humoral immune response is associated with a reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 8361–8368.
- Kondo, K., Okuno, T., Saruta, T., and Kato, E. (1979). Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandins I₂, E₂, F₂ α and indomethacin on blood pressure in the rat. *Prostaglandins* 17, 769–774.
- Kong, X., Banks, A., Liu, T., Kazak, L., Rao, R.R., Cohen, P., Wang, X., Yu, S., Lo, J.C., Tseng, Y.-H., et al. (2014). IRF4 is a key thermogenic transcriptional partner of PGC-1 α . *Cell* 158, 69–83.
- Könner, A.C., and Brüning, J.C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 16–23.
- Kooijman, S., van den Heuvel, J.K., and Rensen, P.C.N. (2015). Neuronal Control of Brown Fat Activity. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 657–668.
- Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A.W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 120, 3466–3479.
- Kraemer, M.P., Choi, H., Reese, J., Lamb, F.S., and Breyer, R.M. (2016). Regulation of arterial reactivity by concurrent signaling through the E-prostanoid receptor 3 and angiotensin receptor 1. *Vascul. Pharmacol.* 84, 47–54.
- Kronic, N., Adamson, S.L., Ackerley, C., Okita, R.T., and Cocceani, F. (2000). Perinatal changes in choroidal 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: implications for prostaglandin removal from brain. *Dev. Brain Res.* 121, 145–155.
- Kurzrok, R., and Lieb, C.C. (1930). Biochemical studies of Human Semen. II The action of semen in the human uterus. *Proceedings* 268–272.

- La Cava, A., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 371–379.
- Lackey, D.E., and Olefsky, J.M. (2016). Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 15–28.
- Lafrance, V., Inoue, W., Kan, B., and Luheshi, G.N. (2010). Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 358–365.
- Landrier, J.-F., Kasiri, E., Karkeni, E., Mihály, J., Béke, G., Weiss, K., Lucas, R., Aydemir, G., Salles, J., Walrand, S., et al. (2017). Reduced adiponectin expression after high-fat diet is associated with selective up-regulation of ALDH1A1 and further retinoic acid receptor signaling in adipose tissue. *FASEB J.* *31*, 203–211.
- 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*, 2059–2065.
- Lawrence, R., and Jones, R. (1992). Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* *105*, 817–824.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 787–795.
- Lê, K.-A., Mahurkar, S., Alderete, T.L., Hasson, R.E., Adam, T.C., Kim, J.S., Beale, E., Xie, C., Greenberg, A.S., Allayee, H., et al. (2011). Subcutaneous Adipose Tissue Macrophage Infiltration Is Associated With Hepatic and Visceral Fat Deposition, Hyperinsulinemia, and Stimulation of NF- κ B Stress Pathway. *Diabetes* *60*, 2802–2809.
- Le Thuc, O., Stobbe, K., Cansell, C., Nahon, J.-L., Blondeau, N., and Rovère, C. (2017). Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Front. Endocrinol.* *8*, 197.
- Lebeaupin, C., Vallée, D., Hazari, Y., Hetz, C., Chevet, E., and Bailly-Maitre, B. (2018). Endoplasmic Reticulum stress signaling and the pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.*
- Lee, J.-H., Jung, N.-H., Lee, B.-H., Kim, S.-H., and Jun, J.H. (2013). Suppression of Heme Oxygenase-1 by Prostaglandin E₂-Protein Kinase A- α -Kinase Anchoring Protein Signaling Is Central for Augmented Cyclooxygenase-2 Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Allergy Asthma Immunol. Res.* *5*, 329–336.
- Lee, Y.S., Li, P., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Lu, M., Kim, J.I., Ham, M., Talukdar, S., Chen, A., Lu, W.J., et al. (2011). Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* *60*, 2474–2483.
- Lee, Y.S., Kim, J., Osborne, O., Oh, D.Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S.M., et al. (2014). Increased Adipocyte O₂ Consumption Triggers HIF-1 α Causing Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Cell* *157*, 1339–1352.
- Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* *2*, 612–619.

- Li, H., Lelliott, C., Håkansson, P., Ploj, K., Tuneld, A., Verolin-Johansson, M., Benthem, L., Carlsson, B., Storlien, L., and Michaëlsson, E. (2008). Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism*. 57, 1704–1710.
- Li, J., Zhao, W.-G., Shen, Z.-F., Yuan, T., Liu, S.-N., Liu, Q., Fu, Y., and Sun, W. (2015). Comparative Proteome Analysis of Brown Adipose Tissue in Obese C57BL/6J Mice Using iTRAQ-Coupled 2D LC-MS/MS. *PLoS ONE* 10.
- Li, J.H., Chou, C.-L., Li, B., Gavrilova, O., Eisner, C., Schnermann, J., Anderson, S.A., Deng, C.-X., Knepper, M.A., and Wess, J. (2009). A selective EP4 PGE₂ receptor agonist alleviates disease in a new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J. Clin. Invest.* 119, 3115–3126.
- Lin, C.-R., Amaya, F., Barrett, L., Wang, H., Takada, J., Samad, T.A., and Woolf, C.J. (2006). Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1096–1103.
- Lin, H.-Y., Xu, Q., Yeh, S., Wang, R.-S., Sparks, J.D., and Chang, C. (2005). Insulin and Leptin Resistance With Hyperleptinemia in Mice Lacking Androgen Receptor. *Diabetes* 54, 1717–1725.
- Lindholm, C.R., Ertel, R.L., Bauwens, J.D., Schmuck, E.G., Mulligan, J.D., and Saupe, K.W. (2013). A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats. *J. Physiol. Biochem.* 69, 165–175.
- Liu, C., Rajapakse, A.G., Riedo, E., Fellay, B., Bernhard, M.-C., Montani, J.-P., Yang, Z., and Ming, X.-F. (2016). Targeting arginase-II protects mice from high-fat-diet-induced hepatic steatosis through suppression of macrophage inflammation. *Sci. Rep.* 6, 20405.
- Liu, H.J., Wei, Y., Ferri, N.R., Nasjletti, A., and Wang, W.H. (2000). Vasopressin and PGE₂ regulate activity of apical 70 pS K⁺ channel in thick ascending limb of rat kidney. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 278, C905–C913.
- Liu, Z.-J., Bian, J., Liu, J., and Endoh, A. (2007). Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 39, 489–494.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., and Lechler, R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–901.
- Lovgren, A.K., Jania, L.A., Hartney, J.M., Parsons, K.K., Audoly, L.P., Fitzgerald, G.A., Tilley, S.L., and Koller, B.H. (2006). COX-2-derived prostacyclin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L144–156.
- Luan, B., Yoon, Y.-S., Le Lay, J., Kaestner, K.H., Hedrick, S., and Montminy, M. (2015). CREB pathway links PGE₂ signaling with macrophage polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15642–15647.
- Luo, T., Nocon, A., Fry, J., Sherban, A., Rui, X., Jiang, B., Xu, X.J., Han, J., Yan, Y., Yang, Q., et al. (2016). AMPK Activation by Metformin Suppresses Abnormal Extracellular Matrix

Remodeling in Adipose Tissue and Ameliorates Insulin Resistance in Obesity. *Diabetes* 65, 2295–2310.

Lupi, R., Del Guerra, S., Fierabracci, V., Marselli, L., Novelli, M., Patanè, G., Boggi, U., Mosca, F., Piro, S., Del Prato, S., et al. (2002). Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes* 51 Suppl 1, S134-137.

Madsen, L., Pedersen, L.M., Lillefosse, H.H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., Petersen, R.K., Hallenborg, P., Ma, T., De Matteis, R., et al. (2010). UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* 5, e11391.

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737.

Mancini, J.A., Blood, K., Guay, J., Gordon, R., Claveau, D., Chan, C.C., and Riendeau, D. (2001). Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Chem.* 276, 4469–4475.

Marinou, K., Hodson, L., Vasani, S.K., Fielding, B.A., Banerjee, R., Brismar, K., Koutsilieris, M., Clark, A., Neville, M.J., and Karpe, F. (2014). Structural and Functional Properties of Deep Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue Explain Its Association With Insulin Resistance and Cardiovascular Risk in Men. *Diabetes Care* 37, 821–829.

Markovič, T., Jakopin, Ž., Dolenc, M.S., and Mlinarič-Raščan, I. (2017). Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov. Today* 22, 57–71.

Martinez-Cutillas, M., Mañé, N., Gallego, D., Jimenez, M., and Martin, M.T. (2014). EP2 and EP4 receptors mediate PGE2 induced relaxation in murine colonic circular muscle: pharmacological characterization. *Pharmacol. Res.* 90, 76–86.

Martinez-deMena, R., Anedda, A., Cadenas, S., and Obregon, M.-J. (2015). TSH effects on thermogenesis in rat brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 404, 151–158.

Martins, A.R., Nachbar, R.T., Gorjao, R., Vinolo, M.A., Festuccia, W.T., Lambertucci, R.H., Cury-Boaventura, M.F., Silveira, L.R., Curi, R., and Hirabara, S.M. (2012). Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 11, 30.

Matsuda, T., Hori, T., and Nakashima, T. (1992). Thermal and PGE2 sensitivity of the organum vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices. *J. Physiol.* 454, 197–212.

Mbonye, U.R., Wada, M., Rieke, C.J., Tang, H.-Y., Dewitt, D.L., and Smith, W.L. (2006). The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *J. Biol. Chem.* 281, 35770–35778.

McColl, A., Thomson, C., Graham, G., and Cavanagh, J. (2014). Peripheral inflammation affects the central nervous system and biology of the brain. *J. Neuroimmunol.* 275, 163.

- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., et al. (2009). Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *J. Neurosci.* *29*, 359–370.
- Miyasaka, K., Kanai, S., Ohta, M., Kawanami, T., Kono, A., and Funakoshi, A. (1994). Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene. *Neurosci. Lett.* *180*, 143–146.
- Miyoshi, H., VanDussen, K.L., Malvin, N.P., Ryu, S.H., Wang, Y., Sonnek, N.M., Lai, C., and Stappenbeck, T.S. (2017). Prostaglandin E2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *EMBO J.* *36*, 5–24.
- Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carvalheira, J.B., Oliveira, A.L.R., Saad, M.J., et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* *4*, e5045.
- Morrison, S.F., and Nakamura, K. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *16*, 74–104.
- Mothe-Satney, I., Filloux, C., Amghar, H., Pons, C., Bourlier, V., Galitzky, J., Grimaldi, P.A., Féral, C.C., Bouloumié, A., Van Obberghen, E., et al. (2012). Adipocytes Secrete Leukotrienes. *Diabetes* *61*, 2311–2319.
- Muir, L.A., Neeley, C.K., Meyer, K.A., Baker, N.A., Brosius, A.M., Washabaugh, A.R., Varban, O.A., Finks, J.F., Zamarron, B.F., Flesher, C.G., et al. (2016). Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obes. Silver Spring Md* *24*, 597–605.
- Münzberg, H., Qualls-Creekmore, E., Berthoud, H.-R., Morrison, C.D., and Yu, S. (2016). Neural Control of Energy Expenditure. *Handb. Exp. Pharmacol.* *233*, 173–194.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* *275*, 32783–32792.
- Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., et al. (1997). Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* *388*, 678–682.
- Nagamachi, M., Sakata, D., Kabashima, K., Furuyashiki, T., Murata, T., Segi-Nishida, E., Soontrapa, K., Matsuoka, T., Miyachi, Y., and Narumiya, S. (2007). Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J. Exp. Med.* *204*, 2865–2874.
- Nagano, T., Nishiyama, R., Sanada, A., Mutaguchi, Y., Ioku, A., Umeki, H., Kishimoto, S., Yamanaka, D., Kimura, S.H., and Takemura, M. (2017). Prostaglandin E2 potentiates interferon- γ -induced nitric oxide production in cultured rat microglia. *J. Neurochem.* *140*, 605–612.
- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *301*, R1207-1228.

- Nakanishi, K., Takeda, Y., Tetsumoto, S., Iwasaki, T., Tsujino, K., Kuhara, H., Jin, Y., Nagatomo, I., Kida, H., Goya, S., et al. (2011). Involvement of endothelial apoptosis underlying chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in adiponectin-null mice: implications for therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 1164–1175.
- Nasrallah, R., Hassouneh, R., and Hébert, R.L. (2016). PGE₂, Kidney Disease, and Cardiovascular Risk: Beyond Hypertension and Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* *27*, 666–676.
- Nasteska, D., Harada, N., Suzuki, K., Yamane, S., Hamasaki, A., Joo, E., Iwasaki, K., Shibue, K., Harada, T., and Inagaki, N. (2014). Chronic Reduction of GIP Secretion Alleviates Obesity and Insulin Resistance Under High-Fat Diet Conditions. *Diabetes* *63*, 2332–2343.
- Negishi, M., Hasegawa, H., and Ichikawa, A. (1996). Prostaglandin E receptor EP₃γ isoform, with mostly full constitutive Gi activity and agonist-dependent Gs activity. *FEBS Lett.* *386*, 165–168.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* *480*, 104–108.
- Nicholls, D.G., and Rial, E. (2016). A novel regulatory mechanisms for the brown-fat uncoupling protein? *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 364–365.
- Nie, T., Hui, X., Mao, L., Nie, B., Li, K., Sun, W., Gao, X., Tang, X., Xu, Y., Jiang, B., et al. (2016). Harmine Induces Adipocyte Thermogenesis through RAC1-MEK-ERK-CHD4 Axis. *Sci. Rep.* *6*, 36382.
- Nishizawa, N., Ito, Y., Eshima, K., Ohkubo, H., Kojo, K., Inoue, T., Raouf, J., Jakobsson, P.-J., Uematsu, S., Akira, S., et al. (2018). Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates liver repair after hepatic injury in mice. *J. Hepatol.*
- Nussmeier, N.A., Whelton, A.A., Brown, M.T., Langford, R.M., Hoelt, A., Parlow, J.L., Boyce, S.W., and Verburg, K.M. (2005). Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N. Engl. J. Med.* *352*, 1081–1091.
- Ogino, N., Miyamoto, T., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1977). Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. *J. Biol. Chem.* *252*, 890–895.
- Oka, T. (2004). Prostaglandin E₂ as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front Biosci* *9*, 3046–3057.
- Okla, M., Ha, J.-H., Temel, R.E., and Chung, S. (2015). BMP7 drives human adipogenic stem cells into metabolically active beige adipocytes. *Lipids* *50*, 111–120.
- Oldfield, B.J., Giles, M.E., Watson, A., Anderson, C., Colvill, L.M., and McKinley, M.J. (2002). The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience* *110*, 515–526.
- Olesch, C., Sha, W., Angioni, C., Sha, L.K., Acaf, E., Patrignani, P., Jakobsson, P.-J., Radeke, H.H., Grösch, S., Geisslinger, G., et al. (2015). MPGES-1-derived PGE₂ suppresses CD80

expression on tumor-associated phagocytes to inhibit anti-tumor immune responses in breast cancer. *Oncotarget* 6, 10284–10296.

Omori, K., Kida, T., Hori, M., Ozaki, H., and Murata, T. (2014). Multiple roles of the PGE₂-EP receptor signal in vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4879–4889.

O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 553–565.

Osaka, T., Endo, M., Yamakawa, M., and Inoue, S. (2005). Energy expenditure by intravenous administration of glucagon-like peptide-1 mediated by the lower brainstem and sympathoadrenal system. *Peptides* 26, 1623–1631.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 85–97.

Ouellet, M., Falgout, J.-P., Hien Ear, P., Pen, A., Mancini, J.A., Riendeau, D., and David Percival, M. (2002). Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr. Purif.* 26, 489–495.

Pagano, C., Pilon, C., Olivieri, M., Mason, P., Fabris, R., Serra, R., Milan, G., Rossato, M., Federspil, G., and Vettor, R. (2006). Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3165–3170.

Park, S.-Y., Kim, H.-J., Wang, S., Higashimori, T., Dong, J., Kim, Y.-J., Cline, G., Li, H., Prentki, M., Shulman, G.I., et al. (2005). Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E30–39.

Park, Y.B., Choi, Y.J., Park, S.Y., Kim, J.Y., Kim, S.H., Song, D.K., Won, K.C., and Kim, Y.W. (2011). ATP-Sensitive Potassium Channel-Deficient Mice Show Hyperphagia but Are Resistant to Obesity. *Diabetes Metab. J.* 35, 219–225.

Pecchi, E., Dallaporta, M., Thirion, S., Salvat, C., Berenbaum, F., Jean, A., and Troadec, J.-D. (2006). Involvement of central microsomal prostaglandin E synthase-1 in IL-1 β -induced anorexia. *Physiol. Genomics* 25, 485–492.

Pellegrinelli, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 59, 1075–1088.

Petridou, A., Chatzinikolaou, A., Avloniti, A., Jamurtas, A., Loules, G., Papassotiriou, I., Fatouros, I., and Mougios, V. (2017). Increased Triacylglycerol Lipase Activity in Adipose Tissue of Lean and Obese Men During Endurance Exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 3945–3952.

Petrova, T.V., Akama, K.T., and Eldik, L.J.V. (1999). Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4668–4673.

- Petrovic, N., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2008). Thermogenically competent nonadrenergic recruitment in brown preadipocytes by a PPARgamma agonist. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *295*, E287-296.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* *285*, 7153–7164.
- Pinho-Ribeiro, F.A., Zarpelon, A.C., Fattori, V., Manchope, M.F., Mizokami, S.S., Casagrande, R., and Verri, W.A. (2016). Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology* *105*, 508–519.
- Pinteaux, E., Inoue, W., Schmidt, L., Molina-Holgado, F., Rothwell, N.J., and Luheshi, G.N. (2007). Leptin induces interleukin-1 β release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. *J. Neurochem.* *102*, 826–833.
- Pisani, D.F., Ghandour, R.A., Beranger, G.E., Le Faouder, P., Chambard, J.-C., Giroud, M., Vegiopoulos, A., Djedaini, M., Bertrand-Michel, J., Tauc, M., et al. (2014). The ω 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol. Metab.* *3*, 834–847.
- Poher, A.-L., Altirriba, J., Veyrat-Durebex, C., and Rohner-Jeanrenaud, F. (2015). Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Front. Physiol.* *6*.
- Poligone, B., and Baldwin, A.S. (2001). Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *J. Biol. Chem.* *276*, 38658–38664.
- Poulos, S.P., Dodson, M.V., Culver, M.F., and Hausman, G.J. (2016). The increasingly complex regulation of adipocyte differentiation. *Exp. Biol. Med.* *241*, 449–456.
- Premyslova, M., Chisaka, H., Okamura, K., and Challis, J.R.G. (2006). IL-1beta treatment does not co-ordinately up-regulate mPGES-1 and COX-2 mRNA expression, but results in higher degree of cellular and intracellular co-localization of their immunoreactive proteins in human placenta trophoblast cells. *Placenta* *27*, 576–586.
- Psarra, A., Nikolaou, A., Kokotou, M.G., Linnios, D., and Kokotos, G. (2017). Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* *27*, 1047–1059.
- Rahman, M.H., Bhusal, A., Lee, W.-H., Lee, I.-K., and Suk, K. (2018). Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: Translational significance. *Biochem. Pharmacol.* *153*, 123–133.
- Rajala, M.W., Lin, Y., Ranalletta, M., Yang, X.M., Qian, H., Gingerich, R., Barzilai, N., and Scherer, P.E. (2002). Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 1920–1930.

- Ranel, H.J., and Griffin, J.D. (2003). The effects of prostaglandin E2 on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 964, 42–50.
- Red Eagle, A., and Chawla, A. (2010). In obesity and weight loss, all roads lead to the mighty macrophage. *J. Clin. Invest.* 120, 3437–3440.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003). The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9244–9249.
- Reis, B.S., Lee, K., Fanok, M.H., Mascaraque, C., Amoury, M., Cohn, L.B., Rogoz, A., Dallner, O.S., Moraes-Vieira, P.M., Domingos, A.I., et al. (2015). Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 194, 5253–5260.
- Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 986–1000.
- Richard, D., Monge-Roffarello, B., Chechi, K., Labbé, S.M., and Turcotte, E.E. (2012). Control and physiological determinants of sympathetically mediated brown adipose tissue thermogenesis. *Front. Endocrinol.* 3, 36.
- Richelsen, B., and Pedersen, S.B. (1987). Antilipolytic Effect of Prostaglandin E2 in Perfused Rat Adipocytes. *Endocrinology* 121, 1221–1226.
- Richelsen, B., Eriksen, E.F., Beck-Nielsen, H., and Pedersen, O. (1984). Prostaglandin E2 Receptor Binding and Action in Human Fat Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 7–12.
- Riendeau, D., Aspiotis, R., Ethier, D., Gareau, Y., Grimm, E.L., Guay, J., Guiral, S., Juteau, H., Mancini, J.A., Méthot, N., et al. (2005). Inhibitors of the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase (mPGES-1) derived from MK-886. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3352–3355.
- Robertson, R.P. (1974). In vivo insulin secretion: Prostaglandin and adrenergic interrelationships. *Prostaglandins* 6, 501–508.
- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O.T., and Poitout, V. (2004). β -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53, S119–S124.
- Rogers, R.C., Barnes, M.J., and Hermann, G.E. (2009). Leptin “gates” thermogenic action of thyrotropin-releasing hormone in the hindbrain. *Brain Res.* 1295, 135–141.
- Romanatto, T., Cesquini, M., Amaral, M.E., Roman, É.A., Moraes, J.C., Torsoni, M.A., Cruz-Neto, A.P., and Velloso, L.A. (2007). TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—Effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 28, 1050–1058.
- Rong, J.X., Qiu, Y., Hansen, M.K., Zhu, L., Zhang, V., Xie, M., Okamoto, Y., Mattie, M.D., Higashiyama, H., Asano, S., et al. (2007). Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* 56, 1751–1760.

- Rong, Y., Yuan, C.-H., Qu, Z., Zhou, H., Guan, Q., Yang, N., Leng, X.-H., Bu, L., Wu, K., and Wang, F.-B. (2016). Doxorubicin resistant cancer cells activate myeloid-derived suppressor cells by releasing PGE₂. *Sci. Rep.* *6*, 23824.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* *14*, 1293–1307.
- Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* *16*, 22–26.
- Ross, S.A., and Dupre, J. (1978). Effects of ingestion of triglyceride or galactose on secretion of gastric inhibitory polypeptide and on responses to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. *Diabetes* *27*, 327–333.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Santoro, M.G. (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* *403*, 103–118.
- Saberi, M., Woods, N.-B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J.C., Bandyopadhyay, G., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab.* *10*, 419–429.
- Säfhholm, J., Manson, M.L., Bood, J., Delin, I., Orre, A.-C., Bergman, P., Al-Ameri, M., Dahlén, S.-E., and Adner, M. (2015). Prostaglandin E2 inhibits mast cell-dependent bronchoconstriction in human small airways through the E prostanoid subtype 2 receptor. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 1232-1239.e1.
- Sahu, A. (1998). Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* *139*, 795–798.
- Samad, F., Yamamoto, K., Pandey, M., and Loskutoff, D.J. (1997). Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol. Med. Camb. Mass* *3*, 37–48.
- Sampey, A.V., Monrad, S., and Crofford, L.J. (2005). Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2. *Arthritis Res. Ther.* *7*, 114–117.
- Sanchez-Alavez, M., Klein, I., Brownell, S.E., Tabarean, I.V., Davis, C.N., Conti, B., and Bartfai, T. (2007). Night eating and obesity in the EP3R-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3009–3014.
- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M., Sparks, C.A., Tang, Y., Li, H., and Guertin, D.A. (2012). PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* *16*, 348–362.
- Schippers, M., Beljaars, L., Post, E., Lotersztajn, S., Reker-Smit, C., Han, B., Munoz-Llancao, P., Schmidt, M., and Poelstra, K. (2017). Upregulation of Epac-1 in Hepatic Stellate Cells by Prostaglandin E2 in Liver Fibrosis Is Associated with Reduced Fibrogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *363*, 126–135.

- Schmitz-Peiffer, C. (2010). Targeting Ceramide Synthesis to Reverse Insulin Resistance. *Diabetes* 59, 2351–2353.
- Schneider, K., Valdez, J., Nguyen, J., Vawter, M., Galke, B., Kurtz, T.W., and Chan, J.Y. (2016). Increased Energy Expenditure, *Ucp1* Expression, and Resistance to Diet-induced Obesity in Mice Lacking Nuclear Factor-Erythroid-2-related Transcription Factor-2 (*Nrf2*). *J. Biol. Chem.* 291, 7754–7766.
- Schulz, M., and Engelhardt, B. (2005). The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2, 8.
- Schuster, V.L. (1998). Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 221–242.
- Schuster, V.L. (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68, 633–647.
- Schuster, V.L., Chi, Y., and Lu, R. (2015). The Prostaglandin Transporter: Eicosanoid Reuptake, Control of Signaling, and Development of High-Affinity Inhibitors as Drug Candidates. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 126, 248–257.
- Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., and Porte, D. (1996a). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2, 589–593.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1996b). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98, 1101–1106.
- Seale, P. (2015). Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation. *Diabetes* 64, 2369–2375.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Chin, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch. *Nature* 454, 961–967.
- Sehic, E., Székely, M., Ungar, A.L., Oladehin, A., and Blatteis, C.M. (1996). Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res. Bull.* 39, 391–399.
- Sell, H., Berger, J.P., Samson, P., Castriota, G., Lalonde, J., Deshaies, Y., and Richard, D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology* 145, 3925–3934.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14, e1002533.
- Sepa-Kishi, D.M., and Ceddia, R.B. (2018). White and beige adipocytes: are they metabolically distinct? *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 33.

Shabalina, I.G., Petrovic, N., de Jong, J.M.A., Kalinovich, A.V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2013). UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic. *Cell Rep.* 5, 1196–1203.

Shahid, M., Javed, A.A., Chandra, D., Ramsey, H.E., Shah, D., Khan, M.F., Zhao, L., and Wu, M.X. (2016). IEX-1 deficiency induces browning of white adipose tissue and resists diet-induced obesity. *Sci. Rep.* 6, 24135.

Shalev, A., Holst, J.J., and Keller, U. (1997). Effects of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) on whole-body protein metabolism in healthy man. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 10–16.

Shaw, J.E., Ramwell, P.W., and Plasse, W. the technical assistance of A.M. (1968). Release of Prostaglandin from Rat Epididymal Fat Pad on Nervous and Hormonal Stimulation. *J. Biol. Chem.* 243, 1498–1503.

Shen, Y., Zuo, S., Wang, Y., Shi, H., Yan, S., Chen, D., Xiao, B., Zhang, J., Gong, Y., Shi, M., et al. (2016). Thromboxane Governs the Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells Toward Endothelial Cells In Vitro and In Vivo Novelty and Significance. *Circ. Res.* 118, 1194–1207.

Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801.

Sipols, A.J., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1995). Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44, 147–151.

Sjögren, T., Nord, J., Ek, M., Johansson, P., Liu, G., and Geschwindner, S. (2013). Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3806–3811.

Snijder, M.B., Dekker, J.M., Visser, M., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D.A., Kostense, P.J., Yudkin, J.S., Heine, R.J., Nijpels, G., and Seidell, J.C. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1192–1197.

So, M., Gaidhu, M.P., Maghdoori, B., and Ceddia, R.B. (2011). Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis.* 10, 99.

Song, E., Ouyang, N., Hörbelt, M., Antus, B., Wang, M., and Exton, M.S. (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* 204, 19–28.

Souza, G.F.P., Solon, C., Nascimento, L.F., De-Lima-Junior, J.C., Nogueira, G., Moura, R., Rocha, G.Z., Fioravante, M., Bobbo, V., Morari, J., et al. (2016). Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. *Sci. Rep.* 6.

Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113, 6576–6583.

- Spinella, F., Rosanò, L., Di Castro, V., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2004). Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *J. Biol. Chem.* 279, 46700–46705.
- Sreeramkumar, V., Fresno, M., and Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol. Cell Biol.* 90, 579–586.
- Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., Townsend, K.L., Lee, M.-Y., Takahashi, H., So, K., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Hellbach, K., Hirshman, M.F., et al. (2015). A Novel Role for Subcutaneous Adipose Tissue in Exercise-Induced Improvements in Glucose Homeostasis. *Diabetes* 64, 2002–2014.
- Stastny, J., Bienertova-Vasku, J., and Vasku, A. (2012). Visfatin and its role in obesity development. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 6, 120–124.
- Steinberg, D. (1967). Prostaglandins as Adrenergic Antagonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139, 897–909.
- Steinberg, D., Vaughan, M., Nestel, P.J., and Bergström, S. (1963). Effects of prostaglandin E opposing those of catecholamines on blood pressure and on triglyceride breakdown in adipose tissue. *Biochem. Pharmacol.* 12, 764–766.
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312.
- St-Jacques, B., and Ma, W. (2014). Peripheral prostaglandin E2 prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. *Exp. Neurol.* 261, 354–366.
- Storer, P.D., Xu, J., Chavis, J.A., and Drew, P.D. (2005). Cyclopentenone Prostaglandins PGA2 and 15-Deoxy- Δ 12,14 PGJ2 Suppress Activation of Murine Microglia and Astrocytes: Implications for Multiple Sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 80, 66.
- Straus, D.S., and Glass, C.K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 21, 185–210.
- Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes* 56, 2910–2918.
- Strong, P., Coleman, R.A., and Humphrey, P.P.A. (1992). Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: Probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins* 43, 559–566.
- Stylianou, I.M., Langley, S.R., Walsh, K., Chen, Y., Revenu, C., and Paigen, B. (2008). Differences in DBA/1J and DBA/2J reveal lipid QTL genes. *J. Lipid Res.* 49, 2402–2413.
- Subbaramaiah, K., Morris, P.G., Zhou, X.K., Morrow, M., Du, B., Giri, D., Kopelovich, L., Hudis, C.A., and Dannenberg, A.J. (2012). Increased Levels of COX-2 and Prostaglandin E2 Contribute to Elevated Aromatase Expression in Inflamed Breast Tissue of Obese Women. *Cancer Discov.* 2, 356–365.

- 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.
- Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1993). Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 2712–2718.
- Sugita, R., Kuwabara, H., Kubota, K., Sugimoto, K., Kiho, T., Tengeji, A., Kawakami, K., and Shimada, K. (2016). Simultaneous Inhibition of PGE2 and PGI2 Signals Is Necessary to Suppress Hyperalgesia in Rat Inflammatory Pain Models.
- Sun, K., and Ferguson, A.V. (1997). Cholecystokinin activates area postrema neurons in rat brain slices. *Am. J. Physiol.* 272, R1625-1630.
- Sun, S., Ji, Y., Kersten, S., and Qi, L. (2012). Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. *Annu. Rev. Nutr.* 32, 261–286.
- Sung, H.-K., Doh, K.-O., Son, J.E., Park, J.G., Bae, Y., Choi, S., Nelson, S.M.L., Cowling, R., Nagy, K., Michael, I.P., et al. (2013). Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* 17, 61–72.
- Tai, H.-H., Ensor, C.M., Tong, M., Zhou, H., and Yan, F. (2002). Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68, 483–493.
- Takahashi, A., Shimazu, T., and Maruyama, Y. (1992). Importance of sympathetic nerves for the stimulatory effect of cold exposure on glucose utilization in brown adipose tissue. *Jpn. J. Physiol.* 42, 653–664.
- Takeuchi, K. (2010). Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Adv. Clin. Chem.* 51, 121–144.
- Tamma, G., Wiesner, B., Furkert, J., Hahm, D., Oksche, A., Schaefer, M., Valenti, G., Rosenthal, W., and Klussmann, E. (2003). The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho. *J. Cell Sci.* 116, 3285–3294.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.
- Tang, E.H.C., Cai, Y., Wong, C.K., Rocha, V.Z., Sukhova, G.K., Shimizu, K., Xuan, G., Vanhoutte, P.M., Libby, P., and Xu, A. (2015). Activation of prostaglandin E2-EP4 signaling reduces chemokine production in adipose tissue. *J. Lipid Res.* 56, 358–368.
- Tang-Christensen, M., Vrang, N., and Larsen, P.J. (2001). Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 25 Suppl 5, S42-47.

- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S., and Watanabe, K. (2002). Identification and Characterization of a Novel Type of Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 884–889.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E2 Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 32775–32782.
- Tannahill, G., Curtis, A., Adamik, J., Palsson-McDermott, E., McGettrick, A., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N., Kelly, B., Foley, N., et al. (2013). Succinate is a danger signal that induces IL-1 β via HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271.
- Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol. Rev.* 93, 359–404.
- Teske, J.A., Billington, C.J., and Kotz, C.M. (2014). Mechanisms underlying obesity resistance associated with high spontaneous physical activity. *Neuroscience* 256, 91–100.
- Thaler, J.P., Yi, C.-X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 153–162.
- Thurnher, M., Putz, T., Gander, H., Rahm, A., Bartsch, G., and Ramoner, R. (2005). The cyclopentenone prostaglandin PGA2 costimulates the maturation of human dendritic cells. *Exp. Hematol.* 33, 144–150.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 772–783.
- Timmers, S., Schrauwen, P., and de Vogel, J. (2008). Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol. Behav.* 94, 242–251.
- Toita, R., Kawano, T., Murata, M., and Kang, J.-H. (2016). Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice. *Biomaterials* 110, 81–88.
- Tran, P.O.T., Gleason, C.E., Poitout, V., and Robertson, R.P. (1999). Prostaglandin E2 Mediates Inhibition of Insulin Secretion by Interleukin-1 β . *J. Biol. Chem.* 274, 31245–31248.
- Tran, P.O.T., Gleason, C.E., and Robertson, R.P. (2002). Inhibition of interleukin-1 β -induced COX-2 and EP3 gene expression by sodium salicylate enhances pancreatic islet beta-cell function. *Diabetes* 51, 1772–1778.
- Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., Pandher, K., Lapointe, J.-M., Saha, S., Roach, M.L., et al. (2003). Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9044–9049.

- Tsai, V.W., Zhang, H.P., Manandhar, R., Lee-Ng, K.K.M., Lebhar, H., Marquis, C.P., Husaini, Y., Sainsbury, A., Brown, D.A., and Breit, S.N. (2018). Treatment with the TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 reduces the adiposity and corrects the metabolic dysfunction of mice with diet-induced obesity. *Int. J. Obes.* 2005 42, 561–571.
- Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R.L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., and Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 24, RC19-21.
- Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000–1004.
- Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T., and Ichikawa, A. (2004). Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1066–1072.
- Tsukazaki, K., Nikami, H., Shimizu, Y., Kawada, T., Yoshida, T., and Saito, M. (1995). Chronic administration of beta-adrenergic agonists can mimic the stimulative effect of cold exposure on protein synthesis in rat brown adipose tissue. *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 96–100.
- Tupone, D., Madden, C.J., and Morrison, S.F. (2014). Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Front. Neurosci.* 8.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 3, 333–341.
- Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., et al. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395, 281–284.
- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389, 610–614.
- Van Coillie, E., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1999). The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10, 61–86.
- Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., and De Block, C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875–880.
- Vegiopoulos, A., Müller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Berriel Diaz, M., Rozman, J., Hrabe de Angelis, M., Nüsing, R.M., et al. (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328, 1158–1161.

- Vegiopoulos, A., Rohm, M., and Herzig, S. (2017). Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* *36*, 1999–2017.
- Véret, J., Bellini, L., Giussani, P., Ng, C., Magnan, C., and Le Stunff, H. (2014). Roles of Sphingolipid Metabolism in Pancreatic β Cell Dysfunction Induced by Lipotoxicity. *J. Clin. Med.* *3*, 646–662.
- Vila, I.K., Badin, P.-M., Marques, M.-A., Monbrun, L., Lefort, C., Mir, L., Louche, K., Bourlier, V., Roussel, B., Gui, P., et al. (2014). Immune Cell Toll-like Receptor 4 Mediates the Development of Obesity- and Endotoxemia-Associated Adipose Tissue Fibrosis. *Cell Rep.* *7*, 1116–1129.
- de Vilhena e Santos, D.M., Katzmarzyk, P.T., Seabra, A.F.T., and Maia, J.A.R. (2012). Genetics of physical activity and physical inactivity in humans. *Behav. Genet.* *42*, 559–578.
- Vittoz, N.M., and Berridge, C.W. (2006). Hypocretin/orexin selectively increases dopamine efflux within the prefrontal cortex: involvement of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *31*, 384–395.
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 181–193.
- Wang, M., Zukas, A.M., Hui, Y., Ricciotti, E., Puré, E., and FitzGerald, G.A. (2006). Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14507–14512.
- Wang, M., Lee, E., Song, W., Ricciotti, E., Rader, D.J., Lawson, J.A., Puré, E., and FitzGerald, G.A. (2008). Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* *117*, 1302–1309.
- Wang, P., Zhu, F., and Konstantopoulos, K. (2010). Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B activation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *298*, C1445–C1456.
- Wang, P., Guan, P.-P., Yu, X., Zhang, L.-C., Su, Y.-N., and Wang, Z.-Y. (2016). Prostaglandin I2 Attenuates Prostaglandin E2-Stimulated Expression of Interferon γ in a β -Amyloid Protein- and NF- κ B-Dependent Mechanism. *Sci. Rep.* *6*, srep20879.
- Wang, W., Kissig, M., Rajakumari, S., Huang, L., Lim, H., Won, K.-J., and Seale, P. (2014). Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 14466–14471.
- Wang, Y., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2005). Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 555–563.
- Watanabe, K., Kurihara, K., Tokunaga, Y., and Hayaishi, O. (1997). Two Types of Microsomal Prostaglandin E Synthase: Glutathione-Dependent and -Independent Prostaglandin E Synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 148–152.

- Watanabe, K., Kurihara, K., and Suzuki, T. (1999). Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1439, 406–414.
- Watt, M.J., and Steinberg, G.R. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem. J.* 414, 313–325.
- Wei, W., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., Suijkerbuijk, M., Kops, N., Bos, P.K., Verhaar, J.A.N., Zuurmond, A.-M., Dell'Accio, F., and van Osch, G.J.V.M. (2017). High fat diet accelerates cartilage repair in DBA/1 mice. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 35, 1258–1264.
- Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., and Pagliassotti, M.J. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E275-281.
- Weigle, D.S., Duell, P.B., Connor, W.E., Steiner, R.A., Soules, M.R., and Kuijper, J.L. (1997). Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 561–565.
- Weinberg, E.D. (1984). Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* 64, 65–102.
- 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.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1785–1788.
- Wensveen, F.M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T., and Polić, B. (2015). The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur. J. Immunol.* 45, 2446–2456.
- Williams, D.L., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2009a). Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology* 150, 1680–1687.
- Williams, D.L., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2009b). Hindbrain leptin receptor stimulation enhances the anorexic response to cholecystokinin. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1238–R1246.
- Williams, L.M., Campbell, F.M., Drew, J.E., Koch, C., Hoggard, N., Rees, W.D., Kamolrat, T., Thi Ngo, H., Steffensen, I.-L., Gray, S.R., et al. (2014). The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. *PLoS One* 9, e106159.
- Winer, D.A., Winer, S., Dranse, H.J., and Lam, T.K.T. (2017). Immunologic impact of the intestine in metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 127, 33–42.
- Wisløff, U., Najjar, S.M., Ellingsen, O., Haram, P.M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernström, M., Rezaei, K., Lee, S.J., Koch, L.G., et al. (2005). Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science* 307, 418–420.

- Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., and Porte, D. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503–505.
- Woods, S.C., Lutz, T.A., Geary, N., and Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1219–1235.
- Wu, D., Mennerich, D., Arndt, K., Sugiyama, K., Ozaki, N., Schwarz, K., Wei, J., Wu, H., Bishopric, N.H., and Doods, H. (2009). The effects of microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion in acute cardiac ischemia in mice. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 31–33.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332, 243–247.
- Wu, J., Jun, H., and McDermott, J.R. (2015). Formation and activation of thermogenic fat. *Trends Genet. TIG* 31, 232–238.
- Wu, L.E., Meoli, C.C., Mangiafico, S.P., Fazakerley, D.J., Cogger, V.C., Mohamad, M., Pant, H., Kang, M.-J., Powter, E., Burchfield, J.G., et al. (2014). Systemic VEGF-A Neutralization Ameliorates Diet-Induced Metabolic Dysfunction. *Diabetes* 63, 2656–2667.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelman, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151–158.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
- Xu, H., Fu, J.-L., Miao, Y.-F., Wang, C.-J., Han, Q.-F., Li, S., Huang, S.-Z., Du, S.-N., Qiu, Y.-X., Yang, J.-C., et al. (2016a). Prostaglandin E2 receptor EP3 regulates both adipogenesis and lipolysis in mouse white adipose tissue. *J. Mol. Cell Biol.* 8, 518–529.
- Xu, L., Huang, D., Hu, Q., Wu, J., Wang, Y., and Feng, J. (2015). Betaine alleviates hepatic lipid accumulation via enhancing hepatic lipid export and fatty acid oxidation in rats fed with a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 113, 1835–1843.
- Xu, X., Yuan, X., Li, N., Dewey, W.L., Li, P.-L., and Zhang, F. (2016b). Lysosomal cholesterol accumulation in macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38(-/-) mice. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 1001–1013.
- Yamaguchi, M., Murakami, T., Tomimatsu, T., Nishio, Y., Mitsuda, N., Kanzaki, T., Kurachi, H., Shima, K., Aono, T., and Murata, Y. (1998). Autocrine inhibition of leptin production by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) through TNF-alpha type-I receptor in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 30–34.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., et al. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288–1295.


- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* *423*, 762–769.
- Yamazaki, T., Okawa, S., and Takahashi, M. (2016). The effects on weight loss and gene expression in adipose and hepatic tissues of very-low carbohydrate and low-fat isoenergetic diets in diet-induced obese mice. *Nutr. Metab.* *13*, 78.
- Yang, L., Huang, Y., Porta, R., Yanagisawa, K., Gonzalez, A., Segi, E., Johnson, D.H., Narumiya, S., and Carbone, D.P. (2006). Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. *Cancer Res.* *66*, 9665–9672.
- Yang, P., Jiang, Y., and Fischer, S.M. (2014). Prostaglandin E3 metabolism and cancer. *Cancer Lett.* *348*, 1–11.
- Yang, Y.R., Jang, H.-J., Choi, S.-S., Lee, Y.H., Lee, G.H., Seo, Y.-K., Choi, J.H., Park, D., Koh, A., Kim, I.S., et al. (2015). Obesity resistance and increased energy expenditure by white adipose tissue browning in Oga(+/-) mice. *Diabetologia* *58*, 2867–2876.
- Yao, C., Sakata, D., Esaki, Y., Li, Y., Matsuoka, T., Kuroiwa, K., Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2009). Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat. Med.* *15*, 633–640.
- Yasui, M., Tamura, Y., Minami, M., Higuchi, S., Fujikawa, R., Ikedo, T., Nagata, M., Arai, H., Murayama, T., and Yokode, M. (2015). The Prostaglandin E2 Receptor EP4 Regulates Obesity-Related Inflammation and Insulin Sensitivity. *PLOS ONE* *10*, e0136304.
- Young, P., Arch, J. r. s., and Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* *167*, 10–14.
- Zambrano-Zaragoza, J.F., Romo-Martínez, E.J., Durán-Avelar, M. de J., García-Magallanes, N., and Vibanco-Pérez, N. (2014). Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. *Int. J. Inflamm.* *2014*.
- Zhang, Y., and Daaka, Y. (2011). PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cγ pathway. *Blood* *118*, 5355–5364.
- Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C., and Greenberg, A.S. (2002). Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* *51*, 2929–2935.
- Zhou, W., Hashimoto, K., Goleniewska, K., O’Neal, J.F., Ji, S., Blackwell, T.S., Fitzgerald, G.A., Egan, K.M., Geraci, M.W., and Peebles, R.S. (2007). Prostaglandin I2 analogs inhibit proinflammatory cytokine production and T cell stimulatory function of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 702–710.
- Zilversmit, D.B. (1975). Mechanisms of cholesterol accumulation in the arterial wall. *Am. J. Cardiol.* *35*, 559–566.

(2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *The Lancet* 387, 1377–1396.

(2017). World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet.

ANNEXE 1

Composition des différents régimes utilisés pour le développement du modèle d'obésité induite



COMPLETE CARE COMPETENCE
www.safe-diets.com

Rats, Mice & Hamsters
maintenance diet

SAFE A04

Nutritional Composition/kg

AMINO ACIDS		TOTAL *
Arginine	mg	9 000
Cystine	mg	2 500
Lysine	mg	7 200
Methionine	mg	2 800
Tryptophane	mg	1 900
Glycine	mg	8 100

FATTY ACIDS		TOTAL *
Palmitic acid	mg	5 900
Palmitoleic acid	mg	150
Stearic acid	mg	600
Oleic acid	mg	4 800
Linoleic acid	mg	15 000
Linolenic acid	mg	1 200

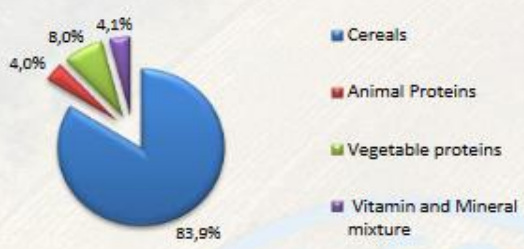
MINERALS		TOTAL *
P	mg	5 500
Ca	mg	7 300
Na	mg	2 500
K	mg	6 000
Mg	mg	1 600
Mn	mg	70
Fe	mg	270
Cu	mg	16
Zn	mg	65
Cl	mg	4 000

VITAMINS		TOTAL *
Vitamin A	UI	7 500
Vitamin D3	UI	1 000
Vitamin B1	mg	5
Vitamin B2	mg	6,5
Vitamin B5	mg	10
Vitamin B6	mg	3
Vitamin B12	mg	0,01
Vitamin E	UI	30
Vitamin K3	mg	2,5
Niacin	mg	70
Folic Ac.	mg	0,35
Biotin	mg	0,08
Choline	mg	1 600

Composition

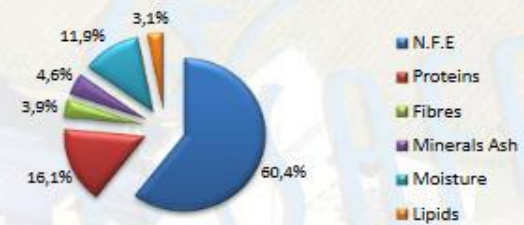
Barley, wheat, maize, soybean meal, wheat bran, hydrolyzed fish proteins, dicalcium phosphate, pre-mixture of minerals, calcium carbonate, pre-mixture of vitamins.

Centesimal Composition in %



Category	Percentage
Cereals	83,9%
Animal Proteins	8,0%
Vegetable proteins	4,1%
Vitamin and Mineral mixture	4,0%

Nutritional Composition in %



Category	Percentage
N.F.E	60,4%
Proteins	16,1%
Fibres	11,9%
Minerals Ash	3,9%
Moisture	3,1%
Lipids	4,6%


Energy value**	Kcal/kg	Mj/kg	% Proteins	% Lipide	% Carbohydrates
Atwater	3 338	13,97	18,3	8,4	72,4
ME	3 146	13,17	-	-	-

** Energy calcul information:
<http://www.safe-diets.com/en/cervicoes-r-and-d/diet-energy/>

Nitrogen free extract		
- of which starch	(%)	48,6
- of which total sugars	(%)	3,2

Pellets Technology

		Mean*
Diameter	mm	15,43
Resistance to crushing	kgf/cm ²	22,7
Resistance to abraking	%	97,3
Specific mass	g/l	645
Average pellet weight	g	5,319
Average pellet length	mm	22,64



* Values are given as an indication only. They are calculated averages of product raw values. They are indicative and have no contractual value. They are subject to variations related to production conditions storage and analytical methods. An analysis is performed on request.

N.F.E.: Nitrogen-free extract, calculated value.

Updated October 05th 2017

T: +33(0)3 86 53 76 90 • Fax: +33(0)3 86 53 35 96 • info@safe-diets.com

ssniff® EF acc. D12492 (I) mod.



Experimental diet for rats and mice, very high fat content (LARD) / DIO series

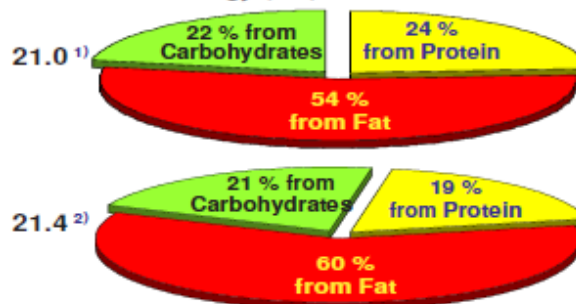
Description

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	[%]	Amino acids	[%]	Vitamins	per kg
Calcium	1.03	Lysine	1.98	Vitamin A	15,000 IU
Phosphorus	0.61	Methionine	0.83	Vitamin D ₃	1,500 IU
Sodium	0.20	Cystine	0.46	Vitamin E	150 mg
Magnesium	0.17	Met+Cys	1.28	Vitamin K (as menadione)	20 mg
Potassium	1.00	Threonine	1.07	Vitamin C	30 mg
		Tryptophan	0.31	Thiamin (B ₁)	16 mg
Fatty acids	[%]	Arginine	0.88	Riboflavin (B ₂)	16 mg
C 8:0	—	Histidine	0.76	Pyridoxine (B ₆)	18 mg
C 10:0	0.04	Valine	1.64	Cobalamin (B ₁₂)	30 µg
C 12:0	0.07	Isoleucine	1.25	Nicotinic acid	45 mg
C 14:0	0.44	Leucine	2.36	Pantothenic acid	55 mg
C 16:0	7.72	Phenylalanine	1.29	Folic acid	19 mg
C 16:1	0.94	Phe+Tyr	2.57	Biotin	310 µg
C 17:0	—	Glycine	0.50	Choline-Chloride	2,300 mg
C 18:0	4.34	Glutamic acid	5.41	Inositol	80 mg
C 18:1	13.57	Aspartic acid	1.79		
C 18:2	4.75	Proline	2.76	Trace elements	per kg
C 18:3	0.51	Alanine	0.79	Iron	139 mg
C 20:0	0.02	Serine	1.43	Manganese	82 mg
C 20:1	0.01			Zinc	56 mg
C 20:4	0.53			Copper	12 mg
C 20:5	—			Iodine	0.97 mg
C 22:6	—			Selenium	0.13 mg
				Cobalt	0.13 mg

Cholesterol [mg/kg] 265
 (original content)

Feed composition
 On request

Main products

E15742-34	10 mm pellets, Colour BLUE
E15742-347	10 mm pellets, Colour BLUE, 25 kGy <i>γ-irradiated is vitamin fortified</i>

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 2

Un traitement aigu à la metformine renforce la satiété et active les neurones nesfatinérgiques du tronc cérébral

Acute oral metformin enhances satiation and activates brainstem nesfatinergic neurons

Thaïs Rouquet, Clément Pierre, Stéphanie Gaigé, Catherine tardivel, Julien Roux, Michel Dallaporta, Bruno Bariohay, Jean-Denis Troadec, Bruno Lebrun

Obesity (publié)

L'objectif de ces travaux était d'étudier les mécanismes centraux de la metformine, un agent anti-hyperglycémique et anorexigène utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Les voies de signalisations et les structures centrales impliquées dans son effet anorexigène n'étant pas encore déterminées, nous avons choisi de focaliser nos travaux sur complexe vagal dorsal (CVD) et l'hypothalamus, deux structures centrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. Nous avons montré qu'un traitement oral de metformine induit un effet anorexigène indépendant de la leptine. Il augmente également l'activité neuronale de neurones situés dans le CVD et l'hypothalamus, indépendamment des afférences vagales. Les neurones marqués au sein du CVD sont essentiellement des neurones exprimant la nesfatine, un peptide anorexigène. En plus de ces résultats, nous avons montré que la metformine induit un ralentissement de la vidange gastrique, ainsi qu'une diminution de la taille des repas, deux mécanismes contribuant à la satiété. L'ensemble de ces résultats montrent que la metformine agit sur la satiété et suggèrent que son effet serait médié par la nesfatine.

Acute Oral Metformin Enhances Satiety and Activates Brainstem Nesfatinergic Neurons

Thaïs Rouquet^{1,2}, Pierre Clément^{1,2}, Stéphanie Gaigé¹, Catherine Tardivel^{1,3}, Julien Roux², Michel Dallaporta¹, Bruno Bariohay², Jean-Denis Troadec¹ and Bruno Lebrun¹

Objectives: The study was designed to determine metformin effects on meal pattern, gastric emptying, energy expenditure, and to identify metformin-sensitive neurons and their phenotype.

Methods: This study was performed on C57BL/6J and obese/diabetic (db/db) mice. Metformin (300 mg/kg) was administered by oral gavage. Food intake, meal pattern, oxygen consumption (VO_2), and carbon dioxide production (VCO_2) were obtained using an Oxylet Physiocage System. Gastric emptying assay and real-time RT-PCR from dorsal vagal complex extracts were also performed. C-Fos expression was used as a marker of neuronal activation. Phenotypic characterization of activated neurons was performed using either proopiomelanocortin (POMC)-Tau-Topaz GFP transgenic mice or NUCB2/nesfatin-1 and tyrosine hydroxylase (TH) labeling.

Results: Acute *per os* metformin treatment slowed down gastric emptying, reduced meal size, but not meal number in a leptin-independent manner, and transiently decreased energy expenditure in a leptin-dependent manner. Metformin specifically activated central circuitry within the brainstem, independently of vagal afferents. Finally, while POMC neurons seemed sparsely activated, we report that a high proportion of the c-Fos positive cells were nesfatinergic neurons, some of which coexpressing TH.

Conclusions: Altogether, these results show that metformin modifies satiety by activating brainstem circuitry and suggest that NUCB2/nesfatin-1 could be involved in this metformin effect.

Obesity (2014) 00, 00–00. doi:10.1002/oby.20902

Introduction

Metformin, a biguanide antihyperglycaemic agent, has been used for treating type 2 diabetes for over 50 years with a very good safety record and is still considered as the best treatment for this disease (1). In contrast to other antihyperglycaemic treatments, such as insulin, thiazolidinediones, and sulphonylureas, metformin has been described as inducing significant weight loss in diabetic and nondiabetic patients (2–4). This improvement in body weight control does not seem to depend on modulation of energy expenditure (EE; 2,5,6), but is associated with reduced food intake (3–8). The mechanisms of metformin's anorectic effect are not yet fully understood.

An action on the central neuronal circuits involved in food intake control has been suggested, with a first focus on the hypothalamus. Metformin treatment was shown to improve central leptin sensitivity in high-fat diet-fed rats (9), and to increase leptin-receptor expression within the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC) (10).

However, metformin effects on the hypothalamic neuropeptidergic systems involved in leptin signaling integration, i.e., the orexigenic neuropeptide Y (NPY) and the anorexigenic proopiomelanocortin (POMC), remain controversial (7,11,12). Metformin was also shown to act on the energy sensor adenosine-monophosphate-protein-kinase (AMPK) within the hypothalamus (6,13). Recently, oral metformin treatment has also been shown to induce c-Fos activation in the nucleus tractus solitarius (NTS) (5), a brainstem nucleus involved in satiety as well as illness-induced anorexia.

Since metformin readily crosses the blood brain barrier (12) and exerts anorexia when injected intracerebroventricularly (icv; 6,11), it appears possible that metformin directly activates central neurons. Alternatively, metformin could trigger gastrointestinal signals, which could in turn activate vagal afferents or reach the brain via a humoral route. Among the various gastrointestinal signals generated in response to food ingestion, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) has been pointed out as a potential mediator of metformin anorectic

¹ EA 4674, Laboratoire de Physiologie et Physiopathologie du Système Nerveux Somato-Moteur et Neurovégétatif, FST St Jérôme, Aix-Marseille Université, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13013 Marseille, France. Correspondence: Lebrun Bruno (bruno.lebrun@univ-amu.fr) ² Biomcostasis CRO, FST St Jérôme, Service B52, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, Marseille ³ INRA, Département AlimH, 63122 St Genès Champanelle, France.

Funding agencies: This work was supported by the Aix Marseille University, by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and by Biomeostasis.

Disclosure: The authors have no conflict of interest to declare.

Author Contributions: RT, PC, GS, TC, and DM performed the experiments and analyzed the results. RJ, BB, TJD, and LB designed the study and analyzed the results. LB wrote the paper.

Received: 17 April 2014; **Accepted:** 18 August 2014; **Published online** 00 Month 2014. doi:10.1002/oby.20902

effects (8,14-16). Overall, analysis of the neuronal and signaling pathways involved in the anorectic effect of metformin remains very limited. Among the unexplored potential players, nesfatin-1, a peptide derived from nucleobindin 2 (NUCB2), exerts potent anorectic action after either peripheral or central administration (17) and its icv injection in high-fat diet-fed rats recapitulates many of the metabolic effects of metformin (18).

The present study aimed to determine the effect of an acute *per os* administration of metformin on food intake, EE, and to identify central c-Fos activation pattern in wild type (WT), and leptin-receptor deficient db/db mice. We asked whether POMC neurons or nesfatinergic neurons were activated in response to peripheral metformin administration.

Methods

Animals

Adult male C57BL/6J (12 weeks) and db/db mice (15 weeks) were, respectively, purchased from Charles River Laboratories (L'Abresle, France) and from Janvier Laboratories (Le Genest St Isle, France). Additional experiments were performed using male POMC-Tau-Topaz green fluorescent protein (GFP) transgenic mice (19). All mice were individually housed in standard cages, maintained in controlled environment (12 h/12 h cycle, 23-25°C and 40-50% humidity) with free access to water and food (pellet A04, SAFE, Augy, France).

Ethics statements

Experiments carried out in this study were performed in strict accordance with European Economic Community guidelines (86/609/EEC) and the local committees' recommendations (C-13-055-6, Aix-Marseille University) for the care and use of laboratory animals.

Drug administration

Metformin hydrochloride (SIGMA-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was dissolved in 0.9% saline for the behavioral experiments or in distilled water for immunostaining experiments. All treatments were administered by oral gavage one hour prior to the dark phase, at a dose of 300 mg/kg.

Measurement of body weight, food intake, and EE

Body weight was measured daily, before the onset of the dark phase. Food intake, oxygen consumption (VO_2), and carbon dioxide production (VCO_2) were measured using the Oxylet Physiocage System (Panlab/Harvard apparatus, Cornella, Spain) and the software suite METABOLISM (V2.2.01, Panlab). The respiratory exchange ratio (RER) was calculated as VCO_2/VO_2 and EE was calculated according to the formula $EE [kcal/(day \cdot kg^{0.75})] = VO_2 \times 1.44 \times [3.815 + (1.232 \times RER)]$. Mice were habituated to the metabolic chambers for 24 h before data collection.

Meal pattern analysis

Only meals strictly superior to 0.02 g and composed of one or several bouts separated by less than 5 min were considered in the meal pattern analysis.

Gastric emptying

C57BL/6J mice were fasted for 8 h, received metformin or saline 1 h prior to oral gavage with 0.2 ml of 6.5 mg/ml fluorescein-isothiocyanate-dextran 70 kDa (FD-70, Sigma) diluted in carboxymethylcellulose (1.5% w/w in water) and were anesthetized (sevo-flurane 4%) and sacrificed 10 min later. The stomach was flushed with 5 ml PBS, samples were centrifuged (3000 rpm, 5 min, 4°C) and the fluorescence of the supernatants determined in reference to a serial dilution of FD-70 standards (SYNERGY Mx microplate reader, BioTek).

RT-PCR analysis

C57BL/6J mice were food-deprived just after *per os* treatment and sacrificed 2 h later. Brains were rapidly removed and each microdissected dorsal vagal complex (DVC) was frozen in liquid nitrogen. mRNA extraction, RT, and real-time PCR were performed as previously described (22), with the primers shown in Figure 6A.

Unilateral cervical vagotomy surgery

C57BL/6J mice were anesthetized by an intraperitoneal (ip) injection of a solution of ketamine (100 mg/kg; ketamine 1000, Virbac, France), and xylazine (6 mg/kg, Rompun, Bayer), and left unilateral cervical vagotomy was performed as previously described (20).

Immunohistochemistry procedures

Mice were food-deprived just after *per os* treatment and sacrificed 2 h later under anesthesia (ketamine/xylazine: 100/6 mg/kg) by intracardiac perfusion with cold 0.1 M PBS (pH 7.4), followed by cold 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M PB. Brains were removed and postfixed 1 h in 4% PFA and rinsed overnight at 4°C in PBS. Brains were cryoprotected in 30% sucrose solution and frozen in isopentane (-40°C). 40 μ m coronal sections were prepared using a cryostat (Leica CM3050).

c-Fos immunohistochemistry was performed using an anti-c-Fos rabbit antiserum (Ab-5, Calbiochem) as previously described (21). To determine the potential activation of POMC or NUCB2/nesfatin-1 expressing neurons within the brainstem in response to metformin administration, we performed double immunohistochemistry labeling on c-Fos stained sections as previously described (20). Further phenotyping of the activated nesfatinergic neurons was performed with triple labeling against tyrosine hydroxylase (TH), with a monoclonal anti-TH primary antibody (MAB318, Chemicon).

Microscopy, image analysis, and cell count

c-Fos positive cells were counted bilaterally for each even structure, on four nonconsecutive coronal sections per animal and data were averaged per hemisection. Photomicrographs were acquired and analyzed as previously described (20,22). For triple labeling, confocal images were merged with colorized phase contrast images to allow counting of multilabeled cells.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm standard error of the means (SEMs). Statistical analysis was performed by using GraphPad 6.0 software, with repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons for cumulative food intake and body weight.

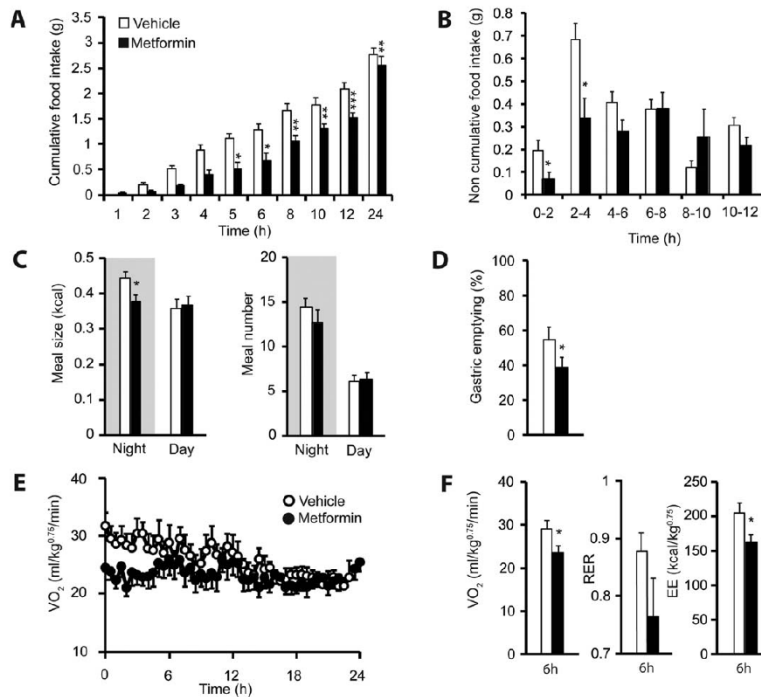


Figure 1 Effects of metformin on food intake, meal pattern, gastric emptying and EE in C57BL/6J mice. **A** Cumulative food intake over 24 h after an acute per os administration of vehicle (NaCl 0.9%; white bars; $n = 7$) or metformin (300 mg/kg; black bars; $n = 7$). **B** Noncumulative food intake by periods of 2 h over the first 12 h of the data presented in **A**. **C** Meal pattern analysis of the data presented in **A**. Meal size and meal number are given for the dark phase and light phase following per os treatment. **D** Gastric emptying 10 min after an oral load of FID-70 in C57BL/6J mice pretreated with an acute per os administration of vehicle (NaCl 0.9%; white bars; $n = 12$) or metformin (300 mg/kg; black bars; $n = 10$). Data are expressed in percentage of the FID-70 retrieved from the stomach of saline pretreated mice gavaged with FID-70 under anesthesia and sacrificed immediately after ($n = 6$). **E** Oxygen consumption (VO_2) over 24 h following an acute oral administration of vehicle (open circles, $n = 7$) or metformin (300 mg/kg; closed circles, $n = 8$). **F** Mean VO_2 , RER, and energy expenditure (EE) over 6 h after the treatment. Data are presented as means \pm SEMs. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

All other parameters were analyzed using unpaired two-tailed Student's *t* tests.

Results

Metformin reduces food intake in C57BL/6J mice

Compared with control, a single oral administration of metformin (300 mg/kg) decreased cumulative food intake in C57BL/6J mice ($F_{1,12} = 8.693$, $P < 0.05$), by 32–43% between 5 and 12 h post-treatment, with a remaining 18% reduction 24 h post-treatment (Figure 1A). Metformin induced a 64% reduction in noncumulative food intake at 0–2 h and 50% at 2–4 h (Figure 1B). Body weight did not significantly change following treatment (data not shown).

Metformin decreases meal size, but not meal number in C57BL/6J mice

During the dark phase following treatment, metformin reduced meal size (metformin: 0.38 ± 0.02 kcal versus vehicle: 0.44 ± 0.02 kcal, $P < 0.05$) (Figure 1C) but not meal number (metformin: 12.7 ± 1.4 versus vehicle: 14.4 ± 1.0 , $P = 0.3439$). Later on, during the light phase, metformin affected neither meal size nor meal number.

Metformin slows down gastric emptying in C57BL/6J mice

Metformin significantly slowed down gastric emptying (metformin: $38.61 \pm 6.07\%$ versus control: $60.11 \pm 7.08\%$, $P < 0.05$) (Figure 1D).

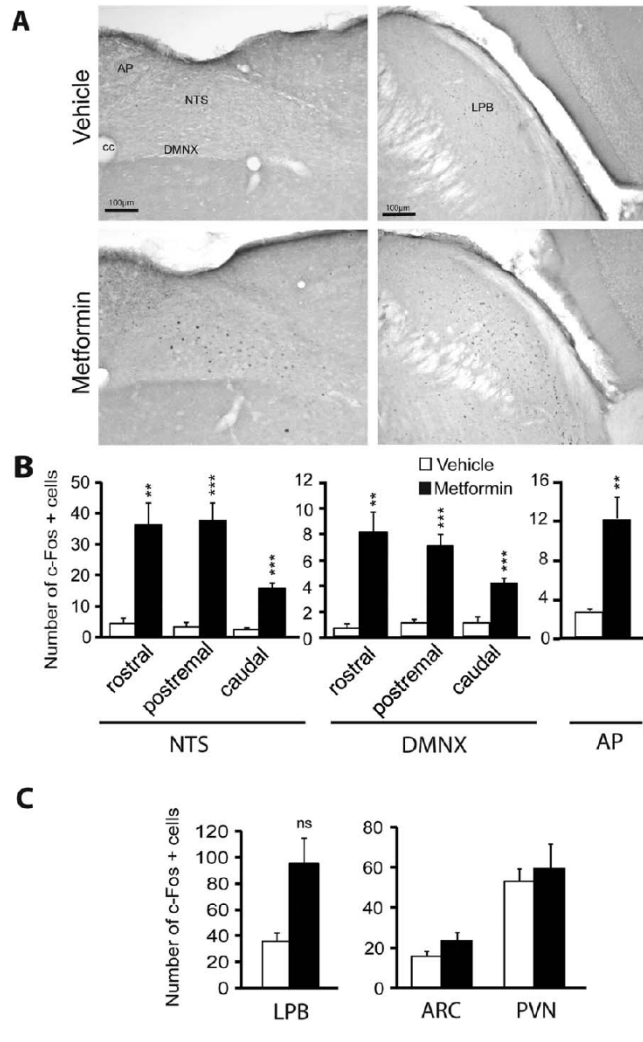


Figure 2 Effect of *per os* metformin administration on c-Fos immunoreactivity in CS7BL/6J mice. **A** Representative coronal sections illustrating the c-Fos labeling within the NTS, DMNX, AP, and LPB of CS7BL/6J mice administered *per os* with either vehicle or metformin (300 mg/kg) and sacrificed 2 h post-treatment. c-Fos labeling was performed by indirect immunohistochemistry and the secondary antibody was revealed by the avidin-biotin complex and a nickel-enhanced diaminobenzidine chromogen. **(B, C)** Quantification of the number of c-Fos immunoreactive nuclei per hemisection: **B** in the NTS, DMNX and AP (vehicle-treated: white bars, $n = 6$; metformin-treated: black bars, $n = 12$); **C** in the LPB, ARC and PVN (vehicle-treated: white bars, $n = 3$ for LPB, $n = 6$ for ARC and PVN; metformin-treated: black bars, $n = 5$ for LPB, $n = 8$ for ARC and PVN). Data are presented as means \pm SEMs per hemisection. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ significantly different from vehicle-treated mice. NTS, nucleus tractus solitarius; AP, area postrema; DMNX, dorsal motor nucleus of the vagus; LPB, lateral parabrachial nucleus; ARC, arcuate nucleus of the hypothalamus; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; CC, central canal.

Metformin transiently decreases EE in C57BL/6J mice

Plots of $\dot{V}O_2$ versus time from vehicle- and metformin-treated mice revealed divergences only during the dark phase (Figure 1E). Analysis revealed that metformin reduced $\dot{V}O_2$ and EE during the first 6 h of the dark phase ($\dot{V}O_2$: 23.6 ± 1.5 vs. 29.0 ± 2.0 ml/(kg^{0.75} · h), $P < 0.05$; EE: 161.9 ± 11.1 vs. 217.0 ± 24.9 kcal/(day · kg^{0.75}), $P < 0.05$), without significantly affecting the RER (0.76 ± 0.07 vs. 0.88 ± 0.03 , $P = 0.1650$; Figure 1F).

Brain pattern of c-Fos activation following metformin oral administration

c-Fos protein immunolabeling was used to identify the central structures activated in response to metformin administration (Figure 2). In vehicle-treated C57BL/6J mice, the number of c-Fos immunoreactive nuclei observed was very low in the NTS, the dorsal motor nucleus of the vagus (DMNX) and the arca postrema (AP), and was moderate in the lateral parabrachial nucleus (LPB), the ARC and the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). In contrast, metformin-treated mice displayed a strong rise in the number of c-Fos positive nuclei in the rostral and postremal NTS, and a moderate rise in the caudal NTS, the DMNX and the AP ($P < 0.01$; Figure 2A,B). In the lateral part of the LPB, the metformin-induced rise in the number of c-Fos positive nuclei did not reach statistical significance (95.0 ± 20.2 vs. 36.0 ± 6.6 , $P = 0.075$; Figure 2A,C). We observed no significant difference in the number of c-Fos positive nuclei between metformin-treated and vehicle-treated mice in the ARC and PVN (Figure 2C).

Metformin-induced c-Fos activation in the brainstem does not depend on vagal afferents

To determine whether metformin-induced c-Fos activation in the brainstem relied on vagal afferents activation, we performed unilateral cervical vagotomy. Comparison of ipsi- and contralateral hemisections revealed no dissymmetry in the c-Fos expression elicited by metformin treatment within the NTS and DMNX whatever the rostrocaudal level analyzed (Figure 3).

Phenotypic characterization of metformin-activated neurons

The use of metformin-treated POMC-GFP transgenic mice revealed that only about 5% of the c-Fos positive cells in the NTS were POMC neurons, whatever the rostrocaudal level analyzed (Figure 4A,B). In contrast, c-Fos and NUCB2/nesfatin-1 double immunolabeling revealed that nesfatineric neurons accounted for a high percentage of the metformin activated cells: 33-43% in the NTS and 30-50% in the DMNX, depending on the rostrocaudal level analyzed (Figure 4C,D). About 15% of the nesfatineric neurons population was activated by metformin (Figure 4E). Triple labeling with TH revealed that 27% of the c-Fos positive nesfatineric neurons in the DVC coexpressed TH (Figure 5).

Metformin induces an increase in POMC mRNA in the DVC

RT-PCR analysis of DVC extracts revealed that metformin induced a 2-3-fold increase in the transcription level of POMC, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its high affinity receptor

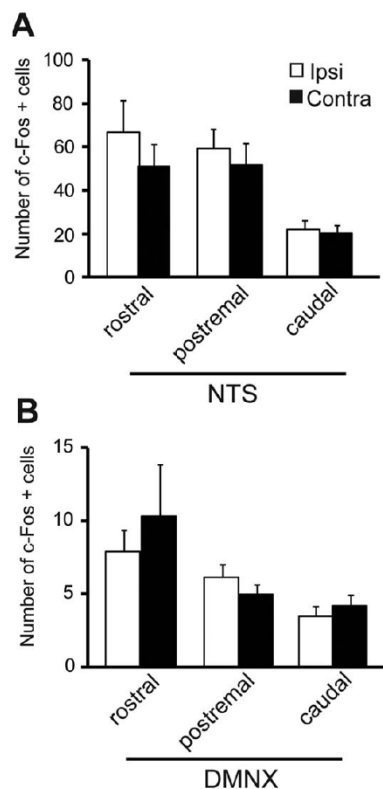


Figure 3 Effect of unilateral cervical vagotomy on c-Fos expression in the brainstem of metformin-treated C57BL/6J mice. (A, B) Quantification of metformin-induced c-Fos immunoreactivity in the hemisections ipsilateral (white bars) and contralateral (black bars) to the cervical vagotomy, in the NTS **A** and the DMNX **B** of vagotomized C57BL/6J mice ($n = 4$). Data are presented as means \pm SEMs. NTS, nucleus tractus solitarius; DMNX, dorsal motor nucleus of the vagus.

troponin-related kinase type B (TrkB), whereas it had no impact on NUCB2 mRNA (Figure 6).

Impact of metformin treatment in db/db mice

We evaluated the impact of metformin in db/db mice, a rodent model of obesity and type II diabetes. A single oral administration of metformin strongly decreased cumulative food intake 5-24 h post-treatment compared with saline-treated mice (time $F_{9,108} = 288.3$, $P < 0.0001$; treatment: $F_{1,12} = 41.54$, $P < 0.0001$; Figure 7A). Analysis of noncumulative food intake revealed a significant metformin-induced reduction at 2-4, 4-6, and 6-8 h (Figure 7B). In contrast, the body weight was not significantly affected by metformin treatment (data not shown). Meal pattern analysis revealed that similarly to its effects in C57BL/6J mice, metformin

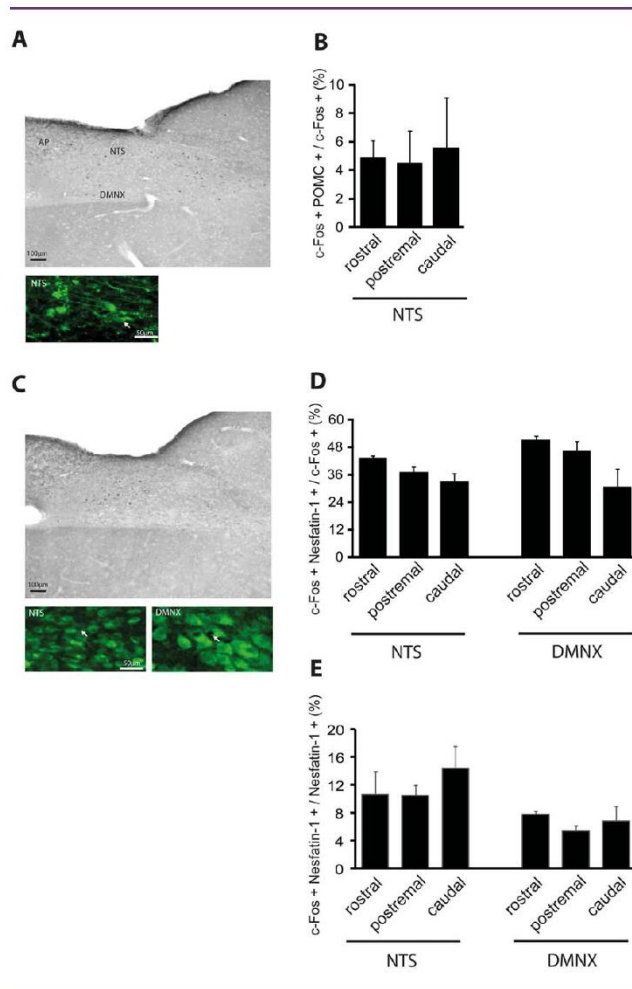


Figure 4 Phenotypic characterization of metformin-activated neurons in the brainstem. **A** Representative photomicrographs of POMC-GFP (green) and c-Fos (dark) double labeling performed in a brainstem coronal section from POMC-GFP mice sacrificed 2 h after *per os* administration of metformin (300 mg/kg). C-Fos and GFP labeling were performed by use of indirect immunohistochemistry. For c-Fos labeling, the secondary antibody was revealed by the avidin-biotin complex and a nickel-enhanced diaminobenzidine chromogen. For GFP labeling we used an Alexa-488-conjugated secondary antibody. Inset shows the merged fluorescence and phase contrast images at a higher magnification. Arrow: double-labeled cell. **B** Quantification of the percentage of double labeled (c-Fos positive/POMC-GFP positive) among c-Fos positive cells in the NTS ($n = 4$) of metformin-treated POMC-GFP mice. **C** Representative photomicrographs of nesfat-1 (green) and c-Fos (dark) double labeling performed in a brainstem coronal section ($n = 4$) C57BL/6J mouse sacrificed 2 h after *per os* administration of metformin (300 mg/kg). Inserts show the merged fluorescence and phase contrast images at a higher magnification in the NTS and DMNX. Arrow: double-labeled cell. **D** Quantification of the percentage of double labeled (c-Fos positive/NUCB2/nesfat-1 positive) among c-Fos positive cells in the NTS and DMNX ($n = 4$) metformin-treated C57BL/6J mice. **E** Quantification of the percentage of double labeled (c-Fos positive/NUCB2/nesfat-1 positive) among NUCB2/Nesfat-1 positive cells in the NTS and DMNX ($n = 4$). Data are presented as means \pm SEMs per hemisection. NTS, nucleus tractus solitarius; DMNX, dorsal motor nucleus of the vagus; POMC, proopiomelanocortin. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

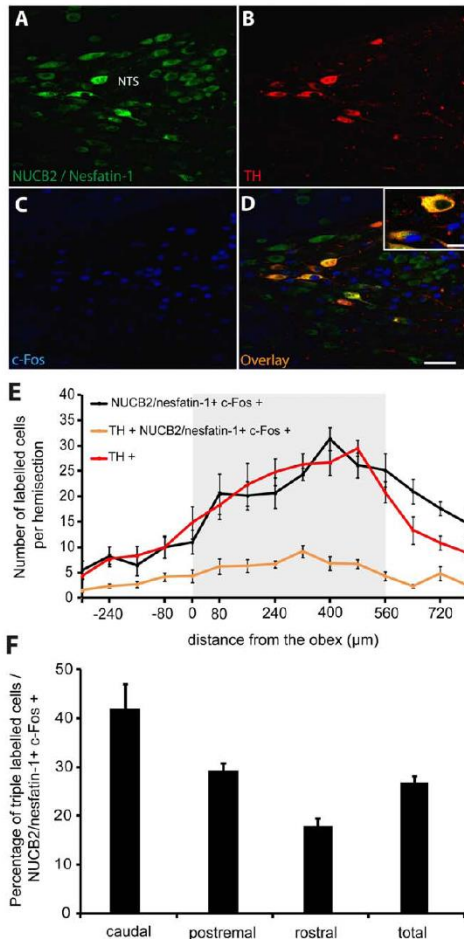


Figure 5 Phenotypic characterization of metformin-activated nesfatinergic neurons in the brainstem. Representative photomicrographs of **A** nesfatin-1 (green), **B** TH (red), **C** c-Fos (blue), and **D** merged triple labeling performed in a brainstem coronal section ($n = 3$) from a C57BL/6J mouse sacrificed 2 h after *per os* administration of metformin (300 mg/kg). C-Fos, nesfatin-1 and TH labeling were performed by use of indirect immunohistochemistry. For c-Fos labeling, the secondary antibody was revealed by the avidin-biotin complex and a nickel-enhanced diaminobenzidine chromogen. Phase contrast images have been colorized in blue. For nesfatin-1 and TH labeling we used respectively an Alexa-488-conjugated and an Alexa-594-conjugated secondary antibody and fluorescence was observed on a confocal microscope (Leica ISCS-SP2). **E** Number of TH positive cells (red), double labeled c-Fos positive/NUCB2/nesfatin-1 positive cells (black) and triple labeled (c-Fos positive/TH positive/NUCB2/nesfatin-1 positive) (orange) all along the rostrocaudal axis within the NTS plus DMNX ($n = 3$). Cell counting was performed bilaterally on serial sections from three animals and averaged per hemi-section, every other section from -0.32 mm to $+0.8$ mm relative to the obex. The gray zone corresponds to the postremal region of the DVC. **F** Percentage of TH positive cells among the c-Fos positive/NUCB2/nesfatin-1 positive cells. Scale bars: 10 μm (insert in D) and 40 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

A

Gene product	RefSeq	Primer
NUCB2	NM_001130479.2	Fw GCTGGATGCCCTTCAAGACA
		Rw CTCCTCTCTGTTCTTCAT
POMC	NM_001278581.1	Fw ACGTGAAGATGCCGAGATT
		Rw GGTITTCAGTCAGGGGCTGT
BDNF	NM_007540.4	Fw GGGTCACAGCGCAGATAAA
		Rw GCCTTTGGATACCGGGACTT
Ntrk2 isoform a	NM_001025074.2	Fw CAGCTATCGAACAAATGAGGTG
		Rw GGGTGTGGATCTCTTGATG
GAPDH	NM_008084.3	Fw TTCTCAAGCTCATTTCTGTATG
		Rw GGATAGGGCTCTTCTGCTCA

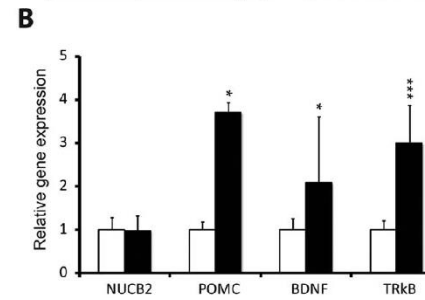


Figure 6 **A** PCR primers. **B** Real time PCR quantification of POMC, BDNF and TrkB mRNA in the DVC of C57BL/6J mice sacrificed 2 h after oral administration of saline or metformin. Data are normalized relative to control mice (vehicle, white bars, $n = 9$; metformin, black bars, $n = 8$). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ significantly different from vehicle-treated mice.

reduced nocturnal meal size (0.43 ± 0.03 kcal vs. 0.67 ± 0.04 kcal, $P < 0.0001$), but not meal number (15.6 ± 4.7 vs. 19.1 ± 7.8 kcal, $P = 0.322$) in db/db mice (Figure 7C). Oral administration of metformin in db/db mice did not affect EE (Figure 7D).

Finally, c-Fos protein expression pattern analysis in db/db mice revealed that metformin significantly increased the number of c-Fos positive nuclei in the NTS ($P < 0.01$), rostral and caudal DMNX ($P < 0.05$), AP ($P < 0.05$), and LPB ($P < 0.05$), but not in the ARC or PVN (Figure 8).

Discussion

In this study, we demonstrate that acute *per os* administration of metformin triggers c-Fos activation in the NTS, DMNX and AP, independently of vagal afferents. A high proportion of metformin-activated cells in the DVC are nesfatinergic neurons. We also show that metformin reduces meal size but not meal number, in a leptin-independent manner, and slows down gastric emptying. Finally, we observe that metformin transiently reduces EE in WT mice but not in db/db mice.

Type 2 diabetes is accompanied by energy waste in the form of glycosuria. Waters and collaborators (23) estimated that antihyperglycaemic drugs, including sulfonylurea and metformin, might substantially increase body weight because of their normalizing effect on

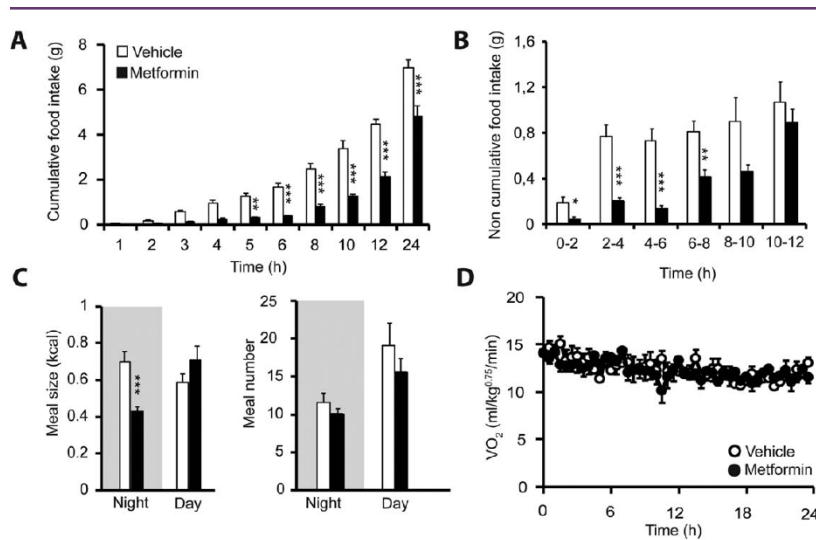


Figure 7 Effects of metformin on food intake, meal pattern and oxygen consumption in db/db mice. **A** Cumulative food intake over 24 h after an acute *per os* administration of vehicle (NaCl 0.9%; white bars; $n = 7$) or metformin (300 mg/kg; black bars; $n = 7$). **B** Non-cumulative food intake by periods of 2 h over the first 12 h of the data presented in **A**. **C** Meal pattern analysis of the data presented in **A**. Meal size and meal number are given for the dark phase (night) and light phase (day) following *per os* treatment. **D** Oxygen consumption (VO_2) over 24 h following an acute oral administration of vehicle (open circles, $n = 7$) or metformin (300 mg/kg; closed circles, $n = 7$). Data are presented as means \pm S.E.Ms. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

glucosuria. They concluded that if glucosuria reduction *per se* could explain the increase in body weight induced by sulfonylureas in diabetic patients, additional mechanisms, such as reduction in food intake and/or increase in EE, might account for the reduction in body weight induced by metformin. Previous studies failed to detect any enhancing effect of metformin on EE (2,5,6). On the contrary, and in accordance with previous studies (5,6), we show that metformin transiently reduces EE in WT mice. In our hands, this EE reduction was equivalent to the caloric content of 300 mg of food, which led to a net effect of metformin-induced anorexia on energy balance, consistent with the body weight reduction observed in patients under chronic metformin treatment. By contrast, metformin did not affect EE in db/db mice. This result suggests that the metformin-induced reduction in EE observed in WT mice requires an intact leptinergic-signaling pathway. We show that metformin administration reduces meal size in WT and db/db mice. We also show that metformin slows down gastric emptying in WT mice, a mechanism that contributes to satiation, as previously shown for cholecystokinin (24). Regulation of meal size involves satiation signals originating from the digestive tract and integration of adiposity signals, such as leptin which modulates the effect of satiation signals (25). The involvement of leptin signaling in the anorectic effect of metformin has been previously questioned. In rats rendered leptin-resistant by high-fat feeding, metformin treatment was shown to improve central leptin sensitivity (9) and increase leptin receptor expression in the ARC (10). However, chronic treatment with metformin has been shown to decrease food intake in genetic

models of leptin-signaling invalidation, such as ob/ob mice (26), db/db mice (27), and obese Zucker rats (7). We also show here that metformin reduces food intake in db/db mice. Moreover, we bring here the first meal pattern analysis of metformin effects in db/db mice and show that metformin-induced anorexia proceeds by reduction of meal size, without altering meal number. Kim and collaborators showed a decrease in both meal size and meal number upon repeated *per os* administration of metformin in obese C57BL/6J mice fed a high fat diet (5), and after an acute icv injection of metformin in lean C57BL/6J mice fed a standard diet (6). However, along the 7 days of their daily oral metformin treatment paradigm, Kim and collaborators (5) noticed that the meal number remained unaffected the first 2 days and was reduced thereafter. It is striking that acute metformin treatment does not reduce meal number when orally delivered (5; the present study), whereas it readily reduces it when centrally delivered (6). Interestingly, acute icv administration of metformin was shown to inhibit ghrelin-induced food intake (13). This central action of metformin could counteract the paradoxical increase in plasma ghrelin observed in diabetic patients treated with metformin (28). Given the role played by ghrelin in meal initiation (29), we can hypothesize that centrally injected metformin could reduce meal number by interfering with ghrelin signaling, whereas orally administered metformin would not affect meal number because of the concomitant metformin-induced increase in plasma ghrelin. Altogether, acute oral metformin treatment does not impact meal number, but reduces meal size, indicating a specific action on satiation mechanisms.

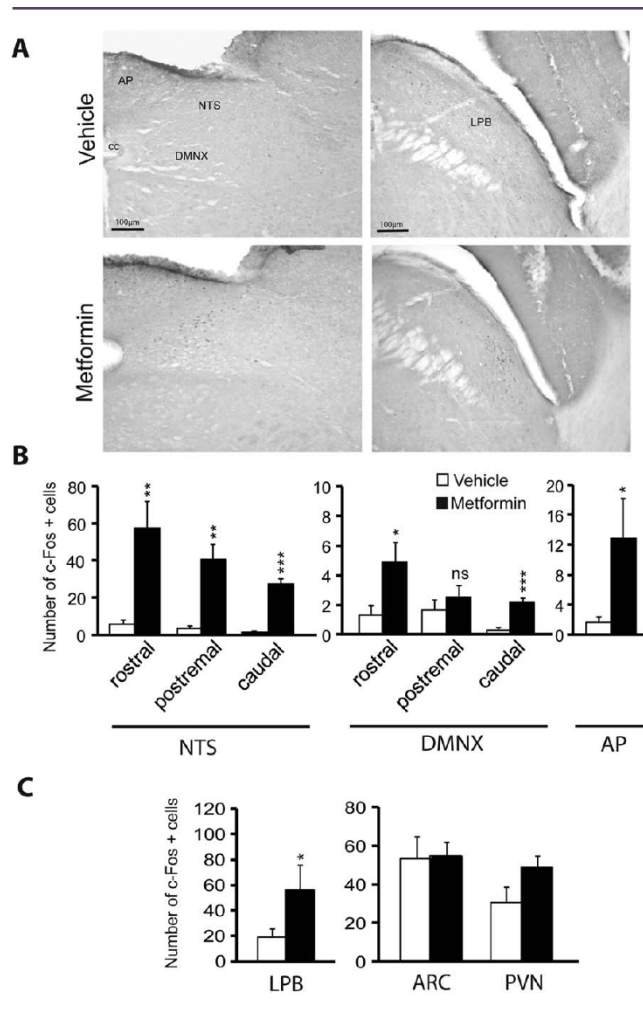


Figure 8 Effect of *per os* metformin administration on c-Fos immunoreactivity in db/db mice. **A** Representative coronal sections illustrating the c-Fos labeling within the NTS, DMNX, AP, and the LPB of db/db mice administered *per os* with either vehicle or metformin (300 mg/kg) and sacrificed 2 h post-treatment. **(B, C)** Quantification of the number of c-Fos immunoreactive nuclei per hemisection: **B** in the NTS, DMNX, and AP (vehicle-treated; white bars, $n = 5$; metformin-treated; black bars, $n = 4$). **C** in the lateral parabrachial, ARC and PVN from db/db mice treated with vehicle (water; white bars; $n = 3$ for LPB; $n = 5$ for ARC and PVN) or metformin (black bars; $n = 4$ for LPB, ARC and PVN). Data are presented as mean \pm SEMs per hemisection. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; significantly different from vehicle-treated mice. NTS, nucleus tractus solitarius; AP, area postrema; DMNX, dorsal motor nucleus of the vagus; LPB, lateral parabrachial nucleus; ARC, arcuate nucleus of the hypothalamus; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; CC, central canal.

The analysis of metformin-induced c-Fos expression revealed that both genotypes displayed metformin-induced c-Fos expression in the NTS, DMNX, and AP, but not in the ARC and PVN. WT and db/db mice displayed a qualitatively similar metformin-induced c-Fos expression pattern, although with some differences. These results extend the previous finding of metformin-induced activation in the NTS (5). Unilateral cervical vagotomy had previously been used to evaluate the contribution of the vagus nerve to c-Fos expression within the NTS in response to refeeding (30), lipopolysaccharide administration (31), and mycotoxins (20,22). In the present study, unilateral cervical vagotomy induced no dissymmetry in the brainstem c-Fos labeling following metformin treatment. This result strongly suggests that metformin-induced c-Fos activation does not depend on vagal afferents. Among the gastrointestinal peptides involved in food intake control, GLP-1 has been put forward as a probable downstream effector of metformin anorectic effect. Metformin enhances GLP-1 secretion (8,14-16,32) in a vagus-independent manner (32). Endogenous GLP-1 has a very short half-life, due to its rapid degradation by the dipeptidyl peptidase-4 and it has been suggested that its effect on food intake involves a paracrine action (33). However, intravenously administered GLP-1 has also been shown to reduce food intake independently of vagal afferents (34,35). Therefore, we cannot exclude that metformin-induced c-Fos activation in the brainstem could involve GLP-1 acting via a humoral route. Alternatively, one could hypothesize that metformin directly acts on the above-mentioned brain structures, since metformin readily passes the blood-brain barrier (12) and induces anorexia when centrally injected (6,11).

We reveal here for the first time that a high proportion of metformin-activated cells in the NTS and DMNX are nesfatinergic neurons, 27% of which coexpress TH. Nesfatin-1 induces potent anorectic effect (17), in a leptin-independent manner (36), and central administration of metformin reduces both meal size and meal number in mice (37) when potentially all the central targets for nesfatin-1 are mobilized. The nesfatinergic neurons located in the hypothalamus and caudal brainstem have been suggested to participate in meal termination mechanisms since they are activated by refeeding (38) or cholecystokinin (39). Importantly, the archetypal satiating hormone cholecystokinin was shown to activate around 15% of the nesfatinergic neurons in the NTS (39), similarly to our results upon metformin treatment. These results suggest that a sub-population of nesfatinergic neurons could be involved in metformin-induced satiation. While it was proposed that POMC neurons relay the nesfatin-1 action, we observed only scarce activation of POMC neurons localized in the NTS in response to metformin. In contrast, we observed metformin-induced transcriptional activation of POMC and of BDNF/TrkB, essential downstream effectors of melanocortinergic signaling within the DVC (40). Taken together, our results suggest that among the various populations of nesfatinergic neurons, some, particularly those coexpressing TH in the DVC, could be activated by metformin to induce satiation.

Conclusion

In conclusion, our results increase our knowledge on metformin effect on energy balance. We show that orally administered metformin reduces food intake in a leptin independent-manner by reducing meal size in both WT and db/db mice, suggesting a specific effect on satiation processes. We show that an acute metformin treatment

decreases EE in WT mice only. We also show that metformin activates c-Fos expression in the caudal brainstem, independently of vagal afferents. Finally, this work provides the first demonstration that metformin targets nesfatinergic neurons and supports the view that nesfatin-1 is a potential relay in metformin action. **O**

Acknowledgments

The authors thank Aix-Marseille Université, CNRS, ISM2, UMR 7313, Marseille, for access to their real-time PCR equipment (AVB Platform, Analyse et Valorisation de la Biodiversité) and to their fluorimeter. The authors also thank the Aix-Marseille Université Microscopy Center CP2M and Kevin Poirrot for expert guidance and help in confocal microscopy.

© 2014 The Obesity Society

References

- Rojas LBA, Gomes MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2013;5:6-20.
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;333:550-554.
- Lee A, Morley JE. Metformin decreases food consumption and induces weight loss in subjects with obesity with type II non-insulin-dependent diabetes. *Obes Res* 1998;6:47-53.
- Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, et al. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metabolism* 2001; 50:856-861.
- Kim H-J, Zhang X-H, Park E-Y, et al. Metformin decreases meal size and number and increases c-Fos expression in the nucleus tractus solitarius of obese mice. *Physiol Behav* 2013;110-111:213-220.
- Kim H-J, Park E-Y, Oh M-J, et al. Central administration of metformin into the third ventricle of C57Bl/6 mice decreases meal size and number and activates hypothalamic S6 kinase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;305:R499-R505.
- Rouru J, Pesonen U, Koulu M, et al. Anorectic effect of metformin in obese Zucker rats: lack of evidence for the involvement of neuropeptide Y. *Eur J Pharmacol* 1995;273:99-106.
- Matsui Y, Hirasawa Y, Sugiura T, Toyoshi T, Kyuki K, Ito M. Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed C57Bl/6J mice. *Biol Pharm Bull* 2010;33:963-970.
- Kim Y-W, Kim J-Y, Park Y-H, et al. Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance. *Diabetes* 2006;55:716-724.
- Aubert G, Mansuy V, Voiron M-J, Pellerin L, Pralong FP. The anorexigenic effects of metformin involve increases in hypothalamic leptin receptor expression. *Metabolism* 2011;60:327-334.
- Lee CK, Choi YJ, Park SY, Kim JY, Won KC, Kim YW. Intracerebroventricular injection of metformin induces anorexia in rats. *Diabet Metab J* 2012;36:293-299.
- Ly W-S, Wen J-P, Li L, et al. The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats. *Brain Res* 2012; 1444:11-19.
- Stevanovic D, Janjetovic K, Misirkic M, et al. Intracerebroventricular administration of metformin inhibits ghrelin-induced hypothalamic AMP-kinase signalling and food intake. *Neuroendocrinology* 2012;96:24-31.
- Mannucci E, Omibene A, Cremasco F, et al. Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2001;24:489-494.
- Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia* 2011;54:339-349.
- Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, et al. Metformin causes reduction of food intake and body weight gain and improvement of glucose intolerance in combination with dipeptidyl peptidase IV inhibitor in Zucker *fa/fa* rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310:614-619.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006;443:709-712.
- Yang M, Zhang Z, Wang C, et al. Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 2012;61:1959-1968.

19. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 2004;304:110-115.
20. Girardet C, Bonnet MS, Jdir R, et al. The food-contaminant deoxyvalencol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. *PLoS One* 2011;6:e26134.
21. Dallaporta M, Pecchi E, Jacques C, et al. c-Fos immunoreactivity induced by intraperitoneal LPS administration is reduced in the brain of mice lacking the microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1). *Brain Behav Immun* 2007;21:1109-1121.
22. Gaigé S, Djelloul M, Tardivel C, et al. Modification of energy balance induced by the food contaminant T-2 toxin: a multimodal gut-to-brain connection. *Brain Behav Immun* 2014;37:54-72.
23. Waters SB, Topp BG, Siler SQ, Alexander CM. Treatment with sitagliptin or metformin does not increase body weight despite predicted reductions in urinary glucose excretion. *J Diabet Sci Technol* 2009;3:68-82.
24. Moran TH, McHugh PR. Cholecystokinin suppresses food intake by inhibiting gastric emptying. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1982;242:R491-R497.
25. Smith GP. The controls of eating: a shift from nutritional homeostasis to behavioral neuroscience. *Nutr Biochem Los Angel Cty Calif* 2000;16:814-820.
26. Bailey CJ, Flatt PR, Hvan C. Anorectic effect of metformin in lean and genetically obese hyperglycaemic (ob/ob) mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986;282:233-239.
27. Ono M, Iakura Y, Nonomura T, et al. Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor ameliorates glucose metabolism in obese diabetic mice. *Metabolism* 2000;49:129-133.
28. Doogue MP, Begg EJ, Moore MP, Lunt H, Pemberton CJ, Zhang M. Metformin increases plasma ghrelin in type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:875-882.
29. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 2006;89:71-84.
30. Timofeeva E, Baraboi ED, Richard D. Contribution of the vagus nerve and lamina terminalis to brain activation induced by refeeding. *Eur J Neurosci* 2005;22:1489-1501.
31. Hermann GF, Finch GS, Toxar CA, Rogers RC. c-Fos generation in the dorsal vagal complex after systemic endotoxin is not dependent on the vagus nerve. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R289-R299.
32. Mulherin AJ, Oh AH, Kim H, Grieco A, Lauffer LM, Brubaker PL. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology* 2011;152:4610-4619.
33. Hayes MR, Kanoski SE, De Jonghe BC, et al. The common hepatic branch of the vagus is not required to mediate the glycemic and food intake suppressive effects of glucagon-like-peptide-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R1479-R1485.
34. Rüttimann EB, Arnold M, Hillebrand JJ, Geary N, Langhans W. Intrameal hepatic portal and intraperitoneal infusions of glucagon-like peptide-1 reduce spontaneous meal size in the rat via different mechanisms. *Endocrinology* 2009;150:1174-1181.
35. Zhang J, Ritter RC. Circulating GLP-1 and CCK-8 reduce food intake by capsaicin-insensitive, nonvagal mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;302:R264-R273.
36. Maejima Y, Sedhazar U, Suyama S, et al. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 2009;10:355-365.
37. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides* 2011;32:36-43.
38. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 2008;149:1295-1301.
39. Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, et al. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul Pept* 2009;157:84-91.
40. Bariouhay B, Roux J, Tardivel C, Trouslard J, Jean A, Lebrun B. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology* 2009;150:2646-2653.

ANNEXE 3

Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR

La leptine est nécessaire à la régulation hypothalamique de microARNs ciblant la région 3'UTR de POMC

Adhel Derghal, Mehdi Djelloul, Coraline Airault, Clément Pierre, Michel Dallaporta, Jean-Denis Troadec, Vanessa Tillement, Catherine Tardivel, Bruno Bariohay, Jérôme Trouslard, Lourdes Mounien

Frontiers in Neurosciences

Les travaux de Derghal et al., (2015) avaient pour objectif d'étudier le rôle de micros-ARN dans la régulation de l'expression du neuropeptide anorexigène POMC, au sein d'un modèle d'obésité génétique (les souris ob/ob qui sont déficientes pour la leptine). Nous avons d'abord utilisé des programmes de prédiction pour sélectionner des micros-ARN ciblant les ARNm de POMC, puis nous avons montré pour la première fois que ces micros-ARN sont abondamment exprimés au sein du noyau arqué de l'hypothalamus. Nous avons ensuite montré que leur expression était significativement augmentée chez les souris ob/ob par rapport à des souris contrôles. Un traitement à la leptine chez les souris ob/ob permet également de restaurer les taux de ces micros-ARN. L'ensemble de ces résultats ont donc montré que l'action de la leptine au sein de l'hypothalamus nécessite l'intervention de micros-ARN ciblant POMC.

Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR

Adel Derghal¹, Mehdi Djelloul^{1,2}, Coraline Airault¹, Clément Pierre³, Michel Dallaporta¹, Jean-Denis Troadec¹, Vanessa Tillement¹, Catherine Tardivel¹, Bruno Bariohay³, Jérôme Trouslard¹ and Lourdes Mounien^{1*}

¹ Faculté des Sciences, Aix Marseille Université, PPSN EA 4674, Marseille, France, ² Stem Cell Laboratory for CNS Disease Modeling, Department of Experimental Medical Science, Wallenberg Neuroscience Centre, Lund Stem Cell Center, Lund University, Lund, Sweden, ³ Biomeostasis, Nutritional Behavior and Metabolic Disorders, Marseille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Marie Z. Mofkiah,
Alexandria University, Egypt

Reviewed by:

Alexander K. Murashov,
East Carolina University, USA
Sherine Abdel Salam,
Alexandria University, Egypt

*Correspondence:

Lourdes Mounien,
Unité de Recherche Physiologie et
Physio-pathologie du Système
Nerveux Somato-moteur et
Neurovégétatif, Faculté des Sciences,
Université d'Aix-Marseille, Campus St.
Jérôme, BP 351-352, 13397
Marseille, France
lourdes.mounien@univ-amu.fr

Received: 14 November 2014

Accepted: 18 April 2015

Published: 06 May 2015

Citation:

Derghal A, Djelloul M, Airault C, Pierre C, Dallaporta M, Troadec J-D, Tillement V, Tardivel C, Bariohay B, Trouslard J and Mounien L (2015) Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR. *Front. Cell. Neurosci.* 9:172. doi: 10.3389/fncel.2015.00172

The central nervous system (CNS) monitors modifications in metabolic parameters or hormone levels and elicits adaptive responses such as food intake regulation. Particularly, within the hypothalamus, leptin modulates the activity of pro-opiomelanocortin (POMC) neurons which are critical regulators of energy balance. Consistent with a pivotal role of the melanocortin system in the control of energy homeostasis, disruption of the *POMC* gene causes hyperphagia and obesity. MicroRNAs (miRNAs) are short noncoding RNA molecules that post-transcriptionally repress the expression of genes by binding to 3'-untranslated regions (3'UTR) of the target mRNAs. However, little is known regarding the role of miRNAs that target POMC 3'UTR in the central control energy homeostasis. Particularly, their interaction with the leptin signaling pathway remain unclear. First, we used common prediction programs to search for potential miRNAs target sites on 3'UTR of POMC mRNA. This screening identified a set of conserved miRNAs seed sequences for *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488*. We observed that *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* are up-regulated in the hypothalamus of leptin deficient ob/ob mice. In accordance with these observations, we also showed that *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* were increased in db/db mice that exhibit a non-functional leptin receptor. The intraperitoneal injection of leptin down-regulated the expression of these miRNAs of interest in the hypothalamus of ob/ob mice showing the involvement of leptin in the expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488*. Finally, the evaluation of responsivity to intracerebroventricular administration of leptin exhibited that a chronic treatment with leptin decreased *mir-488* expression in hypothalamus of C57BL/6 mice. In summary, these results suggest that leptin modulates the expression of miRNAs that target POMC mRNA in hypothalamus.

Keywords: microRNA, melanocortin, hypothalamus, leptin, food intake

Introduction

The control of energy homeostasis is finely tuned by endocrine and neural mechanisms that cooperate to maintain the balance between caloric intake and energy expenditure. In this respect, the central nervous system (CNS) continuously monitors modifications in metabolic

parameters (blood glucose) and/or hormones (insulin or leptin) and elicits adaptive responses such as food intake regulation and autonomic nervous system modulation (Cowley et al., 2001; Ibrahim et al., 2003; Plum et al., 2006; Mounien et al., 2010). It is now clearly established that specific neuronal networks of the hypothalamus play a pivotal role in energy homeostasis regulation (Morton et al., 2006). For instance, within the arcuate nucleus of the hypothalamus, pro-opiomelanocortin (POMC) neurons are critical regulators of energy balance and glucose homeostasis (Porte et al., 2002; Mounien et al., 2005, 2009, 2010; Parton et al., 2007; Hill et al., 2010). In accordance with this aspect, it has been shown that the disruption of the POMC and melanocortin receptor 4 (MC4R) genes in mice models causes obesity (Huszar et al., 1997; Yaswen et al., 1999), while MC3R gene-deficient mice have normal food consumption but accumulate fat (Chen et al., 2000). In humans, obesity can result from genetic deficiencies which produce a lack in the leptin receptor, POMC, or MC3/4R (Lee, 2009).

One important goal of current research is to identify the molecular mechanisms involved in the control of the expression of genes that are important to maintain energy homeostasis. It has long been acknowledged that the leptin acts as a key regulator of hypothalamic genes expression via different signaling cascades (Morton et al., 2006). For instance, when the leptin binds to the extracellular domain of its receptor (LepR), it recruits and activates the Janus kinase (JAK). JAK binds to and phosphorylates LepR at the same time. This mechanism activates signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Once phosphorylated, STAT3 binds to POMC promoters, stimulating POMC expression (Morton et al., 2006). Interestingly, mice with genetic inactivation of STAT3 gain body weight (Gao et al., 2004). Altogether, the above collected data strongly suggest that the stability of energy homeostasis during environmental variation requires metabolic adjustments that are achieved through a fine regulation of genes expression.

Because microRNAs (miRNAs) have been depicted to be another layer of gene regulation, it is not surprising that they are also involved in leptin-regulated gene expression. The miRNAs are endogenous, single-stranded, small, ~22-nucleotides noncoding RNAs, and are generally regarded as negative regulators of gene expression because they inhibit translation and/or promote mRNA degradation by base pairing to complementary sequences within the 3' untranslated region (3'UTR) of protein-coding mRNA transcripts (Bagga et al., 2005). Several studies identified miRNAs that are differentially expressed in the liver, pancreas, and adipose tissue of leptin-deficient (ob/ob) or leptin receptor-deficient (db/db) mice compared to the control animals (Lovis et al., 2008; Li et al., 2009; Nakanishi et al., 2009; Xie et al., 2009). Among these miRNAs, it has been shown that the pancreatic expression levels of *mir-375* are aberrant in ob/ob mice, indicating that they contribute to insulin resistance in this model (Poy et al., 2009). Additional studies provide evidence for the involvement of *mir-335* in lipid metabolism of the liver and the adipose tissue of ob/ob and db/db mice (Nakanishi et al., 2009). In the context of CNS, it has been shown that *mir-200a*, *mir-200b*, and *mir-429* are up-regulated in the hypothalamus of ob/ob and db/db mice (Crépin et al., 2014).

Recently, it has been shown that conditional deletion of the RNase III ribonuclease Dicer (involved in miRNAs maturation) from POMC-expressing cells results in obesity and diabetes which is associated with a neurodegeneration of POMC neurons in the hypothalamus (Schneeberger et al., 2012; Greenman et al., 2013). These observations strongly suggest that miRNAs are important regulators of POMC neuron activity. In this context, the characterization of the miRNAs that target directly POMC mRNA and their interaction with the leptin signaling pathway remain unclear.

In the present study, we focused our attention on the specific miRNAs targeting POMC 3'UTR. Based on bioinformatic predictions of their involvement in POMC-signaling pathway and their conservation among vertebrates, the expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* were investigated in models of obesity characterized by a decrease of POMC mRNA expression and leptin insufficiency (ob/ob) or leptin insensitivity (db/db) (Mizuno et al., 1998). Then, we further analyzed the role of leptin on the expression level of these miRNAs using different models of leptin-treated mice.

Methods

Animals

Experiments were carried out on different types of mice: C57BL/6, ob/ob, and db/db mice were purchased from Charles River (France). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments were performed using male POMC-Tau-Topaz GFP transgenic mice developed by Pinto et al. (2004). To assess GFP expression in POMC-Tau-Topaz GFP mice, we carried out PCR on tail genomic DNA. GFP transgene was detected using the forward primer 5'-GCCACAAGTTCAGCGTGTC-3' and the reverse primer 5'-GCTTCTCGTTGGGGTCTTTGC-3', with the following PCR conditions: 5 min at 95°C, 36 cycles at 95°C for 30 s, 64°C for 30 s, and 72°C for 40 s, followed by a final step at 72°C for 7 min. The amplicon size was 573 bp.

All animals were individually housed in a pathogen-free facility at controlled temperature on a 12/12 h light/dark cycle (lights from 0700 to 1900 h) with standard pellet diet (AO4) and water available *ad libitum*. All experiments were conducted in conformity with the rules set by the EC Council Directive (2010/63/UE) and the French "Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône" (License no. 13.435 and no. 13.430). Protocols used are in agreement with the rules set by the Comité d'Éthique de Marseille, our local Committee for Animal Care and Research. Every precaution was taken to minimize animal stress and the number of animals used.

miRNA Prediction

To search for miRNAs that might regulate mouse POMC expression, we used the following public prediction algorithms and database: Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) and miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). Using these different algorithms, we selected the miRNAs that are conserved among the vertebrates (Targetscan) and that have a good miRVR scores (miRanda).

Surgery and Injections

For the intraperitoneal injection (i.p.), ob/ob, and C57BL/6 mice were injected between 1100 and 1200 h with recombinant murine leptin (Peprotech, France) ($n = 5$, 5 mg/kg) or saline. Mice were sacrificed 4 h after i.p. injection.

Intracerebroventricular (i.c.v.) cannula placement and injections were performed as described previously (Girardet et al., 2011). Animals were anesthetized by an i.p. injection of ketamine (100 mg/kg; Imalgene 1000, Merial, France) and xylazine (6 mg/kg; Rompun, Bayer, France), and placed in a digital stereotaxic apparatus (Model 502600, WPI) coupled to the Neurostar software (Neurostar GmbH, Germany). A 26-gauge stainless steel cannula was implanted into the lateral ventricle at the following coordinates: 0.3 mm posterior to bregma, 1.1 mm lateral to the midline, and 2.6 mm ventral to the skull surface. The cannula was secured to the skull with dental cement and sealed with removable obturators. The animals were sutured, placed in individual cages and allowed to recover for 7 days. During this recovery period, animals were injected with physiological saline every day for habituation. One week post-surgery, mice were administered either 10 μ l (2 μ l/min) of physiological saline or leptin (0.5 μ g/ μ l) solution at the beginning of the dark phase. The correct cannula positioning was checked for each animal at the end of the experiment by cresyl violet staining of brain sections (Supplementary Figure 1).

The exogenous leptin was detected in the hypothalamus of ob/ob and C57BL/6 mice after i.p. and i.c.v. injection by western blotting (Supplementary Figure 2 and Supplementary Material).

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) Analysis

Mice were killed by decapitation and the different brain regions were collected and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein or RNA extraction. Total RNA was extracted with TRI Reagent (Sigma-Aldrich, France). For RNA quantification, cDNA was synthesized by 2 μ g total RNA with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, WI, USA). For miRNAs quantification, cDNA was synthesized by 1 μ g total RNA by the qScript microRNA Quantification System (Quanta Biosciences, MD, USA). For real-time PCR, we used LightCycler 480 (Roche, Germany). We used *Pomc* forward primer 5'-TGAACATCTTTGTCCCCAGAGA-3' and reverse 5'-TGCAGAGGCAACAAGATTGG-3'; β Actin forward primer 5'-GATCTGGCACCACACCTTCTACA-3' and reverse 5'-TGGCGTGAGGGAGAGCATAG-3'; *Gapdh* forward primer 5'-TTCTCAAGCTCATTTCCTGGTATG-3' and reverse primer 5'-GGATAGGGCCTCTCTGCTCA-3'. PCR was initiated by one cycle of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C , 30 s at 60°C , and 2 s at 72°C , followed by a holding at 40°C . For miRNAs, *U6* and *Sno202* were used as normalizers for miRNA quantification. For *U6* we used forward primer 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3' and reverse primer 5'-GGAACGCTTACGAATTTG-3'; *Sno202* forward primer 5'-CTTTGAACCCCTTTCCATCTG-3' *mir-383* forward primer 5'-CAGATCAGAAGGTGACTGTG-3'; *mir-384-3p* forward primer 5'-TGTAACAATTCTAGGCAATGA-3'; *mir-471-3p* forward primer 5'-TGAAAGGTGCCATACTATGTAT-3', *mir-488* forward primer 5'-CCCAGATAATA

GCACCTCTCAA-3'; for the reverse primers we used the Universal Primer (Quanta Biosciences). We performed quantitative PCR according to the manufacturer's instructions (Quanta Biosciences).

miRNA Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) and GFP Immunohistochemistry

For the detection of miRNAs in POMC neurons, POMC-Tau-Topaz GFP transgenic mice were perfused intracardially with heparin 10% in PBS-Diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated (0.1% PBS, 0.1 M, pH 7.4) followed by 4% PFA in PBS-DEPC maintained at 4°C under ketamine/xylazine anesthesia (100 and 15 mg/kg, respectively). The brains were removed and postfixed for 2 h in 4% PFA/DEPC, cryoprotected for 48 h in 30% sucrose in PBS/DEPC at 4°C and frozen in O.C.T. (Tissue-Tek; Sakura Finetek, USA). Subsequently the brains were sliced at 12 μ m thickness from -1.34 to -2.70 mm relative to bregma and transferred serially on poly-L-lysine and gelatin-coated Super Frost slides (Fisher, PA, USA). Slides were stored at -20°C until FISH. The miRNA FISH was based on Thompson et al. (2007) protocol. Slides were removed from storage at -20°C and air dried at 37°C for 30 min then placed in 4% PFA in PBS-DEPC for 20 min and washed in PBS-DEPC 2 times for 10 min. Sections were treated with 10 mg/ml proteinase K for 6 min at room temperature and washed in PBS-DEPC for 10 min. Fixation with 4% PFA in PBS-DEPC was performed for 15 min and rinse in DEPC-treated water. Slides were treated with acetic anhydride (Triethanolamine, 0.1 M, pH 8.0; Acetic anhydride 1:400) 2 times for 5 min and washed with PBS-DEPC for 10 min. Sections were incubated in pre-hybridization buffer (50% Formamide; $5\times$ SSC; 0.3 mg/ml RNA Yeast; 100 μ g/ml heparin; $1\times$ Denhardt's solution (2% bovine serum albumin, 2% polyvinylpyrrolidone; 2% Ficoll 400); 0.1% Tween 20; 0.1% CHAPS; 5 mM EDTA; 0.3 nmole/ml DNA Random Primer 12-mer) for 2.5 h. Hybridization was performed overnight at 37°C in the same buffer with 3' end 6 Fluorescein amidite (6FAM)-labeled DNA oligonucleotide probes at 5 μ g/ml. We used the antisense probes 5'-AGCCACAGTCACCTTCTGATCTTT-3'-6FAM for *mir-383*; 5'-TTACATTGCCTAGGAATTGTTTACATA-3'-6FAM for *mir-384-3p*; 5'-AAAACCTCTCAGATAATAGACCCTT-3'-6FAM for *mir-488*. Scrambled probes were used for negative control for each experiment. The scramble sequences were 5'-TTCCGACAACCTGCACTCTATGTTTC-3'-6FAM for scramble (sc) *mir-383*, 5'-CATGAATATCCGTGGTTAATCATTTA-3'-6FAM for *scmir-384-3p* and 5'-AGATTCTCAACCTGCTTTACAAAGC-3'-6FAM for *scmir-488*. Slides were washed with $2\times$ SSC for 15 min at 37°C . High-stringency tetramethyl ammonium chloride (TMAC, Acros Organics, NJ, USA) washes were performed 2 times for 5 min at 54°C and 1 time for 10 min at 54°C then rinsed in PBS-DEPC with 0.1% Triton X-100 (PBT) for 10 min. Slides were incubated in PBT with 20% horse serum for 1 h for blocking. Rabbit polyclonal antibody anti-fluorescein (1:500, Gen Tex, TX, USA) and mouse monoclonal anti-GFP (1:500, Abcam, MA, USA) antibodies in PBT with 20% horse serum were added to sections and incubated for overnight at 4°C . Slides were washed three times in PBT for 10 min. Alexa 488 fluor-conjugated goat anti-mouse and Alexa 594

fluor-conjugated donkey anti-rabbit (1:500, Life Technologies, France) with PBS 3% horse serum and 0.3% Triton X-100 were added sequentially to slides for 1.5 h at room temperature and sections were washed three times with PBS.

Sections were finally coverslipped with mounting medium for fluorescence microscope preparation. Sections were observed using a Zeiss LSM 700 confocal microscope (Zeiss, France) associated to ZEN 2012 software and a DXM 1200 Camera (Nikon, France) coupled to ACT-1 software. For quantitative analysis, cells were counted manually using the Image J analysis system (National Institutes of Health, USA). For sections stained for both eGFP and miRNA probes, the double labeled cells were examined at multiple focal levels and at appropriate magnifications to ensure that single cells were indeed immunoreactive for both eGFP and miRNA probes. Because POMC neurons constitute a heterogeneous population in relation to their sensitivity to regulatory factors (Mounien et al., 2006a,b; Williams et al., 2010), the average number of cells counted bilaterally in 8 sections at the anterior and posterior levels of the arcuate nucleus in each animal ($n = 4$) was used for statistical comparisons.

Statistical Analysis

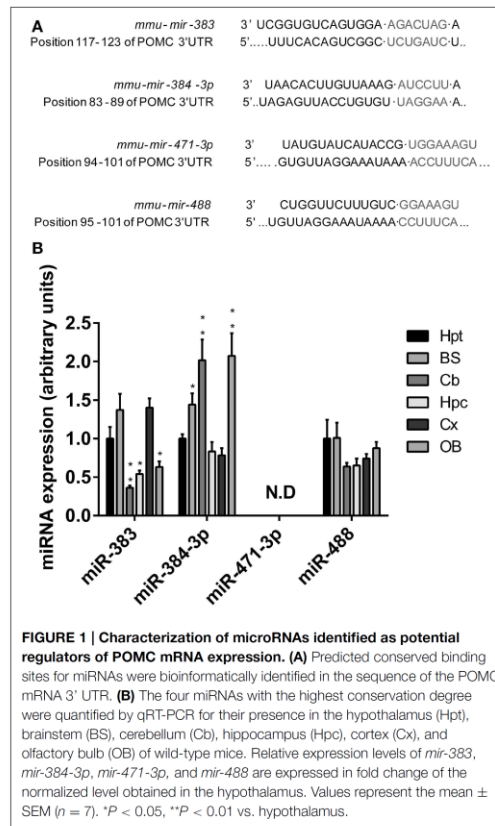
All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by an unpaired 2-tailed Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Identification and Localization of miRNAs of Interest in the Hypothalamus

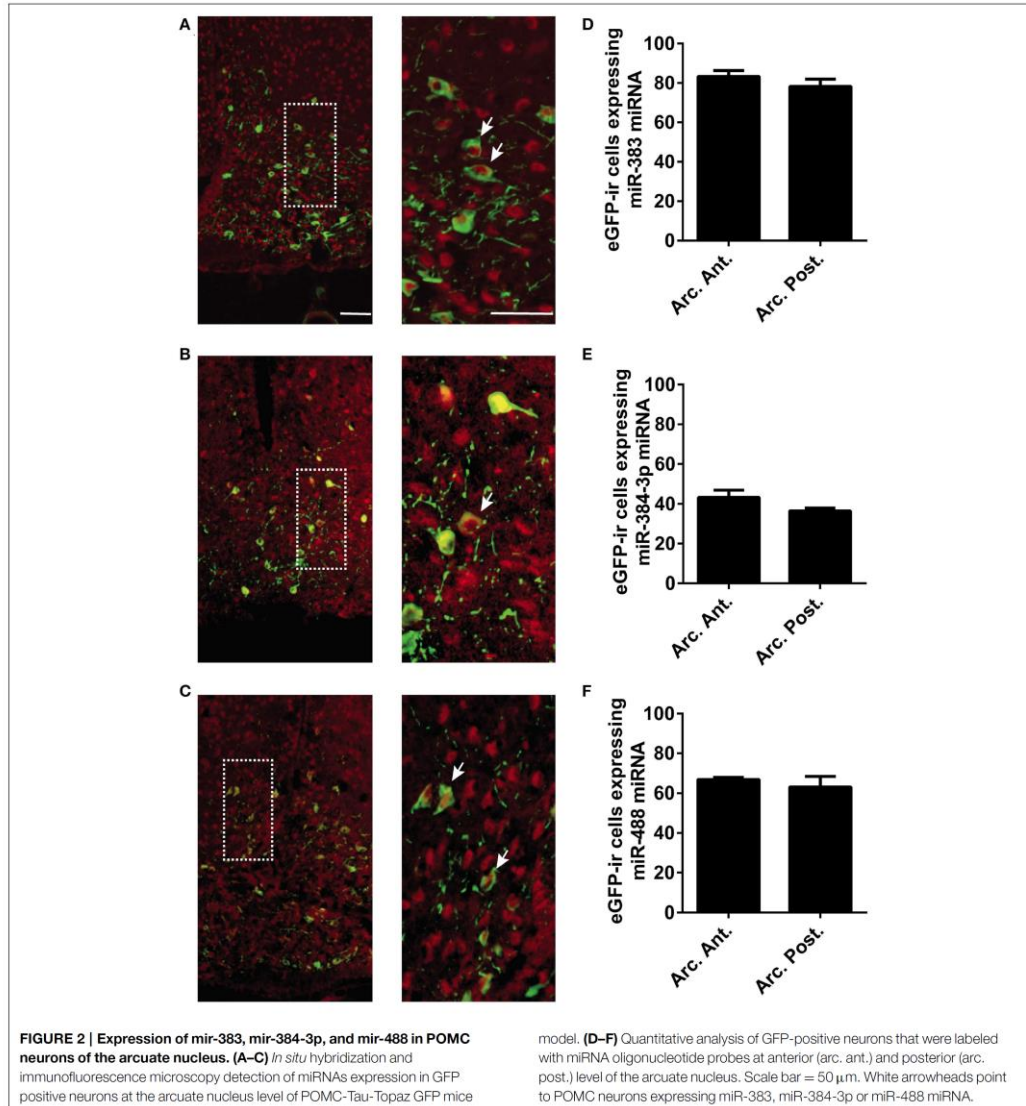
We used common prediction programs (<http://www.targetscan.org> and <http://www.microrna.org>) to search for potential miRNAs target sites on the 3'UTR of Pomc mRNA. In one hand, we identified three conserved miRNAs (*mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488*) with targetscan.org. In the other hand, the conserved miRNAs with a good mirSVR scores identified with microrna.org are *mir-384-3p*, *mir-371-3p*, and *mir-488* (Figure 1A). The distributions of these miRNAs of interest in the mouse CNS were investigated by means of quantitative PCR.

The expression profiles of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs presented many similarities, but also major differences. Thus, in the CNS, the hypothalamus, brainstem, and cortex were the three regions that contained the highest densities of *mir-383* miRNAs (Figure 1B). In other CNS structures such as the cerebellum, hippocampus, and olfactory bulb, much lower concentrations of *mir-383* miRNA were recorded (Figure 1B). The highest amounts of *mir-384-3p* miRNAs were found in the brainstem, cerebellum, and olfactory bulb (Figure 1B). Lower levels of *mir-384-3p* miRNAs were detected in the hypothalamus, hippocampus, and cortex (Figure 1B). The *mir-488* miRNAs were widely expressed throughout the CNS with the same intensity (Figure 1B). It should be noted that *mir-471-3p* miRNA expression was undetectable whatever the brain region studied (Figure 1B). Considering these expression patterns, we focused our work on *mir-383*, *mir-384-3p* as *mir-488* which are expressed in the hypothalamus.



The miRNAs of Interest are Expressed in the POMC Neurons of the Arcuate Nucleus

In POMC-Tau-Topaz GFP mice model, double-staining of brain sections with the fluorescein-labeled *mir-383* probe and the antibody against GFP showed that a large proportion of neurons in the arcuate nucleus contained simultaneously GFP and *mir-383* miRNAs (Figure 2A). Several GFP neurons did not contain *mir-383* miRNAs and, reciprocally, several *mir-383* miRNAs-expressing neurons did not contain GFP protein (Figure 2A). Similarly, double staining of brain sections with the GFP antibody and *mir-384-3p* or *mir-488* probes showed that a large proportion of GFP neurons expressed *mir-384-3p* or *mir-488* miRNAs (Figures 2B,C). Quantitative analysis of double-labeled neurons showed that, in the whole arcuate nucleus, $80.7 \pm 3.4\%$ of the GFP-positive neurons expressed *mir-383* miRNAs, $39.8 \pm 2.5\%$ of the GFP-positive cells expressed *mir-384-3p* miRNAs and $64.9 \pm 3.2\%$ of the GFP-immunoreactive cells contained *mir-488* miRNAs (Figures 2D-F). The proportion of GFP neurons that exhibited *mir-383*, *mir-384-3p*, or *mir-488* miRNAs were not

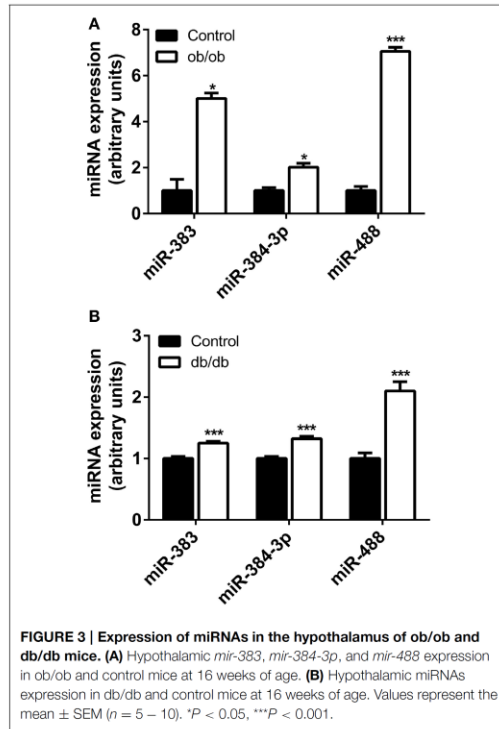


different in the anterior and posterior subdivisions of the arcuate nucleus (Figures 2D,F). The control scrambled probes did not produce any labeling (Supplementary Figure 3).

The miRNA of Interest are Up-regulated in the Hypothalamus of ob/ob and db/db Mice Models

To evaluate whether leptin signaling in hypothalamus is essential for the expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, or *mir-488* miRNAs,

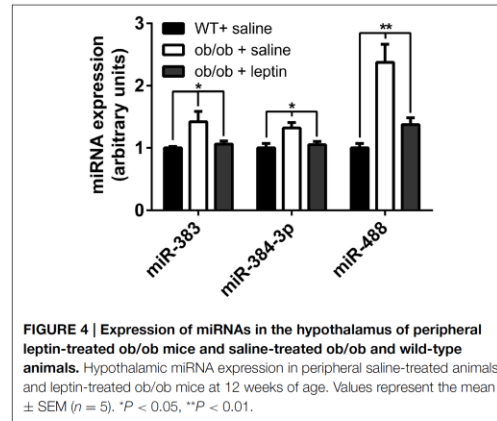
we analyzed the expression of these miRNAs among groups of leptin-deficient (*ob/ob*) mice and C57BL/6 controls. The levels of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs in the hypothalamus of 16-week-old *ob/ob* and C57BL/6 mice were determined by qRT-PCR. Absence of leptin resulted in a significant increase in *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs (+400%, +101%; $P < 0.05$ and +605%; $P < 0.001$, respectively) (Figure 3A).



Because the lack of circulating leptin was associated with a significant increase in the miRNAs of interest, we measured the expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs in the hypothalamus of db/db mice, a model that exhibits a non-functional leptin receptor leading to impaired leptin signaling. As shown in **Figure 3B**, the *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs levels were over-expressed in 16-week-old db/db mice compared to C57BL/6 animals (+25, +32 and +110%, respectively; $P < 0.001$).

The Expression of Selected miRNAs are Restored in the Hypothalamus of ob/ob Mice after Peripheral Leptin Administration

The above data suggest that leptin may be involved in the regulation of the expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs in the hypothalamus. To directly test this hypothesis, ob/ob mice were i.p. injected with leptin at dose of 5 mg/kg and the hypothalamic expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs was evaluated by qRT-PCR 4 h later. We observed an up-regulation of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs in 12-week-old ob/ob animals treated with vehicle compared to C57BL/6 control mice (+42, +32%; $P < 0.05$ and +137%; $P < 0.01$, respectively) (**Figure 4**). As expected, leptin treatment



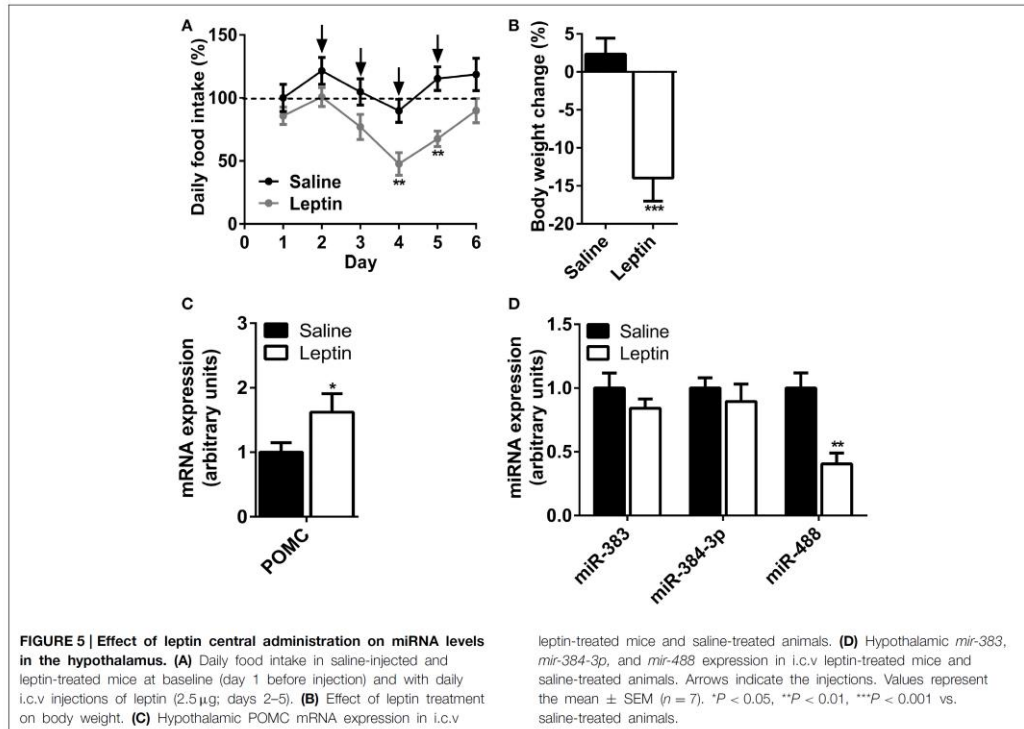
significantly reduced hypothalamic expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs in 12-week-old ob/ob animals treated with leptin compared to vehicle-treated ob/ob mice (-25 , -21% ; $P < 0.05$ and -58% ; $P < 0.01$, respectively) (**Figure 4**).

The Expression of *mir-488* is Decreased in the Hypothalamus of C57BL/6 Mice after Central Leptin Administration

Because leptin exhibits a large range of effect at peripheral level (Margetic et al., 2002), we next investigated the effect of a daily i.c.v leptin administration ($5 \mu\text{g}/\text{mice}$) during 4 days on hypothalamic expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs. The sub-chronic i.c.v leptin administration significantly reduced food consumption and body weight gain in C57BL/6 mice when compared with the control animals (**Figures 5A,B**). The i.c.v administration of leptin significantly increased POMC mRNA level in the hypothalamus of leptin-treated group compared with the vehicle-treated animals ($+62\%$; $P < 0.05$) (**Figure 5C**). Concurrently, the effects of leptin on miRNAs levels were evaluated. Chronic i.c.v administration of leptin had no effect on *mir-383* and *mir-384-3p* miRNAs levels (**Figure 5D**). In contrast, leptin significantly decreased *mir-488* miRNA contents in the hypothalamus after treatment (-60% ; $P < 0.01$) (**Figure 5D**).

Discussion

The relevance of miRNAs in the function of melanocortin pathways has been recently highlighted by the deletion of *Dicer* in POMC-expressing cells which led to a postnatal ablation of POMC neurons resulting in obesity (Schneeberger et al., 2012; Greenman et al., 2013). In this models, the absence of *Dicer* in POMC-positive neurons led to hyperphagia (Schneeberger et al., 2012) and a decrease of energy expenditure without any increase in food intake (Greenman et al., 2013). Taken together, the data



suggests that miRNAs are essential for the integrity of POMC neuron activity.

Firstly, we studied the pattern of expression of miRNAs, i.e., *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488*, in the CNS. It is already established that these miRNAs are highly expressed in the brain (Chiang et al., 2010). In agreement with this data, we have found by using qRT-PCR that the highest concentrations of *mir-383* occurred in the hypothalamus, brainstem, and cortex. The highest amounts of *mir-384-3p* miRNAs were found in the brainstem, cerebellum, and olfactory bulb while *mir-488* miRNAs were widely expressed throughout the structures studied. In many brain regions, *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs distribution patterns did not match each other suggesting that the three miRNAs also exert specific roles. For the first time, we found that the miRNAs encoding the *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs are abundant in the arcuate nucleus. This indicates that a large proportion of the different cell types present in the nucleus are equipped with these miRNAs of interest. The double-staining of POMC-Tau-Topaz GFP mice brain sections with the fluorescein-labeled probes and an antibody against GFP revealed that a high proportion of POMC neurons express *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488*, suggesting that these miRNAs target the expression of protein-coding genes that are distributed in this

neuronal population. Although *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* miRNAs were evenly distributed along the rostro-caudal axis of the arcuate nucleus, the proportion of double labeled GFP/*mir-383*, GFP/*mir-384-3p*, and GFP/*mir-488* neurons did not reflect each other in terms of the proportion of their distribution. These observations are consistent with previous reports demonstrating that POMC neurons constitute a heterogeneous population in relation to their sensitivity to regulatory factors (Mounien et al., 2006a,b; Williams et al., 2010).

In the present context, of special interest is the fact that the POMC neurons are essential for the integration of peripheral signals such as hormones (leptin and insulin) and/or nutrients (glucose) (Morton et al., 2006). For instance, it has been shown recently that leptin directly acts through POMC neurons to stimulate energy expenditure (Berglund et al., 2012). One important goal of current research is to clarify the molecular mechanism involved in the integration of these multiple peripheral metabolic signals such as leptin. One path to reach this goal is to identify the intracellular mediators that allow these POMC neurons to respond to energy status modifications. Interestingly, we observed that the miRNAs targeting POMC mRNAs are up-regulated in *ob/ob* and *db/db* mice models. This data provides the first evidence that the expressions of *mir-383*,

mir-384-3p, and *mir-488* are associated with an impaired leptin signaling pathway. However, the miRNAs that target POMC 3'UTR may modulate the melanocortin system at other levels notably by regulating the expression and/or activity of the prohormone convertases PC1 and PC2 which are required for the processing of POMC and the formation of α -melanocyte-stimulating hormone (Smith and Funder, 1988). In accordance with this hypothesis, we observed in the databases that *mir-488* can also target PC1 3'UTR. In accordance with this hypothesis, PC1 gene expression is different in the arcuate nucleus of leptin-treated obese ob/ob mice (Nilaweera et al., 2003). It is also conceivable that miRNAs may control the biosynthesis of agouti-related protein; the endogenous antagonist of melanocortin receptors MC3R and MC4R (Ollmann et al., 1997).

Several miRNAs have been reported to be differentially expressed in the hypothalamus of ob/ob and db/db mice, but their precise role in the regulation of the hypothalamus function remains to be determined. Recently, it has been shown that *mir-200a*, *mir-200b*, and *mir-429* are up-regulated in the hypothalamus of ob/ob and db/db mice (Crépin et al., 2014). The same group showed that daily injection of a pegylated leptin antagonist predisposed rats to obesity, promoted leptin resistance and modified the hypothalamic miRNA expression profile (Benoit et al., 2013). In our study, we identified the presence of new miRNAs that are expressed differently in the hypothalamus of ob/ob and db/db animals compared to control mice. Additional studies will be necessary to understand the regulation of these different miRNAs in the hypothalamus during the progressive onset of the obese phenotype and to determine their complex role in the regulation of feeding behavior.

We observed that the fold change modification of the selected miRNAs in the ob/ob mice increased in an age dependent way. These results suggest that age positively regulates miRNAs expression in ob/ob mice. In accordance with this hypothesis, it has been also shown that *mir-184* is differentially expressed in the pancreatic islets of ob/ob mice from age 4–16 weeks (Tattikota et al., 2014). The present study shows that leptin peripheral treatment rescues the expression of *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* in ob/ob mice. Thus, together with the altered expression of these miRNAs in ob/ob and db/db mice, these results support the idea that leptin plays an important role in the expression of the miRNAs that target POMC mRNA in the hypothalamus. However, leptin exhibits a wide range of effects at peripheral level (Margetic et al., 2002) and its effect on miRNAs expression in the hypothalamus could thus be indirect. In order to test the effect at central level, we then performed chronic i.c.v infusion of leptin. Surprisingly, i.c.v administration of leptin in mice only decreased the expression of *mir-488* in the hypothalamus suggesting that the expression of *mir-488* is under the control of leptin. The absence of effect by central infusion of leptin on the hypothalamic expression of *mir-383* and *mir-384-3p* can be explained by the peripheral effect of leptin. For instance, it has been shown that leptin increases insulin secretion which in turn modulates the POMC neurons activity and may modulate miRNA expression (Ceddia et al., 1999; Hill et al., 2010).

Interestingly, bioinformatics prediction analysis indicates that the miRNAs targeting POMC can also target genes involved

in the leptin signaling pathways such as STAT3 as well as the leptin receptor. For instance, *mir-488* could modulate the expression of STAT3. These observations suggest that, *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* in the arcuate nucleus are involved in a complex network controlling the sensitivity of POMC neurons to peripheral signals. Additional *in vitro* experiments could clarify this last point. Recently, numerous studies identified several miRNAs as important for the hypothalamic regulation of energy homeostasis. Herzer et al. identified *mir-7a* as a hypothalamic-enriched miRNA with a high expression in Neuropeptide Y/Agouti-related orexigenic peptide neurons (Herzer et al., 2012). Interestingly, two extreme conditions of nutritional stress, i.e., caloric restriction and high fat diet-induced obesity, modified the hypothalamic pattern of expression of a set of miRNAs including *let7a*, *mir-9**, *mir-30e*, *mir-132*, *mir-145*, *mir-200a*, and *mir-218* (Sangiao-Alvarellos et al., 2014). Taken altogether, these different studies point to the importance of miRNAs as regulators and sensors of central energy homeostasis.

In conclusion, we observed that the impairment of leptin synthesis or signaling, induced a defect in the hypothalamic expression of a subset of miRNAs that target POMC 3'UTR. It was observed that *mir-383*, *mir-384-3p*, and *mir-488* were up-regulated in ob/ob and db/db mice and *mir-488* was down-regulated in leptin-treated mice. This indicates that the miRNAs that target POMC important mediators of leptin action in the hypothalamus. New miRNAs modulated by leptin could open important therapeutic perspectives for controlling metabolic disorders.

Author Contributions

LM planned the project. AD, MD, CA, CP, MD, VT, and CT performed experiments. LM wrote the manuscript. JT, BB, and JT helped with data evaluation, interpretation, and manuscript preparation.

Acknowledgments

This research was supported by funding obtained from Aix-Marseille University, the "Région Provence-Alpes-Côte d'Azur," the "Conseil Général des Bouches-du-Rhône" (PACA, CG13) and Benjamin Delessert foundation. We also thank the Aix-Marseille University Microscopy Center CP2M for the access to confocal Microscopy and the AVB platform (Analyse et Valorisation de la Biodiversité, iSm2, UMR 7313, Marseille). AD is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministry of Education. The authors are grateful to O. Knowles and S. Mounien for critical reading of the manuscript. We thank D. Chabbert for expert help with intracerebroventricular injection and Dr. M. Maresca for the gift of antibodies.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00172/abstract>

References

- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massier, K., Holtz, J., Eachus, R., et al. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553–563. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.031
- Benoit, C., Ould-Hamouda, H., Crepin, D., Gertler, A., Amar, L., and Taouis, M. (2013). Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J. Endocrinol.* 218, 35–47. doi: 10.1530/JOE-12-0561
- Berglund, E. D., Vianna, C. R., Donato, J. Jr., Kim, M. H., Chuang, J.-C., Lee, C. E., et al. (2012). Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1000–1009. doi: 10.1172/JCI59816
- Ceddia, R. B., William, W. N. Jr., Carpinelli, A. R., and Curi, R. (1999). Modulation of insulin secretion by leptin. *Gen. Pharmacol.* 32, 233–237. doi: 10.1016/S0306-3623(98)00185-2
- Chen, A. S., Marsh, D. J., Trumbauer, M. E., Frazier, E. G., Guan, X. M., Yu, H., et al. (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.* 26, 97–102. doi: 10.1038/79254
- Chiang, H. R., Schoenfeld, L. W., Ruby, J. G., Auyeung, V. C., Spies, N., Baek, D., et al. (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* 24, 992–1009. doi: 10.1101/gad.1884710
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., et al. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484. doi: 10.1038/35078085
- Crépin, D., Benomar, Y., Riffault, L., Amine, H., Gertler, A., and Taouis, M. (2014). The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 384, 1–11. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.016
- Gao, Q., Wolfgang, M. J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T. L., Shulman, G. I., et al. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4661–4666. doi: 10.1073/pnas.0303992101
- Girardet, C., Bonnet, M. S., Jdir, R., Sadoud, M., Thirion, S., Tardivel, C., et al. (2011). Central inflammation and sickness-like behavior induced by the food contaminant deoxynivalenol: a PGE2-independent mechanism. *Toxicol. Sci.* 124, 179–191. doi: 10.1093/toxsci/kfr219
- Greenman, Y., Kuperman, Y., Drori, Y., Asa, S. L., Navon, I., Forkosh, O., et al. (2013). Postnatal ablation of POMC neurons induces an obese phenotype characterized by decreased food intake and enhanced anxiety-like behavior. *Mol. Endocrinol. (Baltimore Md)* 27, 1091–1102. doi: 10.1210/me.2012-1344
- Herzer, S., Sılahtaroglu, A., and Meister, B. (2012). Locked nucleic acid-based *in situ* hybridisation reveals miR-7a as a hypothalamus-enriched microRNA with a distinct expression pattern. *J. Neuroendocrinol.* 24, 1492–1504. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02358.x
- Hill, J. W., Elias, C. F., Fukuda, M., Williams, K. W., Berglund, E. D., Holland, W. L., et al. (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab.* 11, 286–297. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.002
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81865-6
- Ibrahim, N., Bosch, M. A., Smart, J. L., Qiu, J., Rubinstein, M., Ronnekleiv, O. K., et al. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331–1340. doi: 10.1210/en.2002-221033
- Lee, Y. S. (2009). The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann. Acad. Med. Singapore* 38, 34–41.
- Li, S., Chen, X., Zhang, H., Liang, X., Xiang, Y., Yu, C., et al. (2009). Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J. Lipid Res.* 50, 1756–1765. doi: 10.1194/jlr.M800509-JLR200
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D. R., Gattesco, S., Yang, J.-Y., Widmann, C., et al. (2008). Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 57, 2728–2736. doi: 10.2337/db07-1252
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G., and Hill, R. A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1407–1433. doi: 10.1038/sj.ijo.0802142
- Mizuno, T. M., Kleopoulos, S. P., Bergen, H. T., Roberts, J. L., Priest, C. A., and Mobbs, C. V. (1998). Hypothalamic Pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by Leptin. *Diabetes* 47, 294–297. doi: 10.2337/diab.47.2.294
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., and Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295. doi: 10.1038/nature05026
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, L., Gourcerol, G., Basille, M., Gonzalez, B., et al. (2006a). Expression of PACAP receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070, 457–461. doi: 10.1196/annals.1317.061
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, L., Gourcerol, G., Fournier, A., Vaudry, H., et al. (2006b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide directly modulates the activity of proopiomelanocortin neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience* 143, 155–163. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.022
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, L., Vaudry, H., and Jégou, S. (2005). Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82, 164–170. doi: 10.1159/000091737
- Mounien, L., Do Rego, J.-C., Bizet, P., Boutelet, L., Gourcerol, G., Fournier, A., et al. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 34, 424–435. doi: 10.1038/npp.2008.73
- Mounien, L., Marty, N., Tarussio, D., Metref, S., Genoux, D., Preitner, F., et al. (2010). Glut2-dependent glucose-sensing controls thermoregulation by enhancing the leptin sensitivity of NPY and POMC neurons. *FASEB J.* 24, 1747–1758. doi: 10.1096/fj.09-144923
- Nakanishi, N., Nakagawa, Y., Tokushige, N., Aoki, N., Matsuzaka, T., Ishii, K., et al. (2009). The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 492–496. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.058
- Nilaweera, K. N., Barrett, P., Mercer, J. G., and Morgan, P. J. (2003). Precursor-protein convertase 1 gene expression in the mouse hypothalamus: differential regulation by ob gene mutation, energy deficit and administration of leptin, and coexpression with prepro-orexin. *Neuroscience* 119, 713–720. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00869-2
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., et al. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors *in vitro* and *in vivo* by agouti-related protein. *Science* 278, 135–138. doi: 10.1126/science.278.5335.135
- Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C.-Y., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228–232. doi: 10.1038/nature06098
- Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., et al. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by Leptin. *Science* 304, 110–115. doi: 10.1126/science.1089459
- Plum, L., Belgardt, B. F., and Brüning, J. C. (2006). Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116, 1761–1766. doi: 10.1172/JCI29063
- Porte, D. Jr., Baskin, D. G., and Schwartz, M. W. (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr. Rev.* 60, S20–S29. discussion: S68–S84, 85–87. doi: 10.1301/002966402320634797
- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., et al. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5813–5818. doi: 10.1073/pnas.0810550106
- Sangiao-Alvarellos, S., Pena-Bello, L., Manfredi-Lozano, M., Tena-Sempere, M., and Cordido, F. (2014). Perturbation of hypothalamic microRNA expression patterns in male rats after metabolic distress: impact of obesity and conditions of negative energy balance. *Endocrinology* 155, 1838–1850. doi: 10.1210/en.2013-1770
- Schneeberger, M., Altirriba, J., García, A., Esteban, Y., Castaño, C., García-Lavandera, M., et al. (2012). Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol. Metab.* 2, 74–85. doi: 10.1016/j.molmet.2012.10.001

- Smith, A. I., and Funder, J. W. (1988). Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr. Rev.* 9, 159–179. doi: 10.1210/edrv-9-1-159
- Tattikota, S. G., Rathjen, T., McAnulty, S. J., Wessels, H.-H., Akerman, I., van de Bunt, M., et al. (2014). Argonaute2 mediates compensatory expansion of the pancreatic β cell. *Cell Metab.* 19, 122–134. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.015
- Thompson, R. C., Deo, M., and Turner, D. L. (2007). Analysis of microRNA expression by *in situ* hybridization with RNA oligonucleotide probes. *Methods (San Diego Calif.)* 43, 153–161. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.04.008
- Williams, K. W., Margatho, L. O., Lee, C. E., Choi, M., Lee, S., Scott, M. M., et al. (2010). Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci.* 30, 2472–2479. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010
- Xie, H., Lim, B., and Lodish, H. F. (2009). MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* 58, 1050–1057. doi: 10.2337/db08-1299
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* 5, 1066–1070. doi: 10.1038/12506

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Derghal, Djelloul, Airault, Pierre, Dallaporta, Troadec, Tillement, Tardivel, Bariohay, Trouslard and Mounien. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANNEXE 4

Les endozépinines gliales reversent l'obésité induite par un régime gras en augmentant la sensibilité hypothalamique à la leptine périphérique

Glial endozeptines reverse high fat diet-induced obesity by increasing hypothalamic sensitivity to peripheral leptin

Florent Guillebaud, Manon Duquenne, Mehdi Djelloul, Clément Pierre, Guenièvre Roussel, Seddik Riad, Fabrice Morin, André Jean, Marie-Christine Tonon, Stéphanie Gaigé, Bruno Lebrun, Michel Dallaporta, Jérôme Leprince, Vincent Prevot, Jean-Denis Troadec

Cell Metabolism (en révisions)

Les travaux de Guillebaud et al., (2018) avaient pour objectif d'étudier les mécanismes d'action d'endozépinines, des gliotransmetteurs aux effets anorexigènes, sur la régulation de l'homéostasie énergétique. L'endozépine étudiée est l'octapeptide (OP) C-terminal de l'octadecaneuropeptide (ODN). Nous avons montré que l'OP stimule la satiété en agissant sur la voie de signalisation de la leptine. De manière intéressante l'injection d'OP reverse le phénotype obèse induit par un régime gras et restaure les taux de leptine au sein de l'hypothalamus. De façon intrigante un traitement à l'OP ne permet pas de diminuer la prise alimentaire chez la souris ob/ob, mais potentialise les effets d'un traitement à la leptine. L'OP exercerait son action au niveau des tanocytes hypothalamiques, des cellules gliales qui tapissent le 3^{ème} ventricule du cerveau et qui assurent le lien entre le liquide cébrospinal et les capillaires sanguins.

Glial endozepines reverse high fat diet-induced obesity by increasing hypothalamic sensitivity to peripheral leptin

Florent Guillebaud^{1, £}, Manon Duquenne^{2, 3, £}, Mehdi Djelloul¹, Clément Pierre^{1,4}, Guenièvre Roussel¹, Seddik Riad⁵, Fabrice Morin⁶, André Jean¹, Marie-Christine Tonon⁶, Stéphanie Gaigé¹, Bruno Lebrun¹, Michel Dallaporta¹, Jérôme Leprince⁶, Vincent Prevot^{2,3, #} and Jean-Denis Troadec^{1, #}

Affiliations:

1: Université Aix-Marseille, CNRS UMR 7291, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Marseille, France.

2: INSERM, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre, U1172, Lille, France

3: University of Lille, School of Medicine, Lille, France

4: Biomeostasis CRO, FST St Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France.

5 : Université Aix-Marseille, CNRS UMR UMR 7289, Institut des Neurosciences de la Timone, Marseille, France.

6: Normandie Univ., UNIROUEN, INSERM, U1239, Rouen, France

Abbreviated title: Anti-obesity effect of endozepines

£: These authors equally contributed to the work

#: Corresponding authors

Jean-Denis Troadec, Université Aix-Marseille ; CNRS UMR 7291, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Faculté des Sciences et Techniques de St Jérôme, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France. j-d.troadec@univ-amu.fr; Tel: +33 4 91 28 89 48

Vincent Prevot, INSERM, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre, U1172, Lille, France. Vincent.prevot@inserm.fr, Tel : +33

Summary

The role of glial cells in energy homeostasis has only recently attracted attention. Endozepines, a class of gliotransmitters, exert potent anorexigenic actions through mechanisms that remain unknown. We show here that intracerebral administration of endozepines *i.e.* octadecaneuropeptide (ODN) and octapeptide (OP) enhances satiety by targeting anorexigenic brain circuitry involved in the homeostatic regulation of food intake, and induces STAT3 phosphorylation in hypothalamic and brainstem neurons, a hallmark of leptin signaling. In a diet-induced obesity model, endozepines reverse the obese phenotype by reducing food intake, and restore leptin-induced STAT3 phosphorylation in the mediobasal hypothalamus. Strikingly, endozepines are completely ineffective in reducing food intake in leptin-deficient obese mice but potentiate the reduction in food intake and body weight induced by exogenous leptin administration in these mice. Moreover, the anorexigenic OP action was blunted by pretreatment with a leptin receptor antagonist in wild type mice. Interestingly, OP induces ERK activation, in cultured tanycytes and restoration of leptin-induced STAT3 activation by OP in the hypothalamus of diet-induced obese mice requires leptin receptor expression in tanycytes. Hence, our data identify endozepines as potential anti-obesity compounds that act by modulating the ERK-dependent tanycytic leptin shuttle necessary for leptin transport into the brain.

Keywords: octadecaneuropeptide, tanycytes, energy homeostasis, leptin, *ob/ob*, pSTAT3, hypothalamus, nucleus of the solitary tract.

Introduction

Energy homeostasis, which corresponds to the balance between food intake and energy expenditure, is tightly regulated by the central nervous system. Nutritional, hormonal and neuronal information from the periphery are centrally integrated by the hypothalamus and brainstem, and then relayed to reward circuits. So far, most research on the regulation of energy homeostasis has focused on the involvement of neuronal signaling, and the role of glial cells has been poorly explored. Our understanding of glial cells has evolved considerably over the last few decades. These cells are now recognized as partners of neurons in contributing to normal brain physiology (see for review Araque et al., 2014; Perea et al., 2014). Emerging evidence suggest a significant glial role in the regulation of feeding behavior and the control of energy balance (see for review Dallaporta et al., 2010; García-Cáceres et al., 2012). Changes in glial structure are observed in the hypothalamus during the development of obesity both in rodents (Thaler et al., 2012; Buckman et al., 2013; García-Cáceres et al., 2013; Langlet et al 2013a) and non-human primates (Grayson et al., 2010). These alterations, characteristic of astrogliosis, result in cell hypertrophy, increased proliferation and enhanced expression of astrocytic intermediate filaments proteins *i.e.* glial fibrillary acidic protein (GFAP), nestin and vimentin. In turn, these astrocytic changes in the hypothalamus of obese animals alter the synaptic activity of melanocortin neurons by increasing glial coverage and thus reducing the reception of humoral information from the periphery (Horvath et al., 2010). Several studies have also shown that astrocytes themselves are sensitive to humoral factors related to the regulation of energy homeostasis. Chronic intracerebroventricular (icv) injection of leptin alters the astrocytic expression of structural proteins such as GFAP and vimentin (García-Cáceres et al., 2011) as well as glutamate and glucose transporters (Fuente-Martín et al., 2012). Recently, using a tamoxifen-inducible deletion of the leptin receptor in astrocytes, Kim and colleagues (Kim et al., 2014) have reported that the modulation of the glial coverage of melanocortin neurons depends at least in part upon the leptin sensitivity of astrocytes themselves. In addition, our knowledge regarding the transport and effects of leptin within the brain has recently evolved (Friedman, 2015). In the hypothalamic median eminence (ME), tanycytes, another type of glial cell, were shown to express functional leptin receptors, capture leptin from the bloodstream and release it into the cerebrospinal fluid (CSF, Balland et al., 2014).

Endozepines, such as octadecaneuropeptide (ODN) and its C-terminal octapeptide (OP), derive from an 86 amino-acid polypeptide, the diazepam-binding inhibitor (DBI) and are

considered as the endogenous ligands of benzodiazepine receptors (Farzampour et al., 2015 for review). Within the brain, the highest levels of ODN-like immunoreactivity have been detected in glial cells (astrocytes, ependymocytes and tanycytes) of the hypothalamus (Tonon et al., 1990) and of the brainstem (Guillebaud et al., 2017). ODN has aroused great interest in the last decade because of its potent anorexigenic action described in rodents and goldfish (De Mateos-Verchere et al., 2001; Matsuda et al., 2007), and more recently, its anti-hyperglycemic effect (Lanfray et al., 2013). Interestingly, the ability of ODN and OP to reduce food intake in rats and mice seems to be independent of benzodiazepine receptor binding and relies on a metabotropic receptor positively coupled to phospholipase C (do Rego et al., 2007). Even though central ODN injection has been reported to modify transcripts of neuropeptides related to energy homeostasis, such as those for proopiomelanocortin- (POMC) derived peptide melanocyte-stimulating hormone (MSH) and neuropeptide Y (NPY) in the arcuate nucleus (ARC; Compère et al., 2003), little is known regarding its mode of action and cellular targets. In this context, we designed the present study to identify the mechanisms underlying the anorexigenic action of endozepines and to investigate their potential curative effect in high fat diet-induced obesity.

Results

ODN is expressed by glial cells in brain structures related to food intake

Labeling of mouse brain sections with an ODN antibody revealed the presence of strong immunoreactivity within both the hypothalamus and the dorsal vagal complex (DVC) (Figure 1A, B and S1 A-D). At the hypothalamic level, ODN-like immunoreactivity was observed in the ARC and ventromedial hypothalamus (VMH) (Figures 1A and S1A, C). In the ARC and VMH, ODN-like labeling was associated with GFAP-positive protoplasmic astrocytes (Figures 1A and S1E, F) and vimentin-positive tanycytes lining the 3rd ventricle (Figure S1I, K). In coronal sections of the caudal brainstem, ODN-like immunoreactivity followed a striking pattern with a distinct sub-regional distribution in the DVC. Indeed, the area postrema (AP), the commissural part of the nucleus of the solitary tract (NTS) and the interface between the AP and the subpostremal NTS appeared highly labeled throughout their rostrocaudal extent, whereas only weak ODN-like labeling was observed in other parts of the NTS and the dorsal

motor nucleus of the vagus nerve (DMNX; Figures 1B and S1B, D). Within the NTS, ODN-immunoreactive cells exhibited typical features of differentiated protoplasmic GFAP-expressing astrocytes (Figures 1B and S1G, H). Along the AP/NTS interface, ODN-like labeling was also found to be localized within GFAP- and vimentin-positive processes (Figures 1B and S1J, L), previously described as belonging to tanyocyte-like cells (Pecchi et al., 2007; Langlet et al., 2013b). RT-PCR amplification of DBI mRNAs confirmed the expression of DBI transcripts in hypothalamic and DVC tissues, as well as in primary glial cell cultures prepared from these two central structures (Figure 1C).

Endozepines modify food intake and meal patterns.

Intracerebroventricular ODN injection (2 µg/mouse) decreased spontaneous food intake (Figure 1D, E) as early as the 0-1.5 h post-treatment interval. Additionally, a single icv administration of OP (0.5 and 2 µg/mouse) dose-dependently decreased daily food intake (Figure 1D, E). The doses used here were chosen on the basis of the previous work published by Lanfray et al (2013). The ODN and OP effects on meal patterns were essentially observed during the 0-6 h interval post-treatment (Table S1). During this period, both peptides (2 µg each) significantly reduced meal size (220.37 ± 27.46 mg; 66.94 ± 14.66 mg and 113.13 ± 28.69 mg for NaCl, ODN and OP respectively) and meal number (8.00 ± 1.57 ; 1.71 ± 0.42 and 3.60 ± 0.50 for NaCl, ODN and OP respectively) and increased post-meal intervals (43.17 ± 9.07 min; 135.09 ± 23.59 min and 107.89 ± 27.02 min for NaCl, ODN and OP respectively) without modifying meal duration (Table S1). Consequently, satiety ratios (the post-meal interval divided by the size of the meal) were significantly increased for ODN and OP during the same trial period (Table S1). Since the ODN fragment OP was as efficient as ODN in inducing anorexia, only OP was used in the following experiments. Importantly, OP (2 µg) did not affect total locomotor activity whatever the time period of the dark phase considered (Figure 1F). We next determined the mRNA expression profile of the endozepine precursor, DBI, in fed and fasting animals. We observed that fasting for 24 h strongly reduced DBI mRNA expression within both the hypothalamus and the DVC. Refeeding for 2 h restored initial levels of DBI mRNA expression (Figure 1G).

OP induces the activation of prototypic anorexigenic neuronal pathways

We used immunohistochemical detection of the immediate early gene c-Fos as an indicator of central structures activated in response to OP treatment. A very low basal level of c-Fos-positive

nuclei was observed in the brainstem and forebrain of NaCl-treated mice (Figures 1H-L and S2A). Animals challenged with OP (2 µg/mouse icv) displayed c-Fos labeling in a limited number of structures. A strong rise in c-Fos positive cells was observed only in hypothalamic and brainstem nuclei (Figures 1H-L and S2A). At the brainstem level, the NTS, AP and DMNX were found to be strongly labeled as early as 1.5 h post-treatment and labeling remained high 3 h post-treatment (Figures 1H, J, L and S2A). In particular, c-Fos-positive cells displayed a striking concentration in the AP and subpostremal NTS at 1.5 h post-treatment and were more widely distributed 3 h after treatment (Figures 1H, J, L and S2A). In the hypothalamus, the number of c-Fos-positive nuclei increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), ARC, ME and VMH (Figures 1I, K, L and S2A). It should be noted that the VMH was the earliest hypothalamic area found to be activated in response to OP *i.e.* 1.5h post-injection. The different hypothalamic nuclei appeared labeled throughout their rostrocaudal extent, with a high proportion of c-Fos-labeled cells lining the 3rd ventricle at the level of the ARC and VMH (Figure 1I, K). The use of POMC-GFP transgenic mice revealed that icv OP administration (2 µg/mouse) moderately increased the number of POMC neurons positive for c-Fos, both in the NTS and in the ARC (Figure 1M-N). About 27% and 6% of POMC neurons were found to be immunoreactive for c-Fos within the NTS and the ARC respectively, at 1.5 h post-treatment (Figure 1N). Whole-cell patch-clamp recordings performed on hypothalamic slices revealed that bath application of OP (100 nM) led to membrane depolarization and action potentials in ~33% of the POMC neurons tested (3/9 cells; depolarization: 7.1 ± 1.9 mV; Figure S2B-F). The weak proportion of OP-sensitive POMC neurons observed by c-Fos labeling and patch-clamp recording suggests that alternative anorexigenic neurocircuits could be recruited by OP *in vivo*. In accordance with this hypothesis, the number of nesfatin-1/NUCB2 neurons labeled for c-Fos in the NTS and PVN was greatly increased by OP treatment (Figure 1O-P). The percentage of nesfatin-1/NUCB2 neurons double-labeled for c-Fos was ~ 25-30%. Moreover, these nesfatin-1/NUCB2-positive cells represented about ~ 50% of the entire c-Fos-positive cell population (Figure 1P). Double immunolabeling for c-Fos and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) or c-Fos and tyrosine hydroxylase (TH) performed at the brainstem level revealed that a significant proportion of these two neuronal populations, about 15 to 30% of GLP-1 neurons (Figure S2G) and 40% of TH neurons (Figure S2H, I), were also immunoreactive for c-Fos after OP treatment. Finally, sparse c-Fos labeling was observed in GFAP-positive astrocytes and vimentin-positive tanycytes in response to OP injection both at the hypothalamic (Figures 1Q, S2J) and brainstem levels (data not shown).

Chronic OP treatment reverses high-fat-diet-induced obesity

We next sought to determine whether the anorexigenic effect of OP treatment could reverse diet-induced obesity, known to be characterized by resistance to peripheral leptin. We first observed that 10 weeks of a high-fat diet (HFD) significantly reduced DBI mRNA expression in the hypothalamus and DVC (Figure 2A). We next tested the impact of acute icv OP treatment on HFD mice during a 24h period. OP reduced food intake whatever the time period considered (Figure S3A-B). Interestingly, hyperleptinemic HFD mice appeared to be more sensitive to the acute OP anorexigenic action than normal chow fed mice (Figure S3A-B). Then, we investigated the impact of chronic icv OP treatment (13 days; 2 µg/mouse.day) on body weight and food intake in mice given HFD or normal chow (NC) for 10 weeks. Food intake and body weight was then measured once a day. OP induced a progressive but significant reduction in body weight, leading to lower final body weights in both NC- and HFD-fed mice (Figure 2B-D). In both groups, the effects of OP on body weight became significant after 10 days of treatment (Figure 2B). The final body weight and body weight variation confirmed the significant weight loss induced by chronic OP exposure in both groups (Figure 2C, D). OP also reduced cumulative food intake, expressed in kcal, in both NC- and HFD-fed mice (Figure 2E, F). At the mRNA level, chronic OP treatment restored the expression of POMC, NUCB2 and GLP1, dysregulated by HFD within the hypothalamus and/or the DVC (Figure S4A, B). Interestingly, chronic OP treatment also restored the expression of DBI mRNA, which was depressed by HFD (Figure S4A, B). Obesity is normally associated with glucose intolerance and endozepines have been shown to exert anti-hyperglycemic actions (Lanfray et al., 2013). As expected, HFD mice presented an impaired glucose tolerance and a higher fasting glycaemia in comparison to animals fed with NC (Figure 2G-J), and chronic OP treatment for 13 days improved both these glycaemic parameters (Figure 2G-J). Finally, differences in fat pad deposition levels between NC and HFD groups were observed in both gonadal adipose tissue (GAT) and retroperitoneal adipose tissue (RPAT). OP administration reduced fat pad weights, especially for the RPAT (Figure S5A). While HFD consumption resulted in a noticeable enlargement of adipocytes, chronic OP treatment (2 µg/day) considerably reduced their size in the RPAT (Figure S5B, C). In agreement with these results, OP treatment reduced liver weight gain (Figure S5D) and steatosis in HFD animals, as revealed by Oil Red-O staining and histochemical analysis (Figure S5E, F).

OP fails to reduce food intake in leptin-deficient obese mice

To shed light on the mechanisms by which OP reduces food intake and reverses a diet-induced obesity, we tested the potential interaction between OP and endogenous leptin. Acute OP treatment (2 µg/mouse; 3h) increased mRNA levels for the long form of the leptin receptor (LepR) within the hypothalamus, but not the DVC, of wild-type (WT) mice (Figure 3A). Moreover, DBI mRNA was upregulated in both the hypothalamus and DVC of leptin-deficient mice (*ob/ob* mice; Figure 3B). On the other hand, unlike wild type mice, *ob/ob* mice did not exhibit reduction of DBI mRNA during fasting (Figure 3C). We next evaluated the impact of icv OP on *ob/ob* mice and their littermate controls. Intriguingly, in *ob/ob* mice we did not observe any reduction of food intake in response to OP administered at 2 µg or at higher dose *i.e.* 6 µg (Figure 3D). Together, these data suggest that OP requires circulating leptin to mediate its anorectic actions. Brain endozepines were previously shown to modulate blood glucose levels and take part to the whole-body glucose homeostasis (Lanfray et al., 2013). In *ob/ob* mice, OP also failed to reduce fasting glycemia or a glycemic response to oral glucose overload (Figure S6A).

OP induces STAT3 phosphorylation in leptin-sensitive hypothalamic neurons of lean but not of leptin-deficient obese mice

To better explain the molecular mechanisms involved in the lack of an effect of OP in *ob/ob* mice, we next evaluated the activation of STAT3, a well-known physiological mediator of the effects of leptin. Interestingly, we found that OP (2 µg) elicited robust STAT3 phosphorylation (pSTAT3) within the ARC, VMH and NTS in WT mice but not in *ob/ob* mice (Figure 3E, F). It can be noticed that in WT mice, OP induced pSTAT3 in few arcuate POMC neurons (Figure 3G) and tanycytes (Figure 3H). Next, in WT mice, we compared the effects on STAT3 phosphorylation of treatments with leptin, OP, or their co-administration. We used a submaximal ip dose of leptin *i.e.* 100 µg/kg (Barrachina et al., 1997). Co-administration of OP (2 µg/mouse; icv) and leptin (100 µg/kg; intraperitoneal (ip) injection) in WT mice induced significantly more pSTAT3 when compared to leptin 100 µg/kg alone. However, this co-treatment did not lead to more pSTAT3 than OP alone (Figure 3E). These results could be understood as the lack of an additive effect of leptin and OP at the concentrations used or by a maximal recruitment of STAT-3 pathway by OP in condition of physiological leptin concentration. Any ways, these results support the hypothesis that OP and leptin act through

the same signaling pathway. Moreover, since OP was unable to induce c-Fos expression in the NTS, ARC or VMH of *ob/ob* mice (Figure S6B), these data suggest that the central effects of endozepines are strictly dependent on the mobilization of leptin signaling.

OP enhances central sensitivity to peripheral leptin

On the basis of the results notably obtained in *ob/ob* mice, we hypothesized that OP increases the responsiveness of *ob/ob* mice to exogenous leptin treatment. To test this hypothesis, we administered daily a submaximal dose of exogenous leptin to *ob/ob* mice (100 µg/kg ip injection alone or in combination with OP (2 µg/mouse icv) for 7 days. We found that cumulative (Figure 3J) and daily (data not shown) food intakes were significantly more affected by leptin/OP co-treatment than by leptin alone. Similarly, the leptin/OP combination was more effective in promoting weight loss (Figure 3I) than leptin given alone. After the 7th injection, *ob/ob* mice treated with leptin/OP exhibited a weight loss of $9.4 \pm 1.2\%$ as compared to $2.6 \pm 3.0\%$ in *ob/ob* mice treated with leptin alone ($P < 0.05$; Figure 3I). It should be noted that chronic treatment with OP alone failed to reduce food intake and body weight in *ob/ob* mice (Figure 3D, J and I). These results support the hypothesis that OP plays a role in energy homeostasis through the modulation of leptin responsiveness. To confirm this point, we took advantage of peripheral administration of the mouse super-active leptin antagonist (SLAN) in WT mice. SLAN (20 µg/mouse ip) administered 30 min prior to OP totally blunted the anorexigenic action of the endozepine (Figure 3K). Importantly, we found that OP (2µg/mouse) still stimulated significantly pSTAT-3 expression in ARC of HFD-animals (Figure 4A-E). It should be noted that a strong proportion of OP-activated c-Fos+ cells were found located in the 3rd ventricle wall (Figure 4B, D).

OP stimulates tanycyte-mediated transport of leptin

We next hypothesized that OP increases the efficiency of leptin action on hypothalamic feeding circuits by facilitating the transport of blood-borne leptin into the brain, a process that was recently shown to be mediated by tanycytes in an ERK-dependent manner (Balland et al., 2014). First, we explored the putative role of OP in tanycytic ERK signaling using primary cultures of tanycytes. Similar to the erbB-1 ligand EGF (20ng/mL), which was previously shown to restore the passage of circulating leptin into the hypothalamus of mice with diet-induced obesity

(Balland et al., 2014), incubation with OP (2 µg/mL) for 15 minutes was found to induce ERK phosphorylation in cultured tanycytes (Figure 5A). Consistent with the idea that OP could reinstate the transport of peripheral leptin into the hypothalamus, 4 days of OP treatment restored the ability of exogenous leptin to promote STAT3 activation in the mediobasal hypothalamus of diet-induced obese mice (Figure 5B). We next performed a single ip injection of Cy3-labeled leptin (100 µg/kg) in *ob/ob* mice pre-treated 30 min earlier with NaCl or OP (2 µg). Thirty minutes after Cy3-leptin injection, Cy3 fluorescence in hypothalamic nuclei *i.e.* the ARC and VMH was higher in OP-treated mice than in NaCl-treated control animals (Figure 5C-D). Interestingly, fluorescent spots were observed in cell bodies, possibly tanycytes, lining the 3rd ventricle in a greater extent in OP- than in NaCl-treated animals (Figure 5E-F, arrows). Finally, we performed TAT-CRE injection within the 3rd ventricle of LepR-loxP mice, using a protocol previously used to induce recombination exclusively in tanycytes surrounding the 3rd ventricle. The resulting specific deletion of tanycytic LepR expression strongly lessened the OP-induced STAT3 activation in the hypothalamus (Figure 5G-H).

Insulin regulates DBI mRNA expression in tanycytes

We showed that insulin (5µg/ml), added in presence of low concentration of glucose (0.2 mg/ml), stimulated DBI mRNA expression in cultured tanycytes (Figure S7). Interestingly, when insulin treatment (5µg/ml) was performed with higher glucose concentration (1mg/ml), a synergistic effect was observed (Figure S7).

Discussion

We report here that endozepines are expressed by glial cells in the hypothalamus and the DVC, control food intake by recruiting canonical anorexigenic pathways and reduce obesity by diminishing food intake in mice fed with high fat diet. Importantly, the anorexigenic action of endozepines is strictly dependent on the presence of leptin and related to STAT3 activation. With regard to the effect of OP and leptin co-administration in *ob/ob* mice, OP appears to exert its anorexigenic and anti-obesity effects by increasing leptin sensitivity *via* the facilitation of the tanycytic transport of blood-borne leptin into the brain. In agreement with this hypothesis, invalidation of the LepR in hypothalamic tanycytes reduced OP-induced pSTAT3 in a mouse model of diet-induced obesity.

Glial endozepine expression in food-intake-related structures

Pioneering studies have reported a heterogeneous distribution of DBI mRNA in the rat brain, with noticeably high levels of expression within the hypothalamus, the lining of the 3rd ventricle and the AP (Alho et al., 1988). ODN immunohistochemistry coupled with electron microscopy has established its association with glial and ependymal cells (Tonon et al., 1990). Our results, combining ODN immunodetection and DBI mRNA amplification in the mouse brain, are consistent with these previous results and extend them to the caudal brainstem. As reported earlier for the hypothalamus (Lanfray et al., 2013), glial ODN expression can be seen in NTS astrocytes and tanycyte-like cells surrounding the AP. Interestingly, DBI mRNA levels in the hypothalamus and DVC are reduced after fasting and normalized after refeeding and are also reduced in HFD-fed mice as compared with NC-fed mice. These results are consistent with a role for glial endozepines as endogenous anorexigenic factors.

Endozepine-induced anorexia and the neurocircuitry recruited

By performing the first meal pattern analysis in response to endozepines, we showed that ODN or OP treatment decreased meal size and eating rate, whereas the satiety ratio, an index of satiety, was increased. This profile suggests that ODN or OP inhibited feeding through a physiological mechanism of meal size control. Importantly, OP did not modify locomotor activity at time points when anorexia is ongoing excluding that the endozepines anorexigenic action is a simple consequence of an altered level of arousal through the modulation of GABA signaling. Until now, the central structures activated in response to endozepines were only partly identified (Compère et al., 2003). Using c-Fos immunolabeling, we revealed cellular activation within the NTS/AP, ARC, PVN and VMH nuclei. This pattern of activation is consistent with the OP-induced reduction in food intake. POMC neurons are prototypical anorexigenic neurons known to impact energy homeostasis through α -MSH/melanocortin-3/4 receptors (van Swieten et al., 2014), and the blockade of melanocortin-3/4 receptors suppresses the anorexigenic effects of ODN (Matsuda et al., 2007; Lanfray et al., 2013). Surprisingly, only a small proportion of POMC neurons in the ARC are positive for c-Fos in response to OP. In contrast, in the NTS, nearly 30% of POMC neurons express c-Fos after OP treatment. Interestingly, it was recently demonstrated that a selective acute activation of POMC neurons located in the NTS leads to a rapid and strong reduction in food intake, whereas POMC neurons

in the ARC only suppress feeding behavior upon prolonged activation (Zhan et al., 2013). However, POMC neurons, whether in the ARC or the NTS, account for only a small proportion of the cells in which OP induces c-Fos expression. Thus, the present results argue in favor of the recruitment of other anorexigenic pathways. Nesfatin-1, an 82 amino-acid peptide expressed in various brain areas including hypothalamic and brainstem nuclei (Oh-I et al., 2006; Bonnet et al., 2009) displays a food-intake-reducing effect (Shimizu et al., 2009). Here, we report that nesfatin-1 neurons represent a high proportion of the cells expressing c-Fos in response to OP, both in the hypothalamus and NTS, suggesting a significant contribution of these neurons to OP-induced anorexia. In addition, GLP-1 neurons in the NTS are also significantly stimulated in response to OP and it was demonstrated that GLP-1 NTS neurons project to the PVN and directly activate nesfatin-1 neurons in the PVN to restrict food intake (Katsurada et al., 2014). The activation of the A2/C2 catecholaminergic group by OP, as seen by increased TH/c-Fos co-labeling in the NTS, also attests to the involvement of networks connecting the brainstem and hypothalamus. Altogether, these data strongly support the idea that OP interferes directly or indirectly with neuronal networks devoted to central energy balance and that this action could partly explain the modification of meal frequency and meal size. Finally, a significant proportion of the astrocytes and tanycytes surrounding the 3rd and 4th ventricles appear to be activated after OP injection. These results are in agreement with previous *in vitro* studies showing that ODN and OP could act as factors controlling the activity of astroglial cells (Lamacz et al., 1996; Gandolfo et al., 1997; Leprince et al., 1998).

Endozepines as leptin sensitizers

One major finding of the present work is the lack of OP-induced hypophagia in leptin-deficient *ob/ob* mice after either acute or chronic treatment, suggesting that circulating leptin is required for endozepines action. We can reasonably exclude a lessening of endozepines sensitivity in this genetic model since a high OP dose that totally suppressed food intake in WT mice *e.g.* 6 µg (data not shown) did not alter food intake in *ob/ob* mice. Intracellular leptin signaling involves the JAK-STAT pathway *via* the phosphorylation and nuclear translocation of STAT3. Accordingly, the disruption of the STAT3 docking site on LepR (Bates et al., 2003) or the deletion of neuronal STAT3 (Gao et al., 2004) result in severe hyperphagia and obesity. In the present work, we show that OP induces pSTAT3 within the ARC, VMH and NTS in WT mice but not in *ob/ob* mice. Hence, OP-induced c-Fos expression is also blunted in *ob/ob* mice. Altogether, these data support the idea that endozepines require leptin to be fully effective.

However, since genetic models such as *ob/ob* mice are prone to congenital drifts (Bouret et al., 2004), we cannot exclude the possibility that the lack of OP effect in these mice is due to genetic alterations others than the one affecting leptin functionality. Therefore, we performed an *in vivo* pharmacological inhibition of leptin receptor in WT mice using a super-active leptin antagonist (SLAN, Halpern et al., 2011). The blunt of OP anorexigenic effect observed in presence of SLAN in WT mice confirms that OP action requires a fully operative leptin signaling pathway.

Leptin-deficient *ob/ob* mice were then made the most of by testing whether endozepines act as leptin sensitizers. Using sub-chronic treatment of *ob/ob* mice with exogenous leptin at a low dose, we demonstrated that co-administration of OP potentiates the effect of leptin on the reduction of food intake and the loss of body weight. Resistance to peripheral leptin is a well-known feature of diet-induced obesity (Myers et al., 2008). Our data show that OP promotes body weight loss and improves metabolic parameters in diet-induced obese mice. As observed in lean animals, these OP-effects involved a stimulation of pSTAT-3 expression. In accordance with OP-induced increased leptin sensitivity, we observed that hyperleptinemic HFD mice are more sensitive to acute OP anorexigenic effect compared to NC mice. However, this difference in sensitivity towards OP seems to gradually attenuate under sub-chronic OP treatment, since the reduction in body weight observed in HFD mice after 12 days of treatment did not differ significantly from the one observed in NC mice.

Recently, Maniscalco and Rinaman (2014) have reported the differential sensitivity of STAT3 activation in response to leptin in the ARC, VMH and NTS. According to these authors, the ARC is much more sensitive to leptin than the NTS or VMH, with maximal pSTAT3 labeling obtained with a relatively low leptin dose (50 µg/kg). Moreover, the ARC leptin responsiveness is highly susceptible to saturation within the range of endogenous plasma leptin levels, *i.e.* from 10 to 130 µg/kg (Campfield et al., 1995). Altogether, our data lead us to hypothesize that an endozepines signaling tone could be responsible for the high leptin sensitivity of the ARC. Within the range of endogenous plasma leptin levels, an increase in endozepines signaling would extend leptin signaling to the VMH and the NTS, whereas a reduction in endozepines signaling would lead to a decrease in leptin signaling within the ARC. As demonstrated in this study, a decrease in endozepines signaling is observed during fasting and during diet-induced obesity, as attested by the reduction in DBI mRNA levels. The meal pattern modification and increased satiety observed in responses to endozepines match well with an increased leptin central action (Choi et al., 2008).

Here, we observed that chronic OP treatment reduced hyperglycemia in HFD-fed mice and that insulin stimulated DBI mRNA expression in tanycytes. These results are consistent with the previous observations of a stimulated DBI expression in response to ip insulin administration (Compère et al., 2010) and an OP-induced reduction of hyperglycemia obtained by ip glucose injection (Lanfray et al., 2013). Interestingly, it was recently reported that insulin signaling in astrocytes is required for hypothalamic glucose sensing and that astrocytic insulin receptor ablation reduces glucose-induced activation of hypothalamic neurons and physiological responses (García-Cáceres et al., 2016). Collectively, these results suggested that glial DBI-related products could also contribute to CNS insulin signaling.

Possible mechanisms explaining the improvement of leptin sensitivity by endozeptines

The mechanisms of leptin sensitivity are multifactorial (Balland and Collew., 2015). Previous studies have reported that the overexpression of LepRb in the hypothalamus may contribute to increased leptin sensitivity (Baskin et al., 1998). Here, we observed that acute OP treatment increases LepRb mRNA expression within the hypothalamus. We hypothesize that this small but significant LepRb upregulation contributes, at least in part, to the enhancement of leptin responsiveness observed in response to OP.

We explored a second possible mechanism that could explain the increased leptin sensitivity caused by endozeptines *i.e.* an improvement in leptin transport to the brain. In support of this, diet-induced obesity is also associated with a reduction in leptin transport into the brain, suggesting that impaired leptin transport contributes to leptin resistance (Caro et al., 1996; Schwartz et al., 1996). We showed here that OP treatment restores the ability of circulating leptin to activate STAT3 in the hypothalamus of diet-induced obese mice. The increased access of blood-borne Cy3-leptin to the hypothalamus in OP-treated mice supports the intriguing idea that the main beneficial action of OP in diet-induced obese mice is to restore the transport of circulating leptin into the brain. Tanycytes from the ME were recently shown to express functional LepR and to shuttle blood-borne leptin into the CSF *via* a process that requires ERK signaling (Balland et al., 2014). Our data indicate that OP, in addition to promoting c-Fos and pSTAT3 expression in tanycytes as observed *in vivo*, also triggers ERK signaling in these cells, as observed *in vitro*. Altogether, these data support the view that OP treatment could sensitize the hypothalamus to blood-borne leptin by triggering the shuttling of leptin to the CSF *via* an ERK-dependent tanycytes transcytosis. To further test this hypothesis, we selectively ablated LepR expression in median eminence tanycytes in mice. and observed that OP-induced STAT3

activation in the hypothalamus required LepR expression in tanycytes. Thus, we showed here that ERK-dependent leptin transport by tanycytes, impaired during obesity, can be rescued by endozeptines. Given the strong morphological and phenotypic similarities between tanycytes and tanycytes-like cells of the brainstem, we cannot exclude that a leptin transport through tanycytes-like cells could occur here (Figure 5I), especially since these cells were previously shown to express LepR (Dallaporta et al., 2009). Finally, this study suggests that hypothalamic tanycytes and tanycytes-like cells of the NTS could be among the first cells to be affected by resistance to peripheral leptin in the brain of diet-induced obese mice.

In summary, our data indicate that glial endozeptines expression levels depend on feeding status and are dysregulated during obesity. Chronic endozeptines treatment reverses obesity induced by a high-fat diet which can be explained by two, not mutually exclusive, mechanisms, an upregulation of leptin receptor expression as well as an increased leptin transport through ERK-dependent shuttle in tanycytes. Thus, the present work identifies endozeptines as endogenous peptides able to stimulate peripheral leptin sensitivity and transport to the brain suggesting that the development of endozeptine analogs could hold therapeutic potential in overweight, obesity and their comorbidities.

Materials and Methods

Details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

Animals

Adult male C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Abresle, France). Some mice received a high-fat (60% fat) diet (SSNIFF GmbH, Germany). Some experiments were performed in homozygous male C57BL/6J-*lep^{ob}* mice (*ob/ob*). Experiments were conducted in conformity with EC Council Directive (2010/63/UE) and the French "Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône" (animal housing facility accreditation: N° D13 0556; animal experimentation accreditation N° 13-433).

ODN and OP synthesis

Mouse ODN (H-Gln-Ala-Thr-Val-Gly-Asp-Val-Asn-Thr-Asp-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu-Asp-Leu-Lys-OH; DBI₍₃₃₋₅₀₎) and its C-terminal octapeptide OP (H-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu-Asp-Leu-Lys-OH; DBI₍₄₃₋₅₀₎) were synthesized as previously described (Leprince et al., 1998).

Surgery and intracerebroventricular injection of OP

Cannula implantation was performed as previously described by Gaigé and colleagues (2014). One week post-surgery, mice were icv injected with 10 μ L (2.5 μ L/min) of physiological saline (NaCl 0.9%), OP (0.5 or 2 μ g/day; 0.2 μ g/ μ L) or ODN (2 μ g/day; 0.2 μ g/ μ L) solutions at the beginning of the dark phase.

Food intake measurement

Continuous food intake measurements and meal pattern analysis after acute OP treatment were performed using a previously described feeding station (Gaigé et al., 2014). For food consumption during chronic treatment, non-fasting mice received an icv injection of NaCl (0.9%) or OP (2 μ g) just before lights-off. Food intake (A04 or HFD pellets) was calculated as the difference between the pre-weighed and the remaining food measured with a precision balance (Ohaus Scout Pro).

Telemetry measurements

Locomotor activity was recorded using TA10TA-F20 telemetry probes (Data Sciences International). Mice were anesthetized as previously described. A telemetry probe was implanted ip in each animal. After surgery, mice were housed individually and placed on a receiver RPC-1 (Data Sciences International). Telemetry radio signals emitted by the implanted transmitter were relayed to the data acquisition system *via* a consolidation matrix, converted into locomotor activity data using Dataquest ART 4.2 data acquisition software, and recorded every 5 min.

Glial cell and tanycytes cultures

Primary cultures of NTS glial cells and of ME tanycytes were established from P0-P10 mice pups as described previously (Dallaporta et al., 2009; Balland et al., 2014). After 10-15 days, NTS and ME cultures contained 95-99% of GFAP positive cells and 95-99% of vimentin-positive tanycytes, respectively.

Tissue histology and Oil Red O staining

Oil Red O (ORO) staining of hepatic sections was performed as previously described (Mehlem et al., 2013).

Oral glucose tolerance test and glycemia measurement

Glycemia measurements were carried out during the dark phase on mice having free access to food. Blood samples were collected from tail vein blood and glucose detection was performed as previously described (Gaigé et al., 2014). For oral glucose tolerance test, mice were fasted for 12 h and a bolus of glucose (1.5 g/kg) was administered *per os*.

Tissue preparation and immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on free-floating sections (40 μm thick). Immunohistochemistry conditions and antibodies used for labeling and cellular phenotyping are described in Table S2. Non-specific binding was assessed on alternate slices that were treated identically but in which the primary antibody was omitted. ODN antibody solution (1/400) pre-adsorbed overnight with 10^{-6} M ODN failed to reveal specific labeling. c-Fos revelation was performed as described by Girardet and colleagues (2011). Fluorescent antibody- and DAB-processed slides were air dried and cover-slipped with an aqueous glycerol-based medium (Fluoprep; Dako, CA, USA).

Image acquisition and data processing

Fluorescent images were acquired by confocal microscopy (Zeiss LSM 710). In double-labeling experiments, images were sequentially acquired. All images were further processed in Adobe Photoshop 6.0, only contrast and brightness were adjusted. Photomicrographs of c-Fos labeling

were taken on a Nikon Eclipse E600 light microscope using a DXM 1200 Camera equipped with ACT-1 software. c-Fos-positive nuclei were counted using NIH Image J software. Labeling and counting were performed on every fourth coronal section throughout the rostro-caudal axis from the brainstem to the hypothalamus.

Construction of the three-dimensional models

The three-dimensional models of the brainstem and the hypothalamus were constructed using Free-D 3D reconstruction software (Andrey and Maurin, 2005).

pERK western blotting

pERK detection was performed as previously described by Baland et al (2014) using a rabbit anti-phospho-pERK primary antibody (1:1000; #9101, Cell Signaling Technology).

Statistical analysis

Data are represented as means \pm S.E.M. One-way ANOVA was performed for comparisons between mice treated with different conditions. A Mann-Whitney U test was used for post hoc analysis. A repeated-measure ANOVA was performed in Figures 1D, E, G; 2B, E, G, H; 3C, H-J.

Acknowledgments: This work was supported by funding obtained from the Aix-Marseille Université, the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale de la Recherche grant Glioshuttle4Metabolim (ANR-15-CE14-0025 to V.P.) and EZICROM (ANR-16-CE14 to JL, VP and JDT). The authors acknowledge Dr. S. Rasika for the editing of the manuscript, Coraline Airault, Catherine Tardivel and Elise Courvoisier for their support in qPCR experiments (plateforme Analyse et Valorisation de la Biodiversité, Marseille). We also thank the Aix-Marseille University Microscopy Center CP2M for access to their confocal microscopy equipment and Kevin Poirot for his significant contribution to 3D reconstructions and liver and adipose tissue histology.

Authors contributions

FG, MD, MD, CP, GR, SG, BL, MD and JL performed experiments. JL contributed to ODN and OP synthesis. FM, AJ, MCT, BL, SG, MD, JL VP, JDT designed the study and analyzed data. BL, VP and JDT wrote the paper.

References

Alho, H., Freneau, R.T. Jr., Tiedge, H., Wilcox, J., Bovolin, P., Brosius, J., Roberts, J.L., Costa, E. (1988). Diazepam binding inhibitor gene expression: location in brain and peripheral tissues of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7018-7022.

Andrey, P., Maurin, Y. (2005). Free-D: an integrated environment for three-dimensional reconstruction from serial sections. *J. Neurosci. Methods* 145, 233-244.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728-739.

Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., et al. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 19, 293-301.

Balland, E., Cowley, M.A. (2015). New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front. Neuroendocrinol.* 39, 59-65.

Barrachina, M.D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J.Y., Taché, Y. (1997). Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10455-10460.

Baskin, D.G., Seeley, R.J., Kuijper, J.L., Lok, S., Weigle, D.S., Erickson, J.C., Palmiter, R.D., Schwartz, M.W. (1998). Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes* 47, 538-543.

Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859.

Bonnet, M.S., Pecchi, E., Trouslard, J., Jean, A., Dallaporta, M., Troadec, J.D. (2009). Central nesfatin-1-expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *J. Neuroinflammation* 6, 27.

Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108-110.

Buckman, L.B., Thompson, M.M., Moreno, H.N., Ellacott, K.L. (2013). Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. *J. Comp. Neurol.* 521, 1322-1333.

Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549.

Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., Considine, R.V. (1996). Decreased

cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161. 1:

Choi Y.H., Li C., Hartzell D.L., Little D.E., Della-Fera M.A., Baile C.A. (2008) ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats. *Behav Brain Res.* 188(1):100-8.

Compère V, Lanfray D, Castel H, Morin F, Leprince J, Dureuil B, Vaudry H, Pelletier G, Tonon MC (2010) Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells. *J Mol Endocrinol.* 44, 295-9.

Compère, V.1., Li, S., Leprince, J., Tonon, M.C., Vaudry, H., Pelletier, G. (2003). Effect of intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNAs in rat hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 15, 197-203.

Dallaporta, M., Pecchi, E., Pio, J., Jean, A., Horner, K.C., Troadec, J.D. (2009). Expression of leptin receptor by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *J. Neuroendocrinol.* 21, 57-67.

Dallaporta, M., Bonnet, M.S., Horner, K., Trouslard, J., Jean, A., Troadec, J.D. (2010) Glial cells of the nucleus tractus solitarius as partners of the dorsal hindbrain regulation of energy balance: a proposal for a working hypothesis. *Brain Res.* 1350, 35-42.

De Mateos-Verchere, J.G., Leprince, J., Tonon, M.C., Vaudry, H., Costentin, J. (2001). The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 414, 225-231.

do Rego, J.C., Orta, M.H., Leprince, J., Tonon, M.C., Vaudry, H., Costentin, J. (2007). Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology* 32, 1641-1648.

Farzampour, Z., Reimer, R.J., Huguenard, J. (2015). Endozepines. *Adv. Pharmacol.* 72, 147-164.

Friedman, J.M. (2015). Leptin 20th Anniversary Issue 20 years of research on leptin: Physiology, pathophysiology and therapeutics. *Life Sci.* 140, 1-2.

Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Granado, M., de Ceballos, M.L., Sánchez-Garrido, M.Á., Sarman, B., Liu, Z.W., Dietrich, M.O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizón, P. et al. (2012). Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J. Clin. Invest.* 122, 39003913.

Gaigé, S., Djelloul, M., Tardivel, C., Airault, C., Félix, B., Jean, A., Lebrun, B., Troadec, J.D., Dallaporta, M. (2014). Modification of energy balance induced by the food contaminant T-2 toxin: a multimodal gut-to-brain connection. *Brain Behav. Immun.* 37, 54-72.

- Gandolfo, P., Patte, C., Leprince, J., Thoumas, J.-L., Vaudry, H., Tonon, M.-C. (1997), The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca^{2+} in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 322, 275-281.
- Gao, Q., Wolfgang, M.J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T.L., Shulman, G.I., Fu, X.Y. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4661-4666.
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L.M., Barrios, V., Horvath, T., Argente, J., Chowen, J.A. (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* 152, 1809-1818.
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Argente, J., Chowen, J.A. (2012). Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Mol. Metab.* 1, 37-46.
- García-Cáceres, C., Yi, C.X., Tschöp, M.H. (2013). Hypothalamic astrocytes in obesity. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 42, 57-66.
- García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi CX, Le Thuc O, Szigeti-Buck K, Cai W, Meyer CW, Pfluger PT, Fernandez AM, Luquet S, Woods SC, Torres-Alemán I, Kahn CR, Götz M, Horvath TL, Tschöp MH (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell.* 166, 867-880.
- Girardet, C., Bonnet, M.S., Jdir, R., Sadoud, M., Thirion, S., Tardivel, C., Roux, J., Lebrun, B., Wanaverbecq, N., Mounien, L., et al. (2011). The food-contaminant deoxynivalenol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. *PLoS One* 6, e26134.
- Grayson, B.E., Levasseur, P.R., Williams, S.M., Smith, M.S., Marks, D.L., Grove, K.L. (2010) Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology* 151, 1622-1632.
- Guillebaud, F., Girardet, C., Abysique, A., Gaigé, S., Barbouche, R., Verneuil, J., Jean, A., Leprince, J., Tonon, M.C., Dallaporta, M., et al. (2017). Glial endozepines inhibit feeding-related autonomic functions by acting at the brainstem level. *Front. Neurosci.* 11, 308.
- Halpern, Z., Elinav, E., Gertler, A. (2011). Development and characterization of high affinity leptins and leptin antagonists. *J. Biol. Chem.* 286, 4429-4442.
- Horvath, T.L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J.A., Perez-Tilve, D., et al. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14875-14880.
- Katsurada, K., Maejima, Y., Nakata, M., Kodaira, M., Suyama, S., Iwasaki, Y., Kario, K., Yada, T. (2014). Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 276-281.

Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Szigeti-Buck, K., et al. (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17, 908-910.

Lamacz, M., Tonon, M.C., Smih-Rouet, F., Patte, C., Gasque, P., Fontaine, M., Vaudry, H. (1996). The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Mol. Brain. Res.* 37, 290-296.

Lanfray, D., Arthaud, S., Ouellet, J., Compère, V., Do Rego, J.L., Leprince, J., Lefranc, B., Castel, H., Bouchard, C., Monge-Roffarello, B., et al. (2013). Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes* 62, 801-810.

Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Bolland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., et al. (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* 17, 607-617.

Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B. (2013). Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 521, 3389-3405.

Leprince, J., Gandolfo, P., Thoumas, J.L., Patte, C., Fauchère, J.L., Vaudry, H., Tonon, M.C. (1998). Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J. Med. Chem.* 41, 4433-4438.

Maniscalco, J.W., Rinaman, L. (2014). Systemic leptin dose-dependently increases STAT3 phosphorylation within hypothalamic and hindbrain nuclei. *Am. J. Physiol.* 306, R576-585.

Matsuda, K., Wada, K., Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S.I., Uchiyama, M., Leprince, J., Tonon, M.C., Vaudry, H. (2007) Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. *Neuroscience* 150, 425-432.

Myers, M.G., Cowley, M.A., Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 537-556.

Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., Eguchi, H., Yamamoto, M., Imaki, T., Hashimoto, K., et al. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443, 709-712.

Pecchi, E., Dallaporta, M., Charrier, C., Pio, J., Jean, A., Moyse, E., Troadec, J.D. (2007). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive radial-like cells are present in the vicinity of proliferative progenitors in the nucleus tractus solitarius of adult rat. *J. Comp. Neurol.* 501, 353-368.

Perea, G., Sur, M., Araque, A. (2014). Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 378.

Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., Porte, D. Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2, 589-593.

Shimizu, H., Ohsaki, A., Oh-I, S., Okada, S., Mori, M. (2009). A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides* 30, 995-998.

Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 153-162.

Tonon, M.C., Désy, L., Nicolas, P., Vaudry, H., Pelletier, G. (1990). Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 15, 17-24.

van Swieten, M.M., Pandit, R., Adan, R.A., van der Plasse, G. (2014). The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 61-62, 207-220.

Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J.E., Lin, S., Bao, J., Wu, P., Luo, M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* 33, 3624-3632.

Figure 1. TIF

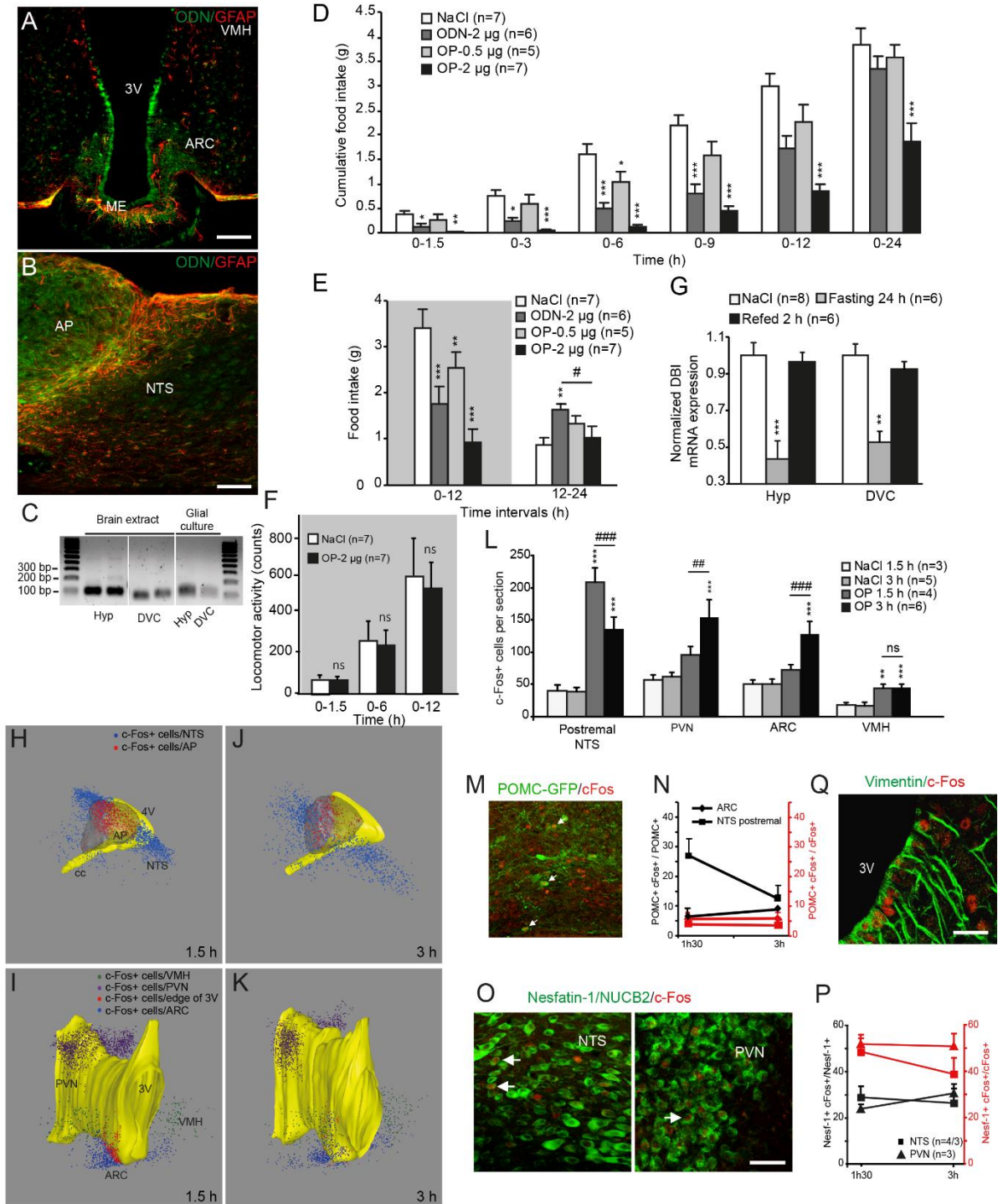


Figure 2. TIF

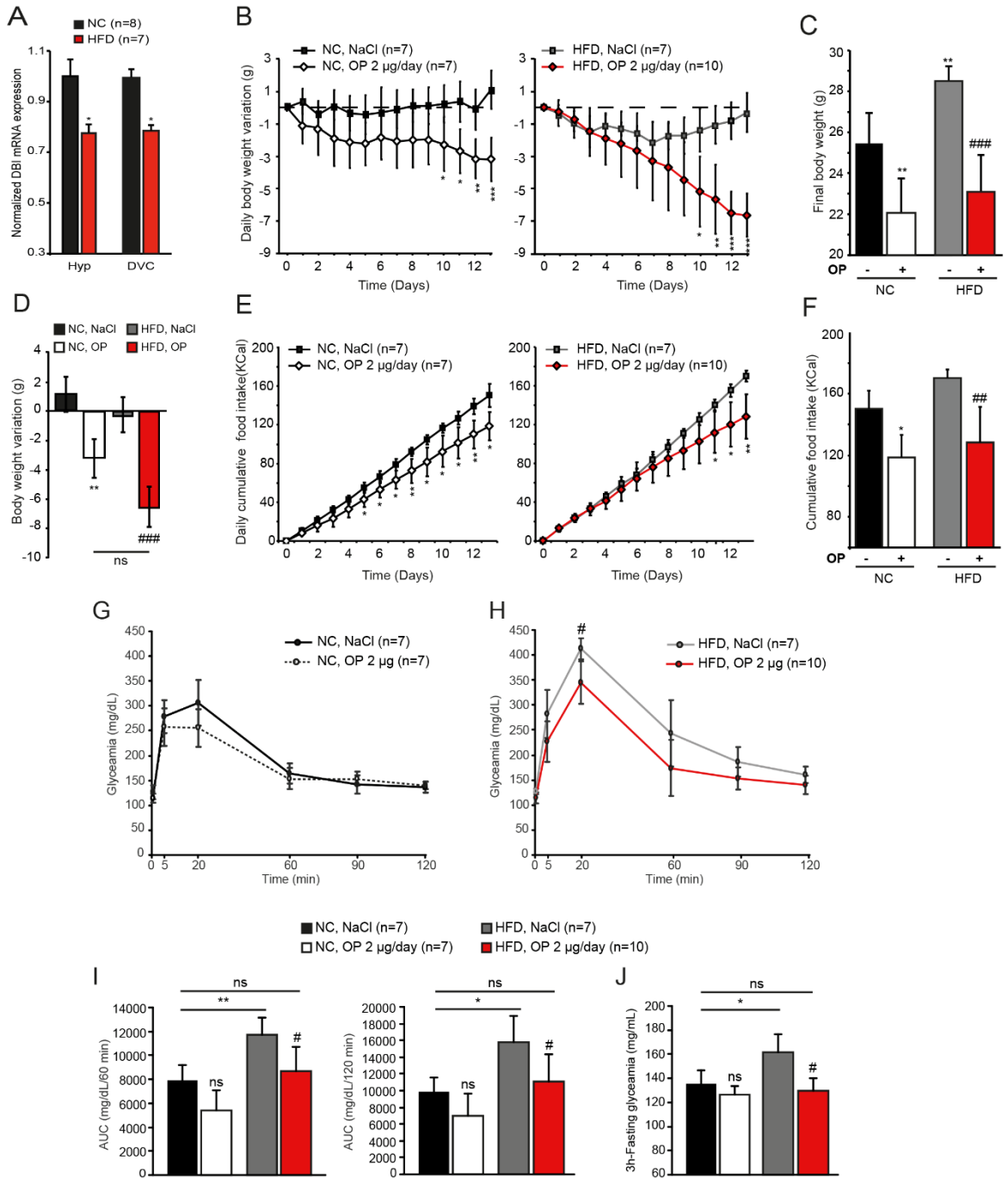


Figure 3. TIF

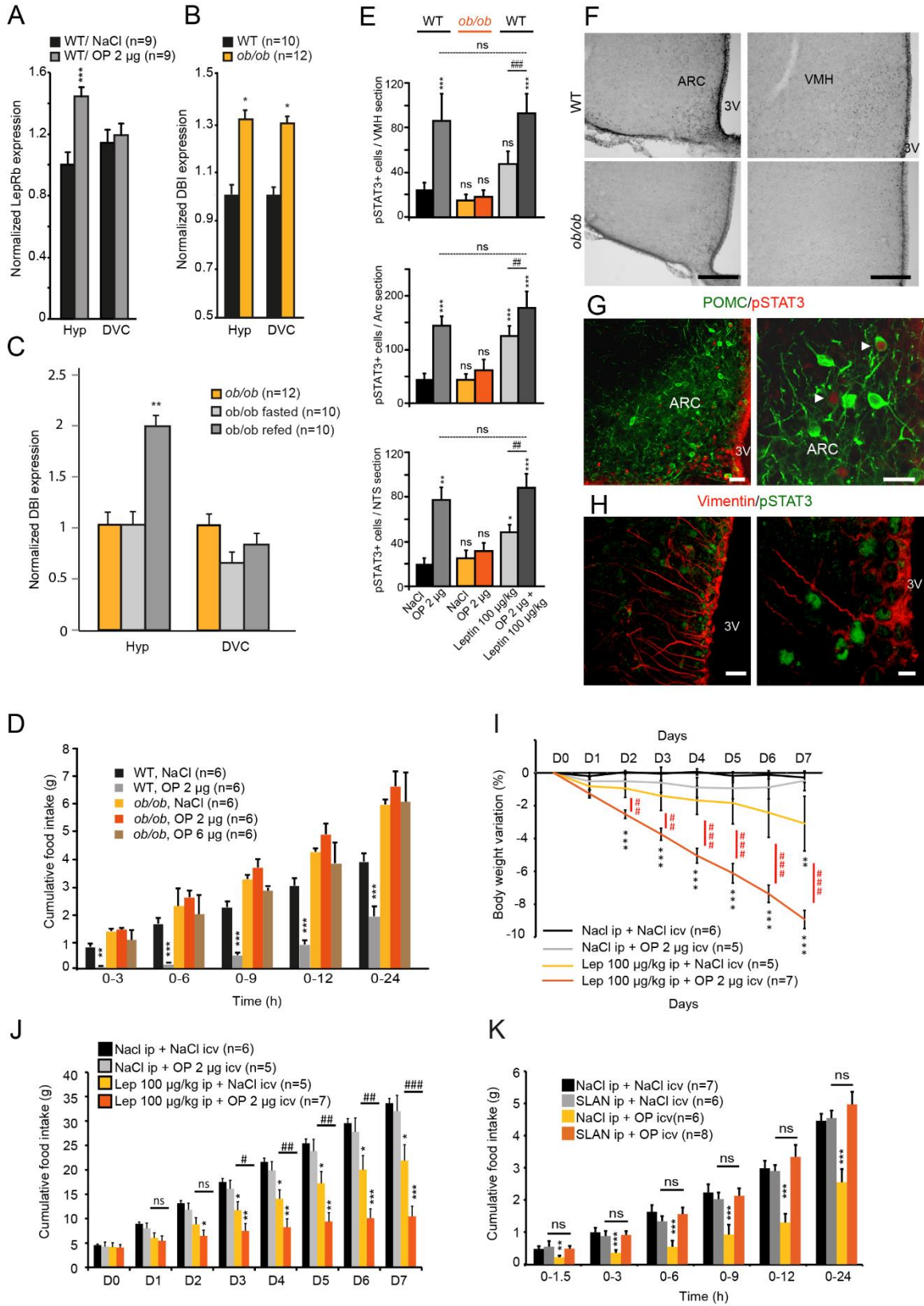


Figure 4. TIF

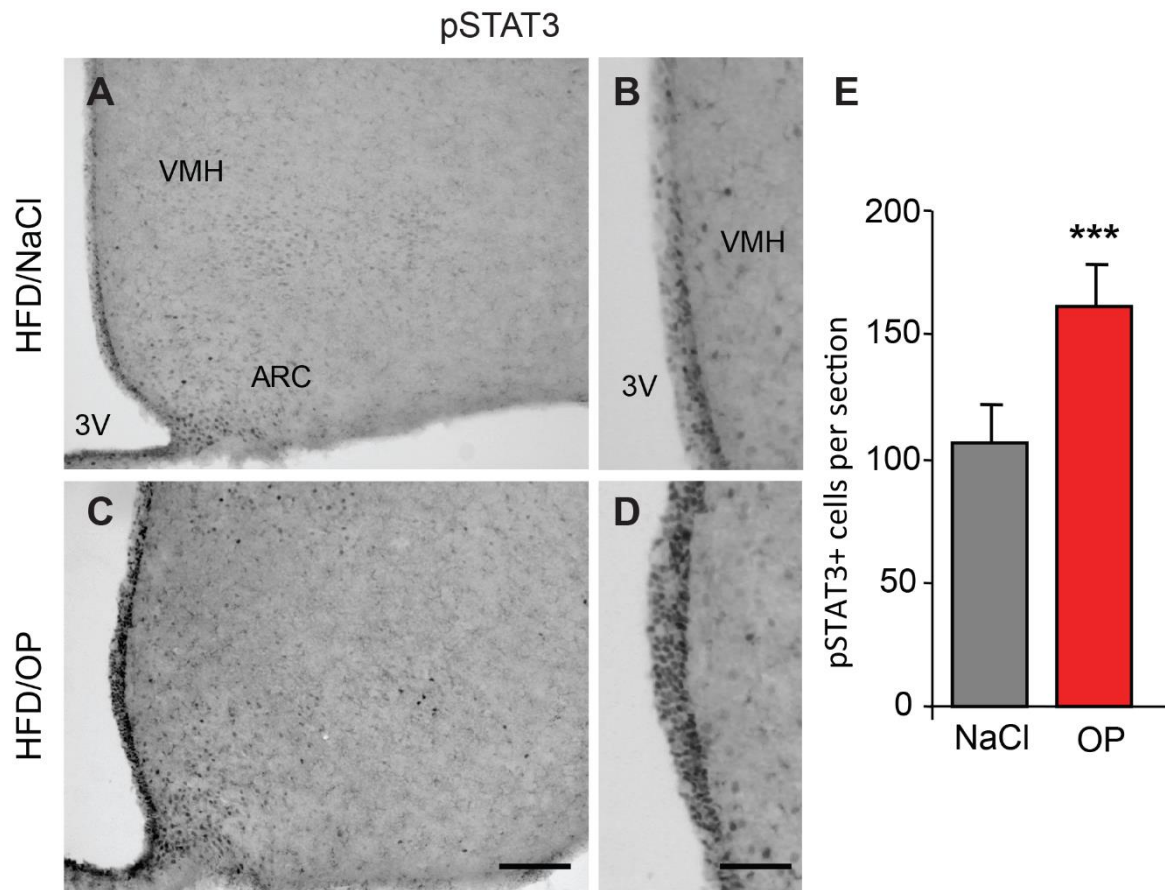


Figure 5. TIF

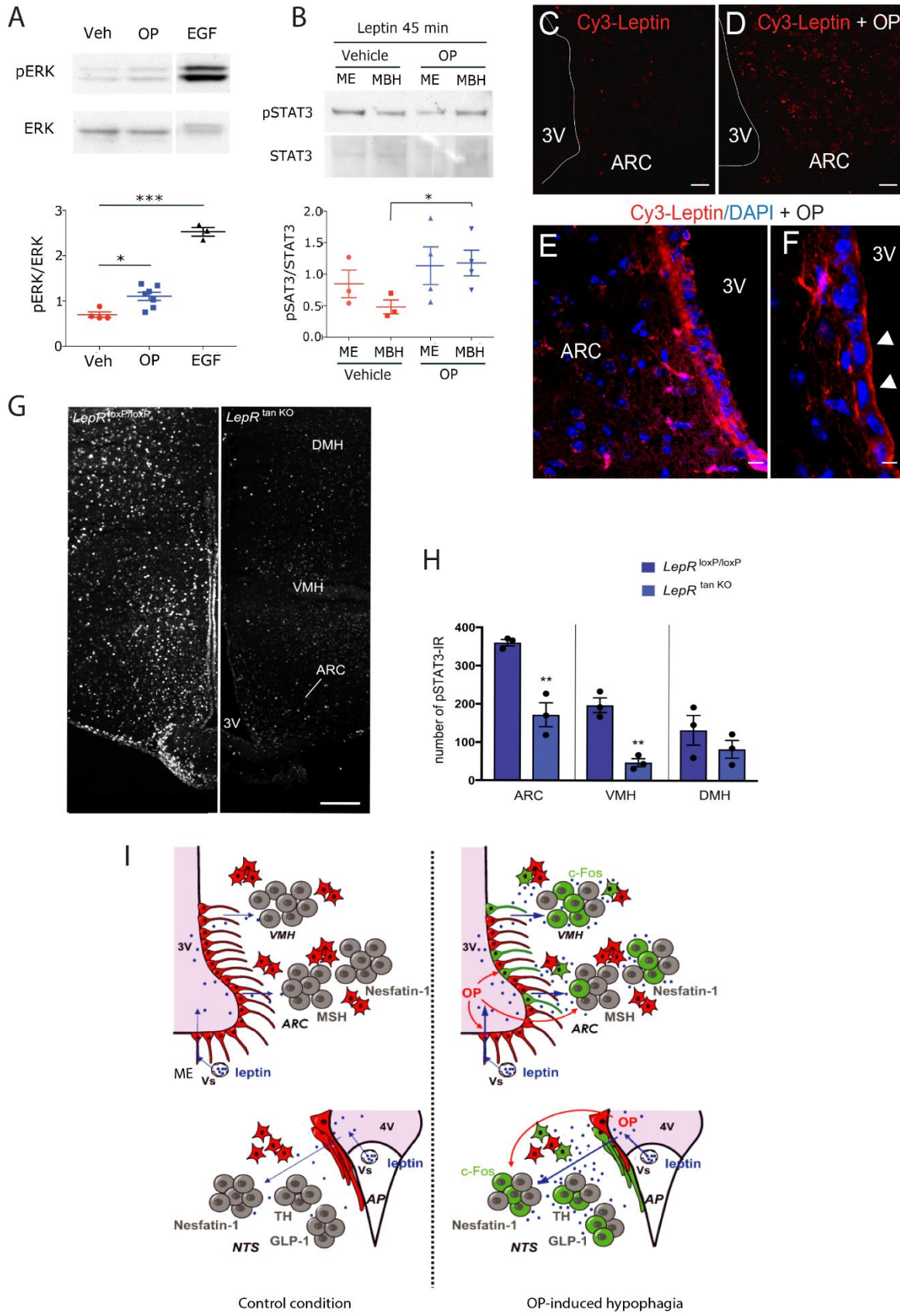


Figure legends

Figure 1: Glial endoepines affect food intake pattern through the activation of anorexigenic pathways.

(A-B) Representative photomicrographs of ODN (green) and GFAP (red) double-labeling performed on mouse hypothalamic (A) and brainstem (B) coronal sections. 3V, third ventricle; AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; ME, median eminence; NTS, nucleus of the solitary tract. Scale bar: 100 μm .

(C) RT-PCR amplification of DBI mRNA from either hypothalamus (Hyp) or dorsal vagal complex (DVC) extracts or cultured glial cells from each structure.

(D-E) Cumulative food intake measured over a 24 h period in mice administered NaCl, ODN (2 μg) or OP (0.5 and 2 μg). In E, the dark period is represented by a shaded box. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ significantly different from NaCl-treated mice.

(F) Total locomotor activity measured during the dark period in mice administered icv NaCl (white bars) or OP (2 μg ; black bars). ns: no significant difference between NaCl and OP-treated mice.

(G) Quantification of DBI transcript expression within the hypothalamus and DVC of control (white bars), 24 h fasting (grey bars) and 2 h refed (black bars) mice. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, significantly different from control mice.

(H-K) 3D reconstructions of c-Fos positive cells in the DVC (H, J) and hypothalamus (I, K) 1.5 h (H, I) and 3 h (J, K) after OP (2 μg) treatment. The boundaries of the 3rd and 4th ventricles appear in yellow while the AP limits are drawn in grey. ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus of the solitary tract; PVN, paraventricular nucleus; VMH, ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle. Scale bar: 100 μm .

(L) Quantification of the number of c-Fos-immunoreactive nuclei observed within the brainstem and hypothalamic structures 1.5 and 3 h after treatment with either NaCl or OP (2 μg). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from NaCl-treated mice. □□ $P < 0.01$, □□□ $P < 0.001$, significant difference between 1.5 and 3 h post-treatment, ns non significantly different between 1.5 and 3 h post-treatment. Scale bar: 100 μm .

(M) Representative photomicrographs of POMC (green) and c-Fos (red) double-labeling performed on brainstem coronal sections of mice treated with OP (2 μg). Note the weak proportion of double-labeled cells (arrow). Scale bar: 100 μm .

(N) Percentage of POMC neurons expressing c-Fos 1.5 and 3 h after icv OP (2 µg) treatment (black plots) and proportion of POMC/c-Fos+ neurons in regard to the entire c-Fos+ population (red plots). ARC, arcuate nucleus; NTS, nucleus of the solitary tract.

(O) Representative photomicrographs of nesfatin-1/NUCB2 (green) and c-Fos (red) double-labeling performed on brainstem and hypothalamic coronal sections of mice treated with OP (2 µg icv). NTS, nucleus of the solitary tract; PVN, paraventricular nucleus. Scale bar: 100 µm.

(P) Percentage of neuronal nesfatin-1/NUCB2 (Nesf) found activated 1.5 and 3h after OP (2 µg) treatment (black plots) and proportion of these neuronal phenotype in regard to the entire c-Fos+ population (red plots). NTS, nucleus of the solitary tract; PVN, paraventricular nucleus.

(Q) c-Fos labeling (red) was also found associated with vimentin+ tanycytes (green). 3V, third ventricle. Scale bars: 100 µm.

Figure 2: Effect of chronic central OP injection on DBI expression, body weight, food intake and glucose tolerance in normal chow and high fat diet-fed mice.

(A) Quantification of DBI mRNA expression within the hypothalamus and DVC of normal chow- (NC, black bars) and high fat diet-fed mice (HFD, red bars). * $P < 0.05$, significantly different from control NC-fed mice.

(B-D) Daily body weight variation (B, difference from initial body weight) measured from Day 1 to 13 after icv injection of either saline or OP (2 µg/day) in NC- (left panel) or HFD-fed mice (right panel). (C-D) Final body weight (C) and total body weight variation (D) measured on day 13 after icv injection of NaCl or OP (2 µg/day) in NC- or HFD-fed mice. In B: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from respective NaCl-treated mice. In C and D: ** $P < 0.01$, significantly different from NC/NaCl-treated mice; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, significantly different from HFD/NaCl-treated mice. ns, non-significant.

(E-F) Daily cumulative (E) and total (F) food intake measured from day 1 to 13 after icv injection of either NaCl or OP (2 µg/mouse/day) in NC- (left panel) and HFD-fed mice (right panel). In E: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from respective NaCl-treated mice. In F: * $P < 0.05$, significantly different from NC/NaCl-treated mice; ## $P < 0.01$ significantly different from HFD/NaCl-treated mice.

(G-J) Time course changes in blood glucose level after *per os* glucose administration (1.5 g/kg) measured at day 13 after icv injection of either NaCl or OP (2 µg/mouse/day) in NC- (G) or HFD-fed mice (H). (I) Quantification of area under the curves (AUC) measured during 60 (left panel) and 120 min (right panel) after *per os* glucose administration. (J) Glycemia measured 3 h after fasting. **P* < 0.05 and ****P* < 0.01, significantly different from NC/NaCl mice. #*P* < 0.05, significantly different from HFD/NaCl mice. ns, not significantly different from NC/NaCl-treated mice.

Figure 3: OP fails to induce pSTAT3 and hypophagia in *ob/ob* mice but potentiates the effects of a low leptin dose.

(A) Leptin receptor (*LepRb*) mRNA expression within the hypothalamus and DVC 3 h after NaCl or OP (2 µg icv) administration. ****P* < 0.001, significantly different from NaCl condition. (B) DBI mRNA expression within the hypothalamus and DVC of WT or *ob/ob* mice. **P* < 0.05, significantly different from WT mice.

(C) DBI mRNA expression within the hypothalamus and DVC of control, 24 h fasting and 2 h refed *ob/ob* mice. **P* < 0.05, significantly different from control condition.

(D) Cumulative food intake over a 24 h period in WT and *ob/ob* mice administered either by NaCl, OP 2 µg or OP 6 µg. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, significantly different from NaCl condition.

(E) Quantification of pSTAT3-positive cells within the VMH, ARC and NTS after NaCl, OP (2 µg), leptin (100 µg/kg) and OP (2 µg, icv) + leptin (100 µg/kg, ip) administration in WT mice and after NaCl or OP administration in *ob/ob* mice. It can be noticed that the leptin concentration used here failed to significantly increase pSTAT3 within the VMH. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, significantly different from NaCl-treated mice. ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001, significantly different from leptin-treated mice. ns, non-significant.

(F) Representative photomicrographs of pSTAT3 labeling in the ARC and VMH of WT (upper panels) or *ob/ob* (lower panels) mice treated with OP (2 µg). ARC, arcuate nucleus; VMH: ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars: 100 µm.

(G) POMC (green) and pSTAT3 (red) double-immunolabeling in the ARC of WT mice treated with OP. ARC, arcuate nucleus. Scale bars: 20 µm.

(H) Vimentin (red) and pSTAT3 (green) double-immunolabeling in the ARC of WT mice treated with OP. 3V, third ventricle. Scale bars: 25 μm (left panel) and 5 μm (right panel).

(I-J) Daily food intake (H) and daily body weight variation (I) in *ob/ob* mice treated with ip NaCl or leptin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and either NaCl or OP (2 μg) icv. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ significantly different from control condition. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ significant difference between leptin alone and leptin + OP condition.

(K) Cumulative food intake measured over a 24 h period in mice pre-treated with either ip NaCl or SLAN (20 μg) and then administered with NaCl or OP 2 μg icv. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ significantly different from NaCl-treated mice. ns: no significant difference between SLAN + NaCl and SLAN + OP treated mice.

Figure 4: OP stimulates pSTAT3 in ARC nucleus of HFD mice

(A-D) Representative photomicrographs of pSTAT3 labeling in the ARC and VMH of HFD mice treated with NaCl (A-B) or OP (2 μg , C-D). B, D: High magnification of pSTAT3 labeling observed in the wall of the 3rd ventricle. ARC, arcuate nucleus; VMH: ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars: 250 μm in A, C; 100 μm in B, D.

(B) Quantification of pSTAT3-positive cells within the ARC after NaCl or OP (2 μg) administration in HFD mice. *** $P < 0.001$, significantly different from NaCl-treated mice.

Figure 5: Effect of central OP injection on leptin transport and hypothetical representation of the mechanisms leading to OP-induced reduction of food intake.

(A) Representative western blot and quantitative comparison of ERK activation in median eminence tanycytes *in vitro* after treatment with NaCl, OP treatment icv. OP (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or EGF (20ng/mL) in. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from control conditions.

(B) Representative western blot and quantitative comparison of pSTAT3 in the median eminence (ME) and mediobasal hypothalamus (MBH) of diet-induced obese mice after ip leptin administration and NaCl or OP treatment icv. * $P < 0.05$, significantly different from control conditions.

(C-F) Localization of Cy3-conjugated leptin in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) 30 min after its ip injection in saline-(C) and OP-treated mice (D-F). Note the higher presence of Cy3-leptin internalization in putative tanycytes lining the 3rd ventricle (3V) in OP-treated mouse (E and F, arrows in F). Scale bars: 10 μm in C, D; 5 μm in E, 15 μm in F.

(G) Representative photomicrographs of OP-induced pSTAT3 labeling in the ARC, VMH and DMH of control animals ($\text{LepR}^{\text{loxP/loxP}}$; left panel) or of mice exhibiting a specific LepR deletion within tanycytes ($\text{LepR}^{\text{tanKO}}$; right panel) ARC, arcuate nucleus; VMH: ventromedial hypothalamus; DMH: dorsomedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars: **100 μm** .

(H) Quantification of pSTAT3 immunoreactivity in response to OP within hypothalamic nuclei of control animals ($\text{LepR}^{\text{loxP/loxP}}$) and mice lacking LepR within tanycytes ($\text{LepR}^{\text{tanKO}}$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from control conditions.

(I) Tanycytes and tanycytes-like cells lining the 3rd (3V) and 4th (4V) ventricles respectively constitute a diffusion barrier between the fenestrated blood vessels located within the median eminence (ME) and the area postrema (AP), and the cerebrospinal fluid (CSF). Moreover, they participate in the transport of leptin from the blood stream to the CSF. In basal conditions (left panel), leptin (blue dots) is present at low concentration within the CSF (pink area) and thereby its diffusion within the cerebral parenchyma is limited. Upon OP icv injections (right panel), tanycytes and tanycytes-like activation may lead to a strong increase in the transportation of leptin to CSF resulting in a larger diffusion of this hormone in adjacent nuclei (blue arrows) *i.e.* arcuate nucleus (ARC), ventromedial hypothalamus (VMH) and nucleus of the solitary tract (NTS). In turn, within these structures, leptin-sensitive circuitries are strongly recruited and may support that OP-induced reduction of food intake. Upper panel, frontal view of hypothalamus; lower panel, dorsal view of DVC; Red cells, ODN^+ cells; green cells, OP-activated cells (c-Fos⁺) ODN^+ and ODN^- cells; AP, area postrema; GLP-1, glucagon like peptide-1; MSH, melanocortin stimulating hormone; TH, tyrosine hydroxylase; Vs, blood vessels.

Supplemental Experimental Procedures

Animals

Adult male C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Abresle, France). For acute OP injection and immunohistochemical studies, adult male C57BL/6J mice (12 to 15 weeks old) were housed in standard cages, maintained in a controlled environment (12 hours/12 hours light-dark cycle, 22°C and 40-50% humidity) with free access to water and food (A04 pellets, SAFE, Augy, France). Electrophysiological experiments and neuronal phenotyping were performed using male POMC-Tau-Topaz green fluorescent protein (GFP) transgenic mice (Pinto et al, 2004). For chronic OP injection, adult male C57BL/6J mice (5 weeks old) were divided into 2 groups: Group 1 was fed with NC (A04 pellets, SAFE, Augy, France), Group 2 was given a HFD (45% fat, 13.2% protein and 41.8% carbohydrates) purchased from SSNIFF GmbH (Germany). Body weight and food intake were measured every week. After 10 weeks, mice underwent the implantation of a cannula in the lateral ventricle. Some experiments were performed in homozygous male C57BL/6J-*lep^{ob}* mice (*ob/ob*), which are obese, insulin resistant and progressively diabetic (type-2), and their age-matched lean littermates (+/+) were used as healthy controls.

Slice preparation and electrophysiology

Coronal slices containing the ARC (200 µm thick) were cut with a Leica VT1000S in ice-cold (0-4 °C) low calcium/high magnesium artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 75 NaCl, 45 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 3 KCl, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 15 glucose, 31 sucrose, 2 ascorbic acid, 2 Na-pyruvate, 3 myo-inositol, pH 7.3-7.4, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Slices were then transferred in a submerged recovery chamber filled with a standard oxygenated aCSF at room temperature containing (in mM): 115 NaCl, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 15 glucose, 2 ascorbic acid, 2 Na-pyruvate, 3 myo-inositol, pH 7.3-7.4. Slices were allowed to equilibrate at least 1 h at room temperature before starting recordings. GFP-expressing POMC neurons were identified *via* epifluorescence using a GFP filter set (470 nm excitation with a pE-100 CoolLED system, Scientifica) and patched under oblique infrared illumination (SsliceScope, Scientifica). Patch electrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (resistance of 4-5 MΩ) and filled with an internal solution supplemented with 10 µM AlexaFluor 594 (Invitrogen). For voltage-clamp recordings of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSCs), the internal solution in the patch-electrode contained (in mM): 135 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP,

pH 7.35 (adjusted with KOH). IPSCs were recorded at -60 mV in the presence of kynurenic acid (2 mM, Sigma), a selective antagonist of ionotropic glutamate receptors. For current-clamp experiments, electrodes were filled with a solution containing (in mM): 120 mM K-gluconate, 10 KCl, 8 NaCl, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 2 Mg-ATP, 0.6 Na-GTP, pH 7.35 (adjusted with KOH). OP solution 100 nM was made up in standard aCSF and bath applied for 5-7 minutes. Data were acquired with an Axopatch 200A amplifier (Molecular Devices), low-pass filtered at 2 kHz and digitized at 10-20 kHz using a Digidata 1322A interface driven by pClamp 10.5 software (Molecular Devices). The detection and analysis of spontaneous IPSCs were achieved by the Mini Analysis software (version 6.0.3, Synaptosoft). The frequency and amplitude of synaptic events were determined 4-5 minutes after the beginning of OP perfusion. Statistical analysis was performed with the non-parametric paired sample Wilcoxon Signed Rank test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Tissue collection

Mice were anaesthetized using ip injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) and sacrificed by decapitation. The hypothalamus, dorsal vagal complex (DVC), liver, gonadic adipose tissue (GAT) and retroperitoneal adipose tissue (RPAT) were collected, rinsed in saline solution (NaCl 0.9%), snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. Liver and adipose tissues were weighed and minced into small pieces (~1 mm³) before freezing. Liver and adipose tissues samples were also fixed by immersion in paraformaldehyde (PFA) 4% overnight.

Oral glucose tolerance test and glycaemia measurement

Blood samples were collected from tail vein. A section of tail vein was pierced by a needle, and blood was directly applied to a strip to allow glucose detection with a glucose meter (Accu-Chek Performa nano, Roche Diagnostics Corp.). OP treatment was performed as described in Materials and Methods section and glycaemia measures were achieved 24 h after the last OP injection. For oral glucose tolerance test, fasted mice (12 h) received a bolus of glucose (1.5 g/kg). At 0, 5, 20, 60, 90, and 120 min after glucose administration, blood samples were collected and glycaemia was determined as described above.

Real time PCR analysis

Animals used for RT-PCR analysis were sacrificed at the end of the treatment period. mRNA extraction and RT were made as described previously (Girardet et al, 2011). Briefly, total RNAs were extracted from frozen organ using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. RT was realized using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase in the presence of random hexamer primers (Promega). Gene expression analysis by real time PCR was performed using the LightCycler® 480 System (Roche Applied Science). The equivalent of 40 ng initial RNAs were subjected to PCR amplification in a 10 µL final volume using specific primers 0.25 µM (Table S3) and KAPA SYBR® FAST Master Mix (2X) optimized for Roche LightCycler® 480 (CliniSciences, KAPABiosystems). The generation of specific PCR products was confirmed by melting-curve analysis. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) was used as internal reference gene.

Tissue histology and Oil Red O staining

Oil Red O (ORO) staining of hepatic sections was performed as previously described (Mehlem et al, 2013). Briefly, 10 µm thick sections were prepared from fixed liver samples with a cryostat (Leica CM3050, France). ORO stock solution was prepared by dissolving 2.5 g ORO powder (Sigma-Aldrich) in 400 mL isopropanol. Sections were then incubated 6 min in ORO working solution (1.5 parts of ORO stock solution to one part of distilled water) and then washed three times in distilled water. RPAT were cut on a cryostat (Leica CM3050) and rinsed in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). Four microphotographs (x20) per animal were acquired using a Nikon Eclipse E600 light microscope coupled to a DXM 1200 Camera and ACT-1 software. The number of inclusions per surface unity (mm²) or the number of adipocytes per surface unity (mm²) was counted for each condition using the NIH Image J software.

- Girardet C et al (2011) The food-contaminant deoxynivalenol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. *PLoS One* 6:e26134.
- Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A (2013) Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc* 8:1149-54.
- Gaigé S, Djelloul M, Tardivel C, Airault C, Félix B, Jean A, Lebrun B, Troadec JD, Dallaporta M (2014) Modification of energy balance induced by the food contaminant T-2 toxin: a multimodal gut-to-brain connection. *Brain Behav Immun* 37:54-72

Figure S1

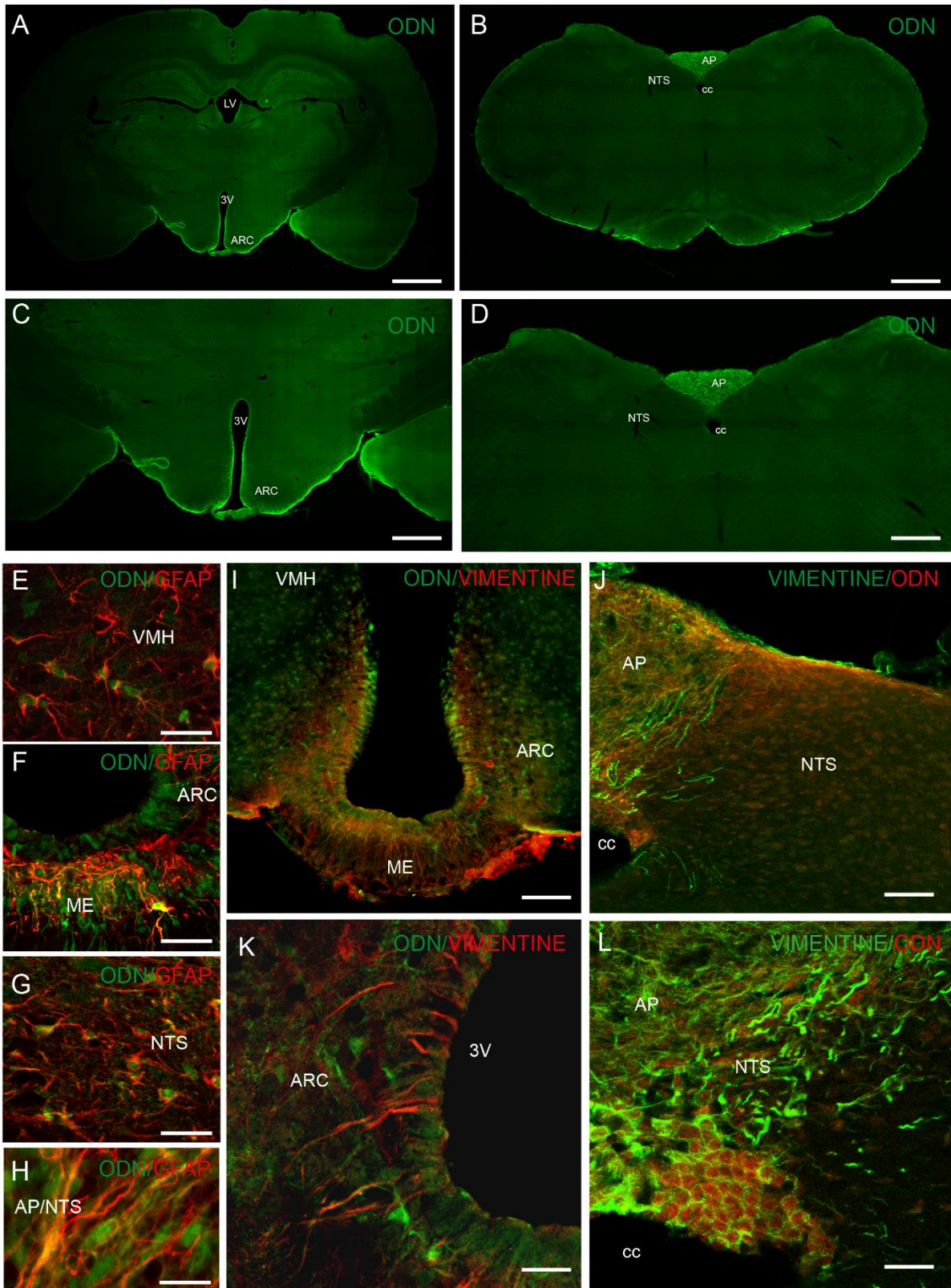


Fig. S2

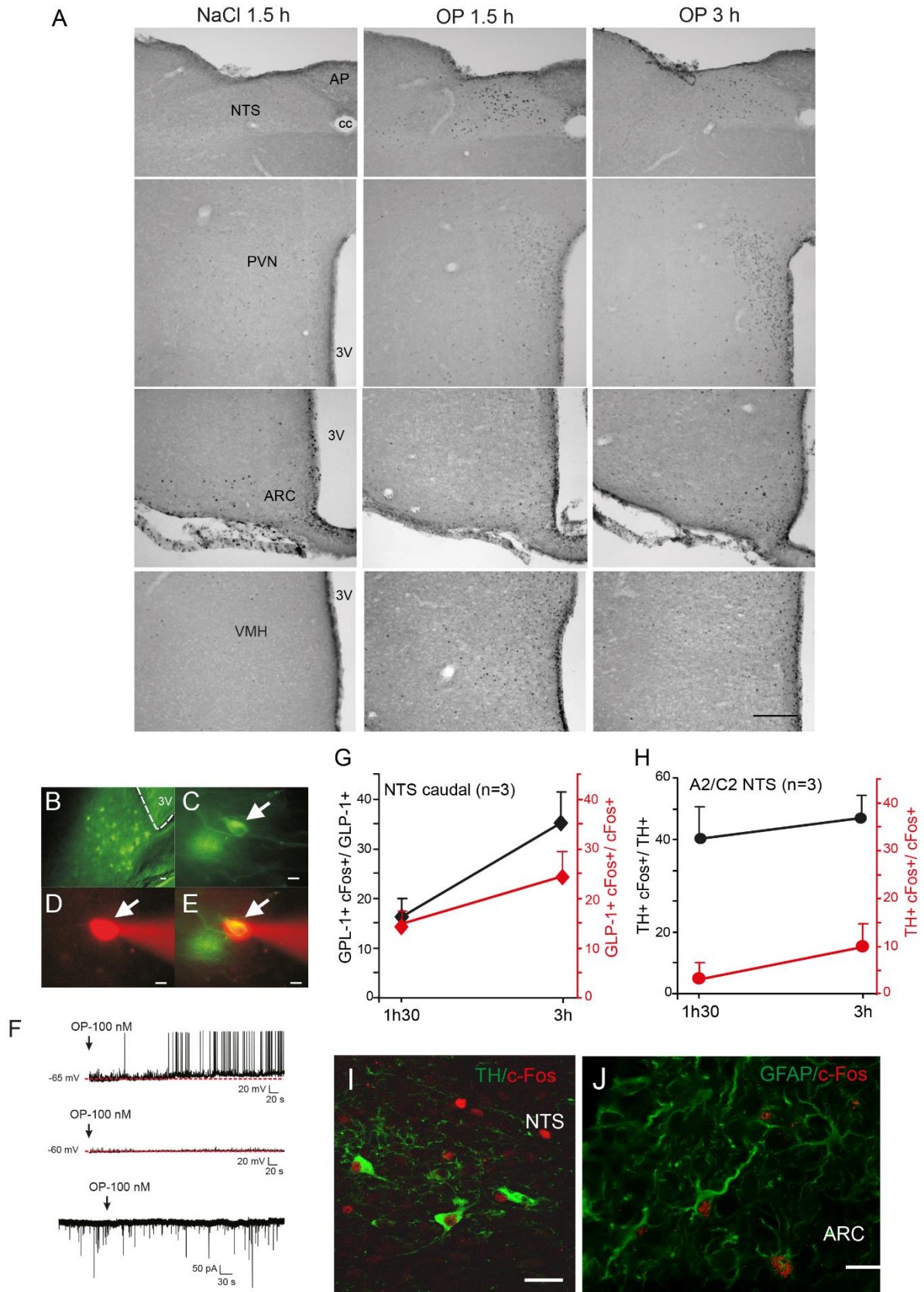


Fig. S3

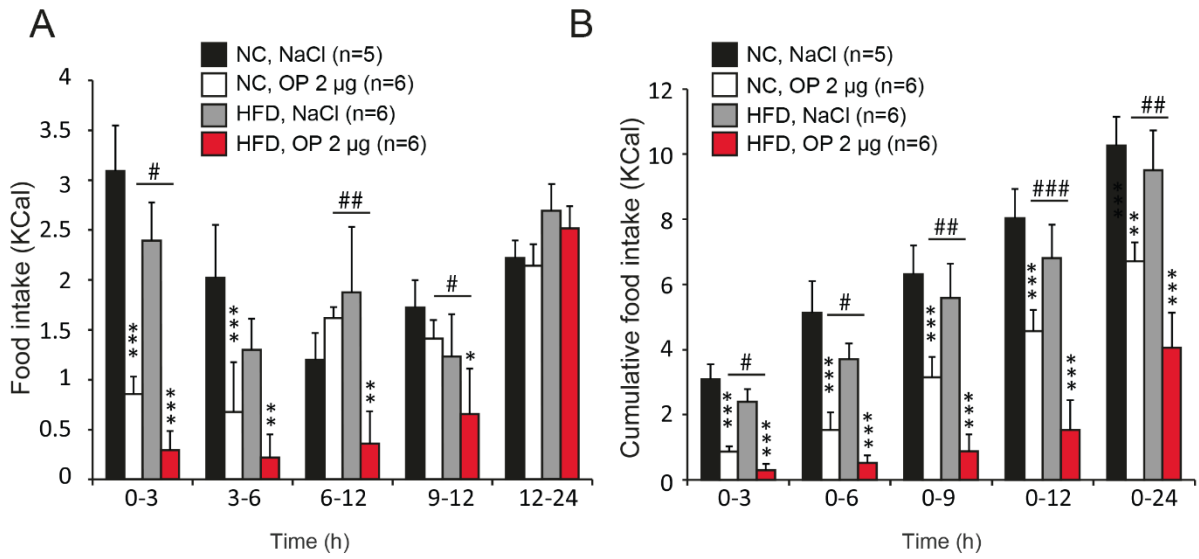


Fig. S4

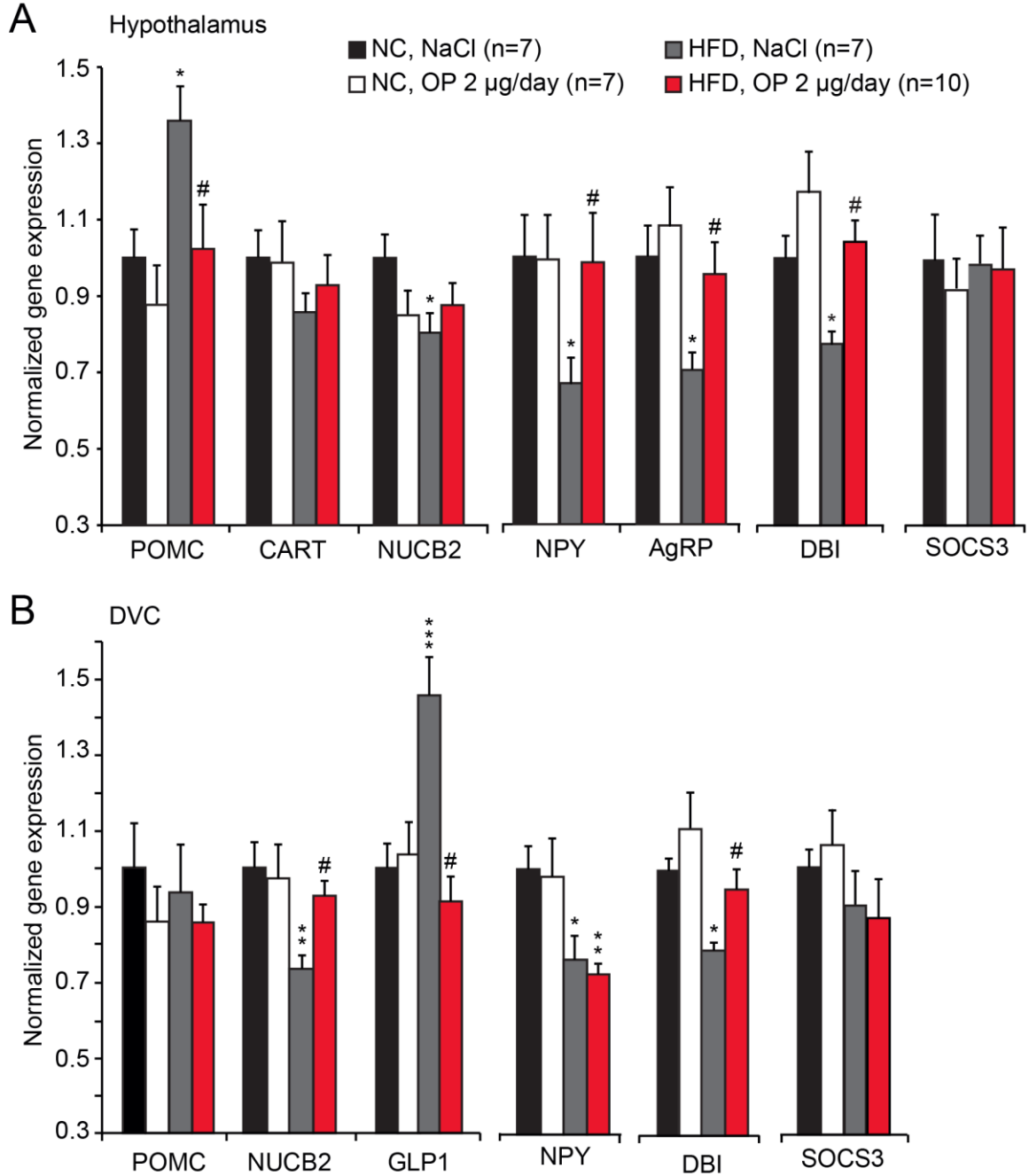


Fig. S5

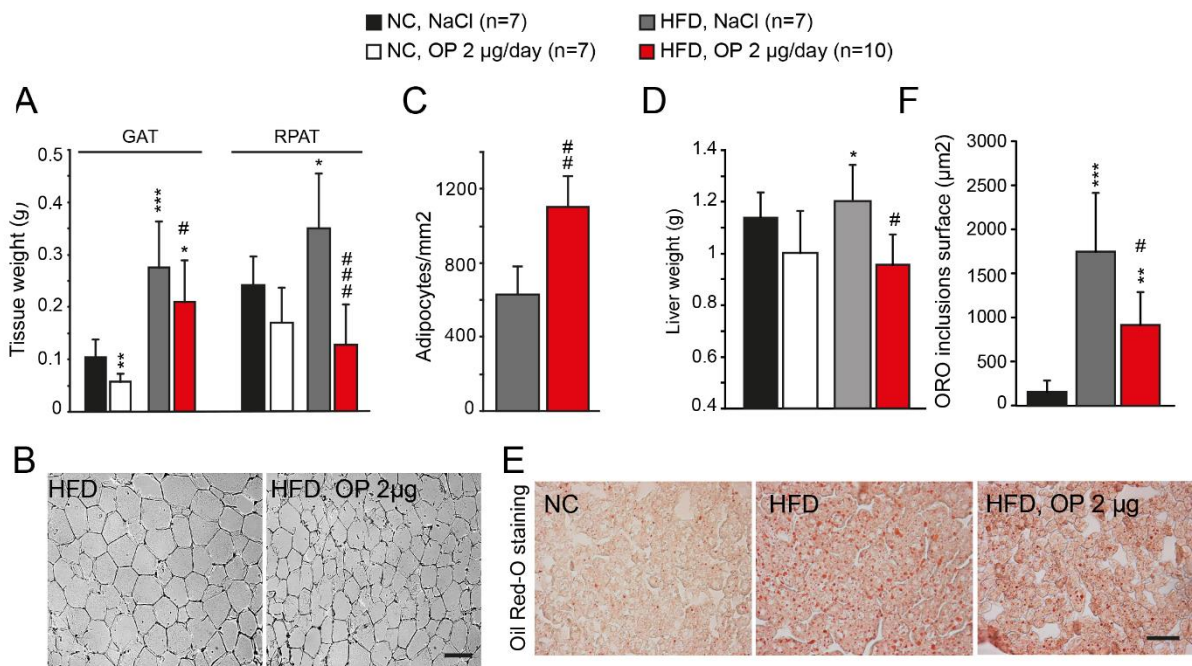


Fig. S6

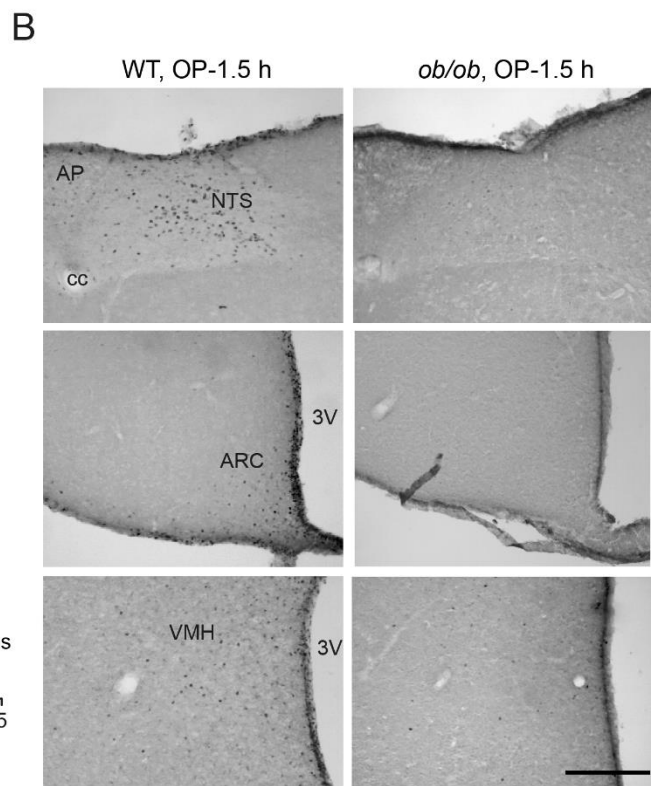
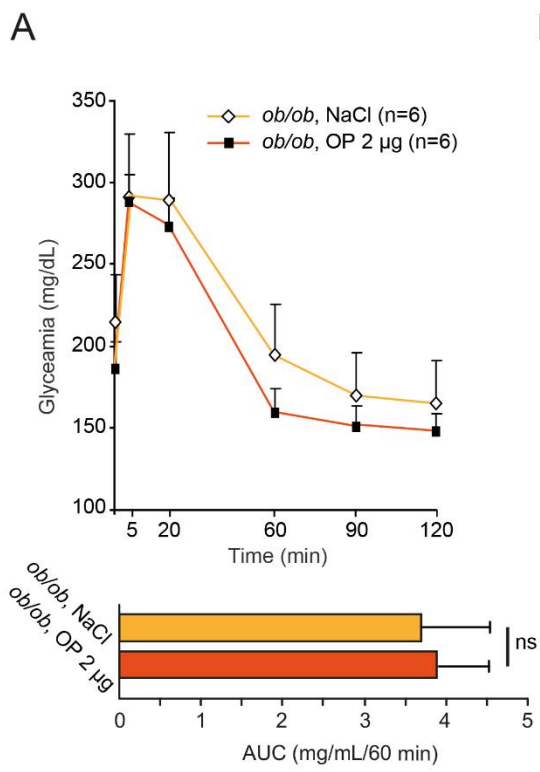


Fig. S7

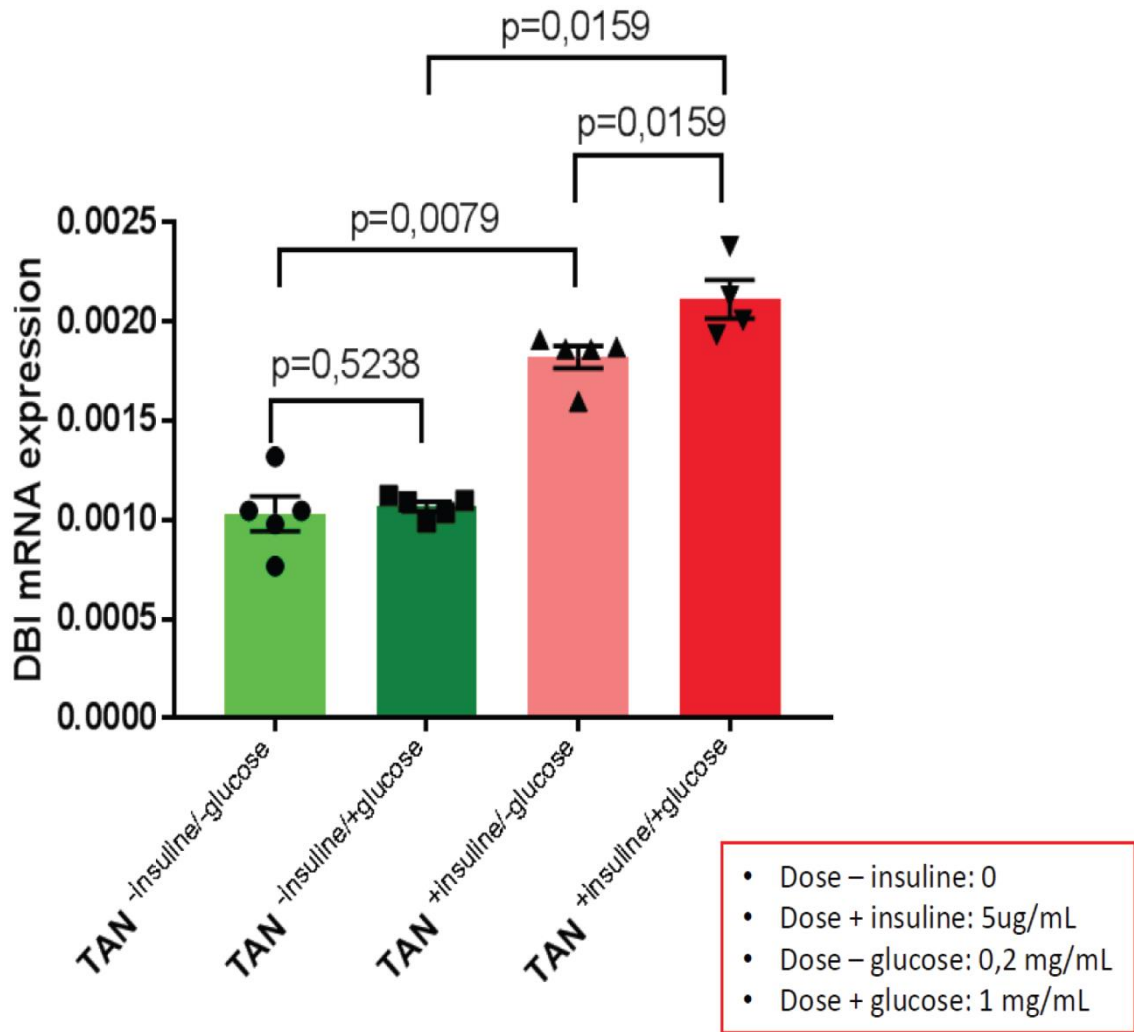


Table S1

Labelling	Antibody	Host Species	Dilution	Incubation	Saturation	Secondary Antibody	
						Type/Reference	Dilution
GFAP	Z03334, Dako	Rabbit	1/1000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3 % Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
	G3893 Sigma	Mouse	1/1000	overnight at 4°C	5% HS 0.3% Triton X-100	Alexa-594; A11032 Molecular Probes	1/400
Vimentin	AB5733 Merck Millipore	Chicken	1/2000	overnight at 4°C	4% NGS 0.3 % Triton X-100	Alexa-594; A11042, Molecular Probes	1/400
ODN	403 2207, Tonon et al, 1990	Rabbit	1/400	overnight at 4°C	1% BSA 0.3 % Triton X-100	Alexa-594; A11032, Molecular Probes	1/400
						Alexa-488; A11029, Molecular Probes	1/400
c-Fos	Ab-5, Calbiochem	Rabbit	1/10000	48 h at 4 °C	3% NGS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs	1/400
						Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
	SC-52, Santacruz	Goat	1/5000	48 h at 4 °C	5% HS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs	1/400
						Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
p-Stat3 (Tyr705)	9131, Cell Signalling	Rabbit	1/400	overnight at 4°C	3% NGS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs	1/200
						Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/200
						Alexa-594; A11012 Molecular Probes	1/200
LepR	Sc-1834, Santa Cruz	Goat	1/1000	overnight at 4°C	5% HS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs Avidin Texas Red Vector Labs	1/200 1/400
Nesfatin-1/NUCB2	H-003-22-B, Phoenix Pharm. Inc	Rabbit	1/10000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3% Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
GFP (POMC-GFP)	A11122, Molecular Probes	Rabbit	1/1000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3% Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
TH	MAB318, Merck Millipore-Chemicon	Mouse	1/1000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3% Triton X-100	Alexa-594; A11032, Molecular Probes	1/400
GLP1	T-4057 Peninsula Lab.	Rabbit	1/800	overnight at 4°C	3% HS 0.3% Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400

Table S2

Time Interval	Condition	Meal Number	Meal size (mg)	Meal duration (min)	Post-meal interval (min)	Eating rate (mg/min)	Satiety ratio (min/mg)
0-6 h	NaCl	8.00 ± 1.57	220.37 ± 27.46	9.99 ± 2.11	43.17 ± 9.07	30.65 ± 5.18	0.24 ± 0.08
	OP 2 µg	1.71 ± 0.42 ***	66.94 ± 14.66 ***	5.16 ± 1.21	135.09 ± 23.59 **	16.54 ± 3.79 *	0.81 ± 0.23 *
	ODN 2 µg	3.60 ± 0.50 *	113.13 ± 28.69 **	6.50 ± 1.82	107.89 ± 27.02 *	38.46 ± 7.87	2.55 ± 1.55 **
6-12 h	NaCl	7.29 ± 1.36	228.87 ± 39.99	10.85 ± 2.95	49.42 ± 10.93	27.67 ± 4.10	0.26 ± 0.04
	OP 2 µg	4.89 ± 0.70	158.81 ± 31.23	10.08 ± 2.01	82.55 ± 20.87	18.37 ± 3.53	0.66 ± 0.14 **
	ODN 2 µg	8.80 ± 1.74	166.91 ± 46.94	7.28 ± 1.90	39.50 ± 8.43	44.47 ± 13.69	0.34 ± 0.06
12-24 h	NaCl	4.00 ± 0.79	180.50 ± 23.22	8.31 ± 1.30	141.63 ± 15.32	26.33 ± 2.17	1.50 ± 0.57
	OP 2 µg	4.43 ± 0.87	227.67 ± 31.66	12.13 ± 2.03	111.31 ± 8.26	22.58 ± 4.91	0.79 ± 0.19 *
	ODN 2 µg	7.6 ± 0.87 *	263.90 ± 19.51	9.50 ± 0.50	103.39 ± 35.04	27.01 ± 2.67	0.53 ± 0.07 *

Table S3

Gene Product	RefSeq	Primers	
		Fw	Rv
DBI	NM_001037999.2	TGCTCCCGCGCTTTCG	CTGAGTCTTGAGGCGCTCAC
POMC	NM_008895.3	ACGTGGAAAGATGCCGAGATT	GGTTTTCAATCAGGGGCTGT
NPY	NM_023456.2	GGGGCTGTGTGGACTGACCCT	GATGTAGTGTGCAAGCGGAG
AgRP	NM_007427.2	AGCTTTGGCGGAGGTGCT	GCATTGAAAGCGGCAGT
NUCB2	NM_001130479.2	GCTGGATGCCCTTCAAGACA	CTCCGCTCGTGTTCCTCAT
GCG (GLP-1)	NM_021332.2	TTCAAGACACAGAGGAGAAACC	CATGACGTTTGGCAATGTTGT
ObRb	U42467.1	AATGACGCAGGGCTGTATGT	TCAAGGCTCCAAGAGAGGG
GAPDH	NM_008084.3	TTCTCAAGCTCATTTCTGGTATG	GGATAGGGCCTCTCTTGCTCA

Supplemental Legends

Figure S1: ODN expression within astrocytes and tanycytes of the hypothalamus and brainstem

(A-D) Low magnification images of ODN labeling performed on mice forebrain (A-B) and brainstem (C-D) coronal sections.

(E-H) High magnification images of ODN (green) and GFAP (red) double labeling performed on mice hypothalamic (E-F) and brainstem (G-H) coronal sections illustrating the presence of double-labeled cells.

(I-L) Representative photomicrographs of ODN and vimentin double labeling performed on mice hypothalamic (I, K) and brainstem (J, L) coronal sections.

3V, third ventricle; AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; ME, median eminence; NTS, nucleus of the solitary tract. Scale bar: 500 μm in A-D; 100 μm in E-L.

Figure S2: Identification of OP-sensitive structures and cells

(A) Representative coronal sections illustrating the c-Fos labeling observed within brainstem and hypothalamic regions of mice treated with icv NaCl (left panel), animals sacrificed 1.5 h (middle panel) or 3 h (right panel) after treatment with icv OP (2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$). AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus of the solitary tract; PVN, paraventricular nucleus; VMH: ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bar: 100 μm .

(B-F) Acute hypothalamic slice under 470 nm illumination showing POMC-GFP neurons within the ARC (B). 3V, third ventricle. (C) Isolated POMC-GFP neuron of the ARC (arrow) observed at higher magnification before electrophysiological recordings and after the complete dialysis of AlexaFluor 594 from the intracellular patch pipette (D, arrow). (E) Colocalization of AlexaFluor 594 with the GFP expression in POMC-GFP neuron. Scale bars: 20 μm in B, 10 μm in C-E. (F) Current-clamp recording of the cells depicted in B-E showing that OP application (100 nM, the arrow indicates the beginning of OP perfusion) leads to membrane depolarization and action potentials discharge (upper trace). Current-clamp recording of an arcuate POMC neuron with no response after bath application of OP (middle trace). Voltage-clamp recording of spontaneous inhibitory post-synaptic currents (IPSCs, holding potential : -60 mV) illustrating the effect of OP (100 nM) on the frequency and amplitude of IPSCs. Neither

the frequency nor the amplitude of the IPSCs was significantly altered between controls (frequency, 1.38 ± 1.19 Hz; amplitude, 84.64 ± 9.23 pA; $n=3$) and during OP applications (frequency, 1.01 ± 0.69 Hz; amplitude, 79.56 ± 18.81 pA; $n=3$; $P > 0.05$, paired sample Wilcoxon Signed Rank test).

(G-H) Percentage of neuronal phenotype, *i.e.* GLP-1 (G) and TH (H) neurons, found activated 1.5 and 3h after OP (2 μ g) treatment (black plots) and proportion of these neuronal phenotypes in regard to the entire c-Fos+ population (red plots).

(I) Representative photomicrographs of TH (green) and c-Fos (red) double labeling performed on brainstem coronal sections of mice treated with OP (2 μ g). NTS, nucleus of the solitary tract. Scale bars: 20 μ m.

(J) Representative photomicrographs of GFAP (green) and c-Fos (red) labeling performed on hypothalamic coronal sections of mice treated with OP (2 μ g). ARC, arcuate nucleus. Scale bars: 100 μ m.

Figure S3: OP acutely reduces food intake in HFD-mice.

Food intake (A) and cumulative food intake (B) measured over a 24 h period in NC- or HFD-fed mice administered either with icv NaCl or OP (0.5 and 2 μ g/mouse). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ significantly different from respective NaCl-treated mice. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ significant difference between NC- and HFD-mice treated with OP (2 μ g).

Figure S4: Effects of chronic OP administration on hypothalamic and DVC food intake related peptides mRNA expression

(A-B) PCR quantification of food intake related peptides mRNA within the hypothalamus (A) and DVC (B) of NC- and HFD-fed mice treated either with vehicle or OP (2 μ g/day). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly different from NC/NaCl mice. # $P < 0.05$ significantly different from HFD/NaCl mice.

Figure S5: Effect of chronic central OP injection on obesity markers

(A-C) Weight of gonadic adipose tissue (GAT) and retroperitoneal adipose tissue (RPAT) measured in all test groups at day 13 after icv of either saline (NaCl) or OP (2 μ g/mouse/day) in NC- or HFD-fed mice (A). (B) Representative photomicrographs of RPAT histology in HFD/NaCl and HFD/OP mice. (C) Quantification of adipocytes number per surface unit in RPAT of HFD/NaCl and HFD/OP mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly

different from NC/NaCl mice; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$, significantly different from HFD/NaCl mice. Scale bar: 100 μm .

(D-F) Liver weight measured in all test groups at the end of the treatment period (D). (E) Representative photomicrographs of Oil Red-O (ORO) staining observed in NC/NaCl, HFD/NaCl and HFD/OP mice. (F) Quantification of ORO positive inclusions number per surface unit in liver of NC/NaCl, HFD/NaCl and HFD/OP mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly different from NC/NaCl mice and # $P < 0.05$, significantly different from HFD/NaCl mice. Scale bar: 100 μm .

Figure S6: OP fails to reduce hyperglycaemia and to activate central structures in *ob/ob* mice.

(A) Time course changes in blood glucose level after *per os* administration of glucose (1.5 g/kg) measured in *ob/ob* mice after icv injection of NaCl or OP (2 μg). Quantification of areas under the curves (AUC) 60 min after injections. ns: non-significant.

(B) Representative photomicrographs of c-Fos labeling performed at the NTS, ARC, and VMH nuclei level of WT (left panel) or *ob/ob* (right panel) mice treated with OP (2 μg), 1.5 h after injection. Scale bars: 100 μm . AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus of the solitary tract; VMH: ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle.

Figure S7: Insulin increases DBI mRNA expression in cultured tanycytes

PCR quantification DBI mRNA expression in tanycytes cultures treated with insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of low (0.2 mg/ml) or high (1 mg/ml) glucose concentration.

*** $P < 0.001$ significantly different from low glucose - insulin condition; ## $P < 0.01$ significantly different from high glucose - insulin condition; ££ $P < 0.01$ significantly different from low glucose + insulin condition.

Table S1: Analysis of meal pattern calculated on three time intervals (0-6 h, 6-12 h and 12-24 h) after NaCl, ODN or OP (2 μg) injection. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly different from NaCl-treated mice.

Table S2: List of antibodies and immunohistochemistry conditions.

Table S3: Primers sequences used for SYBR Green assays.

Résumé

L'obésité est une maladie caractérisée par un apport excessif de nutriments et une dérégulation de la balance énergétique, qui sur le long terme, conduisent à des risques importants pour la santé tels que les problèmes cardiovasculaires, le cancer, ou encore le diabète de type 2. L'obésité est associée à une inflammation chronique de bas seuil, présente au niveau d'organes périphériques et de structures centrales. Parmi les différents organes concernés, l'inflammation du tissu adipeux semble jouer un rôle prépondérant dans le développement de cette pathologie. La prostaglandine E2 (PGE2) est un médiateur de l'inflammation dont l'expression est dérégulée au cours de l'obésité. L'étape terminale de la voie de synthèse de la PGE2 est assurée par différentes prostaglandines E synthase (PGES), mais seule l'expression de la microsomale PGES-1 (mPGES-1) est induite par des signaux pro-inflammatoires. Alors que la PGE2 apparaît comme un médiateur pouvant faire le lien entre obésité et inflammation chronique, le rôle de la mPGES-1 dans le développement de l'obésité est très peu étudié. Dans ce contexte, nous montrons, chez la souris obèse, une diminution significative de l'expression de la mPGES-1 au niveau du foie, du tissu adipeux blanc et du tronc cérébral. Ensuite, l'utilisation de souris invalidées pour la mPGES-1 (souris mPGES1^{-/-}), nous a permis de montrer ces souris développent une résistance à l'obésité induite par un régime gras. Elles présentent notamment un gain de poids corporel et une adiposité plus faible que leurs contrôles sauvages soumis au même régime gras. De façon intéressante, les animaux mPGES-1^{-/-} présentent également une inflammation réduite des tissus adipeux blancs et bruns. Ce phénotype s'explique par un maintien des dépenses énergétiques en fin de régime chez les animaux mPGES-1^{-/-}, sans modification de l'activité du tissu adipeux brun. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'inhibition de la mPGES-1 contribue à enrayer l'inflammation chronique liée à l'obésité, et pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité.

Abstract

Obesity is a disease characterized by an excess of nutrients and a positive energetic balance, which, in the long term, leads to major health problems. Obesity is associated with a chronic low grade inflammation at central structures and peripheral organs. Among the affected organs, the inflammation of adipose tissues seems to play a key role in the development of this disease. The prostaglandin E2 (PGE2) is a well-known mediator of inflammation whose expression is dysregulated over obesity. The final step of PGE2 synthesis is catalyzed by several prostaglandin E synthases (PGES), but only the microsomal PGES-1 (mPGES-1) is inducible. Although PGE2 appears as a potential mediator linking obesity and inflammation, few studies have investigated the role of mPGES-1 in obesity. In this context, we showed that mPGES-1 expression is significantly decreased in adipose tissue, liver and brainstem of obese mice. Then, we observed that mice deleted for the mPGES-1 enzyme (mPGES-1^{-/-} mice) were resistant to diet-induced adiposity. They exhibited a significant decrease in body weight and adiposity, compared with control mice fed with the same fat-diet. Interestingly, mPGES-1^{-/-} mice also displayed a reduced inflammation of white and brown adipose tissues. This phenotype could be partly explained by maintain of stable energy expenditures at the end of the diet period, without any modification of physical activity and brown adipose tissue activity. Altogether, these results showed that mPGES-1 inhibition contributes to decrease inflammation linked to obesity, and could constitute a potential target for obesity and comorbidities treatment.