

Université Paris Est
École doctorale : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Physiopathologie

THESE DE DOCTORAT
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paris Est

Présentée et soutenue publiquement par
Vanessa DEVEAUX
Le 15 décembre 2008

Mise en évidence de deux nouvelles fonctions du
système endocannabinoïde dans la
physiopathologie hépatique: propriétés stéatogènes
du récepteur CB2 et profibrogéniques
du récepteur CB1

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Yannick Laperche
Madame le Docteur Catherine Postic
Monsieur le Professeur Philippe Mathurin
Monsieur le Docteur Vincenzo Di Marzo
Madame le Docteur Sophie Lotersztajn

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

À mes parents, à Fred

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Docteur Sophie Lotersztajn de m'avoir permis de continuer dans la recherche après mon DEA, en m'accueillant au sein de son équipe. Merci de m'avoir donné la chance de faire ce que j'aime.

J'exprime ensuite mon estime et mes remerciements au Docteur Catherine Postic, au Professeur Philippe Mathurin, au Docteur Di Marzo Vincenzo et au Professeur Yannick Laperche, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail.

Je voudrais remercier du fond du cœur mes parents qui m'ont donné goût à l'esprit scientifique dès mon plus jeune âge et qui m'ont donné les possibilités de faire ce que j'aime.

Un tendre merci à celui qui partage ma vie et me soutient dans mes choix depuis toutes ces années. Merci pour la patience que tu as ... Ça y est j'arrive au bout !!!!

Je souhaite remercier tous les membres de l'ex U581 (les présents et partis comme Boris, Maud et Tran), et plus particulièrement :

Fouad mon « rayon de soleil » de la fin d'après-midi, venu de Washington. Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour toutes les discussions qu'on a eues autour du café du matin. Vivement que tu reviennes qu'on recommence en « live » et non plus sur msn !

Alex, Marie-Pierre, Sylvie et Thomas : des « Trois Mousquetaires » nous sommes passés au « Club des 5 ». Merci pour tous les bons conseils et les grands moments de rigolade !!! Heureusement qu'on se serre les coudes et que je peux compter sur vous ! Désolée pour ces dernières semaines où je n'étais pas vraiment disponible, « l'ours râleur » va bientôt sortir de sa cage...vous pourrez le réentendre... râler ou plutôt jurer ! Ça vous manquait non ?

Edith, merci pour tous les bons moments passés à venir se confier au secrétariat!

Tous mes amis (que je ne citerais pas vous vous reconnaîtrez tous), pour tous les moments exceptionnels que l'on a partagés et merci pour votre soutien pendant les moments difficiles !

Enfin, je voudrais remercier, toute ma famille, ma belle famille, mes amies et mes collègues car ils ont tous à leur façon participé à l'élaboration de ce travail !

Et pour terminer, merci à mes petites souris sans qui cette thèse n'existerait pas !!!!

RESUME

Mise en évidence de deux nouvelles fonctions du système endocannabinoïde dans la physiopathologie hépatique: propriétés stéatogènes du récepteur CB2 et profibrogéniques du récepteur CB1

Les cannabinoïdes présents dans la marijuana agissent par l'intermédiaire de deux récepteurs, CB1 et CB2, qui sont également activés par des molécules endogènes, les endocannabinoïdes. Les récepteurs CB1, majoritairement exprimés dans le cerveau, relaient les effets psychoactifs du cannabis, mais exercent également de nombreux effets périphériques. Les récepteurs CB2 prédominent dans les cellules du système immunitaire et interviennent notamment dans la régulation de la réponse immune et inflammatoire. Il apparaît aujourd'hui que le système endocannabinoïde joue un rôle crucial au cours des maladies du foie. En effet, le récepteur CB1 participe au développement de l'hypertension portale et de la cardiomyopathie cirrhotique, deux complications de la cirrhose. Il possède des propriétés stéatogènes associées à l'obésité et à la consommation excessive d'alcool. Le récepteur CB2 quant à lui possède des propriétés antifibrogéniques et protège de l'ischémie reperfusion.

L'obésité est associée à une réponse inflammatoire qui joue un rôle déterminant dans l'insulino-résistance et la stéatopathie métabolique. Des travaux récents ont montré que le système cannabinoïde favorise le développement de la stéatose par l'intermédiaire des récepteurs CB1. Les récepteurs CB2 interviennent dans la régulation de la réponse immune et inflammatoire. Dans la première partie de ce travail, nous avons donc étudié le rôle des récepteurs CB2 dans le développement de l'obésité, de l'insulino résistance et de la stéatopathie métabolique à l'aide de souris sauvages et invalidées pour le récepteur CB2. Nous avons observé que les souris invalidées pour le récepteur CB2 soumises à un régime hyperlipidique ont une prise de poids significativement plus faible que les souris sauvages consécutivement à une augmentation de l'excrétion fécales des lipides et de l'oxydation des acides gras. Les souris obèses invalidées pour le récepteur CB2 sont plus sensibles à l'insuline et développent une stéatose réduite par rapport aux souris sauvages. Les souris sauvages développent une inflammation importante dans le tissu adipeux viscéral. En revanche, l'induction des cytokines proinflammatoires est significativement plus faible chez les souris CB2-/- exposées au régime hyper lipidique ou chez des souris sauvages obèses traitées avec l'AM630 un antagoniste du récepteur CB2. À l'inverse, l'activation des récepteurs CB2 par un agoniste sélectif conduit à une augmentation de la production de TNF α et de CCL2 dans des explants de tissu adipeux isolés de souris obèses sauvages. Ces résultats constituent la première mise en évidence du rôle des récepteurs CB2 dans le développement de l'obésité, de l'insulino résistance et de la stéatose. Le mécanisme mis en jeu implique probablement un effet proinflammatoire des récepteurs CB2 dans le tissu adipeux.

La fibrose est la complication commune de toutes les maladies chroniques du foie et conduit à la cirrhose et à ses complications sévères. Nous avons observé que l'expression de récepteur CB1 est induite dans les zones de fibrose au cours de la cirrhose chez l'homme, notamment dans les cellules fibrogéniques du foie, alors qu'il est peu exprimé dans le foie humain normal. Ces résultats nous ont conduit à évaluer le rôle du récepteur CB1 dans la progression de la fibrose, en étudiant les conséquences de son invalidation génétique et pharmacologique dans trois modèles expérimentaux de physiopathogénie différente, l'administration chronique de tétrachlorure de carbone ou de thioacétamide, ou la ligation de la voie biliaire principale. Dans ces trois modèles, nous avons démontré que l'administration *per os* d'un antagoniste du récepteur CB1, le rimonabant prévient la fibrogenèse. L'étude des mécanismes impliqués dans les effets antifibrogéniques du rimonabant a révélé que la molécule diminue l'accumulation des cellules fibrogéniques du foie en inhibant leur prolifération. Ces résultats mettent en évidence les propriétés profibrogénique du récepteur CB1 et suggèrent que l'utilisation d'antagonistes du récepteur CB1 pourrait constituer une approche intéressante du traitement de la fibrose.

RESUME.....	5
LISTE DES FIGURES.....	9
INTRODUCTION	12
Système endocannabinoïde	13
I. Généralités	13
II. Les récepteurs des cannabinoïdes.....	14
1) Expression des récepteurs dans le règne animal	15
2) Gènes et protéines	15
a) Le récepteur CB1	16
b) Le récepteur CB2	17
3) Polymorphisme génétique	18
4) Dimérisation	19
5) Signalisation des récepteurs CB1 et CB2 (<i>figure 3</i>)	20
a) Récepteurs des cannabinoïdes et AMPc	20
b) Cannabinoïdes et régulation de la perméabilité des canaux ioniques	21
c) Cannabinoïdes et activation de la voie des MAPK.....	21
d) Récepteurs des cannabinoïdes et métabolisme des céramides.....	22
e) Autres voies de signalisation	23
III. Les récepteurs aux cannabinoïdes non-CB1 non-CB2	24
1) Le récepteur de l'abnormal cannabidiol	24
2) Le récepteur hippocampal des cannabinoïdes non-CB1	25
3) Le récepteur CB2-like	25
4) Le récepteur vanilloïde	26
5) Le récepteur GPR55	26
IV. Les cannabinoïdes.....	27
1) Les cannabinoïdes endogènes	27
a) L'anandamide.....	28
b) 2 arachidonoylglycérol ou 2-AG	29
c) Métabolisation classique des endocannabinoïdes	30
d) Métabolisation des endocannabinoïdes par les voies des eicosanoïdes	31
e) Autres endocannabinoïdes.....	32
□ La virodhamine	32
□ La noladine	33
2) Les cannabinoïdes exogènes	33
a) Les ligands exogènes naturels (Tableaux 1 et 2)	33
b) Les ligands synthétiques.....	34
3) Antagonistes ou agonistes inverses ?.....	36
V. FONCTIONS DES RECEPTEURS CB1 ET CB2	39
1) Distribution tissulaire des récepteurs CB1 et CB2	39
2) Fonctions des récepteurs CB1 et CB2	40
3) Les souris invalidées pour les récepteurs des cannabinoïdes, des outils indispensables à l'étude de leurs fonctions.....	42
Système endocannabinoïde et immunomodulation	44
I. Régulation du système endocannabinoïde au cours de la réponse immunitaire	44
II. Rôle chimioattracteur des cannabinoïdes.....	45
III. Système endocannabinoïde et production de cytokines	46
IV. Cannabinoïdes et prolifération des cellules du système immunitaire.....	48
V. Applications thérapeutiques.....	49
1) La sclérose en plaques	49
2) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	50
Système endocannabinoïde et homéostasie énergétique	51
I. Généralités	51
1) Etiologie et facteurs de développement.....	52
II. Les composantes du syndrome métabolique.....	54

1) La résistance à l'insuline	54
a) Signalisation physiologique par l'insuline	54
b) Résistance cellulaire à l'insuline.....	56
2) Le tissu adipeux : un acteur majeur du syndrome métabolique.....	57
a) Physiologie du tissu adipeux	57
□ Composition	57
□ L'adipocyte, une cellule métabolique	57
□ L'adipocyte, une cellule sécrétrice	58
La leptine	58
L'adiponectine	59
La résistine	60
b) Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation associée à l'obésité.....	61
□ Mécanismes de l'infiltration inflammatoire	62
□ L'inflammation du tissu adipeux : le lien entre l'insulino-résistance et l'obésité	63
3) La stéatose	67
a) Mécanismes physiopathologiques.....	67
b) Conséquences de l'insulino-résistance sur le développement de la stéatose	70
III. Le système cannabinoïde et la régulation de l'homéostasie énergétique	72
1) Système endocannabinoïde et contrôle de la prise alimentaire.....	73
2) Rôle du récepteur CB1 dans l'insulino-résistance	75
3) Système endocannabinoïde et tissu adipeux	76
4) Système endocannabinoïde et métabolisme lipidique hépatique.....	76
5) Applications thérapeutiques	78
Foie et système endocannabinoïde.....	80
I. Physiologie du foie	80
1) Généralités.....	80
2) Anatomie	81
a) Généralités	81
b) Le lobule hépatique.....	82
c) Le sinusoiide.....	83
II. Rôle du système cannabinoïde dans les stéatopathies, (ou fatty liver disease)	85
1) Système endocannabinoïde et stéatopathie métabolique.....	86
2) La maladie alcoolique du foie	86
a) Stéatose alcoolique.....	87
b) De la stéatose à l'hépatite alcoolique	87
c) Système endocannabinoïde et maladie alcoolique du foie	88
3) Récepteur CB2 et ischémie/reperfusion	88
4) Système endocannabinoïde et hépatite auto-immune.....	89
III. Rôle du système cannabinoïde dans le développement de la fibrose	90
1) La physiopathologie de la fibrose.....	90
2) Les cellules fibrogéniques du foie	91
3) Rôle des cellules fibrogéniques dans la physiopathologie de la fibrogenèse hépatique	92
a) Activation et recrutement	92
b) Prolifération et survie	93
c) Apoptose	93
d) Remodelage et fibrose	94
e) Stratégies antifibrosantes.....	95
4) Système endocannabinoïde et fibrose hépatique	96
a) Propriétés antifibrogéniques du récepteur CB2	96
b) Études cliniques	98
5) Système endocannabinoïde et complications de la cirrhose	99
a) L'hypertension portale	99
b) L'encéphalopathie hépatique.....	100
c) La cardiomyopathie du cirrhotique	100

OBJECTIFS.....	102
RESULTATS.....	104
1 ^{er} Article : CANNABINOID CB2 RECEPTOR INACTIVATION REDUCES OBESITY, INSULIN RESISTANCE AND STEATOSIS	105
2 ^{ème} Article : CB1 CANNABINOID RECEPTOR ANTAGONISM : A NEW STRATEGY FOR THE TREATMENT OF LIVER FIBROSIS	147
CONCLUSIONS.....	156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	160
PUBLICATIONS ANNEXES.....	178

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du gène Cnr1 humain

Figure 2 : Structure du gène Cnr2 humain

Figure 3 : Principales voies de signalisation des récepteurs des cannabinoïdes

Figure 4 : Synthèse de l'anandamide

Figure 5 : Synthèse du 2-AG

Figure 6 : Structure de différents endocannabinoïdes

Figure 7 : Activité constitutive.

Figure 8 : Répartition de la population française en 2006 en fonction de son niveau d'IMC selon l'étude de Roche, *Obépi 2006*

Figure 9 : Signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux et le muscle squelettique

Figure 10 : Interactions des voies de signalisation de l'inflammation et de l'insuline

Figure 11 : Action des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP sur les voies de la glycolyse et de la lipogenèse dans l'hépatocyte

Figure 12 : Métabolisme des acides gras dans le foie

Figure 13 : Résistance à l'insuline et accumulation des triglycérides dans le foie

Figure 14 : Conséquence de l'inactivation du récepteur CB1 sur les organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

Figure 15 : Localisation du foie dans l'abdomen

Figure 16 : Structure tridimensionnelle d'un lobule hépatique

Figure 17 : Sinusoïde hépatique

Figure 18 : Propriétés fibrogéniques des myofibroblastes

Figure 19 : Le récepteur CB1 exerce des effets délétères à différentes étapes de la progression des maladies chroniques du foie

Figure 20 : Impact du récepteur CB2 aux différentes étapes de la progression des maladies chroniques du foie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux ligands des récepteurs aux cannabinoïdes

Tableau 2 : Affinités comparées des principaux agonistes et antagonistes pour le récepteur
CB1 et CB2

Tableau 3 : Récapitulatifs des fonctions des récepteurs aux cannabinoïdes

Tableau 4 : Effets des cannabinoïdes sur la production de cytokines

LISTE DES ABREVIATIONS

2-AG : 2-arachidonyl glycérol

ACEA : Arachidonyl-2-chloroethylamide

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

AGL : Acide gras libre

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine triphosphate

CB1 : Cannabinoid receptor 1

CB2 : Cannabinoid receptor 2

CCL2 : CC chemokine ligand 2

CCR2 : Chemokine (C-C motif) receptor 2

EGF : Endothelial growth factor

FAAH : Fatty acid amide hydrolase

FAS : Fatty acid synthase

FGF : Fibroblast growth factor

FSV : Fraction stromale vasculaire

IMC : Indice de masse corporelle

IL : Interleukine

IRS-1 : Insulin receptor substrate-1

LHS : Lipase hormone-sensible

MEC : Matrice extracellulaire

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

SREBP : SRE binding protein

THC : delta- 9-tétrahydrocannabinol

TNF α : Tumor necrosis factor α

VLDL : Very low density lipoprotein

INTRODUCTION

Systeme endocannabinoïde

Cannabis sativa est une plante dicotylédone, herbacée et dioïque (mâle et femelle poussent sur des plants séparés), aux feuilles découpées et palmées. Elle forme avec le houblon, *Humulus lupulus*, le genre des cannabinaées. L'espèce compte plus d'une centaine de variétés dans le monde, et s'adapte par sélection naturelle aux conditions de sol, de climat et de traitement qu'elle rencontre. Ainsi, l'aspect de la plante, comme ses concentrations en principes actifs, les cannabinoïdes, varie fortement d'une région à l'autre.

I. Généralités

Le cannabis, ou chanvre, est utilisé depuis l'Antiquité comme source de fibres pour la fabrication de tissus et de cordages. C'est la concentration élevée en cannabinoïdes dans les parties indiennes et chinoises de l'Himalaya, qui a conduit à la mise en évidence des propriétés médicinales du cannabis. La première trace de son utilisation thérapeutique, retrouvée dans un ouvrage pharmaceutique chinois, date du XXVIIIe siècle avant J.C. Les usages thérapeutiques, récréatifs et rituels du cannabis se sont ensuite répandus vers l'Inde, le Moyen-Orient, l'Egypte, la Grèce antique puis au XIXème siècle en occident. Il fut notamment prescrit pour ses propriétés analgésiques, anesthésiantes, anti-inflammatoires, antiémétiques ou oréxigènes. Wood en 1899, Adams en 1940 (Adams 1940) et Wollner en 1942 isolèrent successivement plusieurs composés hydrophobes du cannabis, respectivement le cannabinal, le cannabidiol et le tétrahydrocannabinol, sans pour autant en déterminer la structure exacte. Ce n'est que dans les années 60 que Mechoulam et ses collaborateurs isolèrent le Δ^9 - tétrahydrocannabinol (ou THC), principal composé psychoactif du cannabis (Gaoni and Mechoulam 1964) On regroupe aujourd'hui sous le nom de cannabinoïdes une famille de 60 composés du cannabis possédants ou non des effets psychoactifs. Dès la fin des

années 80, plusieurs groupes ont identifié des sites de liaison des cannabinoïdes, notamment dans le cerveau. Mais ce n'est qu'en 1990 que le premier de ces récepteurs fut cloné à partir de cerveau de rat, le récepteur des cannabinoïdes de type 1 (récepteur CB1). Ultérieurement, un autre récepteur fut identifié dans la rate et le système immunitaire, le récepteur des cannabinoïdes de type 2 (récepteur CB2) (Munro, Thomas et al. 1993). Ces récepteurs furent initialement apparentés aux récepteurs orphelins, en l'absence de ligands endogènes. Mais en 1992 Devane et al (Devane, Hanus et al. 1992) isolèrent à partir de cerveaux de porc un composé lipidique possédant une activité cannabimimétique et déplaçant sélectivement la liaison d'un ligand de haute affinité pour les récepteurs des cannabinoïdes, le HU-243. La mise en évidence de l'arachidonoyl-éthanolamide, ou anandamide (du Sanskrit « ananda » signifiant béatitude), fut suivie par l'identification de ligands endogènes des récepteurs des cannabinoïdes, tous dérivés de l'acide arachidonique. Les études moléculaires, biochimiques, cellulaires et physiologiques du système endocannabinoïde ont permis de démontrer son implication dans de nombreux processus biologiques et pathologiques et de confirmer certaines propriétés déjà décrites depuis l'Antiquité. On regroupe aujourd'hui sous le nom de système endocannabinoïde : les récepteurs aux cannabinoïdes, leurs ligands endogènes et les enzymes impliqués dans la synthèse et la dégradation des endocannabinoïdes.

II. Les récepteurs des cannabinoïdes

Les effets biologiques des cannabinoïdes sont principalement relayés par deux récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs CB1 et CB2. Cependant d'autres récepteurs ont été récemment identifiés.

1) Expression des récepteurs dans le règne animal

Le récepteur CB1 a été identifié et cloné chez l'homme, le rat, la souris, le chat, les oiseaux (Pinson) les amphibiens (*Taricha granulosa*) et les poissons (*Takifugu rubripes*). Sa séquence protéique est très conservée chez les vertébrés. Ainsi le récepteur humain possède une homologie de séquence de 97% avec celui de la souris, de 84% avec celui des amphibiens et de 72% avec celui des poissons (Lutz, 2002).

Le récepteur CB2 n'a pour l'instant été cloné que chez les mammifères : l'homme, le rat et la souris. L'homologie de séquence en acides aminés du récepteur CB2 entre l'homme et la souris est faible, de l'ordre de 82%. Il faut en outre remarquer que l'homologie entre le récepteur CB1 et CB2 chez l'homme n'est que de 44%, indiquant ainsi une séparation phylogénique relativement précoce. Cependant, cette homologie atteint 68% dans les hélices transmembranaires, site de liaison des ligands de ces récepteurs (Lutz, 2002).

2) Gènes et protéines

Chez l'homme, les gènes codant pour les récepteurs des cannabinoïdes sont situés sur deux chromosomes différents. *Cnr1*, codant pour le récepteur CB1, est localisé sur le chromosome 6 en 6q14-q15 (Hoehe, Caenazzo et al. 1991), alors que *Cnr2*, codant pour le récepteur CB2, est localisé sur le chromosome 1, en 1p36 (Valk et al., 1997). En revanche, chez la souris les deux gènes sont situés sur le chromosome 4 (Chakrabarti et al., 1995) (Valk, Hol et al. 1997). Chez l'homme et la souris, les parties codantes de *Cnr1* et *Cnr2* sont dépourvues d'intron, comme c'est le cas pour de nombreux membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

a) Le récepteur CB1

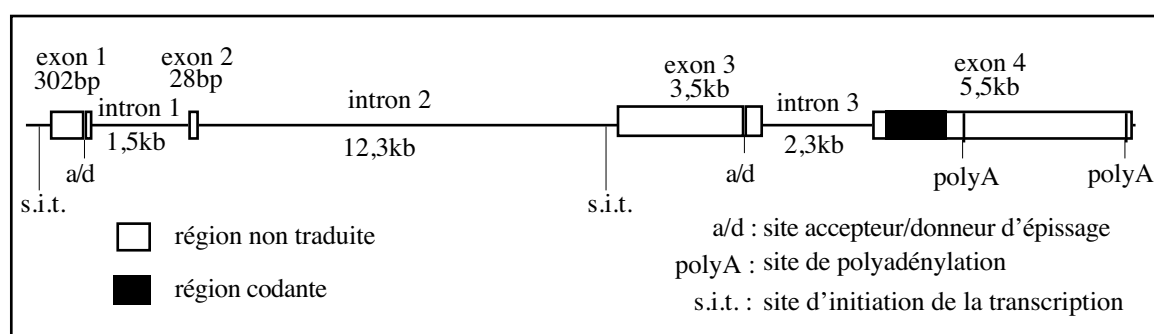


Figure 1 : Structure du gène *Cnr1* humain (Zhang et al., 2004).

Chez l'homme, la structure de *Cnr1* comporte 4 exons et s'étend sur environ 25kb (*figure 1*). Parmi ces exons, seul l'exon 4 code pour la protéine, les 3 autres codant pour la partie 5' non traduite de l'ARNm (Zhang, Ishiguro et al. 2004). Le gène *Cnr1* comprend deux sites d'initiation de la transcription, l'un en amont de l'exon 1 et l'autre en amont de l'exon 3. Le site situé en amont de l'exon 1 semble le plus actif car les transcrits lui correspondant sont généralement plus abondants. Ces sites d'initiation sont dépourvus de CAAT ou de TAATA box, mais en amont de l'exon 1, ont été identifiés des sites de liaison pour les facteurs de transcription AP2, AP4, USF, HSF et GATA (Zhang, Ishiguro et al. 2004). De plus, deux sites accepteurs-donneurs d'épissage ont été mis en évidence, l'un dans l'exon 1 et l'autre dans l'exon 3 (Zhang et al., 2004). Enfin, l'exon 4 comporte deux signaux de polyadénylation, générant des séquences 3' non traduites de 0,6kb ou de 4kb, séquences qui sont impliquées dans la régulation de la transcription, de la stabilité des ARN et de la traduction (Lutz, 2002). Ces sites d'initiation de la transcription, d'épissages alternatifs et de signaux de polyadénylation participent à l'expression de six transcrits différents de *Cnr1* dont la taille peut varier de 1,2kb à 9kb (*figure 1*). Il en existe probablement d'autres, car les sites caractérisés ne suffisent pas à rendre compte de tous les transcrits identifiés (Zhang et al., 2004).

Les transcrits identifiés codent pour deux isoformes du récepteur CB1, les isoformes CB1 et CB1A, appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G (Rinaldi-Carmona et al., 1996). CB1 est l'isoforme majoritaire et physiologiquement active, et code pour une protéine de 472 acides aminés (*figure 1*) de poids moléculaire apparent de 64kda (Tsou et al., 1998). Cependant ce récepteur possède plusieurs sites de glycosylation (Song et Howlett, 1995) pouvant rendre compte de la variabilité du poids moléculaire décrite dans la littérature. La deuxième isoforme, CB1A, est une protéine plus courte (411 acides aminés). Ses 28 premiers acides aminés C-terminaux diffèrent totalement de ceux du récepteur CB1, en raison d'un décalage de la phase de lecture. L'expression de CB1A est plus faible que celle de CB1 (de 1/10 à 1/100 selon les tissus). Ces deux isoformes lient les endocannabinoïdes avec une affinité similaire mais le THC ou encore le CP 55,940 se lient avec une affinité plus faible sur l'isoforme CB1A (Rinaldi-Carmona et al., 1996).

b) Le récepteur CB2

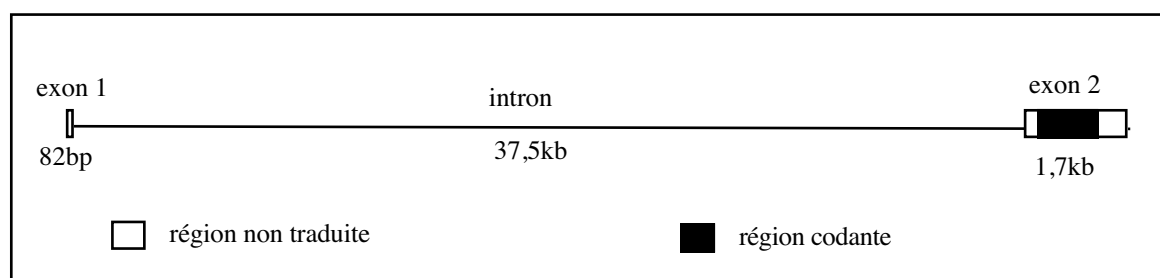


Figure 2: Structure du gène *Cnr2* humain (NM 001841)

Il n'existe que peu de données sur la structure de *Cnr2* chez l'homme. Il s'étend sur 38kb et est composé d'au moins 2 exons, avec l'exon 2 portant toute la partie codante pour la protéine. La taille du transcrit détecté est d'environ 1,8kb (référence NM 001841) (*figure 2*).

En revanche la structure du gène chez le rat diffère de celle de l'homme et de la souris, car il est composé de 3 exons codant tous pour la séquence protéique (Brown et al., 2002). Chez l'homme le transcrit codant pour le récepteur CB2 est constitué de 411 acides aminés, de poids moléculaire apparent de 46kDa et comporte de nombreux sites de glycosylations (Filppula et al., 2004).

3) Polymorphisme génétique

Plusieurs polymorphismes de *Cnr1* ont été récemment associés à une prédisposition à l'obésité ou à la consommation excessive de drogues. Ainsi, l'équipe de Froguel a montré que différentes mutations dans la région intronique du récepteur CB1 constituaient un facteur de risque de développement de l'obésité et contribuaient à la modulation de l'index de masse corporelle dans les populations européennes (Benzinou, Chevre et al. 2008) . Une autre étude a montré l'existence d'un variant du gène *Cnr1* (G1422A) associé à l'obésité abdominale chez les hommes (Peeters et al., 2007). Enfin, une équipe italienne a montré dans deux populations, italienne et anglaise, la présence de deux SNP (single nucleotide polymorphism) au niveau de l'exon 4 du gène *Cnr1* corrélant avec l'obésité (Russo et al., 2007). En ce qui concerne la prédisposition à la consommation excessive de drogues, l'équipe de Uhl a montré l'existence d'un polymorphisme dans le gène *Cnr1*, probablement dans les domaines régulateurs. Ces données ont été retrouvées dans trois populations différentes (afro-américaine, caucasienne et japonaise) (Zhang et al., 2004). Plus récemment, une répétition du triplet (AAT) a été associée à une prédisposition à l'addiction à la cocaïne dans une population noire des Caraïbes (Ballon et al., 2006). Enfin, la présence de deux SNP dans *Cnr1* mis en évidence dans une population afro-américaine et européenne pourrait prédisposer à la dépendance à l'alcool et aux drogues (Zuo et al., 2007).

En ce qui concerne le récepteur CB2, l'existence d'une mutation sur le locus p36 du chromosome 1 prédispose au développement de l'ostéoporose (Karsak et al., 2005). De plus, un polymorphisme (GJA4), détecté dans une population japonaise corrèle avec une baisse de la densité osseuse (Yamada et al., 2007). D'autre part des individus portant un allèle spécifique de *Cnr2* où deux nucléotides ont été mutés, prédisant ainsi la substitution d'une glutamine en position 63 par une arginine, ont une prédisposition au développement de maladies auto-immunes (Sipe et al., 2005). Enfin, le polymorphisme Q63R, dans *Cnr2*, mis en évidence dans la population japonaise est associé à une consommation excessive d'alcool (Ishiguro et al., 2007).

4) Dimérisation

Comme la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, l'étude des récepteurs CB1 et CB2 a permis de démontrer que ces récepteurs étaient capables de former des homo-ou hétéro-multimères (Gomes et al., 2001) (Milligan, 2001). Ainsi le récepteur CB1 s'hétérodimérise avec le récepteur D2 dopamine (Wager-Miller et al., 2002) (Mackie 2005) (Kearn et al., 2005), ou avec le récepteur à l'orexine (Hilairret et al., 2003) (Ellis et al., 2006), potentialisant ainsi les effets de l'orexine sur la voie des MAPK. De plus, le récepteur μ des opioïdes forme également un dimère avec le récepteur CB1 ; cette interaction va inhiber la neuritogénèse (formation des neurones) (Rios et al., 2006). Des hétérotrimères entre le récepteur CB1, le récepteur D2 dopaminergique et le récepteur A2A de l'adénosine ont été également mis en évidence par la technique de FRET-BRET (Carriba et al., 2008). Cependant, les conséquences de cette hétérotrimérisation restent à définir.

5) Signalisation des récepteurs CB1 et CB2 (figure 3)

Les récepteurs CB1 et CB2 font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G et sont notamment couplés à G_i/o sensible à la toxine pertussique. Les récepteurs CB1 et CB2 agissent principalement sur trois voies de signalisation intracellulaire : l'adénylate cyclase, la voie des MAP (mitogen activated protein)-kinases et certains canaux ioniques (action spécifique *via* les récepteurs CB1).

a) Récepteurs des cannabinoïdes et AMPc

En 1984, avant même le clonage des récepteurs des cannabinoïdes, Howlett et al ont montré que les cannabinoïdes inhibent la production d'AMPc (Howlett et Fleming, 1984). Cet effet est bloqué par la toxine pertussique, impliquant ainsi les protéines hétérotrimériques G_i/o dans la transduction du signal (Howlett et al., 1986). Ces observations ont été confortées par le clonage des récepteurs des cannabinoïdes CB1 puis CB2, qui a confirmé leur parenté avec les récepteurs couplés aux protéines G (Matsuda et al., 1990) (Munro et al., 1993). Si le récepteur CB1 est couplé aux protéines G_i et G_o de façon indifférenciée mais également aux protéines G_q et G_s (Howlett, 2004), le récepteur CB2 quant à lui est préférentiellement couplé à la protéine G_o (Glass et Northup, 1999).

Dans certaines conditions expérimentales, le récepteur CB1 peut également stimuler la production d'AMPc. Ainsi, dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur CB1, les cannabinoïdes diminuent la production d'AMPc. Cependant, si on rend indisponible le pool cellulaire de protéines $G_{i/o}$ par traitement à la toxine pertussique, le récepteur CB1 augmente alors la production d'AMPc en recrutant G_s (Glass et Felder, 1997).

b) Cannabinoïdes et régulation de la perméabilité des canaux ioniques

L'activation du récepteur CB1 provoque l'inhibition des canaux calciques voltage dépendants de type N, L et Q/P par le biais de Gi/0, indépendamment de l'inhibition des adénylyl cyclases (Mackie et Hille, 1992) (Twitchell et al., 1997). Les endocannabinoïdes *via* le récepteur CB1 augmentent par ailleurs l'activité des canaux potassiques de la rectification entrante, par le biais d'une protéine G de type Gi/0, mais indépendamment de l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Henry and Chavkin 1995) (Mackie et al., 1995). L'activation du récepteur CB1 diminue la sensibilité au potentiel de membrane des canaux potassiques de type A, *via* une protéine Gi/0 et de façon dépendante de l'inhibition de la voie adénylate cyclase/protéine kinase A (Deadwyler et al., 1993).

c) Cannabinoïdes et activation de la voie des MAPK

L'activation des récepteurs CB1 et CB2 stimule l'activité des trois membres de la famille des MAPK : extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Bouaboula et al., 1995) (Bouaboula et al., 1996) (Galve-Roperh et al., 2000), P38 (Derkinderen et al., 2001) et c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Downer et al., 2003) (Galve-Roperh et al., 2000). Cette activation déclenche une cascade de phosphorylation aboutissant *in fine* à l'activation de facteurs de transcription multiples, tels que krox 24, c-fos ou c-jun (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995; Derkinderen, Valjent et al. 2003). Différentes voies de signalisation sont impliquées dans l'activation des MAPK par les récepteurs CB1 et CB2. Trois d'entre elles ont été bien décrites : (i) l'activation de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) par la sous unité G $\beta\delta$ libérée lors de l'activation du récepteur, qui conduit à la translocation à la membrane et à l'activation de Raf-1 (ERK) ou de Ras (JNK) (Rueda, Galve-Roperh et al. 2000) (Sanchez et al., 1998); (ii) l'inhibition de l'AMPc *via* G α (Derkinderen et al., 2003); (iii) enfin, l'activation transitoire ou soutenue de la synthèse de céramides par les cannabinoïdes, par une

voie indépendante de Gi/0 (Sanchez, Galve-Roperh et al. 1998) (Galve-Roperh et al., 2000). Les voies de signalisation reliant les céramides à la voie des MAPK sont encore mal connues mais pourraient impliquer l'activation directe de la serine/threonine-specific ceramide-activated protein kinase, qui phosphoryle Raf-1, qui active à son tour ERK (Mathias, Dressler et al. 1991) (Mathias, Dressler et al. 1991).

d) Récepteurs des cannabinoïdes et métabolisme des céramides

L'activation du récepteur CB1 déclenche la production de céramides, un second messenger ubiquitaire qui joue un rôle important dans le métabolisme, la différenciation, la survie et la mort cellulaire. Cette augmentation de céramides peut être transitoire ou soutenue (Guzman et al., 2001) (Guzman, Galve-Roperh et al. 2001) par des mécanismes différents. Ainsi, les sphingomyélinases catalysent la synthèse rapide de céramides à partir de sphingomyéline. Dans des lignées d'astrocytes et de gliomes C6, l'activation du récepteur CB1 provoque une augmentation en moins de 15 minutes de la production de céramides, conséquence d'une interaction directe entre le récepteur CB1 et FAN (Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation), un adaptateur moléculaire impliqué dans l'activation des sphingomyélinases neutres (Sanchez et al., 2001). Le récepteur CB1 interagirait avec FAN par une séquence spécifique présente également dans le récepteur au TNF (Guzman M, 2001). Une accumulation prolongée de céramides est généralement liée à une stimulation de la synthèse de *novo* de ces lipides ou une baisse de leur dégradation. Dans des cellules de gliome C6 traitées de façon prolongée par des cannabinoïdes, la production de céramides est observée après deux jours de traitement. Cet effet est bloqué par un inhibiteur de la sérine palmitoyltransférase dont l'activité augmente au cours du traitement. Ces résultats suggèrent que le récepteur CB1 stimule la synthèse de *novo* des céramides en augmentant l'activité de la sérine palmitoyltransférase (Galve-Roperh et al., 2000).

e) Autres voies de signalisation

L'activation des récepteurs CB1 et CB2 est également impliquée dans la régulation d'autres voies de signalisation, notamment (i) Akt (ou protéine kinase B), impliquée essentiellement dans la survie cellulaire, (Gomez del Pulgar et al., 2000), (ii) NFκB, facteur de transcription impliquée dans l'inflammation (Daaka et al., 1997) (Jeon et al., 1996) (iii) et la voie des eicosanoïdes en stimulant la production d'acide arachidonique *via* l'activation de la PLA2 cytosolique (Demuth, Gkoumassi et al. 2005) (Wartmann et al., 1995) et en induisant la COX-2 (Vannacci et al., 2004) (Chen, Hu et al. 2005).

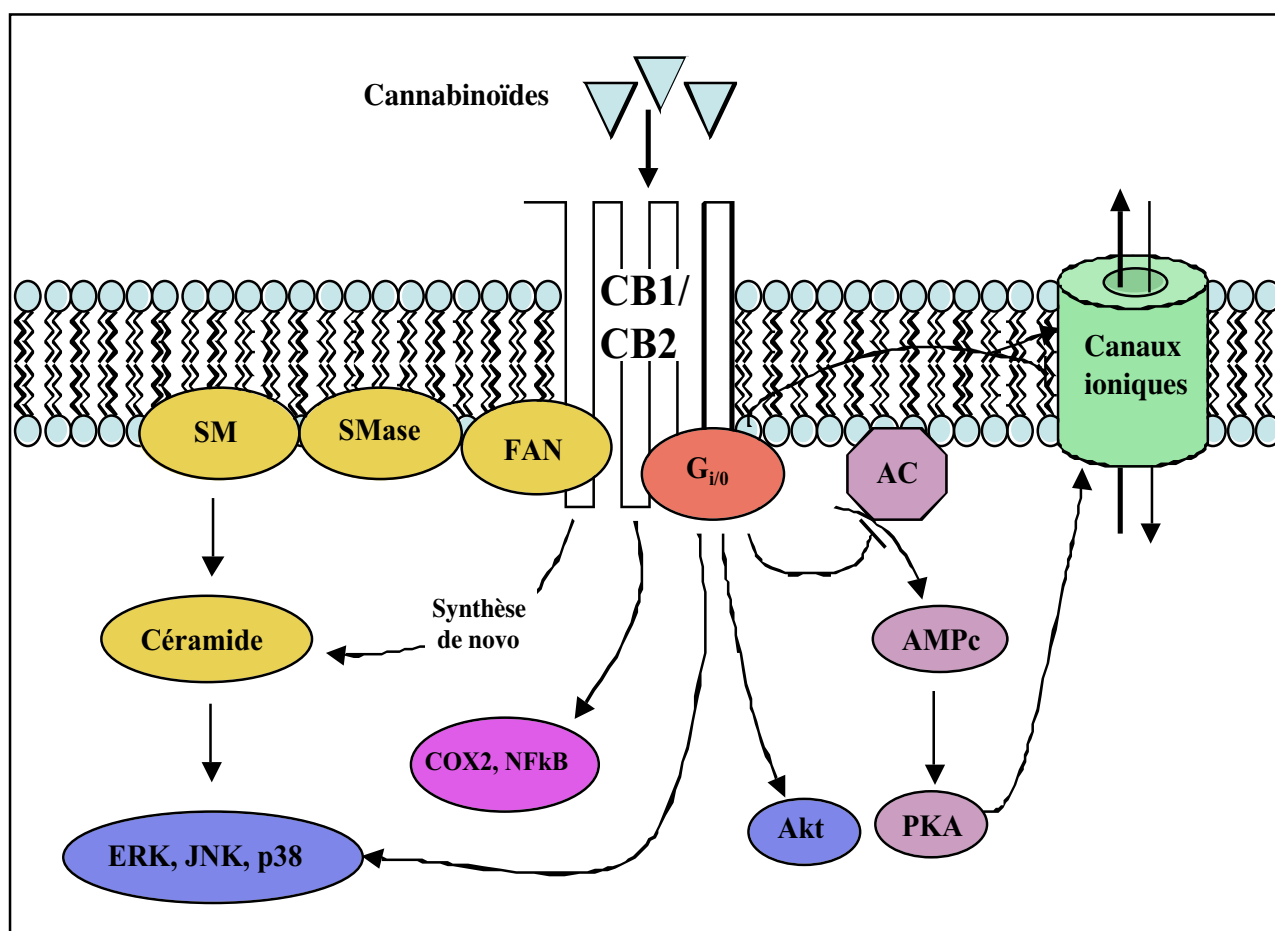


Figure 3 : Principales voies de signalisation des récepteurs des cannabinoïdes (Guzman, 2003)

AC : adénylyl cyclase. AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique. COX2 : cyclooxygénase 2. ERK : extracellular signal-regulated kinase. FAN : factor associated with neutral sphingomyelinase activation. JNK : c-Jun N-terminal kinase. NFκB : nuclear factor κ B. PAK : protéine kinase A. Smase : sphingomyélinase. SM : sphingomyéline.

III. Les récepteurs aux cannabinoïdes non-CB1 non-CB2

La plupart des effets des cannabinoïdes observés ont été attribués au récepteur CB1 et/ou CB2. Cependant la mise au point d'antagonistes de ces récepteurs ainsi que de modèle de souris invalidées pour les gènes des récepteurs CB1, CB2 ou CB1 et CB2 a permis de mettre en évidence certains effets biologiques des cannabinoïdes indépendants de leurs récepteurs classiques.

1) Le récepteur de l'abnormal cannabidiol

Wagner et al. décrivèrent les effets vasodilatateurs de l'anandamide et du R-méthanandamide sur des artères mésentériques isolées (Wagner, Varga et al. 1999). Cet effet est reproduit par l'abnormal cannabidiol, qui ne se lie pas aux récepteurs CB1 et CB2, alors que ni les agonistes synthétiques, qui se lient aux récepteurs CB1 et CB2 comme le WIN 55,212-2 ou le CP 55,940, ni le THC ne peuvent le reproduire (Jarai et al., 1999) (Wagner et al., 1999). Enfin, le SR141716A, un antagoniste du récepteur CB1, bloque les effets de l'anandamide, du R-méthanandamide et de l'abnormal cannabidiol, inhibition nécessitant la présence de l'endothélium vasculaire (Chaytor et al., 1999) (Jarai et al., 1999) (Wagner et al., 2001). Cependant, l'AM251, un autre antagoniste du récepteur CB1, ne reproduit pas ce blocage (White, Ho et al. 2001; Ho and Hiley 2003). Ces résultats suggèrent donc l'existence de sites de liaison de l'anandamide et du R-méthanandamide distincts de CB1 et CB2 et sensibles à une inhibition par le SR141716A. De plus, cette vasodilatation endothélium dépendante est inhibée par la toxine pertussique, ce qui suggère l'implication d'un récepteur couplé aux protéines G (Jarai et al., 1999). Ces données ont également été confirmées *in vivo*. En réponse à un choc endotoxique provoqué par injection de LPS, on observe une augmentation de la production d'anandamide par les macrophages circulants, ce qui provoque une hypotension (Liu et al., 2003). Cette hypotension est bloquée par le SR 141716A chez des

souris sauvages mais aussi chez des souris invalidées pour les gènes des récepteurs CB1 ou CB2 (Batkai, Pacher et al. 2004). Cependant l'existence de ce récepteur n'a pour le moment pas été confirmée par clonage.

2) Le récepteur hippocampal des cannabinoïdes non-CB1

Le récepteur CB1 est impliqué dans l'inhibition du courant exciteur post-synaptique évoqué par le glutamate (Stella, Schweitzer et al. 1997). Hajos et al ont montré que le WIN55,212-2 inhibe le courant exciteur post-synaptique provoqué par une stimulation monosynaptique sur des neurones hippocampaux de souris sauvages, mais aussi de souris invalidées pour le gène du récepteur CB1 (Hajos et al., 2001). Cet effet est sensible à la toxine pertussique, au SR141716A et non à l'AM251 (Hajos et Freund, 2002). De plus le WIN55,212-2 et l'anandamide, mais pas le THC et le HU-210, stimulent la liaison GTP γ S sur des membranes de cerveau de souris invalidées pour le gène du récepteur CB1 (Breivogel, Griffin et al. 2001). Ces résultats suggèrent l'existence d'un récepteur couplé aux protéines Gi/o non CB1 et sensible au SR141716A. Au premier abord, on pourrait penser que ce récepteur est similaire au récepteur de l'abnormal cannabidiol. Néanmoins sa sensibilité au WIN55212-2 (et l'absence de sensibilité du récepteur de l'abnormal cannabidiol à ce ligand) démontre que ces deux récepteurs putatifs sont bien distincts. Là encore, l'existence de ce récepteur n'a pas été confirmée par clonage.

3) Le récepteur CB2-like

Le palmitoylethanolamide est un amide d'acide gras qui ne lie ni le récepteur CB1 ni le récepteur CB2 (Felder, Joyce et al. 1995). Cependant, il exerce un effet antinociceptif bloqué par le SR144528 (Calignano, La Rana et al. 1998) et potentialise la migration de la microglie de façon toxine pertussique sensible (Franklin and Stella 2003). Ces résultats

suggèrent donc l'existence d'un récepteur couplé à Gi/o appelé CB2 « like » en raison de sa sensibilité au SR144528, antagoniste du récepteur CB2.

4) Le récepteur vanilloïde

C'est le récepteur de la capsaïcine, composé exogène responsable de la sensation de chaleur procurée par le piment (Szallasi and Blumberg 1999). C'est un récepteur canal, cation non-sélectif nommé TRPV1 ou VR1 (Caterina, Schumacher et al. 1997) s'ouvrant sous l'effet d'un stimulus thermique supérieur à 48°C. A l'inverse, le froid met le récepteur VR1 au repos. Ce récepteur est particulièrement abondant dans les neurones sensoriels mais est exprimé également dans certaines zones du cerveau (Mezey, Toth et al. 2000).

L'anandamide est un agoniste du récepteur vanilloïde. Dans des cellules CHO surexprimant le récepteur VR1, il déplace en effet la liaison de la résiniferatoxine, agoniste de haute affinité pour ce récepteur (Ross, Gibson et al. 2001). De plus, l'anandamide provoque certains effets caractéristiques de l'activation de ce récepteur comme la vasodilatation des artérioles endothélium-indépendant (Zygmunt, Petersson et al. 1999), la stimulation de l'apoptose de cellules de lymphome et de neuroblastome (Maccarrone, Lorenzon et al. 2000) ou encore la stimulation d'un courant cationique entrant dans les neurones sensoriels (Smart, Gunthorpe et al. 2000). Tous ces effets sont bloqués par un antagoniste sélectif du récepteur VR1, la capsazépine.

5) Le récepteur GPR55

Le récepteur GPR55 (Ryberg, Larsson et al. 2007) est un récepteur couplé aux protéines G orphelin jusqu'en 2007, dont il a récemment été démontré qu'il liait le CP55940 (cannabinoïde synthétique aminoalkylindol), le cannabidiol, l'anandamide et la virodhamine ainsi que l'abnormal cannabidiol. Ce récepteur possède une faible homologie de séquence

avec les récepteurs CB1 et CB2. Il est différent du récepteur de l'abnormal cannabidiol car les effets vasodilatateurs de l'abnormal cannabidiol non médiés par CB1 sont conservés chez les souris GPR55^{-/-} (Maccarrone, Lorenzon et al. 2000) (Johns, Behm et al. 2007).

Le récepteur GPR55 est préférentiellement exprimé dans les glandes surrénales, l'intestin, et le cerveau mais dans de moindres proportions que le récepteur CB1 (Ryberg, Larsson et al. 2007). Le rôle du GPR55 dans les neuropathies a été démontré dans un modèle de souris invalidées pour le récepteur GPR55. Dans ce modèle, les souris GPR55^{-/-} sont résistantes à la douleur par un mécanisme impliquant une augmentation des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10 (Staton, Hatcher et al. 2008).

IV. Les cannabinoïdes

On distingue quatre familles structurales de cannabinoïdes : (i) les cannabinoïdes classiques, (ii) leurs analogues bicycliques ou tricycliques (dit « non classiques »), (iii) les cannabinoïdes amyloalkylindoles et (iv) les cannabinoïdes eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique. (*tableaux 1 & 2*)

1) Les cannabinoïdes endogènes

Les endocannabinoïdes les mieux caractérisés sont l'anandamide (Devane, Hanus et al. 1992) et le 2 arachidonoylglycérol (2-AG) (Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995). Ces composés, de structure lipidique, sont produits localement et ont une demi-vie très courte (Di Marzo, De Petrocellis et al. 2005).

a) L'anandamide

L'anandamide est constitué d'une molécule d'acide arachidonique liée à une molécule d'éthanolamine par une liaison amide (*figure 4*). Il est synthétisé en deux étapes : au cours de la première étape, le précurseur de l'anandamide ; la N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine est synthétisée par la N-acyltransférase qui catalyse le transfert intermoléculaire d'un acide arachidonique sur l'éthanolamine de la phosphatidyléthanolamine (Cadas, di Tomaso et al. 1997). Cette enzyme est régulée par deux seconds messagers : le calcium et l'AMPc (Cadas, di Tomaso et al. 1997). Au cours de la deuxième étape, le clivage de la N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine par une phospholipase D spécifique, libère l'anandamide et un acide phosphorique par un mécanisme calcium dépendant (Piomelli, Beltramo et al. 1999). Les concentrations d'anandamide dans le cerveau sont comparables à celles d'autres neurotransmetteurs comme la dopamine ou la sérotonine. Les concentrations les plus fortes sont retrouvées dans les zones où l'expression du récepteur CB1 est la plus importante, c'est-à-dire l'hippocampe, le striatum, le cervelet ou le cortex (Di Marzo, Fontana et al. 1994; Felder, Nielsen et al. 1996). L'anandamide possède une plus forte affinité pour le récepteur CB1 ($K_i \approx 61$; 543 nM) que pour le récepteur CB2 ($K_i \approx 279$; 1940nM) (*tableau 2*). L'anandamide peut aussi interagir avec d'autres récepteurs non cannabinoïdes, comme le récepteur vanilloïde de type 1, le GPR55 et les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor) α et γ à de fortes concentrations (Di Marzo 2008)

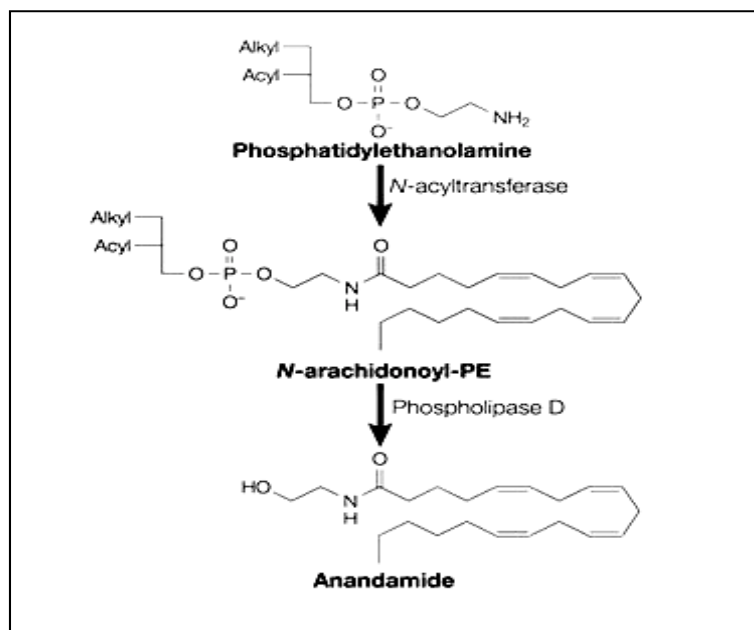


Figure 4 : Synthèse de l'anandamide (Piomelli 2003)

b) 2 arachidonoylglycérol ou 2-AG

Le 2 arachidonoylglycérol (2-AG) est constitué d'une molécule d'acide arachidonique liée au carbone 2 d'un glycérol par une liaison ester. Comme les autres monoacylglycérols, le 2-AG est à l'intersection de nombreuses voies du métabolisme lipidique, rendant difficile l'identification des voies physiologiques de synthèse. Deux voies de synthèse ont été identifiées (*Figure5*) (Piomelli 2003). La première fait intervenir le clivage d'un phosphatidylinositol en 1,2-diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (Stella, Schweitzer et al. 1997). Le DAG hydrolysé par la DAG lipase libère le 2-AG (Farooqui, Rammohan et al. 1989). La seconde voie implique le clivage du phosphatidylinositol par la PLA1 (Higgs and Glomset 1994) et la production du 2-arachidonoyl-lysophospholipide, qui à son tour est hydrolysé par la lyso-PLC en 2-AG. La formation du 2-AG est déclenchée par la stimulation de l'activité neuronale ou en réponse à l'activation de certains récepteurs (notamment ceux de l'acétylcholine) (Higgs and Glomset 1994). Le 2-AG se lie avec une affinité comparable aux

récepteurs CB1 et CB2 ($K_i \approx 400-1400$) (Lopez-Moreno, Gonzalez-Cuevas et al. 2008) (Tableau 2).

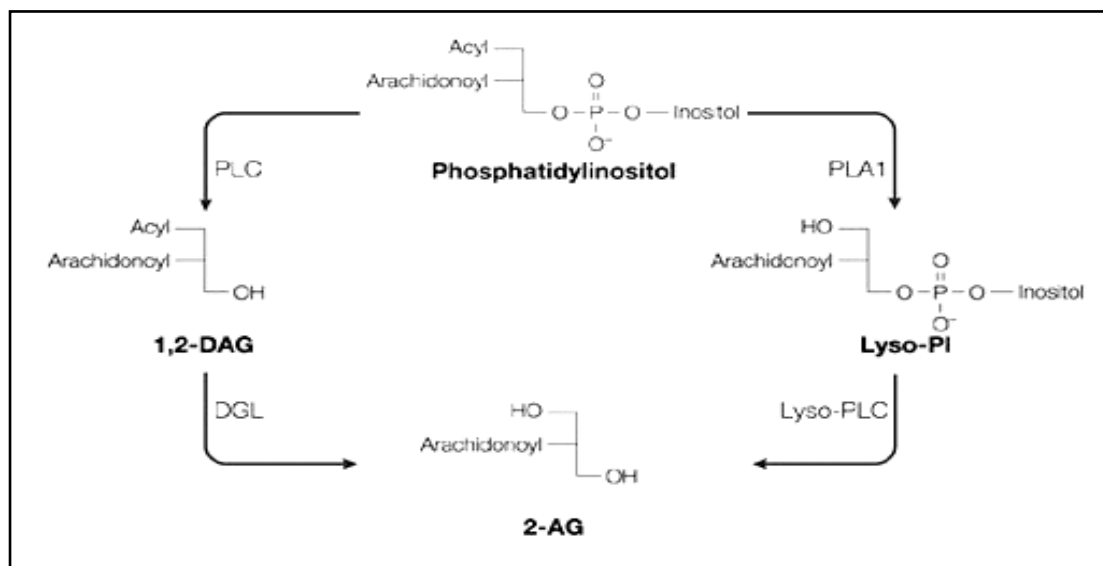


Figure 5: Synthèse du 2-AG extrait (Piomelli 2003)

c) Métabolisation classique des endocannabinoïdes

La métabolisation des endocannabinoïdes implique une étape de recapture dans le cytosol et une hydrolyse par des sérines hydrolases spécifiques.

Les mécanismes de recapture des endocannabinoïdes dans le cytosol restent encore controversés. L'existence d'un transporteur a été proposé sur la base de critères biochimiques et pharmacologiques (Hillard, Edgemon et al. 1997), d'autres équipes ont proposé cette hypothèse de transporteur (Piomelli 2003; Ronesi, Gerdeman et al. 2004). Une fois dans le cytosol les endocannabinoïdes seront métabolisés par des hydrolases (Di Marzo 2008).

Après recapture, l'hydrolyse par des enzymes spécifiques : les sérines hydrolases intracellulaires, la fatty acid amide hydrolase (FAAH)) (Cravatt, Giang et al. 1996) et la monoacylglycérol lipase (MAGL) (Dinh, Carpenter et al. 2002; Di Marzo and Petrosino 2007). Elles hydrolysent respectivement l'anandamide en une éthanamine et un acide

arachidonique et le 2-AG en un glycérol et un acide arachidonique. Il a été récemment montré que la FAAH hydrolysait également le 2-AG (Blankman, Simon et al. 2007; Di Marzo 2008).

d) Métabolisation des endocannabinoïdes par les voies des eicosanoïdes

Les cyclooxygénases (COX) sont les enzymes limitantes dans la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes. Elles catalysent la formation de prostaglandines H₂ (PGH₂) à partir de l'acide arachidonique, qui est métabolisé en PG et en thromboxane par des PG ou des thromboxanes synthases, respectivement. Deux isoformes ont été clonées, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est exprimée de façon constitutive dans les membranes du réticulum endoplasmique. La COX-2 est inductible, exprimée dans les membranes nucléaires, et est induite notamment au cours de la réponse inflammatoire.

L'anandamide et le 2-AG peuvent être des substrats de la COX-2 avec une affinité équivalente à celle de l'acide arachidonique, et génèrent par cette voie de la PGH₂-éthanolamine (PGH₂-EA) et de la PGH₂-glycérol-ester (PGH₂-G) respectivement (Yu, Hung et al. 1997; Kozak, Rowlinson et al. 2000). Ces composés peuvent être métabolisés physiologiquement par les PGE, PGD et PGI synthases, respectivement en PGE₂-G/EA, PGD₂-G/EA, et en PGI₂-G/EA. L'efficacité de métabolisation des PGH₂-G et PGH₂-EA par les thromboxanes synthases est beaucoup plus faible que de la PGH₂, suggérant qu'elles ne constituent pas physiologiquement des substrats pour ces enzymes (Kozak, Crews et al. 2002). De même, à des concentrations physiologiques, le 2-AG et l'anandamide peuvent être substrats de la lipoxigénase (Ueda, Yamamoto et al. 1995; Kozak, Crews et al. 2002) et du cytochrome P450 (Bornheim, Kim et al. 1995). Les conséquences de la métabolisation des endocannabinoïdes par la voie des eicosanoïdes sont doubles. Tout d'abord, l'oxygénation des endocannabinoïdes constitue un mécanisme additionnel d'inactivation de ces composés. En effet, les produits de l'oxydation des endocannabinoïdes comme le PGE₂, PGA₂- ;PGB₂-EA,

(Pinto, Potie et al. 1994) ou le HETE-EA (Di Marzo, Bisogno et al. 1999), perdent leur capacité d'activation du récepteur CB1. De plus, ces composés sont dotés d'une activité biologique propre. Ils peuvent en effet généralement activer les cibles des prostanoïdes dont ils sont dérivés, ou se lier aux mêmes récepteurs (Ross, Craib et al. 2002). D'autre part, ils peuvent également posséder un effet propre : par exemple, alors que la PGE2 stimule la prolifération de cellules cancéreuses coliques, la PGE2-EA déclenche leur apoptose (Patsos, Hicks et al. 2005).

e) Autres endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes représentent probablement une grande famille de ligands qui inclue notamment la virodhamine, la noladine ou le 2 (11,12-époxyeicosatrienoyl-glycerol), récemment mis en évidence, qui est agoniste des récepteurs CB1 et CB2 (Chen, Chen et al. 2008).

□ La virodhamine

La virodhamine ou O-arachidonoyl ethanolamine est constituée d'une molécule d'acide arachidonique liée par une liaison ester à une molécule d'éthanolamine. Elle est produite dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet de rat en concentration similaire à l'anandamide. Elle a également été mise en évidence dans des tissus périphériques comme dans la peau, la rate, le rein et le cœur dans de plus fortes proportions que l'anandamide. (Porter, Sauer et al. 2002). Initialement décrite comme un antagoniste du récepteur CB1 (Porter, Sauer et al. 2002), elle reproduit aussi des effets vasodilatateurs *via* le récepteur de l'abnormal cannabidiol dans les artères mésentériques isolées de rat (Ho and Hiley 2004). Les mécanismes de sa synthèse ne sont pas encore caractérisés, et la virodhamine pourrait être dégradée par les mêmes voies que l'anandamide (Porter, Sauer et al. 2002).

□ La noladine

La noladine ou 2-arachidonyl glyceryl ether isolée du cerveau en 2001, est un agoniste du récepteur CB1 (Hanus, Abu-Lafi et al. 2001) mais également un agoniste du récepteur CB2 (Shoemaker, Joseph et al. 2005). Elle inhibe l'activation des récepteurs aux μ -opioïdes *via* le récepteur CB2 (Paldyova, Bereczki et al. 2008).

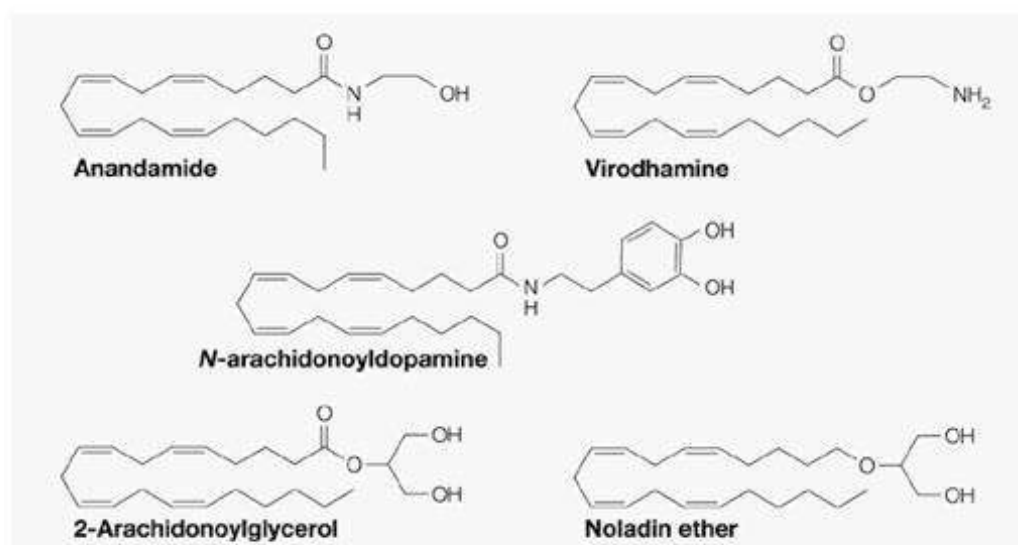


Figure 6 : Structure de différents endocannabinoïdes

2) Les cannabinoïdes exogènes

Les cannabinoïdes peuvent être des ligands naturels dérivés du cannabis ou des ligands synthétiques.

a) Les ligands exogènes naturels (Tableaux 1 et 2)

On en compte plus de soixante, dont le plus abondant et le plus actif est le Δ^9 -trans-tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). Le THC possède une affinité similaire pour les récepteurs CB1 et CB2 ($K_i \approx 60 \text{ nM}$), tout comme la plupart des cannabinoïdes classiques. Il se comporte cependant comme un agoniste partiel pour les récepteurs CB1 et CB2 (Bayewitch,

Rhee et al. 1996; Griffin, Atkinson et al. 1998). Parmi les autres phytocannabinoïdes, on trouve le D8-THC, ainsi que le cannabinal et le cannabidiol (Gaoni and Mechoulam 1964; Pertwee 1999); abnormal cannabidiol (isomère). Encore très récemment, Zimmer et al on démontré que le

beta-caryophyllene présent dans les plantes aromatiques (comme l'origan) est un agoniste du récepteur CB2 qui possède des propriétés anti-inflammatoires (Gertsch, Leonti et al. 2008).

b) Les ligands synthétiques

Parmi ces molécules modifiées chimiquement, on trouve trois classes de familles chimiques : (i) les cannabinoïdes dits « non-classiques » HU-210 et CP-55940, qui dérivent du Δ^9 -THC; (ii) les amylolkyloindoles comme le WIN-55212-2, agoniste complet qui est le plus utilisé car il possède la plus forte affinité pour les récepteurs CB1 et CB2 (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994; Showalter, Compton et al. 1996); (iii) les dérivés pyrazols comme le SR141716A et SR144528 ou le taranabant (MK 0364) (Fong, Guan et al. 2007), qui sont des antagonistes cannabinoïdes ou agonistes inverses (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994; Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1998).

Natural	Specific CB-2 receptor agonists
Phytocannabinoids	AM-1241
Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC)	HU-308
Delta(8)-THC	L-759633
Cannabidiol	L-759656
Cannabigerol	JWH-015
Cannabichromene	JWH-133
Cannabicyclol	GW405833
Cannabielsoin	Eicosanoids
Cannabitrilol	R-(+)-WIN-55, 212-2 (complete CB1-CB2 agonist)
Miscellaneous	Aminoalkylindoles
Endogenous	R-(+)-methanandamide
Endocannabinoids	Arachidonoyl-2 ϵ -chloroethylamide
N-arachidonoyl ethanolamide (anandamide; CB1-CB2 partial agonist)	Arachidonoylcyclopropylamide
2-arachidonoylglycerol (CB1 complete agonist, CB2 agonist)	O-1812
2-arachidonoylglycerol ether (noladin ether; CB1 complete agonist)	2-arylmino-5,6 dihydro-4H-1, 3-thiazines
O-arachinoyl-ethanolamine (virodhamine; CB2 partial agonist, CB1 antagonist, inverse agonist)	Arylsulfonamides (CB1 agonists)
N-arachidonyl-dopamine (CB1 agonist)	Cannabinoid receptor antagonists
Docosatetraenoyl ethanolamide?	Diarylpyrazoles
Oleamide?	SR141716A (rimonabant; CB1 antagonist, inverse agonist)
N-Oleoyl dopamine?	AM251 (CB1 antagonist, inverse agonist)
Dihomo-linolenoyl ethanolamide?	SR147778 (CB1 antagonist, inverse agonist)
Endocannabinoid-related compounds	AM281 (CB1 antagonist, inverse agonist)
Fatty acid derivatives	SR144528 (CB2 antagonist, inverse agonist)
Oleamide	Substituted benzofuranes
Oleylethanolamide	LY 320135 (CB1 antagonist)
2-oleoylglycerol	Aminoalkylindoles
Stearoyl ethanolamide	AM 630 (CB2 antagonist, partial CB1 agonist)
Palmitoyl ethanolamide	Triazole derivatives
2-palmitoylglycerol	LH-21 (CB1 antagonist)
Linoleoyl ethanolamide	Uptake blockers
2-linoleoylglycerol	AM 404
Arachidonoyl-aminoacid	UCM 707
Synthetic	AM1172
Cannabinoid receptor agonists	VDM11
Classical cannabinoids	VDM13
Delta (8)-THC (CB1-CB2 agonist)	OMDM1
HU-210 (CB1-CB2 agonist)	OMDM2
AM411 (CB1 agonist)	LY 2183240
O-1184 (CB1 agonist, CB2 inverse agonist)	LY 2318912
O-1057 (complete CB1-CB2 agonist)	O-2093
Non-classical cannabinoids	Inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH)
CP-55 940 (complete CB1-CB2 agonist)	Carbamate FAAH inhibitors
JWH-015 (CB2 agonist)	OL-135
L-768242 (CB2 agonist)	URB 597
	URB 532
	Bisarylimidazole derivative

Tableau 1 : Principaux ligands des récepteurs aux cannabinoïdes (Lopez-Moreno, Gonzalez-Cuevas et al. 2008)

Ligand	CB ₁ K _i value (nM)	CB ₂ K _i value (nM)
CB ₁ -selective agonists		
ACEA	1.4, 5.29	195, > 2000
O-1812	3.4	3870
ACPA	2.2	715
2-arachidonylglycerol ether (noladin ether)	21.2	> 3000
R-(+)-methanandamide	17.9 to 28.3	815 to 868
Agonists without significant CB ₁ or CB ₂ -selectivity		
HU-210	0.06 to 0.73	0.17 to 0.52
CP55940	0.5 to 5.0	0.69 to 2.8
R-(+)-WIN55212	1.89 to 123	0.28 to 16.2
Nabilone	1.84	2.19
(-)-Δ ⁹ -THC	5.05 to 80.3	3.13 to 75.3
(-)-Δ ⁸ -THC	44, 47.6	39.3, 44
Anandamide	61 to 543	279 to 1940
2-arachidonoylglycerol	58.3, 472	145, 1400
CB ₂ -selective agonists		
AM1241	280	3.4
JWH-133	677	3.4
L-759633	1043, 15850	6.4, 20
L-759656	529 to > 20 000	11.8 to 57
JWH-015	383	13.8
HU-308	> 10 000	22.7
CB ₁ -selective antagonists/inverse agonists		
SR141716A	1.8 to 12.3	514 to 13 200
AM281	12	4200
AM251	7.49	2290
CB ₂ -selective antagonists/inverse agonists		
SR144528	50.3 to > 10 000	0.28 to 5.6
AM630	5152	31.2

Tableau 2 : Affinité comparée des principaux agonistes et antagonistes pour les récepteurs CB1 et CB2 (Lopez-Moreno, Gonzalez-Cuevas et al. 2008).

3) Antagonistes ou agonistes inverses ?

Les diarylpyrazoles ont été les premiers antagonistes des récepteurs des cannabinoïdes synthétisés par Sanofi Aventis. Les plus utilisés sont le SR141716A ou rimonabant, antagoniste sélectif du récepteur CB1 (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1994) et le SR144528, antagoniste sélectif du récepteur CB2 (Rinaldi-Carmona, Barth et al. 1998). Il existe également d'autres antagonistes de ces récepteurs, des arylpyrazoles tels que l'AM251

(Gatley, Gifford et al. 1996) et l'AM281 (Lan, Gatley et al. 1999), antagonistes du récepteur CB1, ou des substituts benzofuranes, tels que le LY320135, antagoniste du récepteur CB1 (Felder, Joyce et al. 1998), ou l'AM630, antagoniste du récepteur CB2 (Ross, Craib et al. 2002) (tableau 1).

Outre leurs propriétés antagonistes, la plupart des antagonistes des récepteurs CB1 et CB2, possèdent des propriétés d'agoniste inverse. Ainsi le SR141716A stimule la production d'AMPC dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur CB1 (Bouaboula, Perrachon et al. 1997), diminue la liaison GTP γ S sur des membranes de cerveau (Meschler, Conley et al. 2000) et stimule le courant calcique des neurones du ganglion pelvique en culture (Pan, Ikeda et al. 1998). De même *in vivo*, le SR141716A diminue la prise alimentaire (Colombo, Agabio et al. 1998) augmente l'activité locomotrice (Costa and Colleoni 1999) stimule le transit intestinal chez la souris (Colombo, Agabio et al. 1998). Tous ces effets biologiques sont inverses de ceux déclenchés par les agonistes du récepteur CB1. Deux hypothèses peuvent expliquer ces effets agonistes inverses : tout d'abord (i) ces récepteurs sont constitutivement activés par une production endogène de cannabinoïdes ; (ii) les récepteurs sont constitutivement actifs en l'absence de ligand. Il est généralement difficile de trancher entre ces deux hypothèses et notamment d'exclure une production endogène de cannabinoïdes dans le système étudié. Cependant l'activité constitutive du récepteur CB1 a pu clairement être démontrée dans les cellules CHO surexprimant le récepteur CB1 dans lesquelles le SR141716A stimule la production d'AMPC alors que ces cellules ne produisent pas d'endocannabinoïdes (Bouaboula, Perrachon et al. 1997). Le modèle suivant a été suggéré pour rendre compte de l'activité constitutive du récepteur CB1: les récepteurs à sept domaines transmembranaires sont en équilibre entre une conformation inactive R, dans laquelle le récepteur est couplé à la protéine G sous sa forme hétérotrimérique, et une conformation active R*, dans laquelle le récepteur est couplé à la sous unité alpha de la protéine G (Leff

1995). Dans le cas général, en l'absence d'agoniste, la forme R prédomine. Cependant dans le cas de certains récepteurs, notamment dans le cas des récepteurs aux cannabinoïdes, la différence énergétique entre les deux conformations est suffisamment faible pour permettre au récepteur d'adopter la forme R* spontanément : on parle alors d'activité constitutive. Ainsi un agoniste stabilise le récepteur dans sa conformation R* et un agoniste inverse le stabilise dans sa conformation R (Leff 1995). Enfin, il existerait deux sites de liaison pour les agonistes inverses, l'un de haute affinité bloquant l'action des agonistes, et l'autre de plus faible affinité inhibant l'activité constitutive du récepteur, probablement par un phénomène allostérique. À l'appui de cette hypothèse, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le SR141716A et l'AM251 bloquent les effets d'agonistes du récepteur CB1 à des concentrations plus faibles que celles qui sont nécessaires pour observer une activité agoniste inverse (Sim-Selley, Brunk et al. 2001; Savinainen, Saario et al. 2003). Des antagonistes neutres du récepteur CB1, dénués d'activité agoniste inverse ont été synthétisés, comme le NESS 0327, dérivé du SR141716A (Ruiu, Marchese et al. 2003), ou le O-2654 dérivé du cannabidiol (Hegde, Hegde et al. 2008).

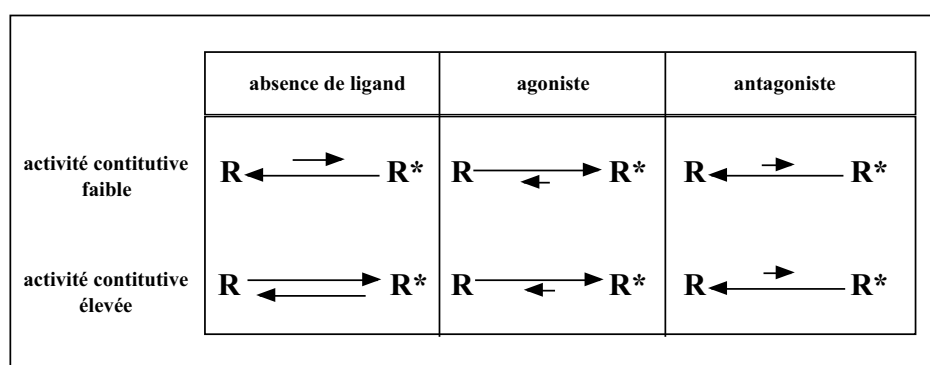


Figure 7 : Activité constitutive : un équilibre entre la forme active (R*) et la forme inactive (R)

Le récepteur CB2 est lui aussi doté d'une activité constitutive élevée, des effets agonistes inverses des antagonistes sélectifs du récepteur CB2 (l'AM630 et le SR144528) ayant été observés.

V. FONCTIONS DES RECEPTEURS CB1 ET CB2

1) Distribution tissulaire des récepteurs CB1 et CB2

Initialement identifiés dans le cerveau et le système immunitaire où leur expression est prédominante, des travaux récents indiquent que les récepteurs CB1 et CB2 et leurs ligands sont présents dans un grand nombre de tissus.

Dans le système nerveux central, le récepteur CB1 est majoritairement exprimé dans les cellules nerveuses mais également, plus faiblement, dans les cellules gliales (Herkenham, Lynn et al. 1990; Matsuda, Lolait et al. 1990). Il est également faiblement exprimé dans un très grand nombre de tissus périphériques, dans les terminaisons nerveuses périphériques, notamment dans l'intestin (Di Carlo and Izzo 2003), la vessie (Pertwee 2001), mais également dans le tissu adipeux (Cota, Marsicano et al. 2003), le foie (Osei-Hyiaman, Depetrillo et al. 2005), le testicule (Gye, Kim et al. 2001), l'utérus (Das, Paria et al. 1995), le système immunitaire (Schatz, Lee et al. 1997), la rétine (Buckley, Hansson et al. 1998) et l'endothélium vasculaire (Liu, Batkai et al. 2003).

Le récepteur CB2 est majoritairement exprimé dans les cellules du système immunitaire, est abondant dans le pancréas (Juan-Pico, Fuentes et al. 2006) et les tissus du système lymphoïde comme le thymus, la rate, la moelle osseuse et les amygdales (Galiegue, Mary et al. 1995). Il est également présent dans le tissu adipeux (Starowicz, Cristino et al. 2008), le muscle squelettique (Cavuoto, McAinch et al. 2007), dans l'épiderme (Casanova, Blazquez et al. 2003) et la glie (Franklin and Stella 2003; Carrier, Kearn et al. 2004).

2) Fonctions des récepteurs CB1 et CB2

En accord avec la très large expression des récepteurs CB1 et CB2 dans différents tissus, il est maintenant bien établi que le système endocannabinoïde intervient dans la régulation de fonctions diverses et dans des processus physiopathologiques très variés en exerçant des effets bénéfiques ou délétères suivant les situations et les tissus (*Tableau 3*).

Ainsi, des agonistes du récepteur CB1 (comme le Marinol®) sont utilisés en clinique pour leurs effets antiémétiques et orexigènes chez les patients atteints de SIDA ou sous chimiothérapies, alors que des antagonistes de ce récepteur inhibent le développement de l'obésité en partie en diminuant la prise alimentaire (Despres, Golay et al. 2005).

L'utilisation d'agonistes du récepteur CB1 pourrait être intéressante dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (Izzo and Coutts 2005) alors que des antagonistes du récepteur CB1 pourraient bloquer le développement de la fibrose (Teixeira-Clerc, Julien et al. 2006). De même, des études pré cliniques indiquent que des agonistes du récepteur CB2 pourraient être intéressants dans le traitement de l'ostéoporose ou de l'athérosclérose mais que suivant les situations les agonistes du récepteur CB2 possèdent des propriétés anti-ou pro inflammatoires. Ces données soulignent l'intérêt thérapeutique potentiel à la fois des agonistes et des antagonistes de ces récepteurs mais démontrent également que l'utilisation prolongée de ces molécules peut engendrer des effets indésirables (Di Marzo 2008).

FONCTIONS	Effets	TROUBLES	Récepteurs CB1 ou CB2	RÉFÉRENCES
Métabolisme	↗	Prise alimentaire Désordres métaboliques Obésité	⎓CB1	(Ravinet Trillou, Arnone et al. 2003; Di Marzo and Matias 2005), (Despres and Lemieux 2006)
Douleurs inflammatoires	↘	Neuropathies	CB1/CB2	(Walker and Huang 2002) (Fox and Bevan 2005)
Système nerveux central	↘	Maladies neurodégénératives (Parkinson, Huntington, Gilles de la Tourette, Alzheimer)	CB1/CB2	(Ramos, Gonzalez et al. 2005)
	↘	Maladies mentales (schizophrénie, dépression, anxiété)	CB1/ CB2	(Robson 2005)
	↗	Insomnie	CB1	(Le Foll and Goldberg 2005)
	↗	Épilepsie Addiction aux drogues	CB1	
Cardio vasculaire	↘	Hypertension	CB1	(Gorelick, Heishman et al. 2006)
	↘	Problèmes circulatoires	CB1/CB2	(Steffens, Veillard et al. 2005)
	↗	Ischémie Athérosclérose	CB2	
Pulmonaire	↗	Asthme	CB2	(Calignano, Katona et al. 2000; Schmid, Niederhoffer et al. 2003) (Wahn, Wolf et al. 2005) (Yoshihara, Morimoto et al. 2005)
Visuel	↘	Glaucome Rétinopathie	CB1/ CB2	(Jarvinen, Pate et al. 2002; Tomida, Pertwee et al. 2004) ;(Robson 2005)
Cancer	↗	Tout types	CB1/CB2	(Guzman 2005)
Gastrointestinal / foie	↗	Ulcère intestinal	CB1	(Harada, Foley et al. 2004) (Darmani, Izzo et al. 2005)
	↘	Inflammations intestinale	CB1	
	↗	Maladies chroniques et aiguës du foie Fibrose Ischémie /reperfusion	CB1 ; CB2 CB2	(Teixeira-Clerc, Julien et al. 2006); (Julien, Grenard et al. 2005) (Batkai, Osei-Hyiaman et al. 2007)
Os	↘	Arthrite rumathoïde	CB1/CB2	(Malfait, Gallily et al. 2000) ; (Russo and Guy 2006) (Idris, van 't Hof et al. 2005) (Karsak, Cohen-Solal et al. 2005; Ofek, Karsak et al. 2006)
	↘	Ostéoporose	CB2 ;CB1	
Appareils reproducteurs	↗	Fertilité (masculine/féminine) Trouble de l'érection	⎓CB1	(Rossato, Ion Popa et al. 2005) (Melis, Pistis et al. 2004; Whan, West et al. 2006)

Tableau 3 : Récapitulatif des fonctions des récepteurs CB1 et CB2.

3) Les souris invalidées pour les récepteurs des cannabinoïdes, des outils indispensables à l'étude de leurs fonctions

Les souris génétiquement invalidées sont devenues des outils indispensables dans l'étude du système endocannabinoïde et dans la mise au point de traitement ciblant les récepteurs CB1 et CB2. Les souris invalidées pour les gènes des récepteurs CB1 ont été obtenues dans deux fonds génétiques différents (C57bl6J ou CD1) (Ledent, Valverde et al. 1999; Zimmer, Zimmer et al. 1999). Les souris CB1^{-/-} sur fond C57bl6 présentent un taux de mortalité plus élevé que chez les hétérozygotes + /- ou C57bl6J. Ces résultats n'ont pas été confirmés chez les souris CB1^{-/-} obtenues en fond CD1. En revanche, ces souris sont insensibles aux effets psychoactifs des cannabinoïdes et présentent une dépendance aux opioïdes réduite (Ledent, Valverde et al. 1999). Des invalidations ciblées ont été également réalisées, notamment afin d'étudier les effets spécifiquement périphériques du récepteur CB1. Ainsi des souris invalidées pour le récepteur CB1 spécifiquement dans l'hépatocyte ont été obtenues par l'équipe de Georges Kunos (Jeong, Osei-Hyiaman et al. 2008).

Les souris invalidées pour le récepteur CB2 sont viables et fertiles. Initialement l'analyse par FACS n'avait pas montré de différences de répartition des cellules immunitaires mais chez ces souris les cannabinoïdes n'inhibent plus l'activation des cellules T helper induites par les macrophages. Cependant, il a été démontré plus récemment que les souris invalidées pour CB2 présentent une déficience en lymphocytes T et B au niveau de la rate et un déficit en natural killers dans l'intestin (Zandi, Rothwarf et al. 1997).

Les souris invalidées à la fois pour les récepteurs CB1 et CB2 sont également viables et fertiles. Leur taille et leur poids sont comparables aux souris sauvages de même fond

génétique C57bl6J (Jarai, Wagner et al. 1999). L'utilisation de ces lignées a été déterminante dans la compréhension des fonctions associées à l'un ou l'autre de ces récepteurs. Elles ont notamment permis de mettre en évidence le rôle du récepteur CB1 dans l'obésité et ses complications (Di Marzo, Goparaju et al. 2001; Osei-Hyiaman, Depetrillo et al. 2005) ou l'inflammation colique (Massa, Marsicano et al. 2004). Elles ont également permis de démontrer le rôle du récepteur CB2 dans l'ostéoporose (Idris, van 't Hof et al. 2005; Ofek, Karsak et al. 2006) et de démontrer la coopération entre les récepteurs CB1 et CB2 dans la réduction des allergies cutanées (Karsak, Gaffal et al. 2007) ou de caractériser les effets des cannabinoïdes récepteurs indépendants (Jarai, Wagner et al. 1999).

Dans les paragraphes suivants, je détaillerai certaines fonctions des récepteurs CB1 et CB2 en rapport avec les travaux que j'ai réalisés dans le cadre de cette thèse.

Système endocannabinoïde et immunomodulation

Il est clairement établi que le récepteur CB2 joue un rôle important dans la réponse inflammatoire en accord avec sa forte expression dans les cellules immunitaires. Ainsi, par ordre décroissant, ce sont les lymphocytes B qui expriment majoritairement le récepteur CB2, puis les natural killers, les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes T (Bouaboula, Rinaldi et al. 1993; Galiegue, Mary et al. 1995; Schatz, Lee et al. 1997). Le système endocannabinoïde intervient dans le contrôle de l'homéostasie du système immunitaire en régulant la synthèse des cytokines pro- et anti-inflammatoires, ainsi que la migration, la prolifération et l'activation des cellules de l'immunité.

I. Régulation du système endocannabinoïde au cours de la réponse immunitaire

La réponse aux infections bactériennes déclenche une réponse immunitaire innée et adaptative. L'activation de la réponse inflammatoire dépend de la production de cytokines et de chimiokines, mais aussi d'autres facteurs produits par les cellules de l'immunité, comme l'acide arachidonique et certains de ses dérivés. De nombreuses études ont décrit la régulation de l'expression des composants du système endocannabinoïde au cours de la réponse immunitaire. En effet, *in vitro*, le lipopolysaccharide bactérien (LPS) stimule la production d'endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) par les monocytes circulants (Maccarrone, Lorenzon et al. 2000), les cellules dendritiques (Matias, Pochard et al. 2002) et les macrophages (Di Marzo, Bisogno et al. 1999); de plus le LPS diminue la dégradation des endocannabinoïdes dans les monocytes circulants en inhibant l'expression de la FAAH

(Maccarrone, De Petrocellis et al. 2001). Enfin, l'activation des cellules immunitaires par le LPS ou d'autres agents pathogènes module également l'expression des récepteurs CB1 et CB2, positivement ou négativement selon l'agent utilisé et le type cellulaire considéré (Munro, Thomas et al. 1993; Daaka, Friedman et al. 1996; Noe, Newton et al. 2000 ; Gardner, Zu et al. 2002).

II. Rôle chimioattracteur des cannabinoïdes

Après reconnaissance de l'agent pathogène, les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée produisent des facteurs chimioattractants qui provoquent notamment la migration de cellules myéloïdes et lymphoïdes au site de l'infection. Plusieurs études *in vitro* ont montré que le système endocannabinoïde stimule la migration des cellules de l'immunité. En effet, le 2-AG active la migration des éosinophiles (Oka, Ikeda et al. 2004), des macrophages (Kishimoto, Gokoh et al. 2003), de cellules dendritiques (Maestroni 2004) et d'une lignée de lymphocytes B (Rayman, Lam et al. 2004), par un mécanisme impliquant, dans la plupart des cas, le récepteur CB2 (Kishimoto, Gokoh et al. 2003; Alberich Jorda, Rayman et al. 2004). Cet effet chimioattractant et la synthèse d'endocannabinoïdes en réponse à un agent pathogène suggère que le système endocannabinoïde pourrait intervenir dans la migration de cellules myéloïdes et lymphoïdes au site de l'infection au cours de la réponse immunitaire. Il a été montré que la migration des macrophages est inhibée par le THC et le CP55 940 ainsi que par des agonistes du récepteur CB2 comme le O-2137 mais pas par des agonistes du récepteur CB1. L'inhibition par le THC est reversée par le SR144528 mais pas par le rimonabant (Raborn, Marciano-Cabral et al. 2008). Le THC inhibe ou stimule la migration des macrophages péritonéaux selon le temps d'incubation (Steffens, Veillard et al. 2005; Montecucco, Burger et al. 2008). Il a également été montré qu'un agoniste inverse du CB2 (le Sch-336) bloquait le recrutement des macrophages *in vivo* dans un modèle

d'inflammation (Lunn, Fine et al. 2006). Le récepteur CB2 joue donc un rôle important dans la migration des différentes cellules immunitaires, positif ou négatif rendant difficile à l'heure actuelle l'évaluation de son rôle chimio-attractant *in vivo* (Miller and Stella 2008).

III. Système endocannabinoïde et production de cytokines

Le système endocannabinoïde module également la production de cytokines de la réaction immunitaire innée et adaptative. Un grand nombre d'études suggère que les cannabinoïdes sont associés à une diminution des cytokines associées à la réponse Thelper1 (Th1) pro-inflammatoire, comme le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IFN}\gamma$ et une augmentation des cytokines associées à la réponse Th2 anti inflammatoire, comme l'IL4 et l'IL10 (Tableau 3). Par exemple, chez des souris traitées préalablement avec un agoniste des récepteurs des cannabinoïdes, le HU-210 ou le WIN55,212-2, on observe une baisse de la production de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL12 en réponse à une infection par *Propionibacterium Acnes*, *L pneumophila* (Buckley 2007) ou une injection de LPS (Smith, Terminelli et al. 2000). Ces effets sont associés à une augmentation de la survie de souris traitées au LPS, probablement en raison d'une augmentation de la production d'IL10 (Smith, Terminelli et al. 2000). Après injections de LPS, le taux de $\text{TNF}\alpha$ plasmatique est augmenté en réponse aux antagonistes respectifs des récepteurs CB1 et CB2 (Roche, Kelly et al. 2008). Enfin, dans des cultures de lymphocytes T, le THC diminue la synthèse de $\text{IFN}\gamma$ par un mécanisme dépendant de l'activation du récepteur CB2 (Yuan, Kiertscher et al. 2002). En accord avec les nombreuses observations décrivant la stimulation de la synthèse des cytokines de la réponse Th2 et l'inhibition de la production des cytokines de la réponse Th1, Yuan et al. ont montré que les cannabinoïdes favorisent la différenciation des cellules Thelper en cellules Th2 plutôt qu'en cellules Th1 (Yuan, Kiertscher et al. 2002). Il faut cependant souligner que quelques études décrivent un effet pro-inflammatoire des cannabinoïdes. Par exemple, dans des cultures de macrophages, le

cannabidiol provoque une augmentation de l'IL12 et une baisse de l'IL10 (Sacerdote, Martucci et al. 2005). Les cannabinoïdes peuvent également stimuler la production d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL1 et l'IL6.

Cytokine	Système	Cannabinoïde	Référence
Stimulation de la production de cytokines			
IL1	<i>In vitro</i> , macrophages de souris	THC	(Newton, Klein et al. 1998)
	<i>In vivo</i> (souris)	THC	(Klein, Newton et al. 1993)
TNF α	<i>In vitro</i> , macrophages de souris	THC	(Newton, Klein et al. 1998)
	<i>In vivo</i> (souris)	THC	(Klein, Newton et al. 1993)
IL4	<i>In vitro</i> , co-culture de lymphocytes T humains et de cellules dendritiques	THC	(Yuan, Kiertscher et al. 2002)
IL6	<i>In vivo</i> , sérum de souris	THC	(Klein, Newton et al. 1993)
IL10	<i>In vivo</i> , rate de souris	HU-210 WIN55,212-2	(Smith, Terminelli et al. 2000)
IL12	<i>In vitro/ex vivo</i> , macrophages de souris	CBD	(Sacerdote, Martucci et al. 2005)
Inhibition de la production de cytokines			
IFN γ	<i>Ex vivo</i> , rate de souris	THC	(Blanchard, Newton et al. 1986)
	<i>In vitro</i> , cellules NK humaines	THC	(Srivastava, Srivastava et al. 1998)
	<i>In vitro</i> , splénocytes de souris	THC	(Blanchard, Newton et al. 1986)
	<i>In vitro</i> , PBMC humains	THC/CBD	(Watzl, Scuderi et al. 1991)
	<i>In vitro</i> , co-culture de lymphocytes T humains et de cellules dendritiques	THC	(Yuan, Kiertscher et al. 2002)
	<i>In vitro</i> , splénocytes de souris	THC	(Newton, Klein et al. 1998)
TNF α	Lignées cellulaires de macrophages	THC	(Zheng, Specter et al. 1992)
	<i>In vitro</i> , cellules NK humaines	THC	(Kusher, Dawson et al. 1994)
	<i>In vitro</i> , PBMC humains	CBD	(Watzl, Scuderi et al. 1991)
	<i>In vitro</i> , cellules NK humaines	THC	(Srivastava, Srivastava et al. 1998)
IL1	<i>In vitro</i> , PBMC humains	CBD	(Watzl, Scuderi et al. 1991)
IL2	<i>In vitro</i> , rate de souris	THC	(Nakano, Pross et al. 1992)
IL6	<i>In vitro</i> , macrophages de souris	THC	(Newton, Klein et al. 1998)
IL10	<i>In vitro</i> , lymphocytes T humains	THC/CBD	(Srivastava, Srivastava et al. 1998)
	<i>In vitro/ex vivo</i> , macrophages de souris	CBD	(Sacerdote, Martucci et al. 2005)
IL12	<i>In vitro</i> , splénocytes/macrophages de souris	THC	(Newton, Klein et al. 1998)

Tableau 4 : Effets des cannabinoïdes sur la production de cytokines. THC= Δ 9-tétrahydrocannabinol ; CBD=cannabidiol ; PBMC=monocytes circulants.

IV. Cannabinoïdes et prolifération des cellules du système immunitaire

Des effets opposés du système endocannabinoïde ont été décrits sur la prolifération et la survie des cellules du système immunitaire. Plusieurs études ont en effet montré qu'à de fortes doses, le THC exerce un effet apoptotique sur des cellules mononuclées humaines (Schwarz, Blanco et al. 1994) ainsi que sur des macrophages et des lymphocytes de souris (Zhu, Friedman et al. 1998). De même, à fortes doses, les cannabinoïdes inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes B et T soumis à un agent mitogène comme la concanavaline A ou le LPS (Klein, Newton et al. 1985). Cependant, à plus faibles doses, les cannabinoïdes stimulent la prolifération de ces même cellules lymphocytaires (Pross, Nakano et al. 1992; Derocq, Segui et al. 1995). Ces observations suggèrent donc un effet biphasique des cannabinoïdes sur l'activation et la prolifération lymphocytaire.

En conclusion, le système endocannabinoïde intervient dans le contrôle de la réponse immunitaire de façon complexe : il exerce un rôle chimioattractant, régule la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que la prolifération et l'activation des cellules de l'immunité. Cependant, le système endocannabinoïde peut dans certains cas (i) stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération lymphocytaire, (ii) et dans d'autres stimuler la production de cytokines anti-inflammatoires, inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires ou encore inhiber l'activation et la prolifération des cellules de l'immunité. Ainsi l'action du système endocannabinoïde sur le système immunitaire dépend des agents infectieux, des cellules immunitaires considérées, du type et de la dose de cannabinoïdes utilisés. L'implication de récepteurs différents (CB1, CB2 ou récepteurs non

CB1/non CB2) pourrait donc rendre compte des différences d'effets observés. Et pour un même récepteur ses effets pro ou anti-inflammatoire dépendent du contexte, du tissu, ou de l'environnement (Miller and Stella 2008).

V. Applications thérapeutiques

Plusieurs études suggèrent que les cannabinoïdes pourraient être utilisés dans le traitement des maladies impliquant le système immunitaire comme la sclérose en plaque ou les maladies chroniques de l'intestin.

1) La sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune se traduisant par la destruction des gaines de myéline. Elle provoque l'apparition de spasmes, de tremblements et de douleurs. De nombreux patients atteints de cette pathologie ont signalé la réduction de l'intensité des symptômes après avoir consommé du cannabis (Consroe, Musty et al. 1997). Plusieurs études cliniques ont évalué l'efficacité des cannabinoïdes sur les symptômes de la sclérose en plaque avec des résultats généralement positifs (Croxford and Miller 2004; Pryce and Baker 2005). Les effets immunomodulateurs des cannabinoïdes pourraient rendre compte de leur action sur la sclérose en plaques. Dans un modèle murin de sclérose en plaques virale, les cannabinoïdes réduisent les signes cliniques de la maladie, réduction associée à une baisse du nombre de lymphocytes T myéline-spécifiques ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme IFN γ , le TNF α , l'IL1 β , et l'IL6 (Croxford and Miller 2003). Une autre équipe a montré, dans le même modèle, que des agonistes non sélectifs ou sélectifs des récepteurs CB1 (ACEA) ou CB2 (JWH-015) réduisaient le déficit neurologique en inhibant l'activation de la microglie et l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ dans le système nerveux central (Croxford and Miller 2003).

2) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Le rôle des cannabinoïdes dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin a été documenté(Izzo and Camilleri 2008). Ils pourraient agir à deux niveaux : (i) en diminuant, *via* CB2, le transit intestinal par une action inhibitrice sur la production de cytokines ou les voies inflammatoires (cyclooxygénase, NO synthase) qui contrôlent la motilité (Mathison, Ho et al. 2004), (ii) en réduisant, *via* CB1, la réponse inflammatoire comme cela a été démontré dans un modèle de colite inflammatoire induite par le DNBS (Massa, Marsicano et al. 2004).

Système endocannabinoïde et homéostasie énergétique

L'homéostasie énergétique est maintenue par un réseau de signaux périphériques et centraux qui renseigne sur le statut nutritionnel. L'intégration de ces signaux de faim et de satiété au niveau du système nerveux central (SNC) permet de développer une réponse adaptée aux modifications de la disponibilité en nutriments. Une perturbation de ce système intégrateur est probablement responsable, au moins en partie, de la propagation épidémique du syndrome métabolique dans les pays industrialisés.

I. Généralités

La prévalence de l'obésité a fortement augmenté au cours de ces vingt dernières années et l'obésité constitue aujourd'hui une véritable pandémie. En effet, l'obésité modérée de l'adulte, définie par un index de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30kg/m^2 , a augmenté de 40% en France entre 1999 et 2006 pour atteindre 12,4%. Dans le même temps, l'obésité morbide ($\text{IMC} \geq 40\text{kg/m}^2$) a doublé (0,4% versus 0,8%). Selon la dernière étude ObEpi, menée en France au cours de l'année 2006, 41,6% de la population est en surpoids ou présente une obésité modérée ou morbide (*figure 8*).

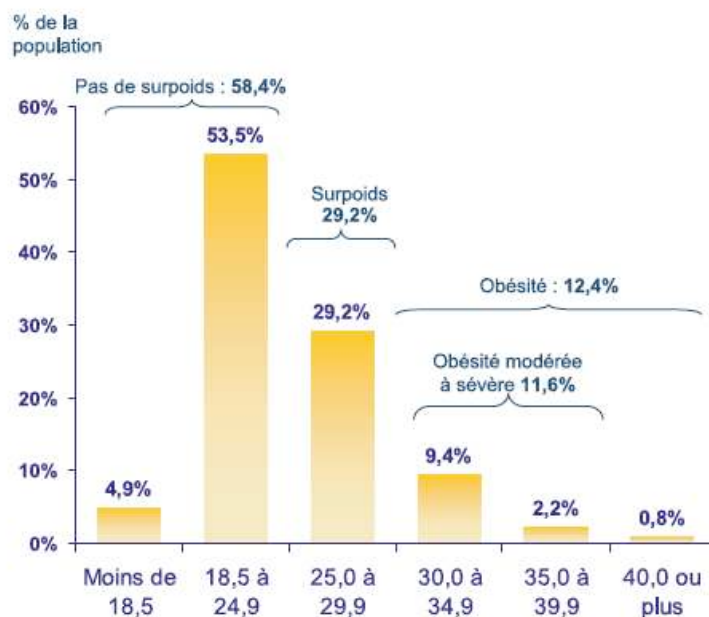


Figure 8 : Répartition de la population française en 2006 en fonction de son niveau d'IMC. Selon l'étude Obépi 2006 de Roche

Au niveau mondial, un milliard d'individus sont en surpoids, dont 300 millions sont obèses avec une incidence dans les pays industrialisés d'environ 15% à 30%. L'association entre obésité, diabète de type 2, hypertension artérielle et anomalies lipidiques est connue depuis de nombreuses années. On regroupe aujourd'hui sous le nom de syndrome métabolique la présence de plusieurs anomalies métaboliques associées à au moins deux des facteurs suivants : obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, hyperglycémie modérée à jeun associée à une insulino-résistance, hypertension artérielle. Le syndrome métabolique prédispose notamment à la survenue d'un diabète de type 2, de complications cardiovasculaires et d'une stéatopathie métabolique.

1) Etiologie et facteurs de développement

L'obésité et l'insulino-résistance représentent les facteurs prépondérants dans l'étiologie du syndrome métabolique, contribuant à l'hyperglycémie, l'hypertension et

l'hypercholestérolémie. (Standl E, 2005 suupll) Les troubles du métabolisme lipidique sont, quant à eux, à l'origine de l'accumulation de la graisse viscérale, associée à un excès d'acides gras libres provenant d'une lipolyse élevée dans le tissu adipeux. La recapture et le stockage d'acides gras libres au niveau hépatique entretiennent l'évolution du syndrome métabolique en favorisant la résistance périphérique à l'insuline, la production de VLDL et la néoglucogenèse. Ces perturbations du métabolisme des acides gras provoquent également un dysfonctionnement endothélial à l'origine du processus d'athérogenèse (Lau, Dhillon et al. 2005). Le tissu adipeux est un acteur majeur du syndrome métabolique. Au-delà de ses rôles de stockage de lipides neutres et de source d'acides gras, le tissu adipeux est un organe endocrine et paracrine qui sécrète de nombreuses cytokines ou adipokines (TNF α , IL6, adiponectine, leptine...), jouant un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique et l'inflammation systémique associée à l'obésité. Ces adipokines constituent probablement le lien moléculaire entre l'obésité et l'insulino-résistance.

Ce sont essentiellement des problèmes comportementaux et environnementaux qui vont s'associer pour surpasser les systèmes neuroendocriniens de contrôle de la balance énergétique et aboutir à une mise en réserve excessive de lipides. En effet, le confort de la vie moderne dans les sociétés des pays développés conduit à une diminution de la dépense énergétique alors que les modes alimentaires sont modifiés avec une mise à disposition plus facile des aliments et une augmentation des apports lipidiques. Mais, il existe également des prédispositions génétiques qui peuvent être à l'origine de l'obésité chez un faible pourcentage de la population.

II. Les composantes du syndrome métabolique

1) La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline se définit comme un état de diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'hormone en présence d'une concentration normale d'insuline ou comme une réponse normale au prix d'une insulïnémie élevée. En effet, tant que la sécrétion β pancréatique est suffisante pour contrer la résistance à l'insuline, la glycémie reste normale ou modérément altérée. Ainsi, le syndrome métabolique se traduit biologiquement par une hyperinsulinémie et une altération de la tolérance au glucose soit de type intolérance au glucose, soit dans l'évolution par un diabète de type 2 lorsque les capacités sécrétoires du pancréas sont dépassées. Cet état de résistance à l'insuline, au premier plan dans le syndrome métabolique, a été proposé comme étant l'altération centrale responsable, non seulement des troubles de la tolérance au glucose, mais également des autres anomalies métaboliques. Il concerne en premier lieu le foie, les muscles et le tissu adipeux. De même, la résistance de la cellule β pancréatique entraîne une altération de la sécrétion d'insuline qui précipite l'évolution vers l'hyperglycémie chronique (Grimaldi 2005).

a) Signalisation physiologique par l'insuline

L'insuline a trois tissus cibles majeurs : le foie, le muscle et le tissu adipeux. L'activation de son récepteur, du fait de la liaison d'une molécule d'insuline par récepteur, va révéler son activité tyrosine kinase et conduire à son autophosphorylation sur les résidus tyrosines. Celle-ci va permettre le recrutement à la membrane de protéines substrats qui seront également phosphorylées sur tyrosine par le récepteur. Ces protéines appartiennent à deux familles jouant des rôles relativement différents dans la transmission de l'information hormonale. La principale est la famille des protéines insulin receptor substrate (IRS) qui sont

cytosoliques et peuvent, une fois activées par le récepteur, se relocaliser dans la cellule vers différents compartiments, y adressant ainsi le message insulinaire. Après avoir été phosphorylées par le récepteur, elles recrutent à leur tour des protéines qui participent à la transmission du message. En priorité, on trouve la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K) qui va phosphoryler des lipides membranaires. Cette phosphorylation va permettre l'activation d'une kinase plus distale, la phosphatidyl-inositol-dépendent kinase 1 (PDK1), qui à son tour est capable d'activer certaines sérines/thréonines kinases de la familles des protéines kinases C (PKC), les isoformes δ et λ , ainsi que la protéine kinase B (PKB /Akt). L'activation de ces deux voies par l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux va conduire à la translocation à la membrane plasmique des vésicules intracellulaires portant les transporteurs de glucose insulino-dépendants, GLUT4 (Kahn and Flier 2000) (Virkkamaki, Ueki et al. 1999; Taniguchi, Emanuelli et al. 2006).

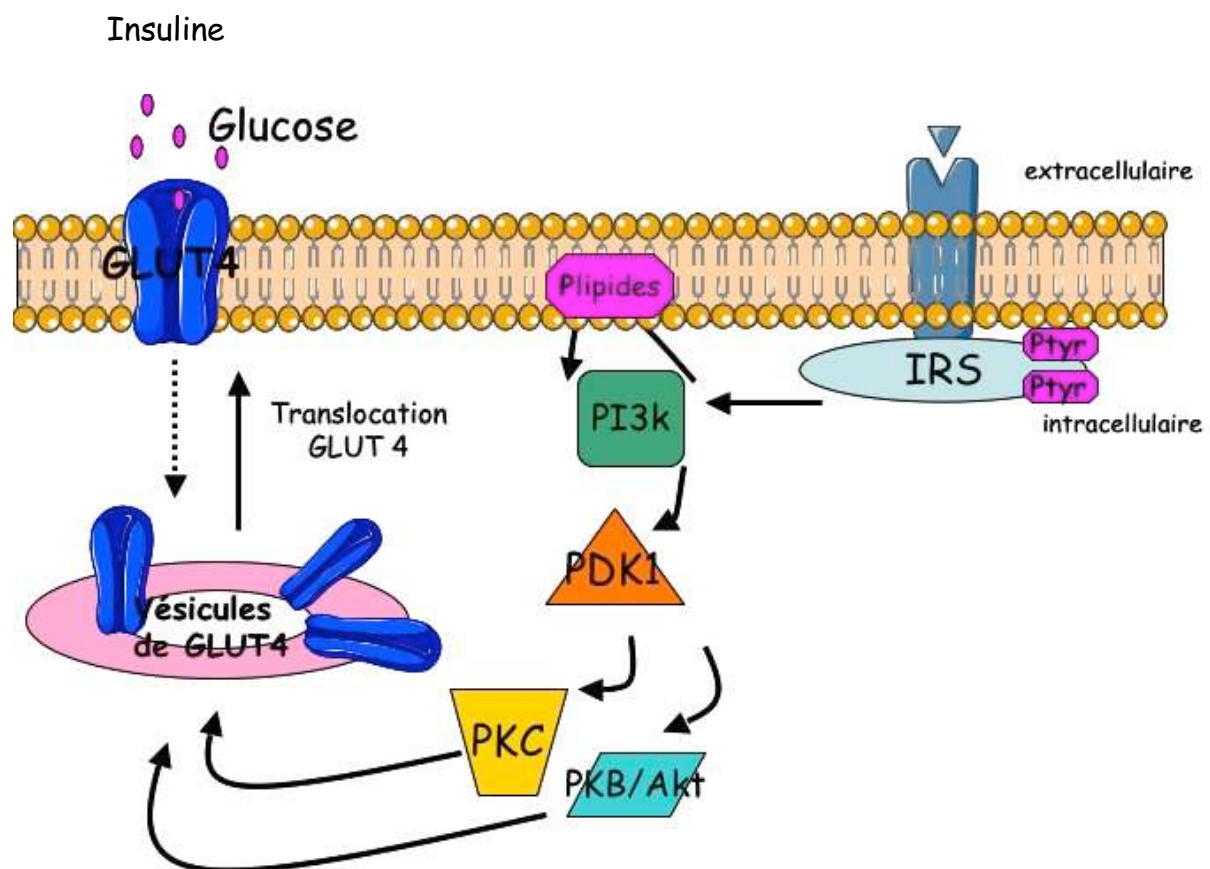


Figure 9 : Signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux et le muscle squelettique

L'activation du récepteur à l'insuline induit des phosphorylations activatrices sur les IRS1/2 entraînant une activation de la voie PI3kinase qui conduit *in fine* à la translocation des transporteurs Glut4 à la membrane.

b) Résistance cellulaire à l'insuline

Dans une cellule, la résistance à l'insuline peut toucher chacune des étapes allant du récepteur lui-même jusqu'aux étapes les plus distales. Le fonctionnement du récepteur de l'insuline, des protéines IRS ou d'autres acteurs de la transmission du message, est altéré par la présence dans la cellule de molécules inhibitrices. Cet aspect a été très largement documenté en ce qui concerne le récepteur et IRS, par la mise en évidence d'une phosphorylation inhibitrice sur des résidus sérine ou thréonine intervenant donc de façon opposée aux phosphorylations activatrices sur des résidus tyrosine (Kellerer, Lammers et al. 1999). Parmi les acteurs responsables de cette phosphorylation sur sérine on trouve, en premier lieu, la famille des protéines PKC qui ont donc une fonction ambivalente étant également, pour certaines d'entre elles, impliquées dans l'activation du transport du glucose. Une augmentation de la phosphorylation sur sérines du récepteur de l'insuline et d'IRS1 a également été retrouvée en réponse au TNF α . Si le tissu adipeux devient résistant à l'insuline, la lipolyse adipocytaire est mal freinée par cette hormone et l'excès d'acides gras circulants libérés favorise la résistance musculaire à l'insuline.

Dans le contexte de l'insulino-résistance, l'hyperinsulinémie, lorsqu'elle se prolonge, aggrave l'état de résistance en désensibilisant le récepteur et les systèmes post-récepteurs, en particulier en induisant des phosphorylations sur sérine. L'hyperglycémie joue également un rôle délétère : elle active les PKC qui phosphorylent le récepteur et les protéines IRS sur les résidus sérine.

2) Le tissu adipeux : un acteur majeur du syndrome métabolique

Le tissu adipeux est un acteur majeur du syndrome métabolique. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle délétère que pouvait jouer le tissu adipeux viscéral dans l'obésité et l'insulino-résistance, ce qui renforce l'importance que pourrait avoir son inflammation préférentielle dans le syndrome métabolique chez l'homme.

a) Physiologie du tissu adipeux

La physiologie du tissu adipeux est complexe. En effet, le métabolisme adipocytaire est contrôlé par un grand nombre de facteurs hormonaux et de cytokines, certaines cytokines étant secrétées par le tissu adipeux lui-même. Ces facteurs modulent l'état de différenciation, la prolifération et/ou l'apoptose et l'expression des enzymes importantes pour le métabolisme lipidique.

□ Composition

Le tissu adipeux blanc est un tissu hétérogène composé de nombreux types cellulaires. On distingue ainsi dans ce tissu, en plus des adipocytes blancs (responsables du rôle métabolique et sécréteur), la présence de fibres nerveuses, de vaisseaux sanguins, de précurseurs des adipocytes de forme fibroblastique tels que les préadipocytes, et des macrophages. On estime que la fraction adipocytaire ne représente que 1/3 des cellules du tissu adipeux alors que les autres types cellulaires, regroupés sous le nom de fraction stroma-vasculaire (FSV) constituent les 2/3 restants (Avram, Avram et al. 2005).

□ L'adipocyte, une cellule métabolique

Certaines enzymes sont impliquées dans la fonction de stockage des graisses comme la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse les triglycérides des VLDL et des chylomicrons,

permettant ainsi le captage des acides gras par l'adipocyte, ainsi que l'acide gras synthétase (FAS) qui intervient dans la lipogenèse ou encore la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), enzyme glycéronéogénique dans le tissu adipeux. À l'inverse, la lipase hormono sensible et la monoglycéride lipase sont des enzymes lipolytiques permettant la libération des acides gras à partir des triglycérides de stockage. L'adipocyte exprime également des récepteurs nucléaires de la famille des PPAR responsables entre autre de la différenciation des préadipocytes en adipocytes pour l'isoforme PPAR β/δ (Matsusue, Peters et al. 2004) et de la prolifération des adipocytes pour l'isoforme PPAR γ (Rangwala and Lazar 2000).

□ **L'adipocyte, une cellule sécrétrice**

L'adipocyte a été longtemps considéré comme une cellule de stockage et de réserve d'énergie sous forme de triglycérides. Cependant depuis une vingtaine d'années, l'adipocyte est étudié pour ses propriétés sécrétrices (Kahn and Flier 2000). En effet, il sécrète de nombreux facteurs de nature peptidique et non peptidique notamment des adipokines telles que la leptine, l'adiponectine, la résistine, et le TNF α (qui chez l'homme est produit par la fraction stromale vasculaire) (Fain, Bahouth et al. 2004).

La leptine

La découverte de la séquence des gènes *obese* (ob) murin et humain, a été réalisée par l'équipe de Friedman (Zhang, Proenca et al. 1994). La leptine est un peptide de 16kDa synthétisé à partir de ce gène ob et sécrété principalement par l'adipocyte dans le tissu adipeux. La leptine est une hormone circulant dans le plasma à une concentration dépendante du statut énergétique et du niveau de masse adipeuse de l'organisme. Dans les modèles murins, l'obésité est associée à une élévation du taux plasmatique de leptine tandis que les états lipodystrophiques sont associés à une réduction de ce taux (Maffei et al., 1995)

(Considine, Sinha et al. 1996). La leptine agit en se liant à des récepteurs (OB-R), faisant partie de la classe I de la super famille des récepteurs aux cytokines (dont fait partie le récepteur à l'IL6). Il existe six isoformes qui ne diffèrent que par leurs domaines cytoplasmiques de différentes longueurs conduisant au déclenchement de multiples voies de signalisation (Jak2/STAT3, MAPK, PI3K, AMPK) (Fruhbeck 2006). La leptine est considérée comme l'hormone de la satiété puisqu'elle contrôle la prise alimentaire et la dépense énergétique au niveau cérébral (Halaas, Gajiwala et al. 1995). Plusieurs modèles animaux présentent une altération du signal leptine, ce qui induit une hyperphagie. Ainsi, les souris ob/ob sont déficientes en leptine, les souris db/db et les rats fa/fa sont déficients en OB-R. Ces 3 modèles sont utilisés en tant que modèles génétiques d'obésité et d'insulino-résistance (Shore 2007). Les souris ob/ob sont immunodéficientes alors que les db/db présentent une atrophie du thymus (Kimura, Tanaka et al. 1998), suggérant un rôle important de la leptine dans le système immunitaire. Depuis de nombreuses études ont montré que outre ses effets centraux sur la prise alimentaire, la leptine agit au niveau périphérique en jouant un rôle majeur dans la régulation de la réponse inflammatoire (Lago, Gomez et al. 2008) (Otero, Lago et al. 2006) (Tilg and Moschen 2006) (Matarese, Moschos et al. 2005).

L'adiponectine

L'adiponectine est une hormone de 30kDa, synthétisée strictement par l'adipocyte (Maeda, Okubo et al. 1996). L'adiponectine exerce ses effets en se liant à deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2. AdipoR1 est exprimé dans la plupart des tissus mais plus particulièrement dans le muscle squelettique. AdipoR2, quant à lui, est exprimé dans le foie (Yamauchi et al., 2003). L'adiponectine exerce des effets insulino sensibilisateurs en activant la voie de l'AMPK. Elle augmente la translocation du transporteur GLUT4 du cytoplasme vers la membrane plasmique et facilite ainsi la captation du glucose par les tissus. Elle

diminue la production du glucose par le foie et augmente l'oxydation des acides gras (Goldfine and Kahn 2003). Outre ses propriétés insulino sensibilisatrices, l'adiponectine possède également des propriétés anti inflammatoires en diminuant la production de cytokines inflammatoires comme le $TNF\alpha$.

La résistine

La résistine est une petite protéine de 12,5kDa qui est produite par le tissu adipeux et notamment le tissu adipeux viscéral qui sécrète des quantités de résistine très supérieures au tissu adipeux sous-cutané (Steppan et al., 2001) (Atzmon, Yang et al. 2002). L'implication de la résistine dans l'homéostasie glucidique a d'abord été montrée par l'injection de cette hormone chez l'animal. Ces expériences ont montré qu'un traitement aigu par la résistine, chez la souris altérait le métabolisme glucidique (inhibition du captage de glucose en réponse à l'insuline par le tissu adipeux et production accrue de glucose par le foie conduisant ainsi à l'apparition d'une résistance à l'insuline qui pouvait être contrecarrée par des anticorps neutralisant la résistine (Steppan et al., 2001) (Lee et al., 2005). Chez la souris, la résistine est un marqueur d'insulino-résistance (Muse et al., 2004) (Muse, Lam et al. 2007). En revanche chez l'homme, la résistine apparaît comme un marqueur de l'inflammation (Bokarewa et al., 2005). Elle est principalement synthétisée par la fraction non adipocytaire et plus particulièrement par les macrophages humains (Fain et al., 2003) (Patel, Hezode et al. 2003). Il existe une corrélation entre les taux circulants de CCL2 qui sont élevés au cours de l'insulino-résistance chez les personnes obèses et les taux de résistine plasmatique (Aquilante, Kosmiski et al. 2008). De plus, la résistine est exprimée par le foie humain au niveau des hépatocytes. En outre, la résistine induit une insulino-résistance hépatique en bloquant les voies de signalisation de l'insuline (comme PI-3K / Akt) (Sheng, Di et al. 2008).

b) Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation associée à l'obésité

L'obésité est depuis peu considérée comme un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit, à l'instar de nombreuses pathologies qui lui sont associées comme l'athérosclérose, le diabète de type 2 et la stéatose. Les données accumulées ces quinze dernières années ont démontré le rôle majeur du tissu adipeux dans l'inflammation associée à l'obésité. De plus, il semble bien établi que la production excessive de facteurs inflammatoires contribue au développement de l'insulino-résistance.

Une série de données récentes montre que le tissu adipeux exprime de nombreux facteurs pro- et anti-inflammatoires et contribue vraisemblablement à l'augmentation de leurs taux circulants chez l'obèse. Le tissu adipeux produit donc des cytokines inflammatoires (TNF α , TGF β , interféron γ , IL1, IL6, IL10 et IL8, ostéopontine), des chimiokines (CCL2) et diverses autres biomolécules, comme les adipokines (leptine, adiponectine). L'expression et la production de certains de ces facteurs par le tissu adipeux humain sont augmentées au cours de l'obésité, comme le TNF α (Hotamisligil et al., 1993) (Kern et al., 1995) IL6 (Kern, Ranganathan et al. 2001), l'ostéopontine (Nomiyama et al., 2007). À l'inverse, l'amaigrissement est associé à une diminution de l'expression des marqueurs de l'inflammation comme l'IL6 (Bastard, Jardel et al. 2000). Par contre, l'obésité est associée à une diminution de la production d'adiponectine (Stefan and Stumvoll 2002).

Les travaux récents chez l'homme et chez l'animal suggèrent que la sécrétion de molécules liées à l'inflammation peuvent être produites par les adipocytes mais également par les macrophages de la FSV, dont le rôle particulièrement délétère au cours de l'obésité a été

clairement démontré. (Fain et al., 2004; Bouloumie et al., 2005; Wellen et Hotamisligil, 2005)

□ Mécanismes de l'infiltration inflammatoire

Les mécanismes facilitant l'infiltration macrophagique et l'activation des macrophages dans le tissu adipeux sont vraisemblablement multiples. Des signaux paracrines, autocrines et endocrines aussi bien que des modifications mécaniques (c'est-à-dire liées à l'hypertrophie et l'hyperplasie) peuvent jouer un rôle. Des chimiokines, telles que CCL2 sont impliquées dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux. En effet, chez des souris invalidées pour CCL2 sous régime hyperlipidique, l'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux est réduite par rapport aux souris sauvages (Kanda et al., 2006). De même, chez les souris invalidées pour le récepteur du CCL2: CCR2, l'infiltration macrophagique du tissu adipeux est réduite lors d'un régime hyperlipidique (Weisberg et al., 2006). Il en est de même pour les souris invalidées pour l'ostéopontine, démontrant ainsi que l'ostéopontine joue également un rôle déterminant dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux (Nomiya, Perez-Tilve et al. 2007) (Bertola, Deveau et al. 2008). Des études *in vitro* suggèrent également que la leptine favorise l'adhérence de macrophages dérivés des monocytes aux cellules endothéliales du tissu adipeux (Curat et al., 2004). À l'inverse, l'adiponectine inhibe ce processus dans un modèle de cellules endothéliales aortiques (Ouchi et al., 2003). Ces observations soulèvent la possibilité d'une action locale de ces deux adipokines, exerçant des effets inverses ou antagonistes quant au recrutement des macrophages dans le tissu adipeux.

Les macrophages présents dans le tissu adipeux ont fait l'objet de nombreuses études. En effet, leur proportion et leur phénotype varient au cours de l'obésité (Bouloumie, Curat et al. 2005)(Weisberg et al., 2003; Lumeng et al., 2007). Chez la souris, deux populations de macrophages semblent co-exister dans le tissu adipeux au cours du développement de

l'obésité. Une population M1 présentant un phénotype pro-inflammatoire qui augmente au cours de l'obésité et les M2 présentant un phénotype anti-inflammatoire (Lumeng, Bodzin et al. 2007). Les M1 pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline associée à l'obésité *via* la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires (Xu et al., 2003) (Lumeng, Deyoung et al. 2007). Lorsque cette population M1 (CD11c+) est déplétée, le tissu adipeux des souris obèses sécrète moins de cytokines pro-inflammatoires (IL6) et plus de cytokines anti-inflammatoires. Ces souris sont plus sensibles à l'insuline que des souris obèses contrôle (Patsouris, Li et al. 2008). À l'inverse, les M2 joueraient un rôle bénéfique et permettraient, *via* le récepteur nucléaire PPAR γ (Hevener, Olefsky et al. 2007; Odegaard, Ricardo-Gonzalez et al. 2007) ainsi que par le récepteur PPAR δ (Odegaard, Ricardo-Gonzalez et al. 2008) de maintenir la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux. Les mécanismes responsables de la transition M1-M2 restent à déterminer. Ces deux populations de macrophages existent dans d'autres tissus notamment dans le foie. Une étude récente sur l'obésité a montré que les Kupffer de phénotype M2 activés par les récepteurs nucléaires PPAR δ contribuent à une amélioration de l'insulino-résistance (Kang, Reilly et al. 2008; Odegaard, Ricardo-Gonzalez et al. 2008).

□ L'inflammation du tissu adipeux : le lien entre l'insulino-résistance et l'obésité

Plusieurs expérimentations suggèrent que l'infiltration macrophagique peut ainsi modifier la biologie des adipocytes. Parmi ces molécules inflammatoires produites par la FSV, le TNF α exerce un puissant effet inhibiteur sur la différenciation adipocytaire. Le TNF α et d'autres cytokines, comme l'IL6, favorisent la résistance à l'insuline des cellules adipocytaires. Ainsi, l'IL6 induit une diminution de l'expression du récepteur de l'insuline et de IRS-1 dans l'adipocyte et inhibe l'activation des kinases Akt/PKB par l'insuline (Lagathu,

Bastard et al. 2003) (Schenk, Saberi et al. 2008) (*figure 10*).

Deux facteurs transcriptionnels majeurs de l'inflammation, NF κ B, et AP-1, et leurs enzymes partenaires clés (IKK et JNK) ont été particulièrement étudiés notamment dans le cadre des effets pro-inflammatoires de l'obésité et de l'insulino-résistance. Il faut souligner que ces deux voies sont activées en réponse non seulement aux adipokines, notamment au TNF α (Shoelson, Herrero et al. 2007), mais également aux acides gras libres présents en excès (Lee, Sohn et al. 2001), au stress oxydatif (Furukawa, Fujita et al. 2004) et au stress du réticulum endoplasmique (Ozcan, Cao et al. 2004).

L'invalidation des gènes participant à ces complexes de transcription module la sensibilité à l'insuline. Les souris IKK +/- nourries avec un régime hyperlipidique, ou croisées avec des souris ob/ob, présentent une baisse significative de leur glycémie et une insulino-résistance améliorée (Yuan, Konstantopoulos et al. 2001), avec en parallèle une réponse insulinémique plus performante (Kim, Kim et al. 2001). En revanche, une activation tissu-spécifique de IKK- β dans le tissu adipeux et dans le foie, mais pas dans le muscle, provoque une insulino-résistance systémique. En accord avec ces résultats, une inhibition sélective de la fonction de NF κ B dans le tissu adipeux et dans le foie, mais pas dans le muscle protège contre le développement d'une insulino-résistance dans des modèles d'obésité nutritionnelle ou génétique (Cai, Yuan et al. 2005).

L'activité JNK, principalement liée à l'isoforme JNK1, est augmentée chez les souris obèses. Les animaux invalidés pour JNK1 prennent moins de poids et sont moins susceptibles de détériorer leur sensibilité à l'insuline, que ce soit au cours d'un régime hyperlipidique ou d'une obésité génétique (Hirosumi, Tuncman et al. 2002). La suppression de la voie JNK dans le foie réduit l'insulino-résistance dans des modèles de diabète (Nakatani, Kaneto et al. 2004).

L'implication de ces voies de l'inflammation est également très fortement suggérée par l'effet protecteur de certains composés anti-inflammatoires vis-à-vis de l'insulino-résistance associée à l'obésité. Ainsi, l'aspirine est capable d'inhiber non seulement les voies IKK et JNK (Yin, Yamamoto et al. 1998; Hundal, Petersen et al. 2002; Gao, Zuberi et al. 2003; Shoelson, Lee et al. 2003), mais également d'autres sérine/thréonine kinases impliquées dans l'insulino-résistance induite par le TNF α . En outre, grâce à ses propriétés antioxydantes, l'aspirine réduit l'activation de NF- κ B et AP-1 en réponse au stress oxydant (Gao, Zuberi et al. 2003).

Les cytokines principalement responsables de cette insulino-résistance sont le TNF α et l'IL6. Les souris TNF $^{-/-}$ présentent une sensibilité à l'insuline accrue (Ventre, Doebber et al. 1997) et un taux d'acides gras circulants réduits. Pour ce qui est de l'IL6, elle réduit l'insulino-résistance tissulaire et systémique *via* la voie JAK/STAT en impliquant une induction du facteur SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3) qui assure un rétrocontrôle négatif du signal porté par l'insuline et la leptine (Rieusset, Bouzakri et al. 2004; Kim, Kim et al. 2008). Ces différentes études montrent donc le lien étroit entre le développement de l'insulino-résistance et de l'inflammation, *via* les cytokines inflammatoires comme le TNF et l'IL6.

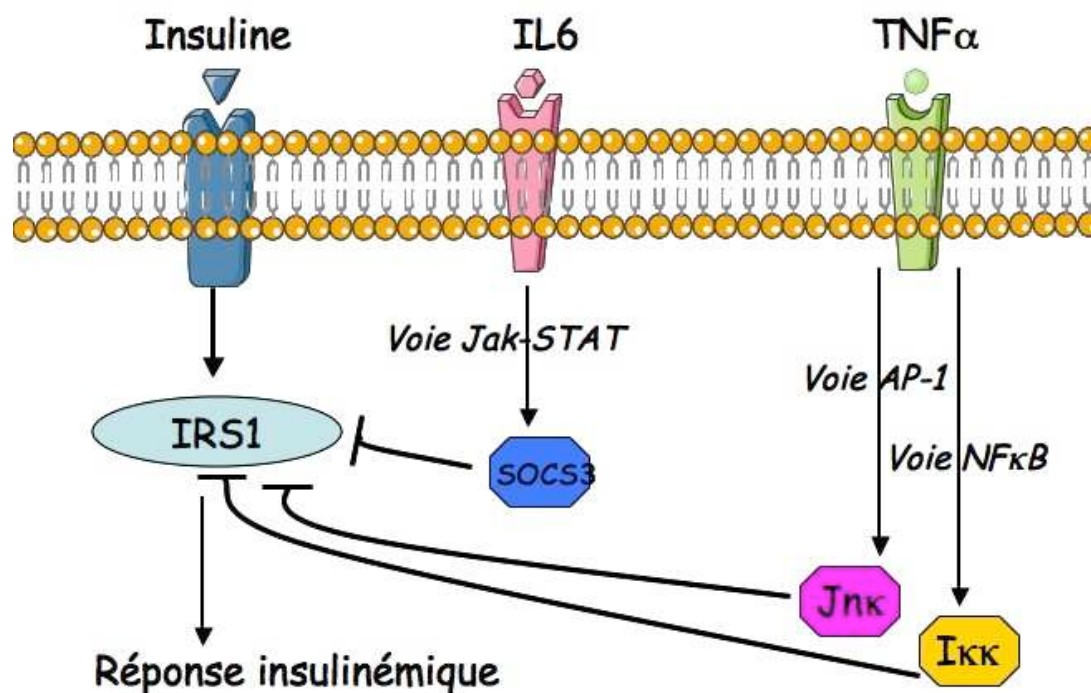


Figure 10 : Interaction des voies de signalisation de l'inflammation et de l'insuline. Les voies de signalisation induites par le TNF et l'IL6 inhibent la phosphorylation de l'IRS1 ce qui annule la réponse insulinémique.

En conclusion, l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux chez l'obèse contribue à l'augmentation des concentrations systémiques de certaines cytokines inflammatoires. Ces molécules peuvent agir à distance de leur site de production et sont susceptibles de constituer un lien moléculaire entre tissu adipeux et les complications métaboliques, cardiovasculaires, voire même hépatiques associées à l'obésité. Le TNF α et l'IL6, sont produits par les macrophages activés (Lehrke, Reilly et al. 2004) et peuvent, comme on vient de le voir, directement contribuer aux mécanismes d'altération de la sensibilité à l'insuline dans différents tissus (*figure 10*) en inhibant la signalisation de l'insuline (Trayhurn and Wood 2005) (Wisse 2004). D'où cette relation étroite entre l'obésité et l'insulino-résistance *via* l'inflammation du tissu adipeux.

3) La stéatose

Dans le foie, l'obésité entraîne une stéatose, c'est-à-dire une accumulation excessive de triglycérides dans les hépatocytes. La prévalence de la stéatose est de l'ordre de 15 à 25 % dans la population générale (Browning and Horton 2004), et de 60 %, en moyenne, chez les patients obèses (cette valeur atteignant 100% chez les patients diabétiques) (Angulo and Lindor 2002). La stéatose peut être bénigne, non inflammatoire et rester stable sans provoquer d'autre complication hépatique. Elle est aujourd'hui considérée comme l'une des composantes du syndrome métabolique.

Dans un foie sain, le stock de triglycérides qui résulte du métabolisme lipidique est tel qu'il n'est pas visible en microscopie optique dans le cytoplasme des hépatocytes. En revanche dans un foie stéatosique, l'examen microscopique montre des vacuoles optiquement vides dans le cytoplasme des hépatocytes, déformant la structure même du parenchyme hépatique. Schématiquement, on distingue deux types de stéatose, en fonction de la morphologie et de la taille des gouttelettes lipidiques : la stéatose microvésiculaire et la stéatose macrovésiculaire (Brunt 2001).

a) Mécanismes physiopathologiques

Le foie est le premier organe qui rencontre les nutriments après leur digestion et l'absorption intestinale. Schématiquement, l'afflux d'acides gras libres (AGL) arrivant par la veine porte peut être géré de trois façons par le foie : i) les AGL peuvent être totalement dégradés en acétyl-CoA, principalement par la β -oxydation mitochondriale, pour produire l'essentiel de l'énergie du foie sous forme d'ATP, ou ii) être estérifiés pour être stockés sous

forme de triglycérides, ou iii) encore combinés à des protéines pour être sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de VLDL.

Une autre voie intervient dans le développement de la stéatose, il s'agit de la lipogenèse. C'est la voie métabolique qui permet de synthétiser des acides gras à partir du glucose. Elle nécessite le métabolisme du glucose en pyruvate par la voie de la glycolyse permettant ainsi de fournir les carbones nécessaires à la synthèse des acides gras. L'activité de la glycolyse et de la lipogenèse est étroitement contrôlée par les conditions nutritionnelles. Ainsi, un repas riche en hydrates de carbone stimule la synthèse de lipides alors que le jeûne ou un repas riche en lipides l'inhibe. Les enzymes impliquées dans ces voies incluent la glucokinase (GK) et la pyruvate kinase (L-PK) pour la glycolyse, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS) pour la lipogenèse (*figure 11*). Leur régulation s'effectue entre autre au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription comme SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein de type 1c) et ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein) , qui respectivement sous l'action du glucose ou de l'insuline induisent la lipogenèse (Robichon, Girard et al. 2008).

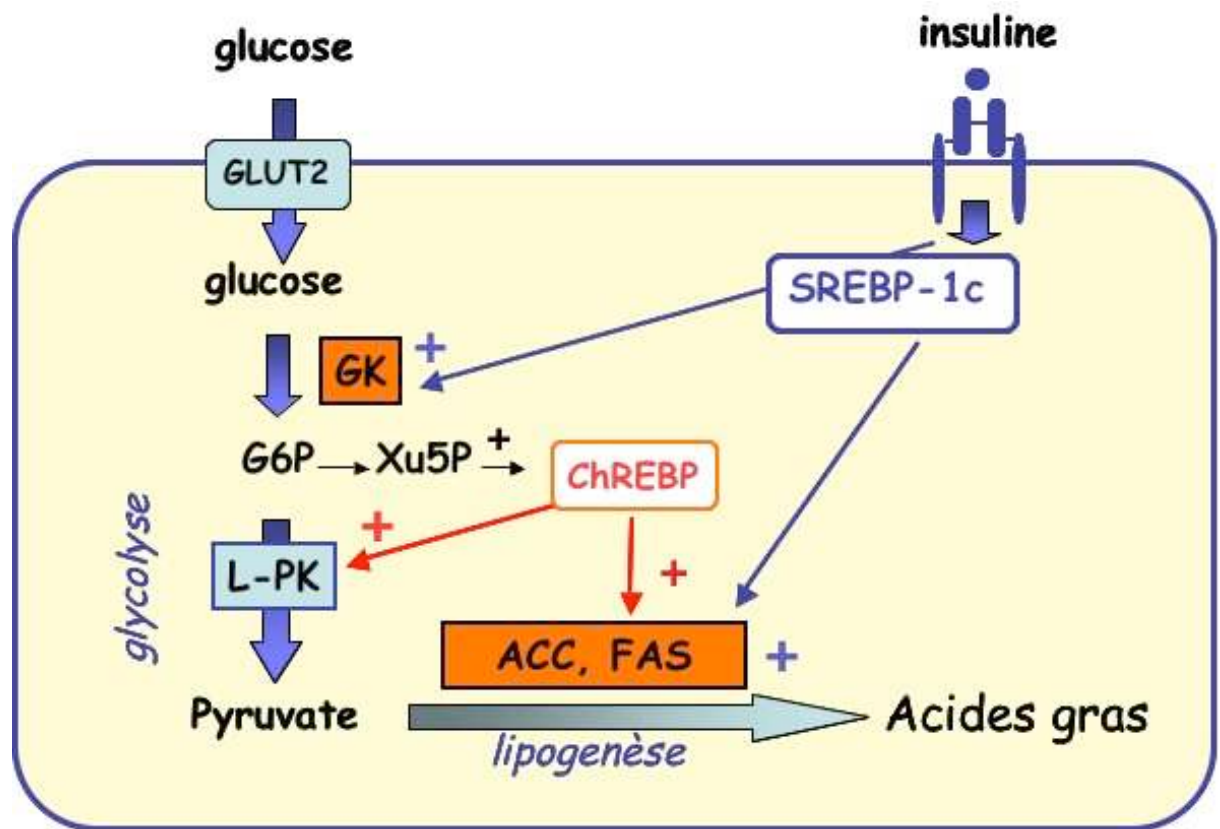


Figure 11: Action des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP sur les voies de la glycolyse et de la lipogenèse dans l'hépatocyte. D'après (Robichon, Girard et al. 2008)

Le contenu lipidique des hépatocytes est régulé par les activités enzymatiques qui catalysent la capture, la synthèse, l'oxydation et l'export des lipides. Lorsque l'entrée des acides gras dans ce système est supérieure à la capacité du foie à dégrader ou sécréter les acides gras, la stéatose se développe. La saturation de la capacité de stockage par les hépatocytes peut être due à une augmentation d'entrée des AGL dans les hépatocytes, à une induction de la synthèse de *novo* d'acides gras, à un défaut d'oxydation des acides gras, ou à un défaut de sécrétion des acides gras dans la circulation sous forme de VLDL. Il faut noter que l'insulino-résistance module toutes les composantes impliquées dans le développement de la stéatose.

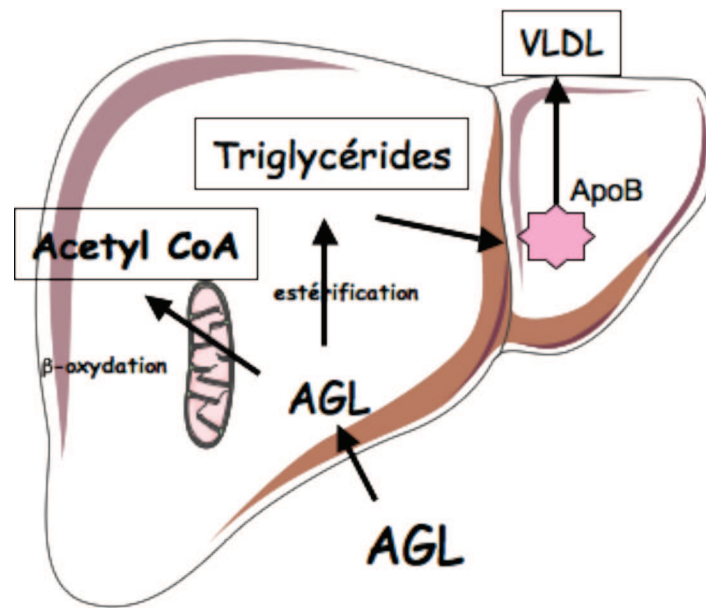


Figure 12 : Métabolisme des acides gras dans le foie. Une fois arrivés dans le foie les acides gras libres (AGL) vont être β -oxydés dans la mitochondrie pour fournir de l'énergie au foie ou estérifiés pour se transformer en triglycérides et être relargués dans la circulation générale sous forme de VLDL.

b) Conséquences de l'insulino-résistance sur le développement de la stéatose

Dans un adipocyte sain, les lipides sont synthétisés, mis en réserve puis, au fur à mesure des besoins, dégradés par lipolyse. Plusieurs enzymes catalysent les différentes étapes de la lipolyse, et libèrent successivement les acides gras. L'une de ces enzymes, la triglycéride lipase ou lipase hormono-sensible (LHS) est activée par le glucagon et inhibée par l'insuline. Dans le contexte de l'insulino-résistance, les adipocytes ne sont pas capables de répondre correctement aux effets de l'insuline, ils ne sont plus réceptifs à l'inhibition de la LHS. Cette levée d'inhibition (de la LHS) active alors la dégradation des triglycérides et, par conséquent, la libération d'AGL dans la circulation, qui arrivent au foie *via* la veine porte. Des études récentes ont démontré le rôle du transporteur CD36 dans le transport des acides gras dans l'hépatocyte au cours de la stéatose (Ibrahimi and Abumrad 2002; Bradbury 2006). Le transporteur CD36 est une glycoprotéine membranaire cible de certains facteurs de

transcription, notamment des PPAR γ (Zhou, Febbraio et al. 2008). Son activation constituerait l'un des mécanismes des effets stéatogènes des PPAR γ .

Conséquence de l'insulino-résistance sur la stéatose

Dans le cadre de l'insulino-résistance, la production hépatique de glucose est augmentée, de façon concomitante à une hyperinsulinémie. L'hyperglycémie active ChREBP et l'hyperinsulinémie induit le facteur de transcription SREBP-1c. L'action simultanée et synergique de SREBP-1c et de ChREBP conduisent, chez le rat, à l'activation transcriptionnelle des gènes de la lipogenèse hépatique précédemment décrits (FAS et ACC) (Assimacopoulos-Jeannet, Brichard et al. 1995). Une étude récente a montré dans le modèle murin d'obésité *ob/ob* que la lipogenèse est anormalement élevée en raison de la surexpression du facteur de transcription ChREBP dans le foie (Dentin, Benhamed et al. 2006; Postic and Girard 2008). Dans ce modèle le blocage de ChREBP spécifiquement dans le foie diminue la stéatose, les taux sériques de triglycérides et d'acides gras non estérifiés et améliore de façon significative la sensibilité du foie à l'insuline.

Ainsi dans le contexte de la résistance à l'insuline, les AGL provenant de la circulation et de la lipogenèse hépatique *de novo*, sont préférentiellement estérifiés en triglycérides pour être stockés. Leur excrétion vers la circulation générale est assurée par une protéine de transfert MTP (microsomal triglyceride transfer protein) qui transfère les triglycérides hépatiques vers l'apoB afin de permettre la synthèse des VLDL. Ce transfert est inhibé par des cytokines inflammatoires réduisant l'activité des MTP (Navasa, Gordon et al. 1998; Avramoglu, Basciano et al. 2006). L'insulino-résistance diminue l'activité de la MTP ce qui conduit à un excès de triglycérides hépatiques (Kamagate, Qu et al. 2008).

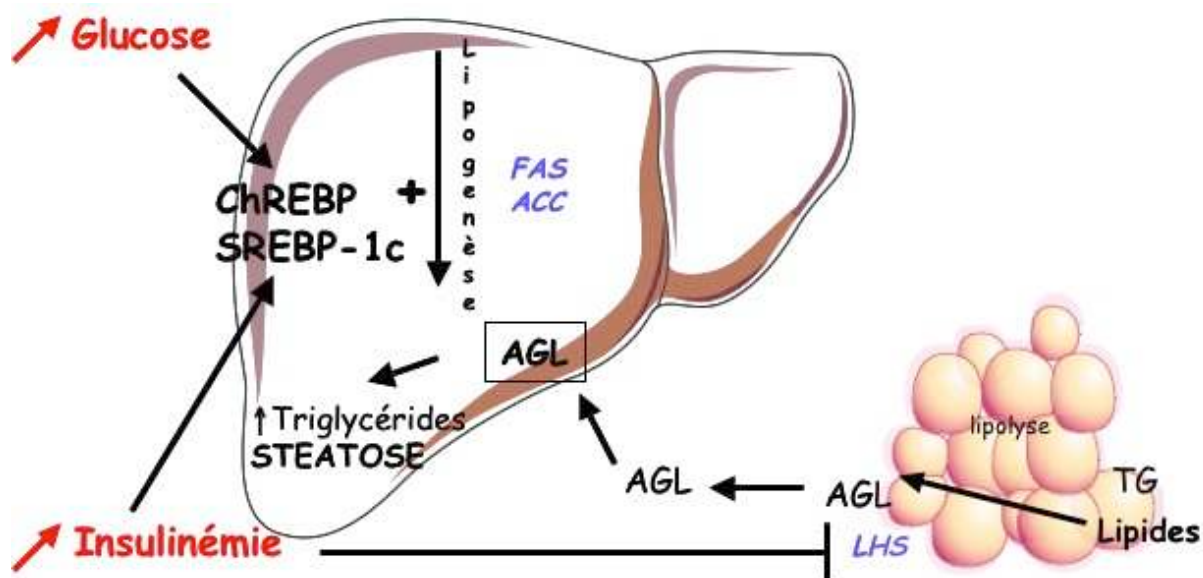


Figure 13 : Résistance à l'insuline et accumulation de triglycérides dans le foie.

La résistance à l'insuline est caractérisée par une hyper insulinémie et une production hépatique de glucose augmentée. Dans le tissu adipeux, l'inhibition exercée par la lipase hormonosensible (LHS) est levée, conduisant à la dégradation des triglycérides stockés dans les adipocytes et la libération des AGL hors du tissu adipeux. Dans le foie l'hyper insulinémie induit le facteur de transcription SREBP-1c, et l'hyperglycémie active ChREBP. Les actions simultanées et synergiques de SREBP-1c et ChREBP conduisent à l'activation transcriptionnelles des gènes des enzymes de la lipogenèse (FAS, ACC). Ainsi, toute la machinerie cellulaire concourt à la conversion de l'excès de glucose en AGL. Donc, l'accumulation des AGL provenant de la périphérie et de la lipogenèse hépatique conduit à l'excès de triglycérides dans le foie et provoque le développement de la stéatose extra-hépatique (Browning and Horton 2004).

III. Le système cannabinoïde et la régulation de l'homéostasie énergétique

Les effets orexigènes de la marijuana sont connus depuis des siècles. Les travaux réalisés depuis une vingtaine d'années ont permis de mettre en évidence le rôle du système endocannabinoïde non seulement dans le contrôle de la prise alimentaire mais également dans la régulation de l'homéostasie énergétique, par des mécanismes centraux et périphériques.

L'ensemble de ces données a permis de démontrer le rôle central du système endocannabinoïde dans le développement de l'obésité et de ses complications cardiométaboliques (Arnone, Maruani et al. 1997; Colombo, Agabio et al. 1998).

L'hypothalamus est la principale région du cerveau impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique (Kalra, Dube et al. 1999). Cette fonction est assurée par la production de neurotransmetteurs (sérotonine, noradrénaline) et de neuropeptides orexigènes, comme le neuropeptide Y et l'orexine, ou de neuropeptides anorexigènes. Il est un relais métabolique qui intègre des signaux circulants anorexigènes comme la leptine, l'insuline ou des signaux orexigènes comme la ghréline (sécritée par l'estomac et l'intestin pour induire un message de faim).

1) Système endocannabinoïde et contrôle de la prise alimentaire

De nombreuses études ont démontré le rôle du récepteur CB1 central dans le contrôle de la prise alimentaire. En effet, comme cela a été décrit pour d'autres hormones orexigènes, la concentration en endocannabinoïdes dans l'hypothalamus (i) est maximale au moment du jeûne et minimale au moment de la prise alimentaire, (ii) est inversement corrélée avec la production de leptine, et (iii) est inhibée par la leptine (Di Marzo, Goparaju et al. 2001; Kirkham, Williams et al. 2002). De plus, la sécrétion de ghréline est bloquée par le rimonabant, ce qui va augmenter le signal de satiété (Gomez, Navarro et al. 2002). Enfin, les cannabinoïdes (THC, 2-AG, anandamide) stimulent l'appétit lorsqu'ils sont administrés *per os*, de façon systémique ou directement dans l'hypothalamus (Williams, Rogers et al. 1998; Williams and Kirkham 1999; Jamshidi and Taylor 2001). Ces effets sont dépendants de l'activation du récepteur CB1 puisqu'ils sont bloqués par le rimonabant (Williams and Kirkham 1999). Les cannabinoïdes exercent leurs effets orexigènes en contrôlant l'expression et l'action d'autres hormones orexigènes (comme la ghréline) ou anorexigènes (comme la

leptine). Ainsi, les antagonistes du récepteur CB1 administrés seuls exercent un effet anorexigène chez le rat et la souris sauvage, mais pas chez les souris invalidées pour le gène du récepteur CB1 (Colombo, Agabio et al. 1998; Di Marzo, Goparaju et al. 2001). En accord avec ces données, après un jeûne de 18h, la prise alimentaire des souris invalidées pour le gène du récepteur CB1 est réduite par rapport à leurs homologues sauvages (Di Marzo, Goparaju et al. 2001). Ces observations suggèrent l'existence, dans des conditions normales, d'un tonus endocannabinoïde impliqué physiologiquement dans la régulation de la prise alimentaire. Elles suggéraient également un rôle du récepteur CB1 dans le contrôle de la prise alimentaire au cours de l'obésité.

Effectivement, le système endocannabinoïde est suractivé au cours de l'obésité, comme le montrent les résultats obtenus chez l'homme et dans des modèles expérimentaux. Ainsi la concentration sérique et hypothalamique d'endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) est augmentée chez le rat fa/fa et la souris ob/ob (Di Marzo, Goparaju et al. 2001). De même, la concentration sérique en endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG) est augmentée chez les patients obèses (Engeli, Bohnke et al. 2005). Ces résultats suggèrent que les endocannabinoïdes pourraient constitutivement activer le récepteur CB1 hypothalamique pour maintenir élevée la prise alimentaire chez les obèses. Ils mettent également en évidence que la perte de poids provoquée par le rimonabant (Colombo, Agabio et al. 1998; Despres, Golay et al. 2005; Van Gaal, Rissanen et al. 2005; Scheen, Finer et al. 2006) est due, au moins en partie, à la baisse rapide de la prise alimentaire pendant les premiers jours de traitement, *via* la régulation de l'expression des peptides orexigènes et anorexigènes. Cependant les effets bénéfiques du rimonabant sur la réduction de la surcharge pondérale impliquent également des mécanismes indépendants de ceux régulant la prise alimentaire, puisque la perte de poids persiste au cours du traitement alors que la prise alimentaire revient à la normale (Bensaid, Gary-Bobo et al. 2003; Vickers, Webster et al. 2003). Ces données démontrent que le

rimonabant réduit à la fois la prise alimentaire précocement en bloquant les récepteurs CB1 centraux et, plus tardivement, agit sur le métabolisme énergétique, *via* des récepteurs périphériques. Ces observations ont conduit à la mise en évidence du rôle des récepteurs CB1 périphériques dans le contrôle du métabolisme énergétique au cours de l'obésité notamment dans le tissu adipeux et le foie.

2) Rôle du récepteur CB1 dans l'insulino-résistance

Plusieurs études ont montré que le blocage du récepteur CB1 par le Rimonabant améliore les différentes composantes du syndrome métabolique, notamment l'insulino-résistance et la tolérance au glucose (Despres, Golay et al. 2005; Van Gaal, Rissanen et al. 2005; Pi-Sunyer, Aronne et al. 2006). Le récepteur CB1 est présent dans les tissus cibles de l'insuline notamment le tissu adipeux, le muscle squelettique (Cota, Marsicano et al. 2003; Pagotto, Marsicano et al. 2006), le foie (Osei-Hyiaman, Depetrillo et al. 2005). Il est également exprimé dans le pancréas (Juan-Pico, Fuentes et al. 2006). Dans ces tissus, on observe une augmentation de l'expression du récepteur CB1 au cours de l'obésité. La contribution du récepteur CB1 dans l'insulino-résistance a été démontrée *in vivo* dans le muscle, où l'administration de rimonabant à des souris ob/ob améliore la captation du glucose dans le muscle squelettique (Liu, Connoley et al. 2005; Pagotto, Marsicano et al. 2006) et également *in vitro* dans des myocytes isolés de muscle squelettique dans lesquels le rimonabant stimule la captation de glucose *via* la régulation de la voie PI3kinase (Esposito, Proto et al. 2008). A l'inverse l'activation du récepteur CB1 par un agoniste sélectif de ce récepteur (le Arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA)) déclenche une intolérance au glucose (Bermudez-Siva, Serrano et al. 2006). Le récepteur CB1 hépatique pourrait également contribuer à l'insulino-résistance associée à l'obésité. En effet, les souris invalidées pour le récepteur CB1 hépatocytaire développent un surpoids comparable à celui des souris sauvages

mais sont insulino sensibles (Kunos, Osei-Hyiaman et al. 2008). Enfin, le rôle du récepteur CB1 dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans le pancréas endocrine a été suggéré, mais est controversé avec un effet stimulateur (Matias, Gonthier et al. 2006) ou inhibiteur (Nakata and Yada 2008) selon les études.

3) Système endocannabinoïde et tissu adipeux

Différentes études ont montré que les adipocytes différenciés expriment non seulement le récepteur CB1 (Bensaid, Gary-Bobo et al. 2003; Cota, Marsicano et al. 2003; Pagano, Pilon et al. 2007) mais aussi les enzymes (FAAH, DAGL, MAGL) impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des endocannabinoïdes. Chez le rat Zucker, l'expression adipocytaire du récepteur CB1 est augmentée par rapport à celles des adipocytes des rats normaux (Bensaid, Gary-Bobo et al. 2003). Dans les adipocytes en culture primaire, la stimulation du récepteur CB1 entraîne l'activation de la lipoprotéine lipase (Cota, Marsicano et al. 2003) et diminue l'expression d'adiponectine (Bensaid, Gary-Bobo et al. 2003; Matias, Gonthier et al. 2006), pouvant ainsi contribuer à l'accumulation de lipides en fournissant respectivement les acides gras pour la synthèse des triglycérides et en réduisant l'oxydation des acides gras. En accord avec ces données, l'administration chronique de rimonabant chez la souris obèse réduit la masse grasse consécutivement à l'induction des enzymes de la β -oxydation (l'éonyl coA hydratase) (Jbilo, Ravinet-Trillou et al. 2005). De plus, il existe une corrélation inverse entre l'expression de la FAAH dans le tissu adipeux et la quantité de tissu adipeux viscéral chez les patients obèses (Bluher, Engeli et al. 2006; Kempf, Hector et al. 2007), ce qui pourrait contribuer à l'effet lipogénique de l'anandamide par un mécanisme qui reste à déterminer.

4) Système endocannabinoïde et métabolisme lipidique hépatique.

Dans le foie, le récepteur CB1 est exprimé dans l'hépatocyte et est impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique (Osei-Hyiaman, DePetrillo et al. 2005). En

effet, l'administration d'un agoniste des récepteurs des cannabinoïdes, le HU-210, chez la souris, stimule la lipogenèse dans le foie normal par un mécanisme CB1 dépendant. Les mécanismes impliqués dans cet effet lipogénique incluent l'activation du facteur de transcription SREBP-1c et des enzymes impliquées dans la lipogenèse, l'ACC et la FAS (Shimomura, Hammer et al. 1998). De plus, dans un modèle murin d'obésité induite par un régime hyperlipidique, on observe une surexpression du récepteur CB1 et une augmentation de la production d'anandamide. Dans ce modèle, la stéatose massive observée chez les souris sauvages obèses est réduite chez les souris invalidées pour le récepteur CB1 obèses ainsi que chez les souris obèses traitées au rimonabant (Osei-Hyiaman, Depetrillo et al. 2005). De plus, les souris invalidées spécifiquement pour CB1 dans l'hépatocyte ne développent pas de stéatose, démontrant ainsi directement le rôle du récepteur CB1 hépatocytaire dans ce processus (Osei-Hyiaman, Liu et al. 2008).

La relevance de ces résultats expérimentaux a été confirmée récemment dans une étude clinique réalisée au sein du département d'hépatologie à l'hôpital Henri Mondor sur une cohorte de trois cent quinze malades atteints d'hépatite chronique virale C. En effet, la stéatose est fréquemment associée à l'hépatite chronique virale C. Elle est directement la conséquence de l'effet stéatogène du genotype 3 du VHC, ou est associée à l'insulino-résistance dans le cas des autres génotypes. Chez trois cent quinze patients atteints d'une hépatite virale C, l'évaluation de l'effet de la consommation de cannabis sur la progression de la stéatose a été réalisée (Hezode, Zafrani et al. 2008). Les malades ont été classés en trois groupes selon leur consommation de cannabis : non-fumeurs (63,5%) ; fumeurs occasionnels (moins d'1 joint par jour :12,4%) ; et fumeurs quotidiens (au moins un joint par jour pendant la durée de la maladie :24,1%). L'analyse multi variée a démontré que la consommation quotidienne de cannabis est un facteur prédictif indépendant de sévérité de la stéatose

(Hezode, Zafrani et al. 2008), chez les patients atteints d'hépatite chronique virale C. Cette étude étaye donc le rôle du système cannabinoïde dans le développement de la stéatose.

En conclusion, le système endocannabinoïde participe à la régulation de l'homéostasie énergétique *via* les récepteurs CB1 centraux, qui stimulent la prise alimentaire et *via* les récepteurs CB1 périphériques impliqués dans le métabolisme des acides gras, de l'insulino-résistance, et de l'intolérance au glucose.

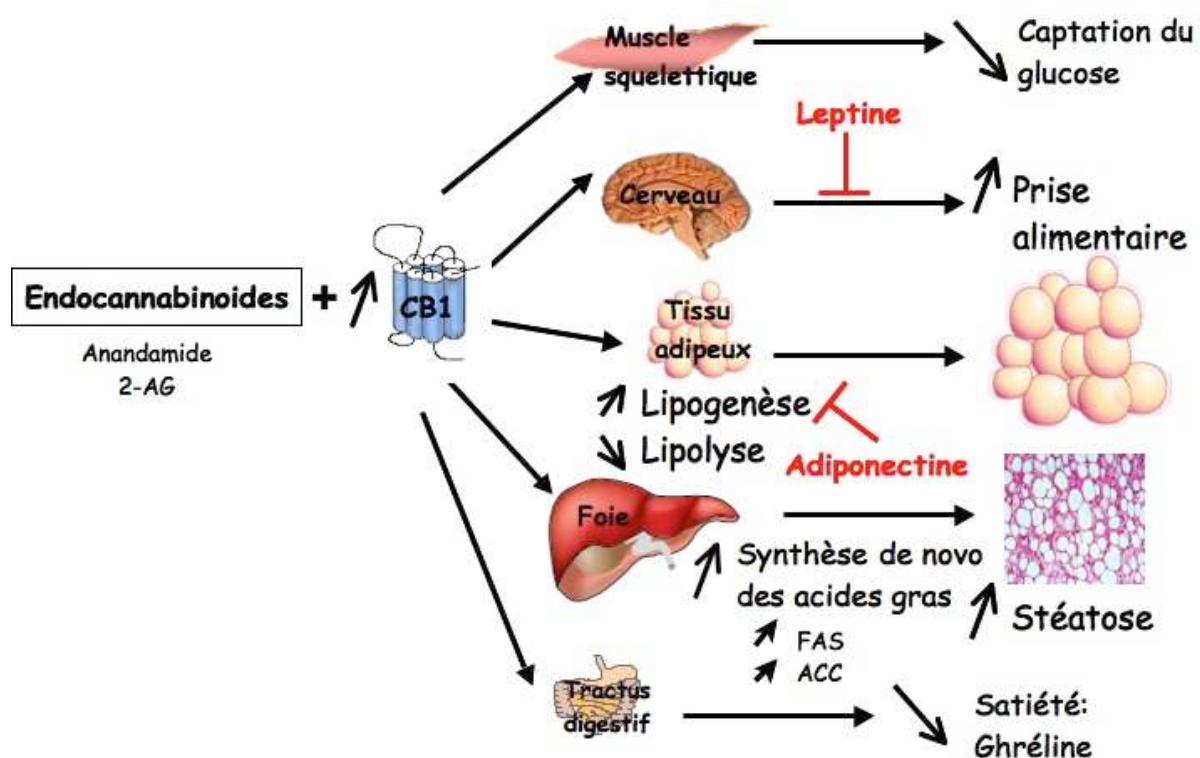


Figure 14 : Conséquences de l'activation du récepteur CB1 sur les organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

5) Applications thérapeutiques

Les effets orexigènes des cannabinoïdes rendent compte des résultats encourageants du traitement par des cannabinoïdes tels le Marinol® sur la perte de poids chez les patients VIH (Walsh, Nelson et al. 2003). D'autre part, le rimonabant ou Acomplia® est indiqué en

Europe dans le traitement de la surcharge pondérale et de ses complications cardiométaboliques (Despres, Golay et al. 2005; Scheen, Finer et al. 2006). Mais les effets secondaires importants de l'Accomplia® (troubles comportementaux, dépression, anxiété) limitent son utilisation et ses indications, notamment chez les patients ayant des antécédents de dépression. La mise en évidence de la contribution des récepteurs CB1 périphériques dans les complications métaboliques de l'obésité ouvre des perspectives intéressantes quant au développement d'antagonistes CB1 à effets périphériques.

Foie et système endocannabinoïde

Contrairement aux effets neurologiques et vasculaires des endocannabinoïdes qui ont été largement étudiés, les fonctions hépatiques du système endocannabinoïde sont longtemps restées méconnues, probablement en raison de la faible expression des récepteurs CB1 et CB2 dans le foie normal. Néanmoins, plusieurs travaux récents indiquent que ce système joue un rôle crucial au cours des maladies du foie (Mallat and Lotersztajn 2006).

Les maladies chroniques du foie sont responsables de plus d'un million de morts par an dans le monde. Les principales causes sont les infections virales B et C, l'alcool et les complications hépatiques de l'obésité. Schématiquement, toutes ces hépatopathies associent des lésions de nécrose hépatocytaire à une inflammation conduisant à une activation des mécanismes de fibrogenèse qui s'accompagnent dans 20% des cas environ d'une évolution vers la cirrhose et ses complications après vingt ans. Il apparaît aujourd'hui que le système endocannabinoïde joue un rôle à différentes étapes de ce processus.

I. Physiologie du foie

1) Généralités

Le foie joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie. Sa position anatomique, à l'interface entre le tube digestif et la circulation générale, lui permet d'assurer ses multiples fonctions. L'une des principales fonctions du foie est de réguler le métabolisme, notamment la régulation de la glycémie grâce à ses capacités de stockage, de redistribution et de néo-synthèse du glucose. Il intervient dans le métabolisme lipidique, en transformant les acides gras en corps cétoniques et en synthétisant les lipoprotéines et le cholestérol. Le foie sécrète également la plupart des protéines plasmatiques, telles que l'albumine, les protéines de

l'inflammation et de la coagulation ainsi que des précurseurs hormonaux. Il est le lieu de synthèse de la bile permettant ainsi l'absorption des graisses et des vitamines liposolubles. Le foie joue par ailleurs un rôle important dans l'immunité car il est impliqué dans la synthèse des protéines du complément, la phagocytose et la présentation d'antigènes. Enfin, le foie est un organe de détoxification qui assure l'élimination des toxines endogènes et exogènes hydrophobes, en les rendant hydrophiles, ce qui permet ainsi leur élimination par le rein.

2) Anatomie

a) Généralités

Représentant 3 à 5% du poids corporel de l'adulte chez les mammifères, le foie est un organe intra-abdominal situé sous la coupole diaphragmatique. Chez l'homme, le foie surplombe la partie droite des viscères abdominaux auxquels le relie les vaisseaux, les voies biliaires et des ligaments (*figure 15*). Il est formé de deux lobes anatomiques, droit et gauche, séparés par l'insertion du ligament falciforme. Chez l'homme, le foie est dit "unifié" c'est-à-dire que l'ensemble des segments et des lobes sont accolés dans un ensemble unique. Cette structure se retrouve également chez les ruminants, le dauphin et l'orang-outang. En revanche, chez le rat, la souris, la majorité des carnivores et certains primates, le foie est dit « lobé ». Il est constitué de quatre lobes anatomiques indépendants : deux lobes ventraux (médian et latéral gauche) et deux lobes dorsaux (latéral droit et caudé).

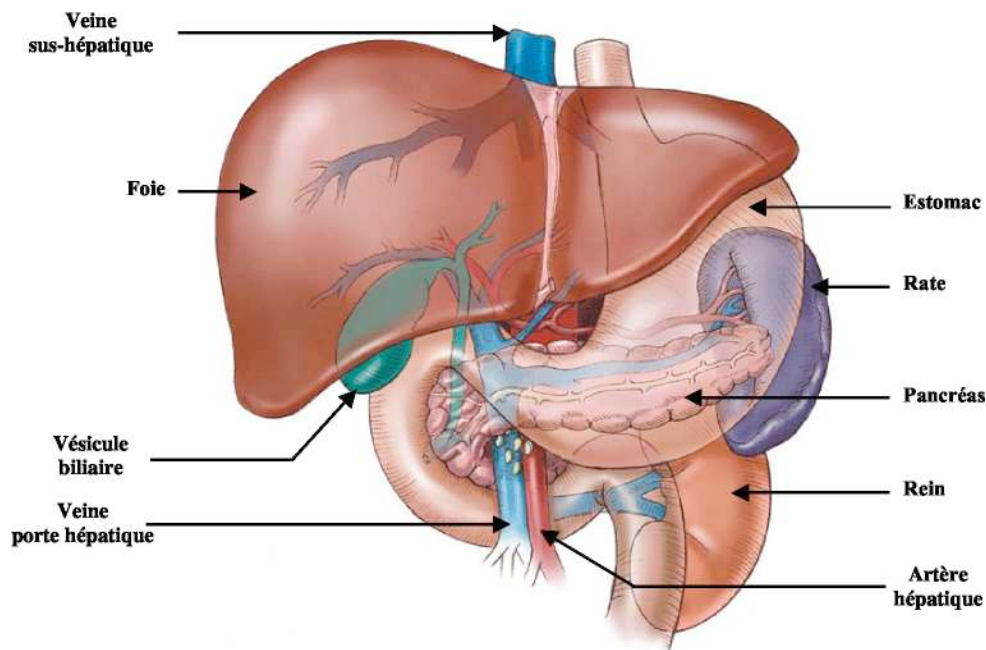


Figure 15 : Localisation du foie dans l'abdomen. Le foie est situé dans le quart supérieur droit de l'abdomen, sous la coupole diaphragmatique.

b) Le lobule hépatique

L'organisation tissulaire du foie est fondée sur une unité fonctionnelle répétée : le lobule hépatique. Au centre du lobule se trouve une veine centrolobulaire. À sa périphérie, on trouve des espaces portes constituant les ramifications de l'arbre portal, artériel et biliaire. Chaque espace porte contient en effet une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte, un canal biliaire mais également une fente lymphatique et des ramifications nerveuses (*figure 16*).

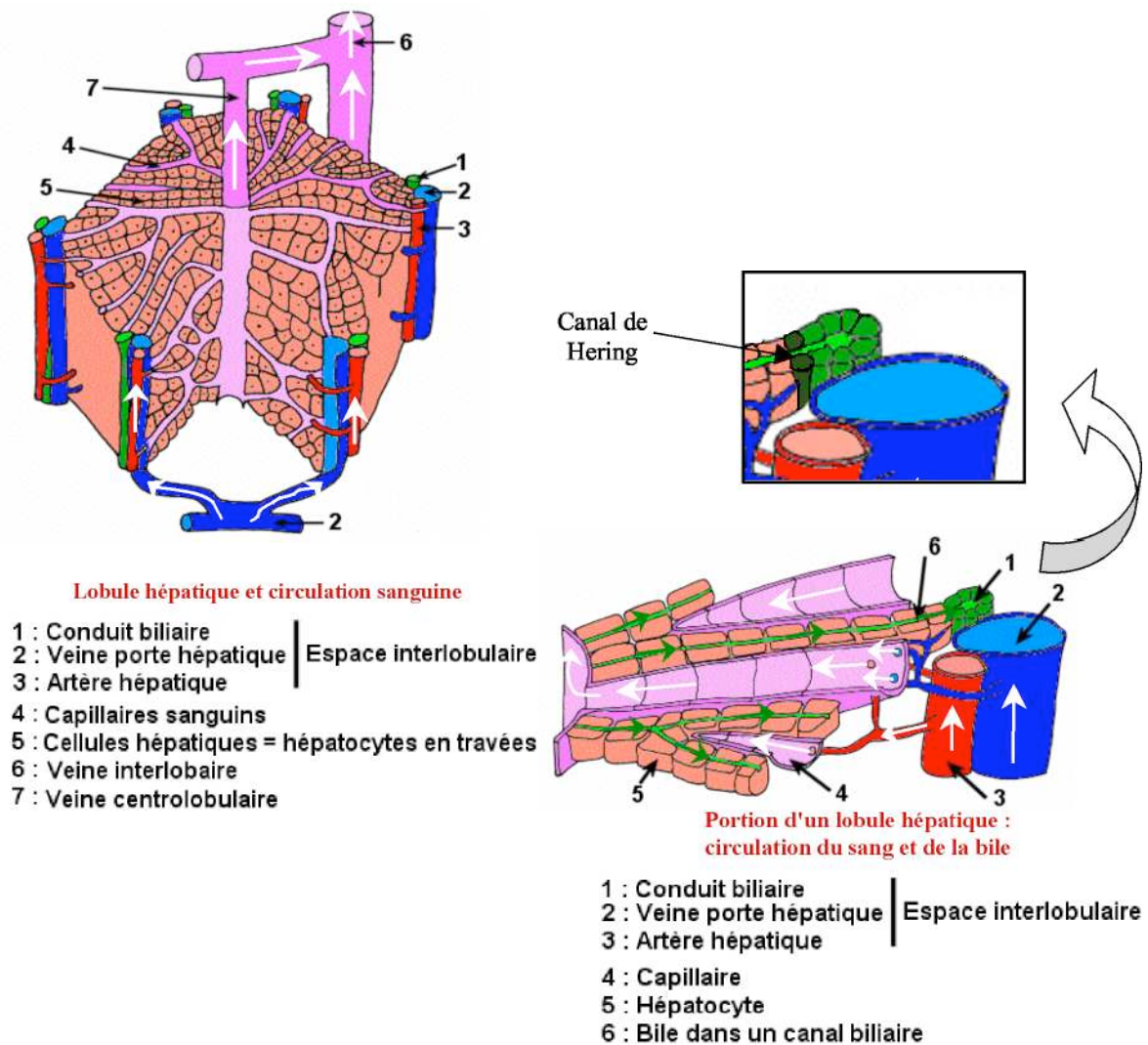


Figure 16 : Structure tridimensionnelle d'un lobule hépatique. (D'après l'ouvrage « Anatomie et physiologie humaine » MARIEB, édition De Boeck.)

Les capillaires sinusoides bordent les travées d'hépatocytes et relient la périphérie du lobule au centre (*figure 16*). La circulation sanguine dans le lobule hépatique s'effectue de la périphérie vers le centre de façon unidirectionnelle. À l'inverse, la circulation biliaire dans le lobule hépatique s'effectue de façon centrifuge.

c) Le sinusoides

Le sinusoides hépatique est une entité physiologique. Il forme un réseau dont la perméabilité favorise les échanges entre le sang et les hépatocytes, cellules parenchymateuses

responsables de la plupart des fonctions hépatiques (*figure 17*). Les hépatocytes, représentant 60% des cellules hépatiques, sont disposés en lames ou en travées monocellulaires séparées les unes des autres par les capillaires sinusoides. Ils sont décrits comme des cellules sécrétrices de type amphicrine. Ils présentent une polarité à la fois morphologique et fonctionnelle permettant de distinguer trois domaines : (i) le domaine latéral, en contact avec un hépatocyte adjacent et caractérisé par la présence de jonctions intercellulaires ; (ii) le domaine apical, lieu de sécrétion de la bile native ; et (iii) le domaine basal (ou sinusoidal) qui est en contact avec le sang. Ce dernier comporte des microvillosités, qui permettent une augmentation de la surface d'échange avec le sang et qui sont séparées des cellules endothéliales du sinusoides par l'espace de Disse. Cet espace contient une matrice extracellulaire lâche, notamment riche en fibronectine, ténectine, collagène IV et laminine. Les cellules endothéliales hépatiques ont des caractéristiques morphologiques très spécifiques : elles forment un endothélium décrit comme discontinu et fenestré, contrairement à la plupart des autres capillaires de l'organisme. La morphologie des cellules endothéliales sinusoidales et la présence d'une matrice extracellulaire lâche sont autant de facteurs favorables aux échanges transendothéliaux. Les cellules étoilées représentent 5 à 10% des cellules et sont localisées dans l'espace de Disse. Elles sont impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et le stockage de la vitamine A, et sont capables de synthétiser les composants de la matrice extracellulaire normale. Elles jouent un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des hépatocytes, des cellules biliaires et des cellules non parenchymateuses. Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, représentent la population macrophagique la plus importante de l'organisme (environ 80%) et représentent 15% des cellules hépatiques. Elles adhèrent aux cellules endothéliales sur leur face vasculaire. Leurs fonctions sont essentiellement phagocytaires et cytotoxiques. Elles sont préférentiellement situées dans la région périportale du lobule. Enfin, les lymphocytes granuleux ou « pit cells » possèdent une

activité « Natural Killer ». Recrutés à partir du sang circulant, ils adhèrent de manière temporaire aux cellules endothéliales et forment des contacts étroits avec les cellules de Kupffer.

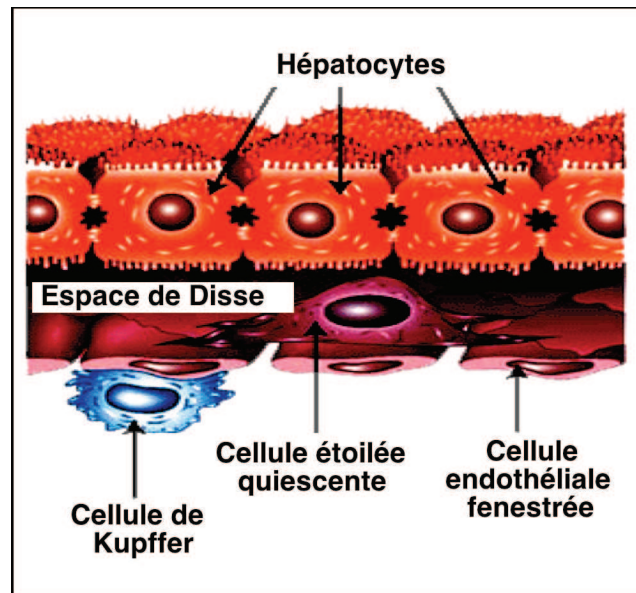


Figure 17 : Sinusioïde hépatique

II. Rôle du système cannabinoïde dans les stéatopathies, (ou fatty liver disease)

Les stéatopathies, qu'elles soient d'origine métabolique ou alcoolique, se distinguent par deux stades de pronostic différent. La stéatose simple (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes) et la stéatohépatite qui associe à la stéatose une inflammation hépatique et une nécrose hépatocytaire. La stéatohépatite conduit à l'activation des mécanismes de fibrogenèse et expose à l'évolution vers la cirrhose dans 15 à 20 % des cas.

1) Système endocannabinoïde et stéatopathie métabolique

Nous avons vu précédemment que le système cannabinoïde jouait un rôle dans le développement de la stéatose d'origine métabolique. Des données préliminaires indiquent que le récepteur CB1 pourrait également favoriser la transition de la stéatose vers la stéatohépatite. En effet, dans un modèle de rat obèse Zucker fa/fa, il a été montré qu'un traitement de huit semaines par le rimonabant de huit semaines (30mg/kg par jour) améliorait non seulement la stéatose mais diminuait également le taux de TNF α hépatique (Gary-Bobo, Elachouri et al. 2007). Dans ce même modèle, l'administration de rimonabant à des doses plus faibles (10mg/kg pendant 14 jours) augmenterait l'expression et la sécrétion adipocytaire d'adiponectine (Bensaid, Gary-Bobo et al. 2003), cette cytokine ayant des effets anti inflammatoires et réduisant la production de TNF α hépatique (Xu, Wang et al. 2003). Ces données suggèrent que le rimonabant pourrait bloquer la transition de la stéatose vers la stéatohépatite en réduisant l'inflammation hépatique (Kim, van de Wall et al. 2007).

2) La maladie alcoolique du foie

La maladie alcoolique du foie reste au premier rang des causes de mortalité liées à une hépatopathie chronique dans les pays industrialisés, avec encore à l'heure actuelle environ 10 000 décès annuels en France. La physiopathologie de la maladie alcoolique du foie présente des analogies avec celle de la stéatopathie métabolique, avec un stade de stéatose simple, résolutif à l'arrêt de l'alcool, et un stade d'hépatite alcoolique, associant une activité nécro-inflammatoire et une activation des mécanismes de fibrogenèse. L'hépatite alcoolique sévère représente une forme clinique particulière caractérisée par l'intensité de la réaction inflammatoire et la gravité du pronostic à court terme (Mathurin, Mendenhall et al. 2002; Louvet, Naveau et al. 2007).

a) Stéatose alcoolique

Il a longtemps été considéré que la stéatose alcoolique était principalement liée à un afflux d'acides gras dans le foie mobilisés à partir du tissu adipeux. Néanmoins, des travaux plus récents indiquent qu'il existe également une dérégulation de la synthèse, de l'oxydation et de l'export des acides gras (Crabb and Sozio 2008). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la stéatogénèse alcoolique sont similaires à ceux décrits (p67) dans le cadre de la stéatogénèse d'origine métabolique (Crabb and Sozio 2008).

b) De la stéatose à l'hépatite alcoolique

La transition stéatose/hépatite alcoolique est étroitement dépendante du développement d'une réaction inflammatoire hépatique (Hines and Wheeler 2004; McClain, Song et al. 2004). Schématiquement, l'alcool augmente la translocation intestinale de l'endotoxine d'origine bactérienne vers le système porte. L'endotoxine active les cellules de Kupffer par l'intermédiaire du récepteur TLR4 et de son co-récepteur CD14, provoquant ainsi un stress oxydant et l'induction de la synthèse de $\text{TNF}\alpha$. Cette surproduction de $\text{TNF}\alpha$ joue elle-même un rôle déterminant dans la physiopathologie de l'hépatite alcoolique, en déclenchant une cascade d'événements pro-inflammatoires, tels que l'expression de molécules d'adhésion, le recrutement et l'activation de polynucléaires neutrophiles, la production de chimiokines et de cytokines (IL6, IL8, IL18), et conduit à l'apoptose des hépatocytes (Hines and Wheeler 2004; McClain, Song et al. 2004). L'activation des voies de stress du réticulum endoplasmique contribue également à l'inflammation et à l'apoptose hépatocytaire par un mécanisme indépendant de la production de $\text{TNF}\alpha$ (Crabb and Sozio 2008).

c) Système endocannabinoïde et maladie alcoolique du foie

Très récemment l'équipe de G. Kunos a démontré que le récepteur CB1 hépatocytaire est impliqué dans le développement de la stéatose alcoolique (Kunos, Osei-Hyiaman et al. 2008). En effet, le récepteur CB1 hépatocytaire est induit et la production de 2-AG est augmentée en réponse au régime alcoolisé. De plus, les souris invalidées pour le récepteur CB1 dans l'hépatocyte sont résistantes au développement de la stéatose induite par l'administration chronique d'alcool par un mécanisme impliquant une absence de stimulation de la lipogenèse et de la β -oxydation. En effet, l'expression des gènes des enzymes de la lipogenèse et de la β -oxydation (FAS, SREBP-1c, CPT1) est également réduite chez ces souris. De plus, de façon surprenante, les auteurs démontrent que ce sont les cellules étoilées du foie qui produisent du 2-AG en réponse au régime alcoolisé par un mécanisme indirect puisque l'éthanol ne permet pas la production de 2-AG dans les cellules étoilées du foie *in vitro*. Ils proposent un modèle dans lequel le 2-AG produit par les cellules étoilées du foie va se lier au récepteur CB1 hépatocytaire et ainsi activer la lipogenèse et inhiber la β -oxydation (Jeong, Osei-Hyiaman et al. 2008). Ces résultats confirment les propriétés stéatogènes du récepteur CB1, décrites dans le modèle de stéatose métabolique. Ils démontrent également le rôle direct du récepteur CB1 hépatocytaire dans la stéatogénèse.

3) Récepteur CB2 et ischémie/reperfusion

Au cours de l'ischémie/reperfusion du foie, on observe une importante augmentation de la production d'anandamide et de 2-AG corrélée à l'intensité de l'atteinte hépatique. De plus, l'activation du récepteur CB2 par le JWH133 protège le foie des lésions induites par l'ischémie/reperfusion, comme l'atteste la baisse des transaminases. Enfin, le JWH133 diminue l'inflammation hépatique, en réduisant l'infiltrat inflammatoire, la production de

TNF α et l'expression des chimiokines attractives ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales des sinusoides (Batkai, Osei-Hyiaman et al. 2007). À l'inverse, les souris invalidées pour le récepteur CB2 développent une atteinte plus importante que les souris sauvages. Ces données ont été confirmées avec un autre agoniste de CB2, le HU380, qui diminue également le stress oxydant et l'apoptose hépatocytaire dans un même modèle d'ischémie/reperfusion (Rajesh, Pan et al. 2007).

4) Système endocannabinoïde et hépatite auto-immune

L'hépatite chronique auto-immune affecte principalement les femmes, généralement entre 10 et 30 ans et à la ménopause. Elle est la conséquence d'une réaction auto-immune contre les constituants de la membrane des hépatocytes. Malgré l'existence de traitements pouvant ralentir la progression de lésions, les hépatites auto-immunes évoluent très souvent vers la cirrhose. Très récemment, l'équipe de Nagarkatti a montré que dans un modèle d'hépatite induite par la concanavaline A (Con A) un traitement par le THC réduit l'atteinte hépatique. Ces effets sont reproduits par l'AEA qui réduit l'atteinte hépatique en diminuant l'expression de certaines cytokines inflammatoires comme le TNF α , l'IL6, le CCL2 (Hegde, Hegde et al. 2008). Enfin, l'utilisation combinée d'agonistes sélectifs des récepteurs CB1 et CB2 réduit l'atteinte, alors que l'administration isolée de l'une ou l'autre de ces molécules n'a pas d'effet. Cette étude montre le lien étroit entre le système endocannabinoïde et l'hépatite auto-immune. L'activation combinée des récepteurs CB1 et CB2 peut être une cible intéressante pour le traitement des hépatites auto-immunes.

III. Rôle du système cannabinoïde dans le développement de la fibrose

Les hépatopathies chroniques, notamment d'origine alcoolique, virale ou métabolique associent des processus d'apoptose hépatocytaire, d'inflammation et de régénération qui provoquent une dérégulation des mécanismes de réparation tissulaire. Cette dérégulation est à l'origine d'une fibrose, dont la progression conduit à la cirrhose, responsable de 15000 décès annuels en France.

La fibrose hépatique est due à un processus de cicatrisation exagérée qui se caractérise par l'accumulation progressive dans le foie d'une matrice extracellulaire de composition altérée, en réponse à une agression chronique. Elle résulte d'un déséquilibre entre synthèse, dépôt et dégradation de ces constituants (Friedman 2003; Lotersztajn, Julien et al. 2005). Les cellules responsables du développement de la fibrose sont des myofibroblastes hépatiques. Au cours des atteintes hépatiques chroniques, ces cellules sont soumises à l'action de cytokines et de chimiokines qui stimulent leur migration, notamment au niveau des zones de nécrose où elles synthétisent les constituants de la fibrose ainsi que les molécules inhibant leur dégradation. Ces cellules sont donc des cibles privilégiées pour une thérapie antifibrosante.

1) La physiopathologie de la fibrose

Au cours des atteintes hépatiques aiguës, la lésion initiale, généralement hépatocytaire ou biliaire, déclenche une réaction inflammatoire, suivie d'une régénération et d'une synthèse de composants matriciels (Friedman 2003; Lotersztajn, Julien et al. 2005). Ce processus permet la cicatrisation de la lésion en restaurant une architecture hépatique normale. En

revanche, si la maladie causale se prolonge, l'inflammation devient chronique, le déséquilibre entre la synthèse excessive de composants matriciels et la faillite des mécanismes de dégradation aboutit à la fibrogenèse (Friedman 2003). Dans le foie fibreux, les modifications de la matrice extracellulaire sont qualitativement et quantitativement comparables quelle que soit l'étiologie. On constate en effet une augmentation de trois à six fois de la plupart des molécules matricielles, principalement des collagènes de type I et III (fibrillaires), des protéoglycanes et des glycoprotéines, avec un dépôt précoce de fibronectine suivi par l'apparition de fibres de collagènes interstitiels (Schuppan, Ruehl et al. 2001). L'accumulation matricielle et les modifications cellulaires qui en résultent réduisent les échanges de substances solubles entre le compartiment sanguin et les hépatocytes, concourant au développement de l'insuffisance hépatique et de l'hypertension portale.

2) Les cellules fibrogéniques du foie

Il est maintenant clairement établi que les constituants matriciels qui s'accumulent dans le foie au cours de la fibrogenèse sont synthétisés majoritairement par des myofibroblastes exprimant l'alpha-actine de type musculaire lisse. De nombreuses études ont démontré que les cellules étoilées du foie activées et les myofibroblastes portaux contribuent à l'accumulation de la matrice extracellulaire dans le foie (Knittel, Kobold et al. 1999; Cassiman, Libbrecht et al. 2002; Lotersztajn, Julien et al. 2005). Des travaux récents suggèrent que les myofibroblastes dérivés des hépatocytes par transition épithélio-mésenchymateuse (Rygiel, Robertson et al. 2008), des canaux biliaires (Robertson, Kirby et al. 2007) ou de la moelle osseuse (Forbes, Russo et al. 2004; Russo, Alison et al. 2006) contribueraient également au processus de fibrogenèse.

3) Rôle des cellules fibrogéniques dans la physiopathologie de la fibrogenèse hépatique

L'étude des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la fibrogenèse hépatique a bénéficié d'une part de modèles murins, et d'autre part de la disponibilité de modèles cellulaires, notamment grâce à la possibilité d'isoler les cellules étoilées du foie avec une pureté relativement élevée. Les principaux modèles expérimentaux de fibrogenèse hépatique sont d'une part l'induction d'une hépatite toxique par administration répétée de tétrachlorure de carbone, ou de thioacétamide, qui génèrent une nécrose hépatocytaire massive associée à une inflammation importante, et d'autre part l'induction d'une cholestase par ligature de la voie biliaire principale, modèle moins inflammatoire.

a) Activation et recrutement

Les mécanismes d'activation des myofibroblastes sont encore mal connus. L'activation des cellules étoilées résulterait de l'action combinée de médiateurs solubles libérés par les cellules adjacentes, et de modifications de la matrice extracellulaire. Ainsi, l'atteinte du parenchyme hépatique provoque l'activation des cellules de Kupffer (macrophages du foie), des cellules endothéliales et des plaquettes, mais également un afflux de leucocytes, occasionnant la production de lipides peroxydés, d'espèces réactives de l'oxygène et de nombreuses cytokines et chimiokines notamment le *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), l'interleukine-1, le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF α) et l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) (Pinzani and Marra 2001). La migration des cellules fibrogéniques vers les lieux de nécrose contribuerait également à leur activation. Cette migration est sous la dépendance de facteurs de croissance (PDGF et *fibroblast growth factor-2*) et de chimiokines, produits par les cellules inflammatoires (CCL2,

CCl21) ou par les cellules fibrogéniques myofibroblastiques (CCL2, PDGF) (Pinzani and Marra 2001). De plus, la libération de facteurs chimiotactiques par les cellules fibrogéniques du foie accentue leur recrutement vers les zones lésées mais également le recrutement de cellules inflammatoires.

b) Prolifération et survie

L'accumulation de cellules fibrogéniques lors d'une atteinte hépatique résulte à la fois de leur capacité de prolifération élevée et de leur résistance vis à vis de l'apoptose. La prolifération des cellules fibrogéniques est stimulée par une grande variété de facteurs de croissance exprimés au cours de l'atteinte hépatique chronique, notamment le PDGF, le mitogène le plus puissant dont les récepteurs sont surexprimés par les cellules étoilées dans le foie cirrhotique, des vasoconstricteurs comme la thrombine, des *Matrix Metalloproteases* (MMPs) comme la MMP-2, ou encore des molécules d'adhésion comme l'intégrine $\alpha V\beta 3$ (Schuppan, Ruehl et al. 2001). Parmi les facteurs de survie on compte le TGF- β (Σαιλε, Ματτηεσ et al. 1999), la sphingosine-1 phosphate (Davaille, Li et al. 2002) et le *Tissue Inhibitor of Metalloproteases-1* (TIMP-1) (Murphy, Issa et al. 2002).

c) Apoptose

L'apoptose des myofibroblastes joue un rôle majeur dans la régression de la fibrose, suggérant que l'identification de molécules apoptotiques pour les myofibroblastes hépatiques pourrait être une voie intéressante pour le traitement de la fibrose. Schématiquement, il a été montré dans des modèles expérimentaux de fibrose, que l'équilibre prolifération/apoptose est en faveur de la prolifération. Cependant, après éradication de l'agent hépatotoxique le phénomène s'inverse avec un arrêt de la prolifération et une accélération de l'apoptose des myofibroblastes. Ce processus s'accompagne d'une restauration des mécanismes de

dégradation de la matrice extracellulaire, notamment une diminution de l'expression des TIMPs, et conduit à une régression de la fibrose (Iredale, Benyon et al. 1998) ; des résultats similaires ont été obtenus avec un agent pro-apoptotique tel que la gliotoxine, qui stimule l'apoptose des myofibroblastes hépatiques et provoque la régression de la fibrose (Wright, Issa et al. 2001). D'autres stimuli apoptotiques ont été identifiés, notamment le ligand de Fas, une prostaglandine dérivée de COX2 (la 15-d-PGJ2) (Li, Tao et al. 2001), et la sphingosine-1 phosphate (Davaille, Gallois et al. 2000; Davaille, Li et al. 2002). Cependant, la sélectivité de ces molécules pour les cellules fibrogéniques hépatiques devra être démontrée.

d) Remodelage et fibrose

La dynamique de la fibrose implique, parallèlement à la synthèse des protéines, un processus de dégradation sous la dépendance de métalloprotéases matricielles. Les cellules étoilées activées expriment une grande variété d'enzymes permettant le remodelage de la matrice extracellulaire comme la plasmine, les cathepsines, l'élastase, et surtout les MMPs et les activateurs des MMPs, qui clivent les pro-MMPs en forme active (Benyon and Arthur 2001). De plus, elles produisent aussi des inhibiteurs spécifiques des enzymes de la famille des MMPs, les TIMPs. Les cellules étoilées activées synthétisent le *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1), inhibiteur de la transformation du plasminogène en plasmine qui joue un rôle fondamental dans l'activation des autres enzymes dégradant la matrice, et qui permet la production de TGF- β par clivage du TGF- β latent inactif. La production de MMPs et de TIMPs est finement régulée selon le stade d'activation des cellules étoilées, et reflète le remodelage de la matrice au cours des maladies chroniques du foie (Arthur 2000). Lors des stades précoces, les cellules étoilées activées expriment les MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 et leurs activateurs, mais ne produisent pas de TIMPs, permettant ainsi la dégradation de la matrice « lâche » présente dans le foie normal et son remplacement par des amas de

collagènes fibrillaires. En revanche, à un stade plus tardif, les cellules étoilées activées ne produisent plus de MMPs mais synthétisent des TIMPs, provoquant ainsi une diminution dramatique de l'activité collagénolytique hépatique (Bataller and Brenner 2001).

Parmi les facteurs stimulant la production de matrice extracellulaire, le TGF- β , le *Connective Tissue Growth Factor* et la leptine jouent un rôle majeur. Le TGF- β est l'un des médiateurs les plus importants de la fibrogenèse (Gressner, Weiskirchen et al. 2002). Il stimule non seulement la synthèse de fibronectine, de collagènes, de protéoglycanes, et de glycoprotéines par les cellules fibrogéniques, mais il s'oppose également aux mécanismes physiologiques de dégradation de la matrice extracellulaire en inhibant la production d'enzymes dégradant la matrice, comme la MMP-1, la MMP-3, et en augmentant l'expression de leur inhibiteurs, tels que le TIMP-1 et le PAI-1. De plus, il stimule sa propre synthèse par les cellules fibrogéniques et contribue à leur survie (Gressner, Weiskirchen et al. 2002).

Les cellules fibrogéniques du foie sont donc au centre du processus de fibrogenèse (*figure 18*), non seulement en synthétisant des constituants matriciels ainsi que des inhibiteurs de leur dégradation, mais également en produisant des enzymes qui stabilisent la fibrose par la formation de ponts covalents, limitant la dégradation des molécules matricielles par les MMPs.

e) Stratégies antifibrosantes

Le traitement de la maladie causale reste un objectif prioritaire dans la prévention de la cirrhose. Cependant, à un stade trop tardif d'évolution, il est essentiel de pouvoir disposer de molécules anti-fibrosantes.

Les myofibroblastes hépatiques sont une cible privilégiée des molécules anti-fibrosantes. Différentes stratégies sont actuellement développées, elles visent à réduire l'accumulation des cellules fibroblastiques par des molécules antiprolifératives ou

apoptotiques, à inhiber la synthèse et augmenter la dégradation des composés matriciels, à moduler la production ou l'activité des cytokines pro-ou anti-fibrogéniques ou des facteurs de croissance. De plus, l'utilisation de molécules anti-inflammatoires, notamment pour leur effet inhibiteur sur la production de cytokines fibrogéniques, peut également constituer une stratégie intéressante et éventuellement complémentaire à une action directe sur les cellules fibrogéniques.

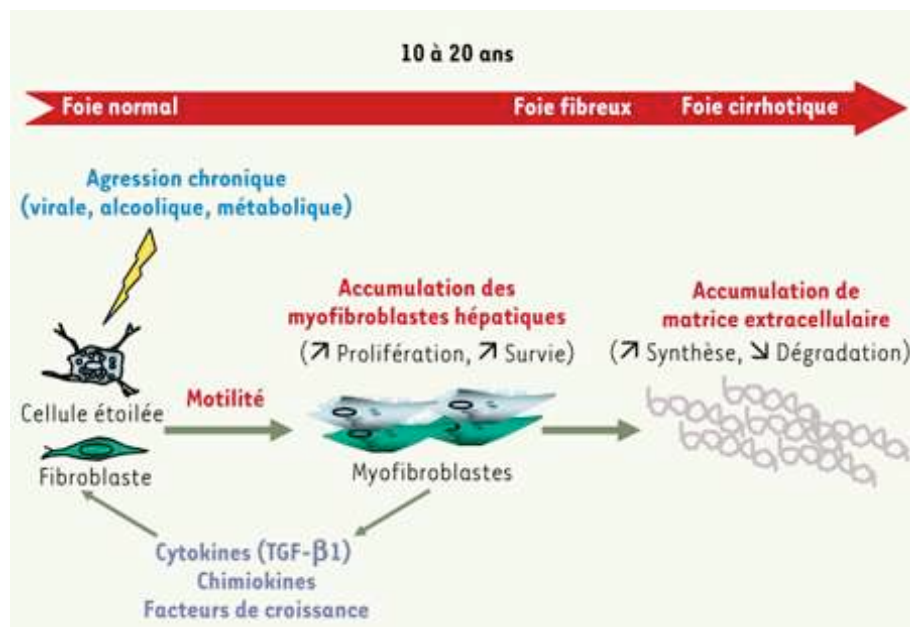


Figure 18 : Propriétés fibrogéniques des myofibroblastes. (extrait de Teixeira-Clerc et al, 2006 ; Medecine Science.)

4) Système endocannabinoïde et fibrose hépatique

a) Propriétés antifibrogéniques du récepteur CB2

L'immunomarquage CB2 dans le foie humain normal est quasi indétectable. En revanche l'expression du récepteur CB2 est fortement induite au cours de la cirrhose chez

l'homme (Julien, Grenard et al. 2005), en particulier dans et à la périphérie des septa fibreux, notamment dans les myofibroblastes hépatiques, exprimant l' α actine de type musculaire lisse (Julien, Grenard et al. 2005). Le rôle du récepteur CB2 a été étudié à l'aide d'animaux invalidés pour ce récepteur dans le modèle d'intoxication chronique par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) Ces souris présentent un score de fibrose plus important que les souris sauvages. *In vitro*, l'activation du récepteur CB2 par un agoniste sélectif, le JWH-015, ou par un agoniste non-sélectif le THC, inhibe les propriétés fibrogéniques des myofibroblastes, notamment en inhibant leur prolifération et en induisant l'apoptose. Ces deux effets sont bloqués par un antagoniste du récepteur CB2, le SR 144528. L'effet antiprolifératif du récepteur CB2 est relayé par la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2), un médiateur connu pour s'opposer à la prolifération des myofibroblastes hépatiques (Gallois, Habib et al. 1998). D'autre part, les effets apoptotiques déclenchés par l'activation du récepteur CB2 sont relayés par le stress oxydatif, car ils sont bloqués par deux antioxydants, la N-acétylcystéine et l'EUK-8. De plus, le THC augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les myofibroblastes hépatiques. Ces observations confirment donc le rôle des ROS dans l'apoptose des myofibroblastes hépatiques que notre équipe avait décrit précédemment (Li, Tao et al. 2001). La stimulation du récepteur CB2 réduit donc la fibrogenèse hépatique en diminuant l'accumulation des myofibroblastes hépatiques par un mécanisme impliquant l'inhibition de leur prolifération *via* la COX2 et l'induction de leur apoptose *via* le stress oxydant. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'agonistes du récepteur CB2 pourrait donc présenter une nouvelle approche dans le traitement de la fibrose hépatique au cours des maladies chroniques du foie.

Ces résultats démontrent donc les propriétés antifibrogéniques du récepteur CB2. Ils ont été confirmés récemment par la démonstration des propriétés antifibrogéniques du JWH-133 dans un modèle d'intoxication chronique au CCl₄ (Munoz-Luque, Ros et al. 2008).

b) Études cliniques

Afin d'étayer ces résultats expérimentaux sur le plan clinique, l'équipe d'Ariane Mallat a évalué l'impact de la consommation de cannabis sur la progression de la fibrose au cours de l'hépatite chronique virale C (Hezode, Roudot-Thoraval et al. 2005). L'étude a inclus deux cent soixante-dix malades consécutifs atteints d'hépatite chronique virale C non traités, de durée déterminée, ayant bénéficié d'une biopsie hépatique. Les données épidémiologiques usuelles ont été recueillies et un questionnaire standardisé a évalué la consommation d'alcool, de tabac et de cannabis durant la période d'exposition au virus. Les malades ont été classés en trois groupes selon leur consommation de cannabis : non-fumeurs (51%) ; fumeurs occasionnels (moins d'1 joint par jour :17%) ;et fumeurs quotidiens (au moins un joint par jour pendant la durée de la maladie :32%). La fibrose a été évaluée selon la classification METAVIR. Les résultats de l'analyse multivariée montrent que la consommation quotidienne de cannabis est un facteur prédictif indépendant de fibrose sévère ou de vitesse rapide de progression de la fibrose. Ces résultats ont été confirmés dans une étude américaine (Ishida, Peters et al. 2008). Ces données démontrent que contrairement aux résultats expérimentaux prouvant les propriétés antifibrogéniques du récepteur CB2, l'usage quotidien de cannabis accélère l'évolution de la cirrhose chez les patients atteints d'hépatite C. Ils suggèrent donc que d'autres récepteurs aux cannabinoïdes (notamment le récepteur CB1 dont l'expression est augmentée au cours de la fibrose chez l'homme) pourraient jouer un rôle délétère dans le développement de la fibrose.

5) Système endocannabinoïde et complications de la cirrhose

a) L'hypertension portale

Des effets hypotenseurs de l'anandamide ont été largement décrits dans des modèles de choc hémorragique, endotoxinémique ou cardiogénique, ainsi que dans différents modèles d'hypertension artérielle. Cette hypotension a été rattachée à un effet vasodilatateur dépendant des récepteurs CB1. Ces données ont conduit à évaluer l'impact du système cannabinoïde sur la physiopathologie de l'hypertension portale.

L'hypertension portale du cirrhotique provient d'une double composante intra-hépatique associant d'une part une augmentation de la résistance hépatique liée aux remaniements architecturaux et à une vasoconstriction excessive des veinules portes et des capillaires sinusoides et d'autre part une vasodilatation artérielle, en particulier splanchnique, constitutive à une surproduction périphérique de molécules vasodilatrices (Mallat 1998). Il a été montré que le rimonabant réduit la vasodilatation artérielle splanchnique et l'hypertension portale dans deux modèles expérimentaux de cirrhose (Batkai, Jarai et al. 2001). Ces résultats suggéraient qu'une activation du système cannabinoïde participait à la vasodilatation systémique provoquée par la cirrhose. Pour appuyer de cette hypothèse, les récepteurs CB1 sont induits dans les cellules endothéliales d'artères mésentériques et la concentration monocyttaire d'anandamide est plus élevée chez les malades cirrhotiques comparés aux témoins (Fernandez-Rodriguez, Romero et al. 2004). Enfin, des données plus récentes indiquent que l'anandamide provoque une vasodilatation sélective des artérioles périphériques (Domenicali, Ros et al. 2005). L'ensemble de ces résultats indique que l'anandamide a un effet vasodilatateur mésentérique marqué, dépendant de CB1, qui favorise le développement de l'hypertension portale.

b) L'encéphalopathie hépatique

L'encéphalopathie hépatique est une manifestation reflétant la gravité de l'insuffisance hépatocellulaire. L'encéphalopathie est consécutive à un dérèglement de la détoxification du sang de substances neurotoxiques (tel que l'ammoniac) secrétées par l'intestin et est caractérisée par des troubles neurologiques graves pouvant conduire au coma. L'expression du récepteur CB2 est induit dans un modèle d'encéphalopathie hépatique. L'administration de THC engendre une activation de l'AMP kinase qui va restaurer les fonctions normales du cerveau chez la souris (Dagon, Avraham et al. 2007).

c) La cardiomyopathie du cirrhotique

La cardiomyopathie cirrhotique est caractérisée par différents éléments révélateurs d'anomalies cardiaques structurales et fonctionnelles chez les patients cirrhotiques. Ils comprennent des dysfonctions systoliques et diastoliques, des modifications électrophysiologiques et des modifications structurales micro- et macroscopiques. La prévalence de la cardiomyopathie cirrhotique est inconnue, surtout parce que la maladie est généralement latente et ne se manifeste que lorsque le patient est soumis à un stress tel qu'un exercice, la prise de médicaments, une hémorragie ou une intervention chirurgicale. Les caractéristiques cliniques principales de la cardiomyopathie cirrhotique sont une augmentation du débit cardiaque au repos, une diminution de la contraction systolique ou de la relaxation diastolique en réponse à des stress physiologiques, pharmacologiques ou chirurgicaux. Dans un modèle de cardiomyopathie chez le rat induite par une ligature du

cholédoque, les taux d'AEA sont augmentés ainsi que l'expression du récepteur CB1 dans le coeur. Par ailleurs, le blocage du récepteur CB1 par l'antagoniste AM-251 augmente la contractilité du ventricule. Le système cannabinoïde joue donc un rôle délétère dans cette pathologie en augmentant la production cardiaque d'endocannabinoïdes, ce qui diminue la contractilité locale. Ces données démontrent le rôle du récepteur CB1 dans le développement de la cardiomyopathie du cirrhotique et suggèrent que le blocage du récepteur CB1 pourrait constituer une piste intéressante pour le traitement de cette pathologie (Gaskari, Liu et al. 2005).

OBJECTIFS

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle du système cannabinoïde dans la stéatopathie métabolique et la fibrose associée aux maladies chroniques du foie.

Le premier travail montre qu'en fait le récepteur CB2 est impliqué dans le développement de l'obésité, de l'insulino-résistance et de la stéatose.

Le deuxième travail met en évidence le rôle profibrogénique du récepteur CB1 dans le foie.

RESULTATS

***1^{er} Article : CANNABINOID CB2 RECEPTOR INACTIVATION
REDUCES OBESITY, INSULIN RESISTANCE AND STEATOSIS***

Soumis pour publication

CANNABINOID CB2 RECEPTOR INACTIVATION REDUCES OBESITY, INSULIN RESISTANCE AND STEATOSIS

Vanessa Deveaux ^{1, 2, 10}, Yasukatsu Ichigotani ^{1, 2, 10}, Thomas Cadoudal ^{1, 2}, Fatima Teixeira-Clerc ^{1, 2}, Alexandre Louvet ^{1, 2}, Sylvie Manin ^{1, 2}, Jeanne Tran-Van Nhieu^{1, 2, 4}, Marie Pierre Belot ^{1, 2}, Andreas Zimmer ⁵, Patrick Even ⁶, Patrice Cani ⁷, Claude Knauf ⁷, Remy Burcelin ⁷, Adeline Bertola ⁸, Yannick Le Marchand-Brustel ⁸, Philippe Gual ⁸, Ariane Mallat ^{1, 2, 3} and Sophie Lotersztajn ^{1, 2, 3, 9}

¹ INSERM, Unite U841, Créteil, F-94000 France;

² Université Paris 12, Faculté de Médecine, UMR-S841, Créteil, F-94000 France;

³ AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Créteil, F-94000 France;

⁴ AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Département de Pathologie, Créteil, F-94000 France ;

⁵ Dept of Molecular Psychiatry, University of Bonn, Bonn, Germany;

⁶ INRA, UMR914, AgroParisTech, Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, CNRH-IdF, Paris F-75005 ;

⁷ INSERM U858, Toulouse, F-31432 France;

⁸ INSERM, U895, Team 8, Nice, F-06107 France

⁹ **Corresponding author** Dr. Sophie LOTERSZTAJN

INSERM U841

Créteil, F-94000

France

Tel : + 33 (0)1 49 81 35 34 ; Fax : +33 (0)1 48 98 09 08

e mail: sophie.lotersztajn@inserm.fr

¹⁰ VD and YI contributed equally to the work.

Short title: CB2 receptor, obesity, insulin resistance and steatosis

ACKNOWLEDGMENTS.

V Deveaux was supported by a fellowship from the Association Française pour l'Etude du Foie, Y Ichigotani by a fellowship from the Agence Nationale de la Recherche and T Cadoudal by a fellowship from the Fondation pour la Recherche medicale. A Bertola was successively supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (CHU of Nice) and the Association pour la Recherche sur le Cancer. Y Le-Marchand Brustel and P Gual are the recipients of an interface grant from CHU of Nice, and S Lotersztajn of an interface grant from AP-HP. This work was supported by the INSERM, the Université Paris-Val-de-Marne, and by grants (to SL) of the Agence Nationale de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Medicale. We thank F Pecker for helpful and constant guidance.

No conflicts of interest exist.

SUMMARY

BACKGROUND AND AIMS: Prevalence of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has dramatically increased in parallel to that of obesity and type II diabetes. Recent data have established the crucial role of adipose tissue inflammation in promoting obesity-induced insulin resistance and fatty liver. Since cannabinoid CB2 receptors play a central role in the regulation of innate immunity, the aim of the present study was to investigate the role of these receptors in the pathogenesis of insulin resistance and fatty liver.

METHODS: The study was conducted in wild type and *Cnr2*-deficient mice (*Cnr2* $-/-$) fed high fat diet (HFD) for 15 weeks or in genetically obese ob/ob mice. In some experiments, ob/ob mice were treated with the CB2 antagonist AM-630 or vehicle for 2 weeks.

RESULTS: Mice lacking CB2 receptors displayed reduced body weight gain following HFD, as a result of enhanced fecal fat excretion and increased fatty acid oxidation. HFD-fed *Cnr2* $-/-$ mice also showed improved insulin sensitivity and resistance to liver steatosis. In keeping, genetic or pharmacological inactivation of CB2 receptors decreased both obesity-associated fat macrophage infiltration and induction of inflammatory cytokines. Conversely, activation of CB2 receptors enhanced inflammation in cultured fat pads from obese WT mice.

CONCLUSION: These results demonstrate that CB2 receptors may contribute to the pathogenesis of obesity, insulin resistance and non alcoholic fatty liver disease.

INTRODUCTION

Obesity has reached epidemic proportions over the past 20 years, and steadily shows rising prevalence rates, as a consequence of sustained overnutrition and reduced physical activity. Excess body weight and obesity are associated with an array of related co-morbidities, including increased risk of insulin resistance, type II diabetes, cardiovascular disorders^{1,2} and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD)³. With the increasing prevalence of obesity and co-morbidities, NAFLD has become the most common cause of liver disease in Western countries, and shows a wide spectrum, ranging from isolated benign steatosis to non alcoholic steatohepatitis and its potential for progression to end-stage liver disease³. Several studies have shown that obesity-associated systemic insulin resistance and fatty liver are promoted by an inflammatory response predominantly triggered by the adipose tissue⁴⁻⁷. Fat inflammation is initiated by lipid accumulation into adipocytes and further amplified by macrophage infiltration into the adipose tissue, thereby leading to insulin resistance and fatty liver⁴⁻⁷.

The cannabinoid receptors CB1 and CB2 belong to the family of G protein-coupled receptors, and bind exogenous ligands derived from *Cannabis Sativa* as well as endogenous arachidonic-derived ligands (endocannabinoids) among which anandamide or 2-arachydonoylglycerol are the best characterized⁸⁻¹⁰. CB1 is the most abundant G-protein coupled receptor in the brain, and exclusively accounts for the psychotropic effects of cannabinoids. The CB1 receptor is also widely distributed at significant levels in peripheral tissues, particularly in organs that control energy balance. Recent studies have demonstrated that endogenous activation of central and peripheral CB1 receptors play a key role in the pathogenesis of obesity, insulin resistance and non alcoholic fatty liver disease^{8, 11}. In this

context, rimonabant, a selective CB1 antagonist, has been EMEA approved as an adjunctive treatment of obesity and related cardiometabolic risk factors¹²⁻¹⁴. CB2 receptors predominate in cells of the immune system and regulate innate immunity in various tissues¹⁵. Thus, CB2 receptors play a critical role in experimental models of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, atherosclerosis or liver ischemia-reperfusion injury¹⁵⁻¹⁸. Interestingly, recent studies have uncovered the presence of CB2 receptors in pancreatic alpha and beta-cells¹⁹⁻²¹, as well as in insulin target tissues such as skeletal muscle, liver and adipose tissue^{20, 22, 23}, suggesting that CB2 receptors may regulate insulin sensitivity. These findings prompted us to investigate the role of CB2 receptors in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and NAFLD.

METHODS.

Animals and Experimental Design. Mice used for the experiments included wild type C57Bl/6J, ob/ob and ob+/ob male mice (Janvier, France) and mice with a targeted mutation of the *Cnr2* gene on a mixed genetic background²⁴. To obtain single mutant mice on an inbred congenic genetic background, heterozygous *Cnr2* +/- mice were backcrossed with wild type C57Bl/6J (The Jackson Laboratory) animals over 10 generations. Heterozygous mice from the N10 generation were intercrossed to homozygous *Cnr2* -/- animals. Genotyping was performed on tail genomic DNA using QuantiTectTM SYBR® Green PCR kit (Qiagen), with the following primers: mouse *Cnr2*: sense 5'-CTGTGCTGCTCATATGCTGG-3', antisense 5'-GCAGAGCGAATCTCTCCACT-3'. We also verified that *Cnr2* -/- mice still expressed CB1 receptors, using the following primers: mouse *Cnr1*: sense 5'-CTCCTGGCACCTCTTTCTCAG-3', antisense 5'-GTCTCCTGCTGGAACCAACGG-3'.

Experimental protocols were conducted in accordance with French government policies (Services vétérinaires de la Santé et de la production animale, Ministère français de l'Agriculture). Adult male mice (7-10 week-old) were housed under 12 hours of light/12 hours of dark cycle, in a temperature-controlled environment. Wild type (WT) mice and *Cnr2* -/- mice were fed standard chow (TD 2016, Harlan, n=8 WT, n=8 *Cnr2* -/-) or high fat diet (36 % fat, TD 99249, Harlan, n= 15 WT, n=15 *Cnr2* -/-) for 15 weeks. Body weight and food intake were measured weekly. We obtained similar results in five independent series of experiments.

The impact of the CB2 antagonist AM-630 (Tocris, France) was evaluated in 6-week-old male obese male mice (ob/ob) and lean counterparts (ob+/ob). AM-630 was freshly

dissolved in a vehicle solution containing 1 drop of Tween 80 in 0.1 ml dimethylsulfoxide (DMSO), sonicated, and further diluted 50 times in NaCl 9%. Mice received a 17 day-course of daily intraperitoneal injection of 1mg/kg AM-630 (n=10 ob/ob and n=5 ob+/ob). Control animals (n=8 ob/ob and n=5 ob+/ob) were treated in parallel with vehicle. Body weight and food intake were measured daily. Mice were sacrificed after overnight fasting; white epididymal adipose tissue was removed, weighed and either fixed in buffered formalin, or snap frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C until use.

Indirect calorimetry. *In vivo* indirect open circuit calorimetry was performed as previously described ^{25, 26}. Briefly, the mice (HFD-fed WT (n=7) and HFD-fed *Cnr2*^{-/-} (n=7)) were housed individually in the metabolic cage at 09:30 with water, but without food. Temperature in the metabolic cage was maintained at 32°C ± 0.5 (low range of thermoneutrality), with an artificial 12h-12h light-dark cycle. Respiratory exchanges and spontaneous activity were continuously recorded at 10s interval from 10:00 until 09:00 the following day. Resting and activity-related metabolic rates were calculated a posteriori using the Kalman filtering method ²⁶. Basal metabolic rate and basal RQ were defined as the mean resting metabolic rate measured between 16:00 and 18:00 when the mice were in a post-absorptive state, just before the 1g-test meal was given. Post meal RQ was defined as the mean RQ measured during 6 hrs following administration of the 1g-test meal (until metabolic rate returned to pre-meal values); peak post meal is defined as the highest value of RQ recorded during the post meal period. Energy expended with activity was calculated from the difference between total and resting metabolism.

Fecal fat excretion. The amount of fat in dried feces (n=7 cages of 5 mice in each group) was measured by the Laboratory of Functional Coprology, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris France.

Preparation of adipocyte and stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue.

Epididymal adipose tissues from C57Bl/6J (*ob/ob*) obese mice were chopped and rinsed in buffer A containing 120mM NaCl, 4mM KH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 750μM CaCl₂, 10mM NaHCO₃ and 30mM HEPES pH 7.4. Explants were incubated at 37°C for 30 minutes in 10 ml of buffer A supplemented with 1 % BSA, 280 mM glucose and 15 mg of type 1 collagenase (Clostrido peptidase A, Sigma). Adipocytes were then collected by filtration and floatation, and the SVF was obtained following further centrifugation for 15 min at 260 g and two washings in buffer A. Purity of the fractions was evaluated by *Emr1* and *Adipoq* expressions (not shown). All samples were stored at -80°C until use.

Culture of explants from adipose tissue. Explants of epididymal adipose tissue were prepared from C57Bl6/J male *ob/ob* mice, following overnight fasting. Epididymal adipose tissue samples were cut into small pieces (1 mm³) under sterile conditions and rinsed in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen). Explants (200 mg) were further incubated for 48 hours at 37°C in DMEM supplemented with 12.5 mM glucose, 200 IU/ml penicillin, 50 mg/liter streptomycin, and 2% BSA, and further exposed to 1 mM JWH-133 (Tocris, France) or vehicle (DMSO 0.02%). After 48 hrs, samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before RNA extraction.

Tissue and serum analysis. Blood was collected at the time of sacrifice, fasting glycemia were determined by Accu-Check active bands (Roche Diagnostics) and insulinemia by Elisa (Ultrasensitive mouse sensitive Elisa, Mercodia), respectively.

Hepatic triglyceride quantification. Hepatic triglycerides were extracted from 50 mg of liver homogenates (HFD-fed WT (n=15) and *Cnr2* ^{-/-} (n=15)) by homogenization in 1 ml of chloroform-methanol (2:1 v/v) using TissueLyser (Qiagen). The homogenate was centrifuged for 10 min at 1000 g, and the lipid phase was diluted with 0.2 ml water. Following an additional centrifugation for 20 min at 2400 rpm, the lipid extract was collected from the lower phase, evaporated and dissolved in 1 ml of 2-propanol. Triglycerides were quantified with a triglyceride determination kit (Sigma).

Insulin tolerance test. HFD-fed WT (n=15) and *Cnr2* ^{-/-} (n=15) mice underwent a 0.75 U/kg i.p. injection of human insulin (Insulin NPH; Lilly), following a 4 hr fasting. Blood samples were taken from the tail vein for determination of glycemia at time 0 and 20, 40, 60, 90, 120, and 180 min after the insulin injection.

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp. Hyperinsulinemic- euglycemic clamp was performed as previously described ²⁷. Briefly, 6h-fasted HFD-fed WT (n=6) and HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} (n=7) mice, received simultaneous infusions of insulin (18 mU.kg⁻¹.min⁻¹ for 3 h), and D-(³H)3-glucose (30 µCi.kg⁻¹.min⁻¹), Perkin Elmer, Boston, MA) to ensure a detectable D-(³H)3-glucose enrichment. Glycemia was assessed throughout the infusion from blood samples collected from the tip of the tail vein and euglycemia was maintained by adjusting a variable infusion of 30% (wt/vol) glucose. Plasma glucose concentrations and D-(³H)3-glucose specific activity were determined in 5 µl of blood sampled from the tip of the tail vein every 10 min during the last hour of the infusion. The enrichment in D-(³H)3-glucose was determined from total blood after deproteinization by a Zn(OH)₂ precipitation as previously described ²⁷. An aliquot of the protein-free supernatant was evaporated to dryness and mixed with scintillation fluid to determine the radioactivity corresponding to D-[³H]3-glucose. In a

second aliquot of the same supernatant, glucose concentration was measured by the glucose oxidase method (Sigma).

RNA preparation and RT-PCR. Total RNA was extracted from mice epididymal fat, using RNeasy® Lipid Tissue Mini kit (Qiagen). Quantitative RT-PCR was carried out on a Light Cycler (Roche Diagnostics), as previously described²³. Oligonucleotide primer sequences of the mouse genes studied were the following. mouse *Rn18S*: **sense** 5'-ACCAGAGCGAAAGCATTTGCCA3', **antisense**: 5'-ATCGCCAGTCGGCATCGTTTAT-3'; mouse *Cnr2*: **sense** 5'-GGATACAGAATAGCCAGGAC-3', **antisense** 5'-GGAGCCGTTGGTCACTTCTG-3'; mouse *Ccl2*: **sense** 5'-GGGCCTGCTGTTCACAGTT-3', **antisense** 5'-CCAGCCTACTCATTGGGAT-3'; mouse *Emr1*, **sense** 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', **antisense** 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; mouse *Tnfr*: **sense** 5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3', **antisense** 5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'. PCR amplified products were analyzed on a 2% agarose gel and sequenced.

Adipose tissue and liver histology. Fat and liver specimen were fixed in 10 % formalin, paraffin-embedded tissue sections (8 and 4 µm, respectively) were stained with hematoxylin-eosin for routine examination. Adipocyte size was quantified on at least 30 cells from 3 separate fields in 7 WT and 5 *Cnr2* ^{-/-} HFD-fed animals, using Image J software. Steatosis was blindly assessed on 4 random fragments from different areas of each liver (n = 10 WT and n = 10 *Cnr2* ^{-/-} HFD-fed animals), and was staged on a scale of 0 to 4, according to the percentage of hepatocytes containing cytoplasmic vacuoles as follows: 0, (<5%), 1 (5-20 %), 2 (20%-30 %), 3 (30-60%), 4 (≥ 60%).

Immunohistochemistry. Immunohistochemical detection of F4/80 was performed in adipose formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (8 μ m), using non diluted antibody to F4/80 (Serotec MCA 497) and biotinylated secondary antibody (1/50, Serotec AAR10B). The signal was amplified with phosphatase alkaline-conjugated streptavidin (1/20, Serotec), and alkaline phosphatase activity was revealed using fast red substrate-chromogen system (Dakocytomation). The total number of F4/80 expressing cells was quantified on at least 500 cells from 5 random fields in 7 vehicle-treated or 7 AM-treated WT mice fed HFD, and 5 *Cnr2* $-/-$ HFD-fed animals, using Image J software. Results are expressed as F4/80 stained cells/total cells.

Statistics. Results are expressed as mean $\pm$ SEM and were analyzed by either Mann and Whitney test, one or two way ANOVA as appropriate, using PRISM 4.0 software. $P < 0.05$ was taken as the minimum level of significance.

RESULTS

Mice lacking CB2 receptors display reduced weight gain.

Wild type (WT) and *Cnr2* ^{-/-} mice were fed a high fat diet (HFD) or standard mouse chow for 15 weeks (**Fig 1 A**). When maintained on standard diet, *Cnr2* ^{-/-} mice and WT littermates showed similar weight gain (**Fig 1 A, inset**). Unexpectedly, body weight gain under HFD was significantly lower in *Cnr2* ^{-/-} mice (**Fig 1 A**), and after 15 weeks, *Cnr2* ^{-/-} animals were leaner than WT counterparts (38.8 ± 0.7 g vs 44.8 ± 0.9 g, respectively; $p < 0.05$ **Fig 1 A**). Accordingly, *Cnr2* ^{-/-} mice displayed significantly smaller adipocyte size compared to WT animals (**Fig 1 B**). Subsequent experiments investigated mechanisms underlying *Cnr2* impact on obesity. HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} and WT mice showed no difference in food intake (**Fig 1 C**), did not differ in basal and total metabolic rate, exhibited the same level of spontaneous activity (**Fig 1 D**), and similar thermogenic response to feeding (not shown). Nevertheless, indirect calorimetry experiments showed that *Cnr2* ^{-/-} mice displayed a lower pre-meal, post meal and overall respiratory quotient, although the differences with WT animals did not reach statistical significance (**Fig 1E**). In addition, the peak of meal-induced RQ increase was significantly reduced in *Cnr2* ^{-/-} animals, compared to WT (**Fig 1E**), therefore indicating that genetic ablation of *Cnr2* reduces the inhibition of lipid oxidation induced by feeding. Finally, quantification of fat elimination in faeces showed a modest albeit significant increase in fecal lipid output in high fat-fed *Cnr2* ^{-/-} mice, as compared to WT counterparts (**Fig 1 F**). Overall, these data indicate *Cnr2* deletion attenuates the progression of obesity by increasing both lipid oxidation and fecal fat excretion.

Genetic invalidation of *Cnr2* improves insulin sensitivity

Insulin resistance was monitored by conventional metabolic parameters and functional tests. As expected, WT HFD-fed obese mice developed hyperglycemia (**Fig 2 A**), and hyperinsulinemia (**Fig 2 B**), resulting in increased HOMA-IR (**Fig 2 C**). In contrast, there was a significant reduction in insulin plasma levels and HOMA-IR in HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} mice (**Fig 2 A-C**). Consistent with these results, HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} mice were more insulin sensitive than their WT counterparts, as measured by an insulin tolerance test (**Fig 2 D**). Finally, in hyperinsulinemic-euglycemic clamp experiments, glucose turnover and glycolysis rate were increased in HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} mice, whereas glycogen synthesis rate remained unchanged, confirming the improvement of insulin sensitivity induced by *Cnr2* invalidation (**Fig 2 E**). Collectively, these results demonstrate that *Cnr2* deletion attenuates obesity-associated insulin resistance.

Cnr2^{-/-} mice are resistant to diet-induced steatosis

As expected, WT obese mice developed severe fatty liver, whereas HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} animals exhibited minimal steatosis (**Fig 3A**). Accordingly, steatosis score and liver triglyceride concentration were markedly decreased in HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} mice, as compared to obese WT animals (**Fig 3B**). Moreover, there was a decrease in the hepatic gene expression of the lipogenic transcription factor SREBP-1c and its targets acetyl-CoA carboxylase-1 (*Acc1*) and fatty acid synthase (*Fas*) in HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} animals as compared to WT obese animals (**Fig 3C**). These results demonstrate that *Cnr2* deletion confers resistance to metabolic steatosis.

Genetic or pharmacological inactivation of CB2 receptors reduces the inflammatory response associated with obesity.

Recent studies have demonstrated that obesity generates a chronic, low-grade inflammation^{5, 6}, predominantly originating from the adipose tissue, that contributes to the development insulin resistance and fatty liver⁴⁻⁷. Given the regulatory role of Cnr2 receptors in innate immunity¹⁵, we therefore investigated the impact of *Cnr2* invalidation on obesity-induced inflammation. As expected, obese WT mice showed macrophage infiltration in the adipose tissue, as reflected by the induction of *Emr1* expression encoding the macrophage-related marker F4/80 (**Fig 4 A**), and the accumulation of F4/80 positive cells in crown clusters around adipocytes (**Fig 4 B**). In contrast, fat macrophage density was reduced in HFD-fed *Cnr2*^{-/-} mice as compared to their WT counterparts (**Fig 4 A-B**). Accordingly, the expression of the inflammatory genes *Tnf* and *Ccl2* was attenuated in HFD-fed *Cnr2*^{-/-} mice as compared to HFD-fed WT animals (**Fig 4 C**).

We next considered the possibility that CB2 receptors may be expressed in the adipose tissue and may therefore directly affect fat inflammation. There was a marked induction of *Cnr2* expression in the adipose tissue of both ob/ob mice and HFD-fed WT mice, that paralleled the increase in body weight and inflammation (**Fig 5A**), as shown by the increased expression of *Emr1* (**Fig 5 A**) and of *Tnf* and *CCL2* (**Fig 4 C**). Adipose tissue fractionation experiments showed a strong induction of *Cnr2* expression in the stromal vascular fraction of ob/ob animals as compared to the low level of expression observed in lean ob⁺/ob mice (**Fig 5 B**); in contrast, *Cnr2* expression was negligible in the adipocyte fraction (**Fig 5 B**). We next investigated the impact of CB2 receptor agonists on adipose tissue inflammation in *ex vivo* experiments performed in cultured fat pads isolated from ob/ob mice. The CB2 receptor

agonist JWH-133 increased *Tnf* and *Ccl2* expression (**Fig 5 C**). Conversely, a short course 17 day-treatment of ob/ob mice with the selective CB2 receptor antagonist AM-630 (1mg/kg) reduced adipose tissue inflammation. Indeed, AM-630 lowered fat macrophage accumulation, as shown by reduced induction of *Emr1* and decreased accumulation of F4/80 positive cells (**Fig 5 D**). Moreover, *Tnf* and *Ccl2* expressions were attenuated in AM-630-treated ob/ob mice, as compared to vehicle-treated animals (**Fig 5 E**). Interestingly, AM-630 treatment did not affect body weight progression in these experimental conditions (**Fig 5 F**). Altogether, these results demonstrate that CB2 receptors expressed in the adipose tissue participate to the inflammatory response of obese animals.

DISCUSSION

The present study uncovers the significant contribution of CB2 receptors to high-fat induced obesity and its metabolic complications. Indeed, high fat fed CB2-ablated mice show attenuated body weight gain, a strong down-regulation of the related fat inflammatory state, improved insulin sensitivity and resistance to steatosis. Moreover, we show that obesity promotes a strong induction of CB2 receptors mRNA in adipose tissue. CB2 receptor immunoreactivity has been previously detected in the adipose tissue²⁰, but with no change in response to HFD²⁰, possibly because of the reported low sensitivity of CB2 antibodies²⁸. Nonetheless, in light of the production of the endogenous CB2 ligand 2-arachidonoylglycerol by fat cells²⁹ and of its increased circulating levels in obese patients³⁰, these data overall indicate that the endogenous CB2 tone is enhanced during obesity and associated metabolic disorders. Similarly, previous studies have reported an overactive CB1 tone during obesity^{31, 32}, associated with detrimental effects on body weight progression, insulin resistance and steatogenesis^{8, 11, 33-35}. Endogenous CB1-dependent activation of the endocannabinoid system was deemed responsible for a complex network of central and peripheral effects, including stimulation of food intake, decreased lipolysis and enhanced lipogenesis in adipose tissue and the liver, and attenuation of energy expenditure^{8, 11, 33-35}. Unlike CB1 receptor inactivation, CB2 ablation has no effect on food intake, but our data identify at least two mechanisms underlying reduction of obesity progression in *Cnr2*^{-/-} mice. Thus, CB2 invalidation increases fecal fat excretion, by a mechanism that may involve inhibition of pancreatic lipoprotein lipase gene expression (Cadoudal et al, preliminary results). In addition, indirect calorimetry experiments demonstrate that CB2 receptor inactivation is associated with a decrease of the respiratory quotient, predominantly during the post-prandial

state, indicating a shift in metabolic fuel preference toward the utilization of fat as an energy substrate, thereby reducing accumulation of fat stores.

Recent studies have conclusively shown that adipose tissue inflammation and over production of *Ccl2* and *Tnf* play a major role in obesity-associated insulin resistance and NAFLD ^{4-7, 36, 37}. Our data show a strong correlation between adipose tissue CB2 receptor expression and fat inflammatory response. Indeed, during obesity progression, fat CB2 receptors are strongly induced concurrently to fat inflammation, both in HFD-fed mice and in ob/ob animals. Adipose tissue fractionation experiments further demonstrate that induction of *Cnr2* in obese mice occurs in the macrophage-enriched stromal vascular fraction, whereas the mRNA remains negligible in the adipocyte fraction (Fig 4B). However, considering previous data showing CB2 receptor expression in human adipocytes and in adipocyte cell lines ^{38, 39}, the contribution of adipocyte CB2 receptors to fat metabolism and inflammation cannot be definitively ruled out. Nevertheless, we demonstrate that CB2 inactivation is associated with a decrease in adipose tissue inflammation, as reflected by a lower density of fat macrophages and reduced expression of *Ccl2* and *Tnf*. Although this beneficial effect on inflammatory response may at least partly result from reduced weight gain, we show that CB2 receptors also directly enhance adipose tissue inflammation. Indeed, the CB2 receptor agonist JWH-133 up-regulates *Ccl2* and *Tnf* mRNAs in isolated fat pads. Conversely, genetic or pharmacological inactivation of CB2 receptors attenuates production of *Ccl2* and *Tnf* and macrophage accumulation into the adipose tissue. Together, these data support a critical role of adipose tissue CB2 receptors in obesity-associated inflammation, by mechanisms that may include i) decreased macrophage recruitment, in light of the reported crucial role of CCL2 in adipose tissue macrophage infiltration ^{38, 37}; ii) increased macrophage migration and/or iii) enhanced chemotaxis, considering reported stimulatory effects of CB2 receptors on these two

functions^{40, 41 15, 42}. Of note, mice treated with AM-630 for 2 weeks display reduced adipose tissue inflammation, but nevertheless show similar growth curves compared to vehicle-treated animals; These findings also argue for a direct effect of CB2 receptors on fat inflammation, independently of body weight gain. Factors underlying AM-630 tissue specific effects with respect to genetically inactivated mice are uncertain. Preferential tissue distribution of the molecule may be envisaged, as well as the short duration of treatment, or intrinsic developmental differences in genetically ablated mice. Altogether, these data strongly argue for crucial proinflammatory properties of adipose tissue CB2 receptors during obesity and related metabolic complications.

Our data suggest that fat CB2 receptors participate to the increase in insulin resistance, , in light of the established contribution of adipose tissue inflammation to obesity-induced insulin resistance⁴⁻⁷, and as expected from enhanced fat inflammation in response to CB2 agonists. In keeping, analysis of metabolic parameters and functional tests showed that *Cnr2* ^{-/-} mice fed HFD display improved systemic insulin sensitivity. It should also be pointed out that contribution of CB2 receptors expressed by other insulin sensitive tissues such as skeletal muscle and liver^{20, 22, 23} may be anticipated, and that additional deleterious effects of CB2 receptors on insulin secretion may also be expected, in light of the inhibition of insulin secretion of CB2 receptors expressed in pancreatic β cells^{19, 20}.

Systemic insulin resistance enhances the release of non esterified fatty acid from adipose tissue, leading to increased fatty acid storage in hepatocytes⁴³ and is therefore a major contributor of fatty liver⁴³. Moreover, recent studies have convincingly demonstrated a tight relationship between obesity-induced overproduction of fat inflammatory mediators such as *Ccl2*, insulin resistance and steatogenesis. Thus, mice specifically overexpressing *Ccl2* in

adipose tissue exhibit insulin resistance and increased hepatic triglyceride content. Conversely, invalidation of *Ccl2* improves insulin sensitivity and prevents steatosis^{36, 37}. These data suggest that inactivation of *Cnr2* may prevent steatosis at least partly via reduced adipose tissue synthesis of *Ccl2*. Additional direct effects of CB2 agonists on fatty acid metabolism in hepatocytes might have been awaited, since CB2 receptors are expressed in the liver²³, and in light of our data demonstrating that *Cnr2* ablation reduces hepatic lipogenic gene expression. However, we did not detect CB2 receptor expression in steatotic hepatocytes (Deveaux, unpublished data), therefore suggesting that CB2-dependent increase in *de novo* lipogenesis is probalby indirect.

In conclusion, the present uncover the potent antiinflammatory effects of CB2 receptor inactivation during experimental obesity and their beneficial consequences on insulin resistance and fatty liver. Moreover, the study also demonstrates that CB2 inactivation may attenuate diet-induced obesity via peripheral effects on energy expenditure and fecal fat excretion. Altogether, these findings indicate that distinct CB1 and CB2 receptor-dependent pathways significantly contributes to the pathogenesis of obesity, insulin resistance and NAFLD^{8, 10, 11}. They also further document the involvement of CB2 receptors in the pathogenesis of inflammatory disorders¹⁵ and liver diseases^{9, 17, 23, 44-47}.

REFERENCES

1. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881-7.
2. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-209.
3. Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2007;132:2191-207.
4. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
5. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-7.
6. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132:2169-80.
7. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-30.
8. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery* 2008;7:438-455.
9. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and Their Receptors in the Liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G9-G12.
10. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:389-462.
11. Kunos G, Osei-Hyiaman D. Endocannabinoids and liver disease. IV. Endocannabinoid involvement in obesity and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G1101-4.

12. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005;365:1389-97.
13. Despres JP, Golay A, Sjostrom L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005;353:2121-34.
14. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *Jama* 2006;295:761-75.
15. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2005;5:400-11.
16. Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature Medicine* 2005;434:782-6.
17. Lotersztajn S, Teixeira-Clerc F, Julien B, Deveaux V, Ichigotani Y, Manin S, Tran-Van-Nhieu J, Karsak M, Zimmer A, A. M. CB2 receptors as new therapeutic targets during liver diseases. *Br J Pharmacol* 2008;153:286-289.
18. Batkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey-White J, Jafri A, Hasko G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Faseb J* 2007;21:1788-800.
19. Juan-Pico P, Fuentes E, Bermudez-Silva FJ, Javier Diaz-Molina F, Ripoll C, Rodriguez de Fonseca F, Nadal A. Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 2006;39:155-62.

20. Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, Di Marzo V. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:553-65.
21. Bermudez-Silva FJ, Suarez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Munoz AL, Fuentes E, Juan-Pico P, Castro MJ, Milman G, Mechoulam R, Nadal A, Rodriguez de Fonseca F. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* 2008;51:476-87.
22. Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA. Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2007;267:63-9.
23. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005;128:742-55.
24. Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 2000;396:141-149.
25. Even PC, Perrier E, Aucouturier JL, Nicolaidis S. Utilisation of the method of Kalman filtering for performing the on-line computation of background metabolism in the free-moving, free-feeding rat. *Physiol Behav* 1991;49:177-87.
26. Even PC, Mokhtarian A, Pele A. Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neurosci Biobehav Rev* 1994;18:435-47.
27. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 2005;115:3554-63.

28. Buckley NE. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol* 2008;153:309-18.
29. Gonthier MP, Hoareau L, Festy F, Matias I, Valenti M, Bes-Houtmann S, Rouch C, Robert-Da Silva C, Chesne S, Lefebvre d'Hellencourt C, Cesari M, Di Marzo V, Roche R. Identification of endocannabinoids and related compounds in human fat cells. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:837-45.
30. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005;54:2838-43.
31. Bluher M, Engeli S, Kloting N, Berndt J, Fasshauer M, Batkai S, Pacher P, Schon MR, Jordan J, Stumvoll M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 2006;55:3053-60.
32. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP, Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:692-9.
33. Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrie P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007;46:122-9.
34. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Batkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G. Hepatic CB(1) receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008.

35. Bellocchio L, Mancini G, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. Cannabinoid receptors as therapeutic targets for obesity and metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:586-91.
36. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 2006;281:26602-14.
37. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494-505.
38. Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006;126:177-87.
39. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3171-80.
40. Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol* 2008;153:299-308.

41. Montecucco F, Burger F, Mach F, Steffens S. CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1145-55.
42. Derocq JM, Jbilo O, Bouaboula M, Segui M, Clere C, Casellas P. Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation. *J Biol Chem* 2000;275:15621-8.
43. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829-38.
44. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran-Van-Nhieu J, Deveaux V, Serriere-Lanneau, Li L, Mallat A, Lotersztajn S. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a novel strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nature Medicine* 2006;12:671-676.
45. Hezode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis smoking as a risk factor for fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;42:63-71.
46. Hezode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, Pawlotsky JM, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis use, a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008;134:432-439
47. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *Journal of Endocrinological Investigation* 2006;29:58-65.

LEGENDS TO FIGURES

Fig 1: Genetic invalidation of *Cnr2* reduces obesity by increasing fecal fat elimination.

WT and *Cnr2* ^{-/-} mice were fed high fat diet (HFD) for 15 weeks. **A**, Body weight progression over time. *Inset*: body weight gain of WT and *Cnr2* ^{-/-} mice fed normal or HFD for 15 weeks; **B**, Adipocyte size, magnification X 200. **C**, Average food intake over 15 weeks in HFD-fed animals; **D**, basal and total metabolic rate and energy expenditure (EE) due to locomotor activity were measured by indirect calorimetry; **E**, Respiratory quotient measured by indirect calorimetry. Basal RQ, post-meal RQ (0-6h post meal), peak post meal (highest value of RQ during the post meal period) and overall RQ are shown. Peak post-meal value was observed at 1 +/- 0.25 h and 2.85 +/- 0.5 h ($p < 0.05$) following administration of test meal in WT mice and *Cnr2* ^{-/-} mice, respectively; **F**, fecal lipid content, expressed as mg lipid/g dry feces weight in WT and *Cnr2* ^{-/-} mice under HFD * $p < 0.05$ for WT vs *Cnr2* ^{-/-} HFD mice.

Figure 2: Genetic invalidation of *Cnr2* improves insulin sensitivity in HFD-fed mice.

Wild type and *Cnr2* ^{-/-} mice were fed either standard chow (control) or HFD for 15 weeks **A-E**, *Cnr2* invalidation reduces obesity-induced insulin resistance: **A**, fasting glycemia; **B**, insulinemia, **C**, HOMA-IR; **D**, blood glucose level during insulin tolerance tests in HFD-fed mice. **E**, Hyperinsulinemic-euglycemic clamp, as assessed by glucose turnover rate, whole body glycolysis and glycogen synthesis, following insulin stimulation. * $p < 0.05$ for WT vs *Cnr2* ^{-/-} HFD mice. # $p < 0.05$ for WT lean vs WT HFD mice.

Figure 3: Genetic invalidation of *Cnr2* blunts steatosis in HFD-fed mice. **A**, Representative liver tissue sections (magnification X 100), mean steatosis score and **B**, hepatic triglycerides in WT and *Cnr2* ^{-/-} mice. **C**, Hepatic *Srebf1*, *Fasn*, *Acc* expressions in WT and *Cnr2* ^{-/-} mice fed HFD. * p<0.05 for WT vs *Cnr2* ^{-/-} HFD mice.

Figure 4: Genetic invalidation of *Cnr2* reduces the inflammatory response in the adipose tissue of HFD-fed *Cnr2* ^{-/-} mice. **A**, *Emr1* expression was quantified in epididymal fat of WT and *Cnr2* ^{-/-} mice fed a HFD or control diet. **B**, Macrophage infiltration into epididymal fat was assessed by immunohistochemical detection of F4/80 (magnification X400) and quantification of F4/80 stained cells/total cells. **C**, *Ccl2* and *Tnf* expression in the epididymal fat of WT and *Cnr2* ^{-/-} mice fed a HFD vs lean mice. *p<0.05 for WT vs *Cnr2* ^{-/-} HFD mice.

Figure 5: CB2 agonists and antagonists modulate the inflammatory response via CB2 receptors expressed in the adipose tissue **A**, Time course of *Cnr2*, and *Emr1* expression in the epididymal adipose tissue of lean ob^{+/ob} and obese ob^{ob} mice, and corresponding body weight. Induction of *Cnr2* and *Emr1* in the adipose tissue of HFD-fed wild mice and their lean counterparts; #, p<0.05 for gene expression in ob^{ob} vs ob^{+/+} mice or for HFD-fed mice gene expression vs mice under control diet. *, p<0.05 for ob^{ob} body weight vs ob^{+/+} mice or for HFD-fed mice body weight vs mice under control diet. **B**, Selective distribution of *Cnr2* in the adipose tissue. *Cnr2* was quantified in the SVF and adipocyte fractions of ob^{ob} and ob^{+/ob} mice. **C**, Activation of CB2 receptors with 1 μ M JWH-133 for 48 hrs up-regulates *Tnf* and *Ccl2* expression in explants isolated from ob^{ob} mice fat pads. *p<0.05 for JWH-133 vs vehicle. **D**, AM-630 reduces macrophage infiltration in the adipose tissue, as assessed by *Emr1* expression and immunohistochemical detection of F4/80 positive cells in ob^{ob} mice daily treated for 17 days with an intraperitoneal injection of AM-630 (1mg/kg) or vehicle; **E**,

Fat *Tnf* and *Ccl2* expression in AM-630 or vehicle-treated ob/ob mice. * $p < 0.05$ for vehicle vs AM-630-treated ob/ob mice. F, Body weight progression of AM-630 and vehicle-treated ob/ob mice over time.

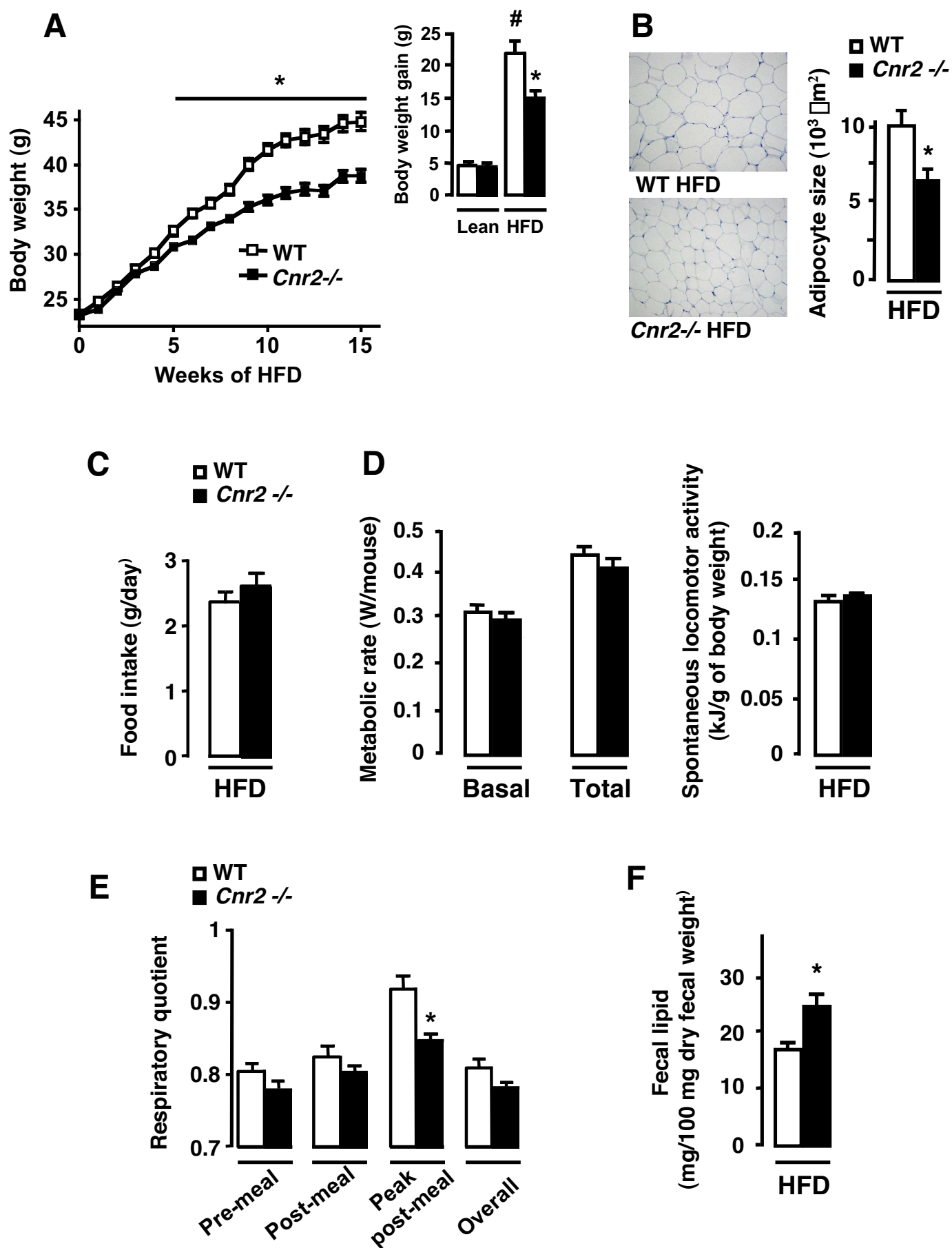


Figure 1

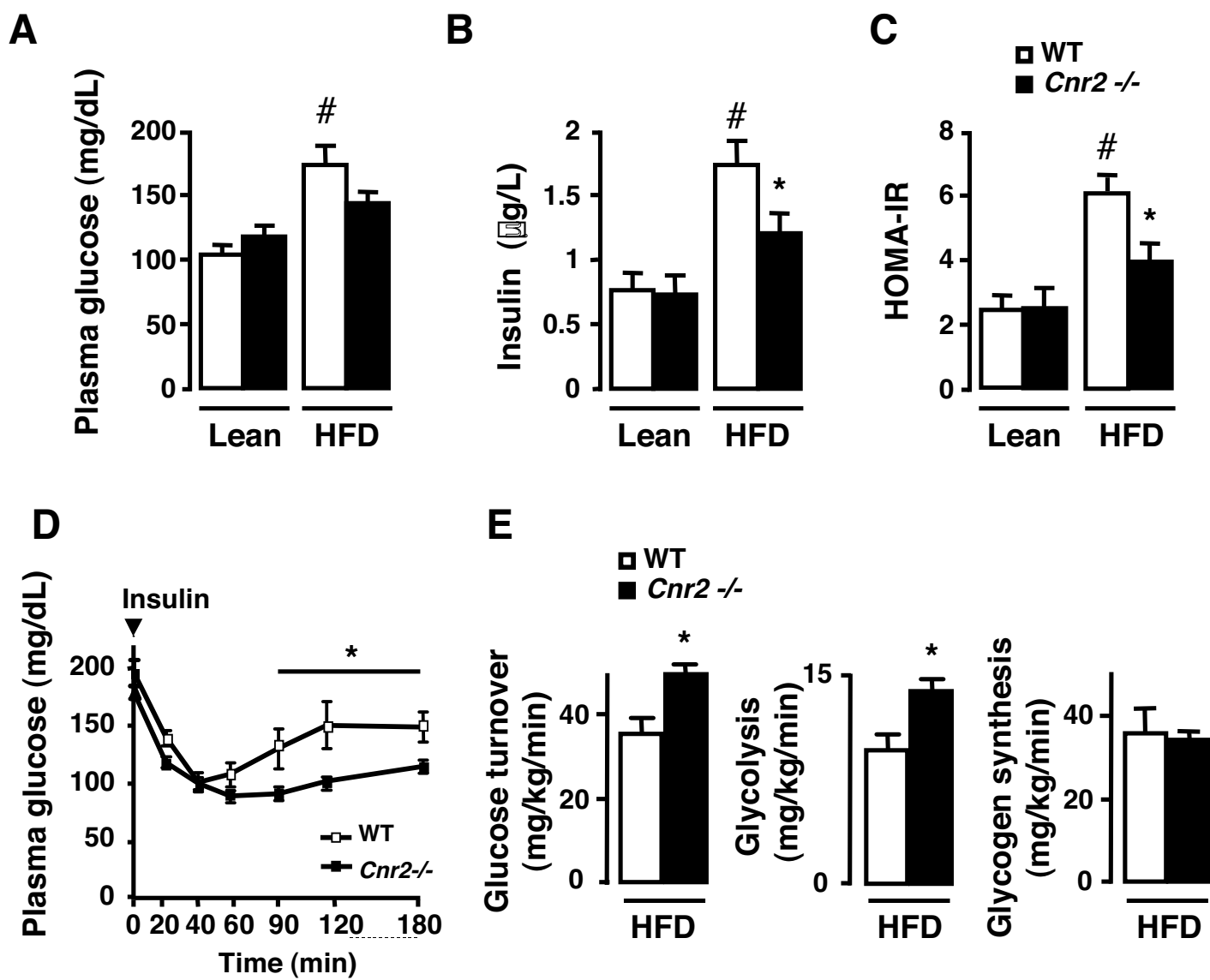
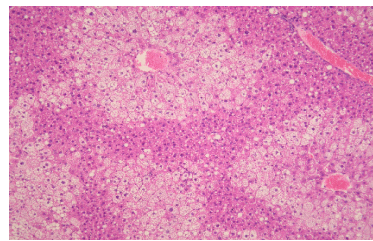
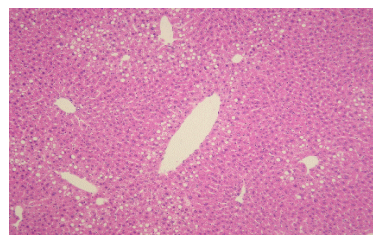


Figure 2
136

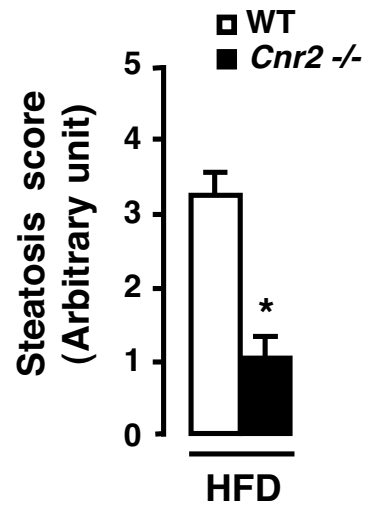
A



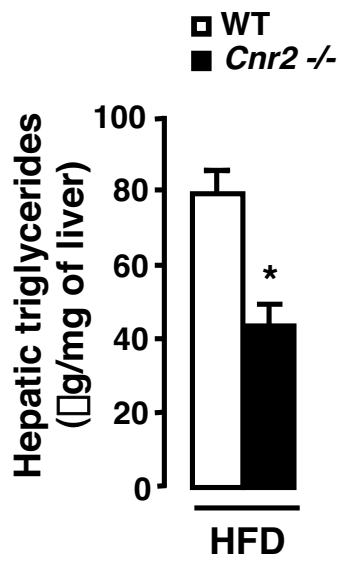
WT HFD



Cnr2^{-/-} HFD



B



C

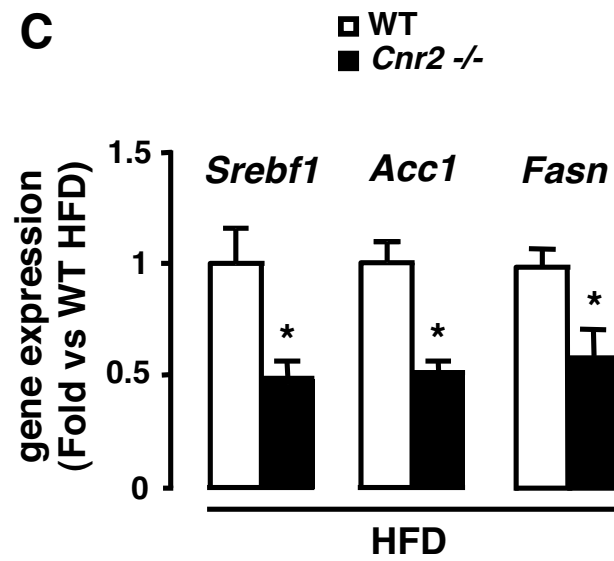


Figure 3

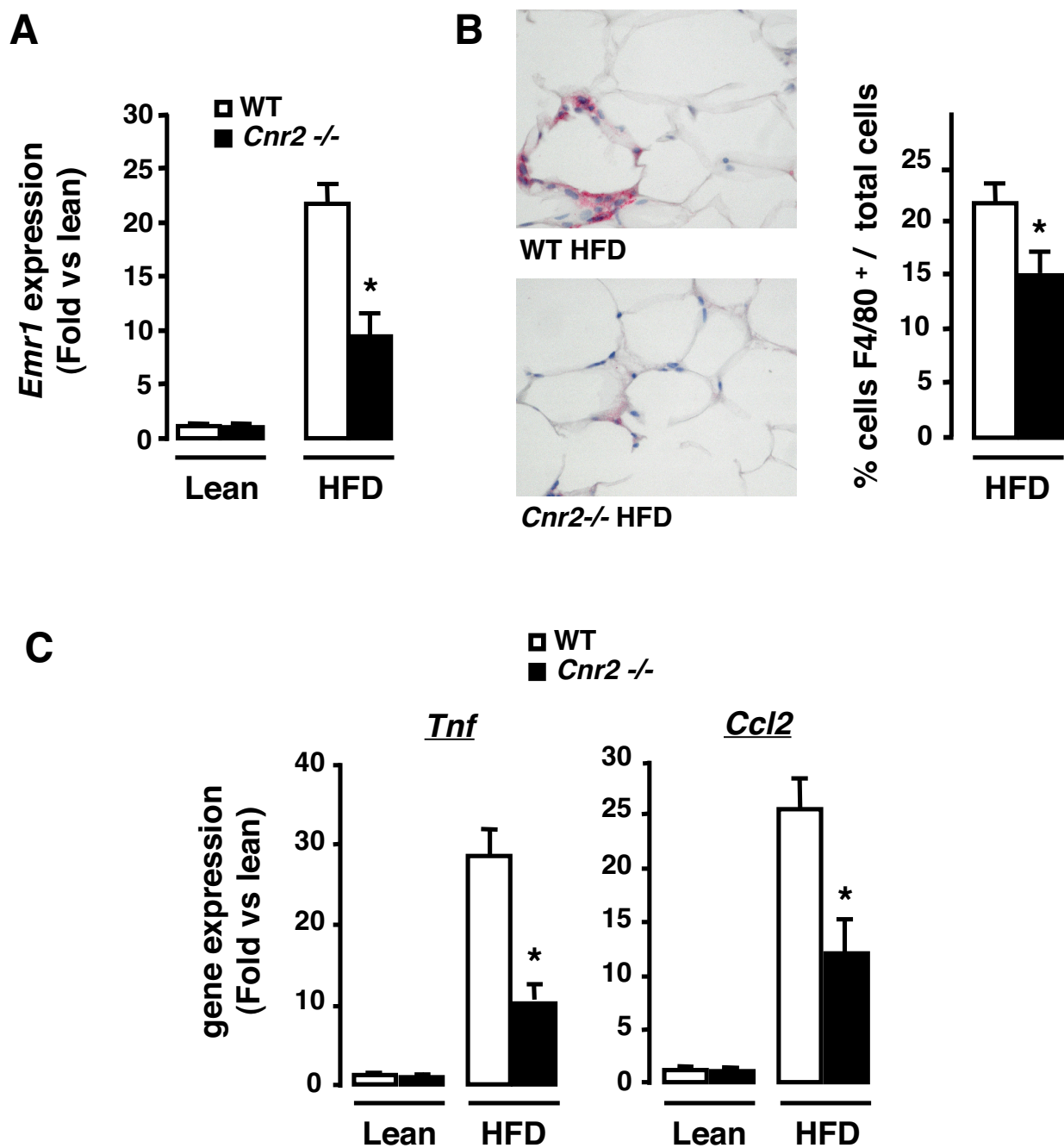


Figure 4

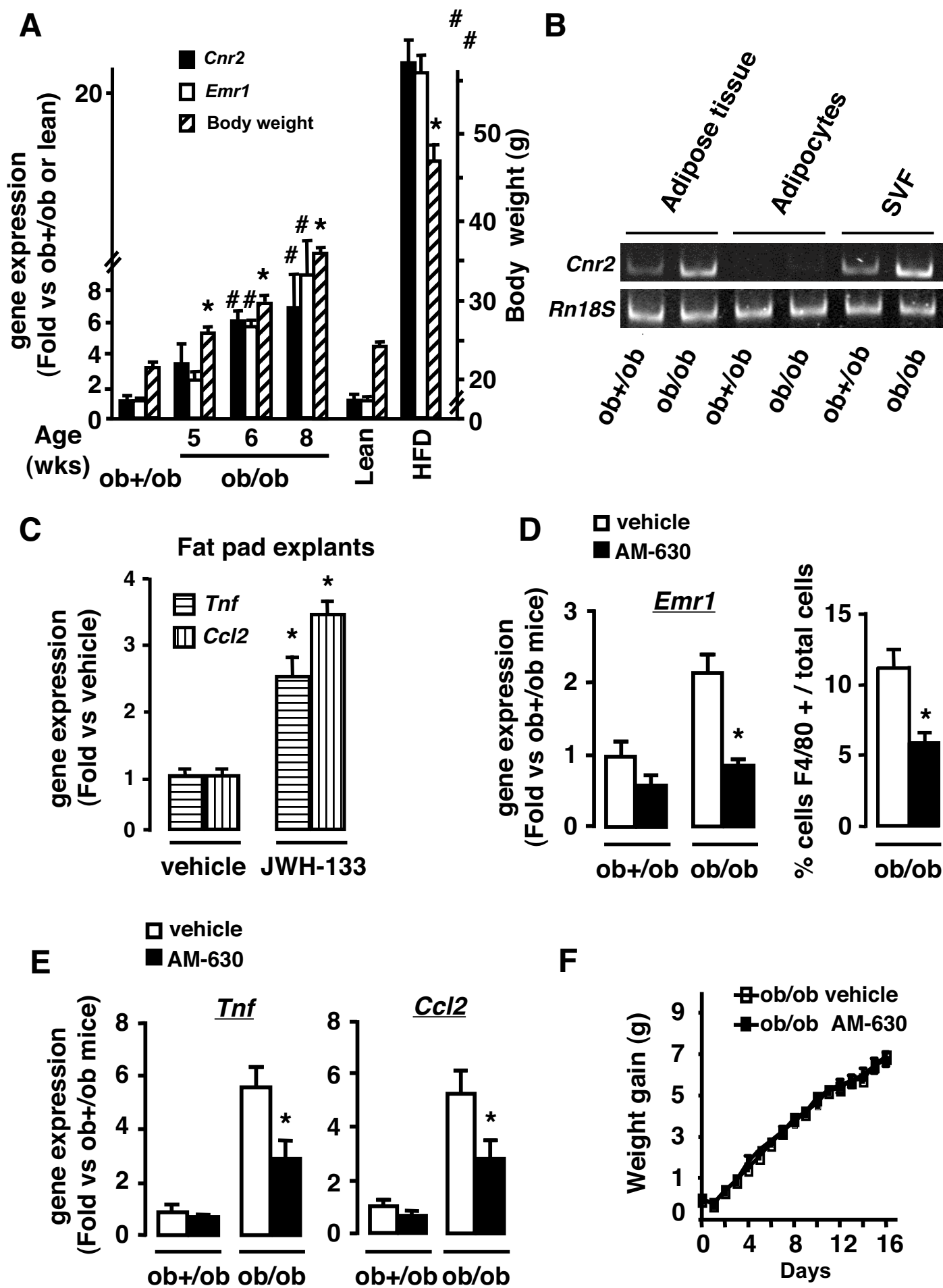


Figure 5

Le récepteur CB2, un nouvel acteur dans le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance et de la stéatose

Il est bien établi que le système cannabinoïde joue un rôle majeur dans le développement de l'obésité, de l'insulino-résistance et de la stéatose via le récepteur CB1 (Di Marzo, Goparaju et al. 2001; Harrold, Elliott et al. 2002; Ravinet Trillou, Delgorge et al. 2004). Cependant il n'existait aucune donnée sur le rôle potentiel du récepteur CB2. Étant donné le rôle majeur de l'inflammation dans l'insulino-résistance et la stéatose (Weisberg, McCann et al. 2003) et l'importance du récepteur CB2 dans la régulation de l'inflammation, notre objectif est d'étudier l'implication du récepteur CB2 dans l'insulino-résistance et la stéatose.

Conséquences de l'invalidation génétique du récepteur CB2 sur le développement de l'obésité et de ses complications telles que l'insulino-résistance et la stéatose.

Cette étude a été réalisée dans un modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique et de souris génétiquement obèses, les souris ob/ob déficientes en leptine. De façon surprenante, nous avons observé que les souris invalidées pour le récepteur CB2 soumises à un régime hyperlipidique, ont une prise de poids significativement plus faible que les souris sauvages alors que la prise alimentaire est identique dans les deux groupes. L'étude de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte a démontré qu'il n'existait aucune différence de métabolisme de base (métabolisme de repos), ni de métabolisme total entre les souris sauvages et invalidées pour le récepteur CB2. De plus, l'effet thermique du repas est identique entre les deux groupes. En revanche, le quotient respiratoire est inférieur chez les souris invalidées pour le récepteur CB2 par rapport aux souris sauvages, bien que la différence entre les deux groupes ne soit pas significative. Ces résultats suggèrent que dans la période post prandiale, les souris invalidées pour le récepteur CB2 réduisent l'inhibition de l'oxydation des

lipides induite par l'alimentation. De plus, l'analyse du débit lipidique des souris sauvages et invalidées pour le récepteur CB2 montre une perte de lipides par les selles chez les souris invalidées pour le récepteur CB2 sous régime hyperlipidique par rapport aux souris sauvages. L'ensemble de ces résultats démontre que l'invalidation du récepteur CB2 réduit la progression de l'obésité en augmentant l'oxydation et l'excrétion fécale des lipides.

Nous avons ensuite étudié les conséquences de l'invalidation du récepteur CB2 sur l'insulino-résistance et la stéatose. Les souris obèses invalidées pour le récepteur CB2 sont moins résistantes à l'insuline que les souris sauvages, comme le montre l'amélioration du score de HOMA et de la tolérance à l'insuline, comme le confirment les données obtenues par la technique du clamp euglycémique. Enfin la stéatose hépatique est massive chez les souris sauvages obèses, alors qu'elle reste minime chez les animaux invalidés pour le récepteur CB2, comme le montrent le score faible de stéatose et la faible augmentation des triglycérides chez les souris invalidées pour le récepteur CB2. Ces données sont confirmées par la réduction de l'expression hépatique du facteur de transcription SREBP-1c et de ses cibles : l'ACC et FAS.

Conséquence de l'invalidation du récepteur CB2 sur le développement de l'inflammation associée à l'obésité.

Nous avons également étudié l'impact du récepteur CB2 sur l'inflammation du tissu adipeux en raison de son rôle majeur dans le développement de l'insulino-résistance et de la stéatose. Les souris sauvages développent une inflammation importante dans le tissu adipeux viscéral, marquée par une augmentation importante de la densité des macrophages et une induction proportionnelle de l'expression d'ARNm du TNF α et de CCL2. En revanche, la densité des macrophages et l'induction des cytokines pro-inflammatoires est significativement plus faible

chez les souris invalidées pour le récepteur CB2 exposées au régime hyperlipidique. Nous avons ensuite considéré la possibilité que le récepteur CB2 pouvait être exprimé par le tissu adipeux et pouvait donc directement stimuler l'inflammation du tissu adipeux. Nous avons mis en évidence une induction de l'expression du récepteur CB2 dans le tissu adipeux de souris obèses soumises au régime lipidique, ou chez les souris ob/ob. Afin de caractériser la distribution de l'expression du récepteur CB2 dans la fraction adipocytaire *versus* non adipocytaire, la fraction adipocytaire a été séparée de la fraction stromale vasculaire par centrifugation. Nous avons observé une induction de l'expression du récepteur CB2 dans la fraction stromale vasculaire alors qu'elle est négligeable dans la fraction adipocytaire.

Ces résultats ont été confirmés *ex vivo*, à l'aide de cultures d'explants de tissu adipeux isolés de souris obèses. En effet, l'activation des récepteurs CB2 par un agoniste sélectif conduit à une augmentation de la production de TNF α et de CCL2 par les explants. À l'inverse, le traitement des souris ob/ob par une injection intrapéritonéale quotidienne d'un antagoniste CB2 (l'AM-630 à 1mg/kg) pendant quinze jours diminue la réponse inflammatoire du tissu adipeux, avec une réduction de l'infiltrat macrophagique associée à une diminution de la production de TNF α et de CCL2. L'ensemble de ces données démontre que le récepteur CB2 du tissu adipeux augmente la réponse inflammatoire, et pourrait, par ce mécanisme, contribuer au développement de l'insulino-résistance.

Discussion

Cette étude dévoile la contribution importante du récepteur CB2 dans le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques notamment l'insulino-résistance et la stéatose. Nous avons montré que l'obésité était corrélée à une forte induction de l'expression du récepteur CB2 dans le tissu adipeux. Ces résultats, associés à la mise en évidence d'une sécrétion de 2-AG par les adipocytes (Gonthier, Hoareau et al. 2007) et à

l'élévation du taux circulant de 2-AG chez les obèses (Engeli, Bohnke et al. 2005) démontrent qu'il existe une activation du système endocannabinoïde au cours du syndrome métabolique. De la même façon, le récepteur CB1 favorise la progression de l'obésité et de ses complications métaboliques par un mécanisme impliquant un effet central sur la prise alimentaire et des effets périphériques sur l'insulino-résistance. En revanche nos résultats indiquent que l'inactivation du récepteur CB2 n'a aucun effet sur la prise alimentaire. Nous avons identifié au moins deux mécanismes contribuant à la réduction de la prise de poids chez les souris invalidées pour le récepteur CB2. En effet, les souris invalidées pour le récepteur CB2 ont une excrétion lipidique fécale augmentée, par un mécanisme qui impliquerait l'inhibition de la lipase pancréatique (résultats préliminaires). De plus, les expériences de calorimétrie indirecte démontrent que l'inactivation du récepteur CB2 est associée à une diminution du quotient respiratoire, essentiellement après le repas. Ceci indique que les souris invalidées pour le récepteur CB2 oxydent plus l'énergie ingérée par rapport aux souris sauvages et réduisent ainsi l'accumulation de lipides.

Les études récentes ont montré que l'inflammation du tissu adipeux joue un rôle important dans la résistance à l'insuline associée à l'obésité (Weisberg, McCann et al. 2003; Xu, Barnes et al. 2003; Hotamisligil 2006; Kamei, Tobe et al. 2006; Kanda, Tateya et al. 2006). Nos données montrent une forte corrélation entre l'expression du récepteur CB2 et la réponse inflammatoire dans le tissu adipeux. En effet, l'induction de l'expression du récepteur CB2 est parallèle à celle de l'expression de cytokines inflammatoires et à la prise de poids. Le récepteur CB2 est exprimé dans la fraction stromale et négligeable dans la fraction adipocytaire. Pourtant, des études avaient identifié la présence du récepteur CB2 dans les adipocytes

humains et dans des lignées adipocytaires (Matias, Gonthier et al. 2006; Roche, Hoareau et al. 2006). Ces données ne nous permettent donc pas d'exclure une contribution des adipocytes dans la réponse inflammatoire du tissu adipeux.

Nous démontrons que l'inactivation du récepteur CB2 est associée à une diminution de l'inflammation du tissu adipeux, comme le montrent la baisse de densité de macrophages dans le tissu adipeux et la diminution de l'expression de l'ARNm du TNF α et du CCL2. Bien que cet effet favorable de l'inactivation du récepteur CB2 sur la réponse inflammatoire peut être la conséquence de la prise de poids réduite des souris invalidées pour le récepteur CB2, nos résultats démontrent que l'activation du récepteur CB2 du tissu adipeux stimule l'inflammation. En effet, les études ex vivo sur cultures d'explants démontrent que l'agoniste du récepteur CB2, le JWH133, augmente l'expression d'ARNm du TNF α et du CCL2. Inversement l'inactivation génétique ou pharmacologique du récepteur CB2 atténue la production de CCL2 et du TNF α ainsi que l'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux. Ces données mettent en évidence le rôle délétère du récepteur CB2 dans le développement de l'inflammation associée à l'obésité qui contribue à un recrutement massif de macrophages dans le tissu adipeux.

De façon intéressante, le traitement des souris obèses à l'antagoniste CB2, l'AM-630 pendant deux semaines réduit l'inflammation du tissu adipeux alors qu'elle ne modifie pas la progression de la prise de poids des souris obèses par rapport aux souris contrôle. Ces données constituent un argument supplémentaire en faveur d'un effet direct des récepteurs CB2 sur l'inflammation, indépendamment de la prise de poids. Ces différences de résultats sur la progression de l'obésité entre les souris invalidées pour le récepteur CB2 de façon génétique ou pharmacologique ne sont pas claires. Elles pourraient être dues à une distribution tissulaire

préférentielle de la molécule dans certains tissus et/ou à une durée de traitement trop courte ou l'invalidation elle-même du récepteur CB2.

L'ensemble de ces données démontre les propriétés pro-inflammatoires du récepteur CB2 dans le tissu adipeux au cours de l'obésité et de ses complications métaboliques.

Étant donnée la relation étroite entre l'inflammation et le développement de l'insulino-résistance (Xu, Barnes et al. 2003; Hotamisligil 2006; Shoelson, Herrero et al. 2007), notre hypothèse était que le récepteur CB2 pouvait contribuer au développement de l'insulino-résistance. De ce fait, nous avons démontré que les souris invalidées pour le récepteur CB2 obèses étaient plus sensibles à l'insuline que les souris sauvages obèses, au niveau systémique. La contribution des tissus cibles de l'insuline chez les souris invalidées pour le récepteur CB2 notamment dans le foie et le muscle squelettique où le récepteur CB2 est exprimé, reste à déterminer (Julien, Grenard et al. 2005; Cavuoto, McAinch et al. 2007).

Il est bien établi que la résistance à l'insuline systémique améliore la libération des acides gras non estérifiés du tissu adipeux, en causant une augmentation des acides gras non estérifiés au niveau hépatique et en contribuant au développement de la stéatose (Postic and Girard 2008). De plus des études récentes ont démontré la relation étroite entre la surproduction de cytokines inflammatoires, et l'insulino-résistance combinée à un effet stéatogène. Ainsi les souris surexprimant CCL2 spécifiquement au niveau du tissu adipeux sont plus insulino résistantes et développent une stéatose massive (Kamei, Tobe et al. 2006). En revanche, l'invalidation du récepteur de CCL2 améliore la sensibilité à l'insuline et prévient de la stéatose (Kanda, Tateya et al. 2006). Ces données suggèrent que l'inactivation du gène *Cnr2* peut prévenir de la stéatose au moins partiellement *via* la synthèse réduite de Ccl2 par le tissu adipeux. De plus, des effets directs du récepteur CB2 hépatique sur la

synthèse de *novo* des acides gras contribueraient au développement de la stéatose, puisque le récepteur CB2 est exprimé dans le foie (Julien, Grenard et al. 2005). Cependant, en raison de l'absence d'expression du récepteur CB2 dans les hépatocytes stéatosiques (résultats préliminaires), il est probable que l'augmentation de la lipogenèse *via* le récepteur CB2 soit indirecte.

En conclusion, cette étude met en évidence les effets anti-inflammatoires de l'inactivation du récepteur CB2 dans un modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique et leurs conséquences favorables sur la résistance à l'insuline et le développement de la stéatose. De plus, cette étude démontre également que l'inactivation du récepteur CB2 diminue l'obésité *via* des effets périphériques sur la dépense d'énergie et l'excrétion lipidique fécale.

***2^{ème} Article : CB1 CANNABINOID RECEPTOR ANTAGONISM :
A NEW STRATEGY FOR THE TREATMENT OF LIVER
FIBROSIS***

Publié dans Nature Medicine

CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis

Fatima Teixeira-Clerc^{1,2,6}, Boris Julien^{1,2,6}, Pascale Grenard^{1,2,6}, Jeanne Tran Van Nhieu^{1,2,4}, Vanessa Deveau^{1,2}, Liying Li^{1,2}, Valérie Serriere-Lanneau^{1,2}, Catherine Ledent⁵, Ariane Mallat¹⁻³ & Sophie Lotersztajn¹⁻³

Hepatic fibrosis, the common response associated with chronic liver diseases, ultimately leads to cirrhosis, a major public health problem worldwide¹. We recently showed that activation of hepatic cannabinoid CB2 receptors limits progression of experimental liver fibrosis². We also found that during the course of chronic hepatitis C, daily cannabis use is an independent predictor of fibrosis progression³. Overall, these results suggest that endocannabinoids may drive both CB2-mediated antifibrogenic effects and CB2-independent profibrogenic effects. Here we investigated whether activation of cannabinoid CB1 receptors (encoded by *Cnr1*) promotes progression of fibrosis. CB1 receptors were highly induced in human cirrhotic samples and in liver fibrogenic cells. Treatment with the CB1 receptor antagonist SR141716A decreased the wound-healing response to acute liver injury and inhibited progression of fibrosis in three models of chronic liver injury. We saw similar changes in *Cnr1*^{-/-} mice as compared to wild-type mice. Genetic or pharmacological inactivation of CB1 receptors decreased fibrogenesis by lowering hepatic transforming growth factor (TGF)- β 1 and reducing accumulation of fibrogenic cells in the liver after apoptosis and growth inhibition of hepatic myofibroblasts. In conclusion, our study shows that CB1 receptor antagonists hold promise for the treatment of liver fibrosis.

Chronic liver injury is associated with prolonged and dysregulated wound healing, characterized by an imbalance between excessive synthesis of extracellular matrix and altered matrix degradation¹. The fibrogenic process is consecutive to proliferation and accumulation of myofibroblastic cells deriving from different cell populations (that is, activated hepatic stellate cells and hepatic myofibroblasts). Both cell types express smooth muscle α -actin (α -SMA) and synthesize fibrogenic cytokines (TGF- β 1), growth factors, chemokines, fibrosis components and inhibitors of matrix degradation¹. Effective antifibrotic treatments are not yet available for human use, and numerous efforts are directed at the development of liver-specific

antifibrotic therapies. Studies have shown that endogenous lipidic cannabinoid ligands and their receptors, CB1 and CB2 (refs. 4–7), have a key role in the pathogenesis of chronic liver injury⁸. Thus, we showed the antifibrogenic properties of CB2 receptors in the liver². In contrast, we found that daily cannabis smoking is an independent predictor of fibrosis progression during chronic hepatitis C³. We therefore hypothesized that CB1 receptors may promote liver fibrosis.

We first investigated whether hepatic CB1 receptor expression is regulated during chronic liver diseases in surgical human liver specimens. Western blot analysis showed faint expression of CB1 receptors in normal human liver, contrasting with a strong induction in cirrhotic samples, whatever the etiology (Fig. 1a). Accordingly, immunohistochemistry showed a discrete, punctuate CB1 immunoreactivity along sinusoidal walls in normal human liver (Fig. 1b), and a marked increase in cirrhosis (Fig. 1c). CB1 receptors were predominantly expressed in nonparenchymal cells distributed along the fibrotic septa in spindle-shaped cells, inflammatory cells and ductular proliferating cells. Double immunohistochemistry, combining antibodies to CB1 receptor and α -SMA, identified liver fibrogenic cells within fibrotic septa as a prominent cell type expressing CB1 receptors (Fig. 1d). Accordingly, cultured liver fibrogenic cells also expressed CB1 receptors in their myofibroblastic phenotype, as shown in human and mouse hepatic myofibroblasts and in fully activated hepatic stellate cells (Fig. 1e). In contrast, CB1 receptors were faintly expressed in quiescent hepatic stellate cells, a phenotype found in normal liver (Fig. 1e). Finally, *Cnr1* mRNA was undetectable in liver or hepatic myofibroblasts isolated from CB1-knockout mice (*Cnr1*^{-/-} mice; Fig. 1e).

We next analyzed CB1 receptor function in liver fibrogenesis in a model of acute wound repair after a single intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCl₄) by examining the consequences of pharmacological or genetic inactivation of CB1 receptors on the induction of two fibrogenic markers, TGF- β 1 (encoded by *Tgfb1*) and α -SMA (encoded by *Acta2*). Administration of the selective CB1 antagonist SR141716A reduced hepatic induction of *Tgfb1* in response to acute liver injury in two distinct genetic backgrounds (CD1 and

¹INSERM, Unité 581, Hôpital Henri Mondor Créteil, F-9400 France. ²Université Paris 12, Faculté de Médecine, Créteil, F-94000 France. ³AP-HP, Groupe Hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Créteil, F-94000 France. ⁴AP-HP, Groupe Hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, Département de Pathologie, Créteil, F-94000 France. ⁵IRIBHN, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium. ⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to S.L. (sophie.lotersztajn@creteil.inserm.fr).

Received 20 September 2005; accepted 28 April 2006; published online 21 May 2006; doi:10.1038/nm1421

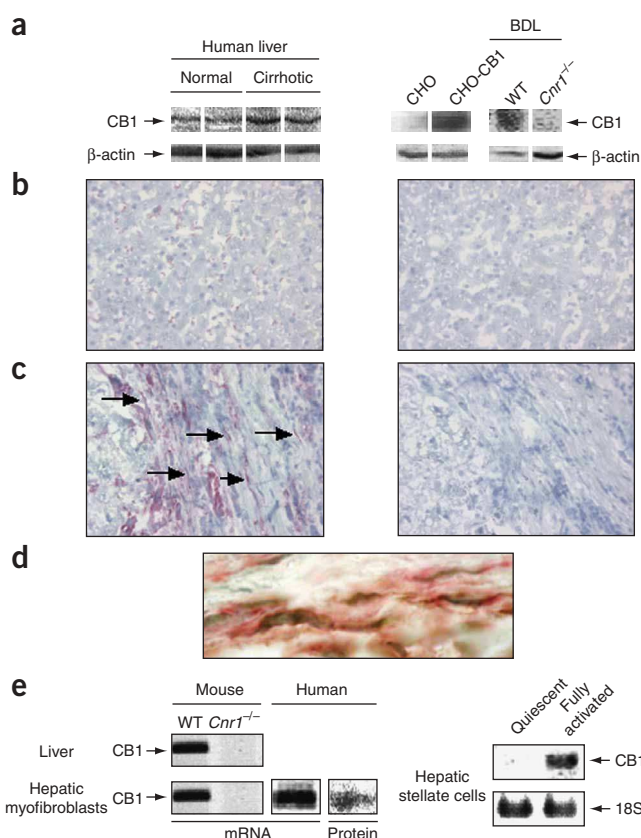


Figure 1 Hepatic expression of CB1 receptor during chronic liver diseases. (a) Western blot analysis of hepatic CB1 immunoreactivity. (b,c) Representative distribution of CB1 immunostaining in liver tissue sections obtained from normal (b) and cirrhotic liver (c) (original magnification, $\times 200$). Left, arrows indicate representative immunostaining of mesenchymal cells within and at the edge of the fibrotic septa. Right, negative control in normal liver and active cirrhosis after preadsorption of the CB1 receptor-specific antibody with the CB1 receptor synthetic peptide. (d) Identification of hepatic myofibroblasts as CB1 receptor-expressing cells. Representative double immunostaining for CB1 receptor (brown) and α -SMA (red) in human cirrhotic liver (original magnification, $\times 630$). (e) Expression of CB1 receptor in mouse liver, hepatic myofibroblasts and hepatic stellate cells.

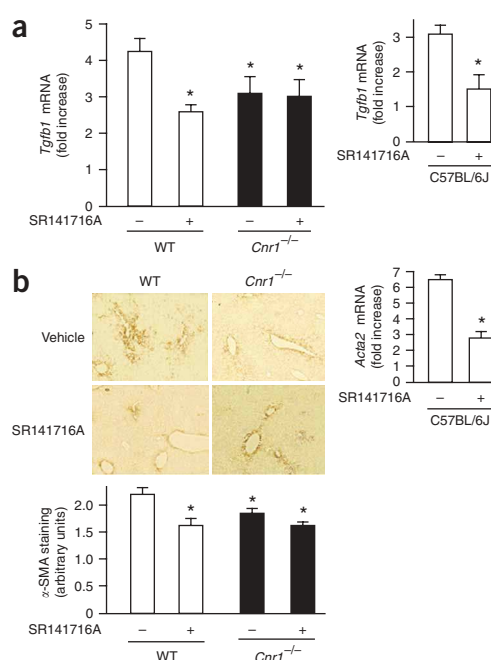
intoxication, chronic thioacetamide intoxication and bile duct ligation (BDL). After chronic CCl₄ intoxication, we observed extensive formation of septa with some nodules in wild-type mice (Fig. 3a). In contrast, CCl₄-treated *Cnr1*^{-/-} mice showed limited formation of fibrotic septa (Fig. 3a). Fibrosis area was decreased by 37% in CCl₄-treated *Cnr1*^{-/-} compared to wild-type mice (Fig. 3a). Similarly, the fibrosis area was reduced by 30% or 35% in *Cnr1*^{-/-} mice exposed to thioacetamide or undergoing BDL, respectively (Fig. 3a). Moreover, treatment with SR141716A strongly reduced fibrosis area by 41% and 34% in the BDL and thioacetamide models, respectively (Fig. 3b). Hepatic expression of TGF- β 1 was also significantly decreased in *Cnr1*^{-/-} or SR141716A-treated mice, compared to wild-type mice ($P < 0.05$; Fig. 3c,d). Finally, the number of liver fibrogenic cells was reduced in *Cnr1*^{-/-} and in SR141716A-treated mice, as shown by decreased expression of α -SMA (Fig. 3e,f). These results show that genetic or pharmacological antagonism of CB1 receptors reduces the fibrogenic response associated with chronic liver injury, independently of the offending agent.

We next studied the mechanisms whereby antagonism of CB1 receptors reduces accumulation of hepatic myofibroblasts, focusing on the regulation of apoptosis and proliferation of these cells both *in vivo* and *in vitro* in cultured cells isolated from wild-type and *Cnr1*^{-/-} mice.

C57BL/6J mice, Fig. 2a). SR141716A also decreased the induction of *Acta2* elicited by CCl₄ (Fig. 2b). Accordingly, *Cnr1*^{-/-} mice acutely exposed to CCl₄ showed decreased hepatic expression of *Tgfb1* and *Acta2* as compared to wild-type mice (Fig. 2). Finally, *Cnr1*^{-/-} mice showed a similar reduction in the wound-healing response with or without SR141716A treatment, thereby demonstrating the CB1 receptor-mediated effect of the compound (Fig. 2). As effects of CB1 receptor on the central nervous system vary with age⁹⁻¹¹, we evaluated the impact of age on CB1 receptor-mediated wound-healing response. Hepatic induction of α -SMA was reduced to a similar extent in young (8–10-week-old) mice (1.80 ± 0.12 -fold versus 2.17 ± 0.09 -fold in *Cnr1*^{-/-} and wild-type mice, respectively; $P < 0.05$) and in older (16–24 weeks) mice (1.73 ± 0.08 -fold and 2.08 ± 0.17 -fold in *Cnr1*^{-/-} and wild-type mice, respectively; $P < 0.05$). Overall, these results suggest that CB1 receptor antagonism counteracts the wound-healing response to acute liver injury by decreasing accumulation of hepatic myofibroblasts and hepatic content of the profibrogenic cytokine TGF- β 1.

We next investigated the consequences of CB1 receptor inactivation on progression of fibrosis in three experimental models: chronic CCl₄

Figure 2 CB1 receptor antagonism decreases accumulation of hepatic myofibroblasts and expression of TGF- β 1 in an acute model of matrix remodelling. (a) Hepatic expression of *Tgfb1* mRNA in CD1 mice. Inset, hepatic expression of *Tgfb1* mRNA in C57BL/6J mice. (b) Expression of α -SMA in CD1 mice as shown by immunohistochemistry (original magnification, $\times 100$) and quantification of α -SMA staining. Inset, expression of *Acta2* mRNA in C57BL/6J mice treated with SR141716A or vehicle. * $P < 0.05$ for SR141716A-treated and for *Cnr1*^{-/-} mice versus vehicle-treated wild-type mice.



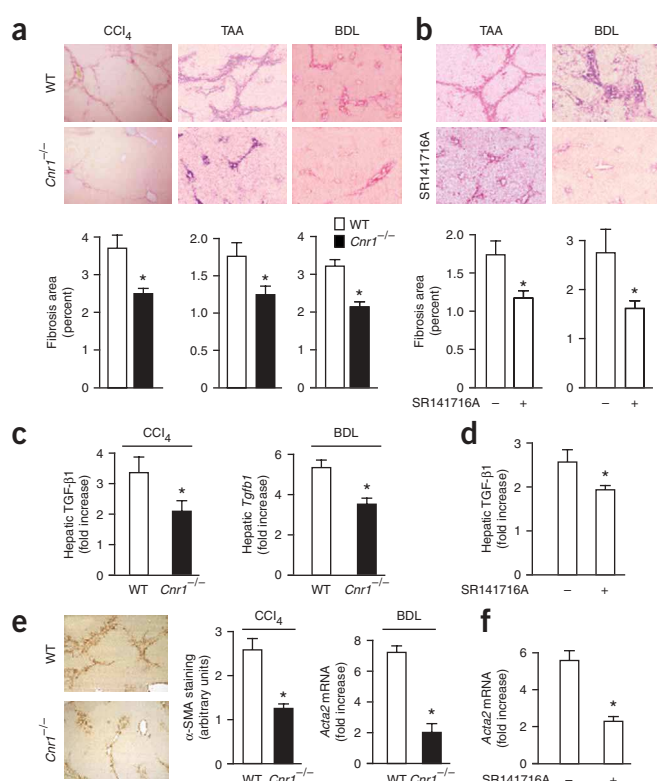


Figure 3 CB1 receptor antagonism reduces fibrosis associated with chronic liver injury. Representative Sirius red staining of liver sections (original magnification, $\times 100$) from (a) *Cnr1*^{-/-} and wild-type mice after 4 weeks of CCl₄, 8 weeks of thioacetamide (TAA) or 2 weeks after BDL; and (b) SR141716A-treated mice and control mice after 8 weeks of TAA or 2 weeks after BDL. Graphs show quantification of fibrosis area by morphometry. **P* < 0.05 for SR141716A-treated or *Cnr1*^{-/-} mice subjected to CCl₄ or TAA intoxication or to BDL versus corresponding wild-type mice. (c) Hepatic TGF- β 1 by ELISA or quantitative RT-PCR analysis in *Cnr1*^{-/-} and wild-type mice after CCl₄ treatment or BDL. **P* < 0.05 for CCl₄ or BDL *Cnr1*^{-/-} mice versus wild-type mice. (d) SR141716A-treated mice and control after 2 weeks BDL. **P* < 0.05 for SR141716A-treated versus wild-type mice. (e) Expression of α -SMA by quantification of immunostaining or by quantitative RT-PCR of samples from *Cnr1*^{-/-} and wild-type mice after 4 weeks of CCl₄ or 2 weeks BDL. **P* < 0.05 for CCl₄-treated or BDL *Cnr1*^{-/-} versus wild-type mice. (f) Expression of α -SMA by quantitative RT-PCR on samples from SR141716A-treated and control mice after 2 weeks BDL. **P* < 0.05 for SR141716A-treated versus wild-type mice.

independently of CB1 and CB2 receptors^{2,18}. We obtained similar results with 2-arachidonoyl glycerol². Alternatively, CB1 receptors may be constitutively active, independently of ligand occupation of the receptor, as shown for several G-protein-coupled receptors¹⁹ including cannabinoid receptors^{19–21}. In keeping with this hypothesis, the CB1 receptor agonist arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) did not affect either proliferation or survival of wild-type hepatic myofibroblasts (data not shown).

Together, these results show that antagonism of CB1 receptors enhances apoptosis and/or decreases proliferation of liver fibrogenic cells, overall reducing hepatic accumulation of myofibroblasts *in vivo*. The reason why genetic and pharmacological inactivation of CB1 receptor triggers distinct biological effects in cultured cells (apoptosis and growth inhibition) remains unknown. This discrepancy may result from developmental defects linked to lifelong absence of CB1 receptors. Nevertheless, both apoptosis and growth inhibition may contribute to the reduction of hepatic myofibroblasts observed *in vivo* upon genetic or pharmacological inactivation of CB1 receptors.

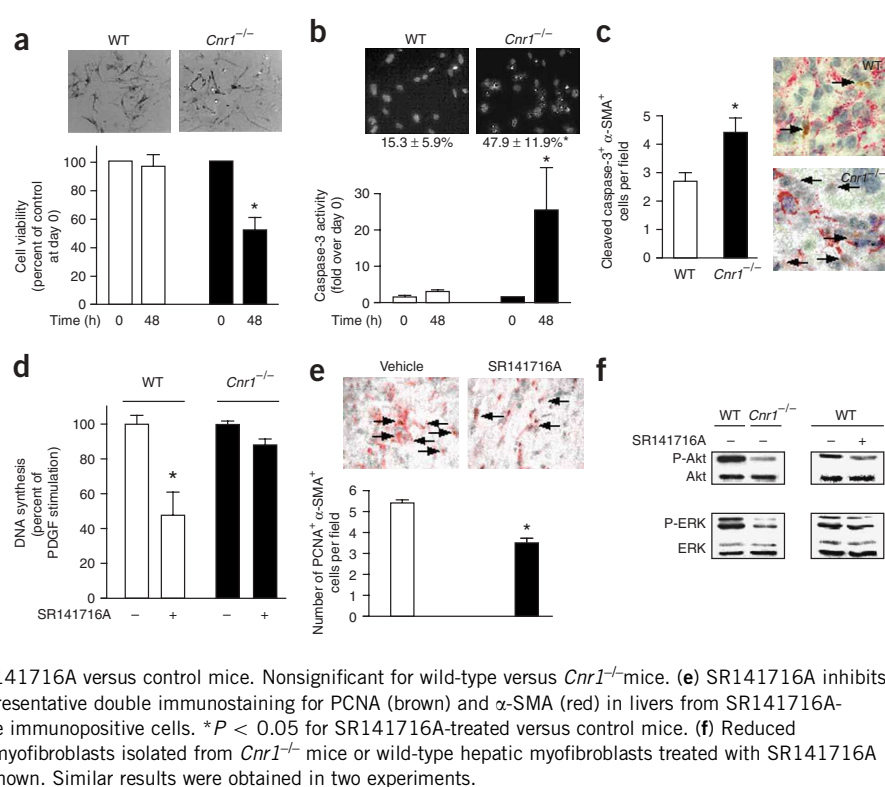
In summary, this study shows that CB1 receptors are upregulated in the liver of cirrhotic individuals and expressed in liver fibrogenic cells. Moreover, owing to the use of a CB1 antagonist under review approval for the treatment of overweight and metabolic syndrome^{22,23} and of *Cnr1*^{-/-} mice, we show that CB1 receptor antagonism reduces matrix remodeling associated with acute liver injury, and decreases the fibrogenic response associated with chronic liver injury. Reduced accumulation of hepatic myofibroblasts after growth inhibition and enhanced apoptosis is a major determinant of the antifibrotic effect of CB1 receptor antagonism.

CB1 receptors have increasingly emerged as crucial targets during liver diseases⁸. Thus, recent studies showed that CB1 receptors enhance portal hypertension by promoting splanchnic vasodilation and increase steatogenesis associated with obesity^{16,17,24,25}. Our study unravels a novel crucial profibrogenic role of CB1 receptors during chronic liver diseases. Notably, we also show that administration of a CB1 receptor antagonist efficiently reduces fibrogenesis. With the first generation of orally active CB1 antagonists, our results may open new therapeutic avenues in the treatment of liver fibrosis. Finally, the profibrogenic effects of CB1 receptors should be considered in light of our recent results indicating an opposite antifibrogenic role of CB2 receptors². Therefore, future studies should delineate whether combined approaches with CB1 receptor antagonists and CB2 receptor agonists may pave the way for synergistic antifibrotic treatments.

Serum deprivation hardly affected the viability of cultured wild-type hepatic myofibroblasts (Fig. 4a), as previously reported^{2,12,13}. In contrast, serum-deprived *Cnr1*^{-/-} hepatic myofibroblasts underwent apoptosis, as shown by decreased cell viability, increased nuclei condensation and caspase-3-like activity (Fig. 4a,b). Accordingly, *Cnr1*^{-/-} mice subjected to BDL showed a 64% increase in apoptosis rate of fibrogenic cells compared to wild-type mice, as assessed by double immunohistochemistry combining antibodies to α -SMA and cleaved caspase-3 (Fig. 4c). In contrast, cultured hepatic myofibroblasts exposed to SR141716A were resistant to apoptosis induced by serum deprivation (data not shown). Nevertheless, SR141716A inhibited the proliferative response to platelet-derived growth factor (PDGF)-BB both in mice (Fig. 4d) and in human (data not shown) hepatic myofibroblasts. The growth-inhibitory effect of SR141716A was related to blockade of CB1 receptors, as shown by the lack of effect of the CB1 receptor antagonist on proliferation of *Cnr1*^{-/-} hepatic myofibroblasts (Fig. 4d). Finally, SR141716A treatment of BDL mice was associated with a 35% reduction of liver fibrogenic cell proliferation, as assessed by double immunohistochemistry combining antibodies to α -SMA and proliferating cell nuclear antigen (PCNA; Fig. 4e).

Finally, we explored intracellular pathways mediating effects of CB1 receptor antagonism on hepatic myofibroblast functions, and focused on PI3K-Akt and ERK, two crucial regulatory pathways of growth and survival of hepatic myofibroblasts^{14,15}. Cells isolated from *Cnr1*^{-/-} mice showed decreased phosphorylation of ERK and Akt, as compared to wild-type cells (Fig. 4f); we obtained similar results in SR141716A-treated wild-type hepatic myofibroblasts (Fig. 4f). These results suggest that CB1 receptors in hepatic myofibroblasts may be activated by an endogenous ligand. In this respect, the endocannabinoid anandamide is overproduced during chronic liver diseases, in experimental models and in humans^{16,17}. However, we and others showed that anandamide regulates liver fibrogenic cell functions

Figure 4 Genetic or pharmacological inactivation of CB1 receptors reduces accumulation of mouse hepatic myofibroblasts *in vitro* and *in vivo*: the effect on proliferation and apoptosis. **(a)** Genetic inactivation of CB1 receptor reduces viability of cultured mouse hepatic myofibroblasts. Upper panels, phase-contrast analysis (original magnification, $\times 100$). Lower panels, cell viability. **(b)** CB1 receptor inactivation enhances apoptosis of cultured mouse hepatic myofibroblasts. Upper panels, representative DAPI staining and quantification of condensed fragmented nuclei (original magnification, $\times 400$). Lower panels, caspase-3-like activity. Mean $\pm$ s.e.m. from six to nine experiments. $*P < 0.05$ for *Cnr1*^{-/-} versus wild-type. **(c)** CB1 receptor inactivation enhances apoptosis of mouse hepatic myofibroblasts *in vivo*. Representative double immunostaining for cleaved caspase-3 (brown) and α -SMA (red) in *Cnr1*^{-/-} and wild-type liver from BDL mice (original magnification, $\times 1,000$). Arrows indicate double immunopositive cells. $*P < 0.05$ for *Cnr1*^{-/-} versus wild-type. **(d)** SR141716A inhibits DNA synthesis in cultured hepatic myofibroblasts isolated from wild-type but not from *Cnr1*^{-/-} mice. $*P < 0.05$ for wild-type mice treated with SR141716A versus control mice. Nonsignificant for wild-type versus *Cnr1*^{-/-} mice. **(e)** SR141716A inhibits DNA synthesis of hepatic myofibroblasts *in vivo*. Representative double immunostaining for PCNA (brown) and α -SMA (red) in livers from SR141716A-treated and control BDL mice. Arrows indicate double immunopositive cells. $*P < 0.05$ for SR141716A-treated versus control mice. **(f)** Reduced phosphorylation of ERK and Akt in cultured hepatic myofibroblasts isolated from *Cnr1*^{-/-} mice or wild-type hepatic myofibroblasts treated with SR141716A or left untreated. Representative immunoblotting is shown. Similar results were obtained in two experiments.



METHODS

Materials. We obtained SR141716A²⁶ from Sanofi-Aventis. For *in vivo* experiments, we dissolved SR141716A in a vehicle solution containing two drops of Tween 80 in 1 ml dimethylsulfoxide (DMSO), sonicated the mixture and further diluted it ten times in 0.9% NaCl. Alternatively, we fed mice standard mice chow (Dietex) containing 65 mg SR141716A/kg chow. For cell-culture experiments, we dissolved a stock solution of 10 mM SR141716A in DMSO and further diluted it in cell-culture medium.

Human liver specimen. We retrospectively studied snap-frozen surgical liver resections from 13 individuals (eight men, five women; mean age, 55 years; range, 39–72). We collected normal liver samples from individuals undergoing hepatic resection for colorectal metastasis ($n = 3$). We obtained cirrhotic samples from eight individuals undergoing liver transplantation and two individuals undergoing hepatic resection for hepatocellular carcinoma. Cirrhosis was consecutive to chronic hepatitis C ($n = 1$) or hepatitis B ($n = 2$) infections, primary biliary cirrhosis ($n = 1$), alcoholic liver disease ($n = 4$) or Wilson disease ($n = 1$) and remained cryptogenic in one case. The usage of surgical liver samples unused for diagnostic purpose was in accordance with the legislation and good clinical practice in France. Accordingly, the study plan was approved by the Comité Consultatif de Protection de Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB Créteil-Henri Mondor).

Animals and experimental design. We generated male CD1 CB1 receptor-deficient mice and wild-type littermates as previously described²⁷. Briefly, we bred heterozygous mice for more than 15 generations on a CD1 background. We generated wild-type and mutant mice used in this study from heterozygous mice, and we used first-generation wild-type and *Cnr1*^{-/-} mice. Where indicated, we used C57BL/6J mice (Charles River). We housed mice in temperature- and humidity-controlled rooms, kept them on a 12-h light-dark cycle and provided unrestricted amounts of standard mice chow (Dietex) or SR141716A food admix. We used male mice aged 8–10 weeks, unless otherwise indicated. Animal procedures were conducted in accordance with French government policies (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture).

Acute liver injury. We induced acute liver injury by a single intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCl₄, Sigma, 0.5 ml/kg body weight (1:5 dilution in olive oil)). Groups were as follows: wild-type mice given CCl₄ ($n = 15$); *Cnr1*^{-/-} mice given CCl₄ ($n = 8$); wild-type mice given CCl₄ and treated with SR141716A (10 mg/kg intraperitoneally) 2 h before and 24 and 48 h after administration of CCl₄ ($n = 6$); and *Cnr1*^{-/-} mice given CCl₄ ($n = 5$) and treated with SR141716A. Sham-treated mice received either olive oil ($n = 3$) or vehicle solution for SR141716A ($n = 3$). We also studied acute liver injury in C57BL/6J wild-type mice, with groups as follows: wild-type mice given CCl₄ ($n = 7$); wild-type mice given CCl₄ and treated with SR141716A ($n = 7$); sham-treated mice given olive oil ($n = 3$); and sham-treated mice given vehicle solution for SR141716A ($n = 3$). All mice were killed 72 h after injection. There were no significant differences in liver tests, necrosis and inflammation scores between CCl₄-treated groups.

Chronic liver injury. We studied liver fibrosis in three experimental models. We generated CCl₄-induced liver fibrosis in *Cnr1*^{-/-} ($n = 15$) and wild-type ($n = 12$) mice by intraperitoneal injection of CCl₄ (0.5 ml/kg, diluted 1:10 in olive oil) twice weekly, alternating with an isovolumetric dose of a 5% ethanol dilution in PBS three times per week. Sham-treated mice (five *Cnr1*^{-/-} and eight wild-type) received olive oil. After 4 weeks, animals were starved overnight and killed 48 h after the last CCl₄ injection.

We generated thioacetamide-induced liver fibrosis by daily administration of 0.03% thioacetamide in drinking water for 8 weeks, as described²⁸. SR141716A was given as a food admix (10 mg/kg body weight) starting 7 d before administration of thioacetamide and throughout the study. Groups were as follows: wild-type mice given thioacetamide ($n = 8$); *Cnr1*^{-/-} mice given thioacetamide ($n = 8$); wild-type mice given thioacetamide and treated with SR141716A ($n = 8$); wild-type mice given sham treatment ($n = 3$); *Cnr1*^{-/-} mice given sham treatment ($n = 3$); and wild-type mice given sham treatment and treated with SR141716A ($n = 3$). We induced biliary fibrosis by transecting the common bile duct between two ligations after midline laparotomy. Sham-treated mice underwent midline laparotomy. Mice were killed after 2 weeks. Groups were as follows: wild-type mice receiving BDL ($n = 16$); *Cnr1*^{-/-} mice receiving BDL ($n = 11$); wild-type mice receiving sham treatment ($n = 3$); and *Cnr1*^{-/-} mice receiving sham treatment ($n = 3$). In a separate experiment, we

gave SR141716A daily as a food admix (10 mg/kg body weight), starting 7 d before surgery and throughout the study. Groups were as follows: wild-type mice receiving BDL ($n = 9$); wild-type receiving BDL and treated with SR141716A ($n = 14$); wild-type mice receiving sham treatment ($n = 3$); and wild-type mice receiving sham treatment and treated with SR141716A ($n = 2$).

We obtained liver samples from several lobes and either fixed them in buffered formalin or snap froze them in liquid nitrogen in RNA (Qiagen) and stored them at -80°C until use. There were no significant differences in mean body weight, liver weight and liver weight/body weight ratio between groups within one experimental fibrosis model. There were also no significant differences in liver tests, necrosis and inflammation scores between non sham groups within experimental models.

Immunohistochemistry. We detected CB1 receptors as previously described², in frozen sections (5–7 μm) of normal and cirrhotic liver, with a rabbit polyclonal antiserum to human CB1 receptor (1:2,000 dilution, Cayman). We showed the specificity of the antibody by the lack of signal in sections incubated with the CB1 blocking peptide (Cayman), in liver extracts obtained from *Cnr1*^{-/-} mice or in the absence of the first antibody. We performed immunohistochemical detection of α -SMA in liver tissue fixed in formalin and embedded in paraffin, using the Vector M.O.M. immunodetection kit (Vector Laboratories) and a 1:1,000 dilution of a monoclonal antibody to α -SMA (Sigma). We showed peroxidase activity using metal-enhanced diaminobenzidine (DAB) substrate (Pierce). We observed no staining when we omitted the primary antibody. We performed double immunostaining of CB1 receptors (1:2,000 dilution) and α -SMA (1:5,000 dilution) on frozen sections, as previously described².

We quantified apoptosis and proliferation of hepatic myofibroblasts in liver tissue sections from BDL or sham-treated mice fixed in formalin and embedded in paraffin, using double immunostaining with antibody to α -SMA and cleaved caspase-3 or PCNA. We first processed sections for cleaved caspase-3 (1:50 dilution, Cell Signaling Technology) or PCNA (1:50 dilution, Santa Cruz) immunostaining, using a standard three-stage biotin-streptavidin immunoperoxidase method². We showed peroxidase activity using liquid DAB + substrate chromogen system (DakoCytomation). We subsequently performed immunostaining for α -SMA as described above, except that we used the mouse alkaline phosphatase-specific antibody (1:20 dilution, DakoCytomation) as the secondary antibody. We showed alkaline phosphatase activity using fast red substrate-chromogen system (DakoCytomation). We counterstained slides with aqueous hematoxylin and then counted cells double stained for cleaved caspase-3 or PCNA and α -SMA cells per field (100 α -SMA⁺ cells/liver).

Isolation and culture of hepatic myofibroblasts and hepatic stellate cells. We obtained human hepatic myofibroblasts by outgrowth of explants prepared from surgical specimens of normal liver obtained from surgery of benign or malignant liver tumors. We cultured and characterized cells as previously described²⁹. The usage of surgical liver samples unused for diagnostic purpose was in accordance with the legislation and good clinical practice in France. Accordingly, the study plan was approved by the CCPRB Créteil-Henri Mondor. We isolated mouse myofibroblasts by collagenase perfusion and subjected them to density-gradient purification in Nycodenz³⁰. We seeded isolated cells in DMEM medium containing 20% FCS and removed non-adherent cells by washing after 24 h. We cultured cells further in DMEM containing 10% FCS, and used cells from between the fourth and ninth passages. Human and mouse cells expressed α -SMA, fibulin-2 and interleukin-6, phenotypic markers of hepatic myofibroblasts found in the fibrotic liver¹⁴. We prepared rat hepatic stellate cells as previously described². Purity of cultures at day 1 was at least 90%, as assessed by characteristic stellate shape and lipid droplets under phase-contrast microscopy. Quiescent hepatic stellate cells underwent activation by culture in DMEM medium containing 10% FCS for 11 d. We prepared RNA from quiescent hepatic stellate cells (day 1, α -SMA⁻) or fully activated hepatic stellate cells (day 11, α -SMA⁺).

Apoptosis assays. We assayed apoptosis in nonconfluent mouse hepatic myofibroblasts seeded overnight in DMEM containing 10% FCS and further cultured in serum-deprived DMEM for 48 h. We assayed caspase-3-like activity, DAPI staining and cell viability as previously described^{12,13}.

Results were obtained from cells isolated from liver of three wild-type and three *Cnr1*^{-/-} mice.

DNA synthesis. We assayed DNA synthesis by [³H]thymidine incorporation, in confluent cells that were serum-starved for 24 h in the presence of 0.1% BSA, and further incubated for 30 h with 20 ng/ml PDGF-BB and 0.01% BSA, in the absence or the presence of 1 μM SR141716A³¹. Results were obtained from cells isolated from liver of three wild-type and three *Cnr1*^{-/-} mice. Results are expressed as percent of maximal DNA synthesis with PDGF-BB.

RNA preparation and RT-PCR. We extracted total RNA using Tri Reagent (Sigma). We carried out RT-PCR on a Light Cycler (Roche Diagnostics), as previously described². Oligonucleotide primers (MWG Biotech) were as follows: human *CNR1*, 5'-TTTGCTACACAATTGGAAGTCTAAGAACCC-3' (sense) and 5'-GCACACATTGACACGTATCCACTGCTT-3' (antisense), (PCR product of 286 bp); mouse *Cnr1*, 5'-TGCAGAGCTCTCATAGAGTC-3' (sense) and 5'-GAATGTCATTTGAGCCACG-3' (antisense), (PCR product of 260 bp); rat *Cnr1*, 5'-GTCTCCCATTTCAAGCAAGG-3' (sense) and 5'-TGCAAGGCCATCTAGGATCG-3' (antisense), (PCR product of 125 bp); mouse *Tgfb1*, 5'-TGCGCTTGCAGAGATTAAAA-3' (sense) and 5'-CTGCCGTACAACCTCCAGTGA-3' (antisense), (PCR product of 156 bp); mouse *Acta2*, 5'-ACTACTGCCGAGCGTGAGAT-3' (sense) and 5'-AGGTAGACAGCGAAGCCA-3' (antisense), (PCR product of 451 bp); mouse *B2m*, 5'-ATGCTGAAGAACGGGAAAAA-3' (sense) and 5'-CGGCCATCTGGCATGCTTA-3' (antisense), (PCR product of 151 bp); rat *18S*, 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' (sense) and 5'-CCATCAATCGGTAGTAGCG-3' (antisense), (PCR product of 151 bp). The PCR-amplified products were analyzed on a 2% agarose gel and sequenced.

Immunoblot analysis. We treated serum-starved hepatic myofibroblasts isolated from wild-type mice with 1 μM SR141716A or vehicle for 15 min. We performed western blot analysis of ERK and Akt with 30 μg serum-starved cell lysates¹³, using primary antibodies (Cell Signaling Technology) to phosphorylated ERK (1:1,000 dilution), ERK (1:1,000 dilution), phosphorylated Akt (1:500 dilution) and AKT (1:1,000 dilution). We performed western blot analysis of CB1 receptor expression with 100 μg liver homogenates, using a rabbit polyclonal antiserum to human CB1 receptor (1:250 dilution). CHO cells overexpressing CB1 receptors provided by Sanofi-Aventis served as a control.

Liver histology. We fixed liver specimens in 10% formalin and embedded them in paraffin. We stained tissue sections (4 μm) with hematoxylin-eosin for routine examination, or with picro-Sirius red for visualization of hepatic collagen deposition. Histological grading (necrosis and inflammatory infiltration) was assessed by an anatomopathologist blinded to the study conditions on at least four fragments from distinct areas of each liver. All samples were scored simultaneously. Blinded to the study conditions, we quantified fibrosis from Sirius red-stained liver tissue sections by morphometric analysis with Image-Pro Plus software (MediaCybernetics, MicroMecanique, France). Values were the mean of ten fields (magnification, $\times 100$) taken from four to five liver fragments per mouse.

Assay of hepatic TGF- β 1. We assayed hepatic TGF- β 1 in acid-activated whole-liver homogenates. We homogenized frozen liver samples in lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 1% NP40, 5 mM MgCl₂, 1.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, phosphatase and protease inhibitors) for 30 min at 4°C . After centrifugation at 20,000g for 10 min at 4°C , we stored cleared tissue lysates at -80°C until analysis. We performed ELISA using mouse TGF- β 1 Quantikine (R&D Systems), after acidification of lysates according to the manufacturer's instructions. Hepatic TGF- β 1 content in normal liver was 0.25 ± 0.03 ng/mg protein.

Statistics. Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m. and were analyzed either by Mann-Whitney test or by analysis of variance (ANOVA) followed by paired comparison, as appropriate. Statistical analysis of quantitative RT-PCR data was performed with the REST program³². $P < 0.05$ was taken as the minimum level of significance.

ACKNOWLEDGMENTS

P.G. was supported by INSERM, B.J. by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and L.L. by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by the INSERM, the Université Paris-Val-de-Marne, and by grants from Sanofi-Aventis, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue départementale du Val de Marne de la Recherche contre le Cancer and of the Agence Nationale de la Recherche (to S.L.). We thank F. Pecker for guidance, G. Guellaen for discussions and support, J. Hanoune and H. Gilgenkrantz for suggestions and C. Pavoiné for critical reading of the manuscript. We are grateful to S. Adubeiro for her help during *in vivo* experiments, to D. Derai (Département de Pathologie, Hôpital Henri Mondor) for technical assistance in histology experiments, to A. Laurent (Service de Chirurgie Digestive, Hôpital Henri Mondor) and V. Fauveau (Institut Cochin, Paris) for their help in surgical setting of bile duct ligation experiments, and to F. Lafdil for providing hepatic stellate cells.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.T.-C., B.J., P.G. & J.T.V.N. designed the study; collected, analyzed and interpreted data; and wrote the manuscript. V.D., L.L., V.S.-L. collected and interpreted data. C.L. conceptualized the study and contributed knockout mice. A.M. conceptualized and designed the study, interpreted data and revised the manuscript. S.L. conceptualized and designed the study and wrote and revised the manuscript.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests (see the *Nature Medicine* website for details).

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

1. Lotersztajn, S., Julien, B., Teixeira-Clerc, F., Grenard, P. & Mallat, A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 605–628 (2005).
2. Julien, B. *et al.* Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* **128**, 742–755 (2005).
3. Hezode, C. *et al.* Daily cannabis smoking as a risk factor for fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* **42**, 63–71 (2005).
4. Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* **6**, 635–664 (1999).
5. Di Marzo, V., Bifulco, M. & De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 771–784 (2004).
6. Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A. & Rodriguez de Fonseca, F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 218–224 (2000).
7. Guzman, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 745–755 (2003).
8. Mallat, A. & Lotersztajn, S. Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *J. Endocrinol. Invest.* (in the press).
9. Bilkei-Gorzo, A. *et al.* Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15670–15675 (2005).
10. Wang, L., Liu, J., Harvey-White, J., Zimmer, A. & Kunos, G. Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1393–1398 (2003).
11. Cota, D. *et al.* The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* **112**, 423–431 (2003).

12. Li, L. *et al.* 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin j2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. a pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 38152–38158 (2001).
13. Davaille, J., Li, L., Mallat, A. & Lotersztajn, S. Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. *J. Biol. Chem.* **277**, 37323–37330 (2002).
14. Davaille, J. *et al.* Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 34628–34633 (2000).
15. Tao, J. *et al.* Biological effects of C-type natriuretic peptide in human myofibroblastic hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 23761–23769 (1999).
16. Batkai, S. *et al.* Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat. Med.* **7**, 827–832 (2001).
17. Ros, J. *et al.* Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* **122**, 85–93 (2002).
18. Siegmund, S.V., Uchinami, H., Osawa, Y., Brenner, D.A. & Schwabe, R.F. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* **41**, 1085–1095 (2005).
19. Milligan, G. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1271–1276 (2003).
20. Bouaboula, M. *et al.* A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **272**, 22330–22339 (1997).
21. Rinaldi Carmona, M. *et al.* SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 644–650 (1998).
22. Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O. & Rossner, S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* **365**, 1389–1397 (2005).
23. Despres, J.P., Golay, A. & Sjostrom, L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2121–2134 (2005).
24. Biecker, E., Sagesser, H. & Reichen, J. Vasodilator mRNA levels are increased in the livers of portal hypertensive NO-synthase 3-deficient mice. *Eur. J. Clin. Invest.* **34**, 283–289 (2004).
25. Osei Hyiaman, D. *et al.* Endocannabinoid activation at hepatic CB(1) receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **115**, 1298–1305 (2005).
26. Rinaldi Carmona, M. *et al.* Characterization and distribution of binding sites for [³H]-SR141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci.* **58**, 1239–1247 (1996).
27. Ledent, C. *et al.* Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**, 401–404 (1999).
28. Li, X., Benjamin, I.S. & Alexander, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J. Hepatol.* **36**, 488–493 (2002).
29. Li, L. *et al.* Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* **125**, 460–469 (2003).
30. Vrochides, D., Papanikolaou, V., Pertoft, H., Antoniadou, A.A. & Heldin, P. Biosynthesis and degradation of hyaluronan by nonparenchymal liver cells during liver regeneration. *Hepatology* **23**, 1650–1655 (1996).
31. Li, L. *et al.* Molecular mechanisms regulating the antifibrogenic protein heme oxygenase-1 in human hepatic myofibroblasts. *J. Hepatol.* **41**, 407–413 (2004).
32. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e36 (2002).

Rôle profibrogénique du récepteur CB1

L'expression des récepteurs CB1 et CB2 est fortement augmentée dans le foie humain cirrhotique, notamment dans les cellules fibrogéniques (myofibroblastes hépatiques), alors qu'ils sont peu exprimés dans le foie normal. De plus, l'équipe avait mis en évidence les propriétés antifibrogéniques du récepteur CB2. Cependant les études cliniques de l'équipe démontraient que l'usage quotidien de cannabis accélère la progression de la fibrose chez les patients atteints d'hépatite chronique virale C. Ces résultats apparemment contradictoires nous ont conduit à émettre l'hypothèse d'un rôle profibrogénique du récepteur CB1. Nous avons évalué le rôle du récepteur CB1 dans la progression de la fibrose, en étudiant les conséquences de son invalidation génétique et pharmacologique dans trois modèles expérimentaux de physiopathologie différente, l'induction d'une hépatite toxique par administration chronique de tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou de thioacétamide (TAA) et la cholestase par la ligature de la voie biliaire principale.

Conséquences de l'invalidation génétique et pharmacologique du récepteur CB1 sur le remodelage tissulaire et la fibrose hépatique. Nous avons mis en évidence les propriétés antifibrosantes du rimonabant dans un modèle de remodelage tissulaire, induit par une injection unique de CCl₄. En effet, dans ce modèle, nous avons démontré que l'administration de rimonabant (10 mg/kg) par voie intra-péritonéale prévient l'activation des mécanismes de fibrogenèse, comme le montrent la diminution de production de TGF- β hépatique et la réduction de l'accumulation des myofibroblastes hépatiques chez les souris traitées. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris invalidées pour le récepteur CB1. Ces résultats ont été confirmés dans trois modèles de fibrose expérimentale de physiopathologie différente, l'induction d'une hépatite toxique par administration chronique de tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou de thioacétamide (TAA) et la cholestase par la ligature de la voie biliaire

principale. Dans les trois modèles, nous avons démontré que l'administration per os de rimonabant prévient la fibrogenèse, en réduisant l'accumulation des myofibroblastes hépatiques et la production de TGF β -1 hépatique. L'ensemble de ces résultats a été confirmé à l'aide de souris déficientes en récepteur CB1, qui présentent une fibrose réduite par rapport aux souris sauvages. L'étude des mécanismes impliquées dans les effets antifibrogéniques du rimonabant a révélé que la molécule diminue l'accumulation des myofibroblastes hépatique en inhibant leur prolifération, à la fois *in vivo* et dans les myofibroblastes hépatiques en culture. Cet effet antiprolifératif du rimonabant repose sur l'inhibition de la PI3K/Akt et ERK, deux voies de signalisation contrôlant la prolifération et la survie cellulaire. Ces résultats mettent en évidence les propriétés profibrogéniques du récepteur CB1. Ils démontrent également que l'utilisation d'antagonistes du récepteur CB1 tels que le rimonabant pourrait offrir de nouvelles perspectives dans le traitement de la fibrose hépatique au cours des maladies chroniques du foie. Cette étude, associée aux travaux antérieurs de l'équipe démontrant les effets antifibrosants des récepteurs CB2 (Julien, Grenard et al. 2005), suggère qu'une approche antifibrosante optimale pourrait combiner l'utilisation d'antagonistes du récepteur CB1 et d'agonistes du récepteur CB2.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence deux nouveaux aspects du rôle du système endocannabinoïde dans la physiopathologie hépatique, avec d'une part la démonstration des propriétés profibrogéniques du récepteur CB1 et d'autre part la mise en évidence du rôle du récepteur CB2 dans la stéatose associée à l'obésité et l'insulino-résistance.

La recherche sur le système endocannabinoïde ouvre des perspectives intéressantes en physiopathologie hépatique. En effet, le récepteur CB1 pourrait jouer un rôle majeur dans la stéatopathie d'origine métabolique ou alcoolique, de par ses effets sur l'insulino-résistance pour la stéatopathie métabolique, ses propriétés stéatogènes, inflammatoires et profibrogéniques. Ces résultats suggèrent que les antagonistes du récepteur CB1 pourraient offrir des voies nouvelles dans le traitement de ces hépatopathies. De plus les récepteurs CB1 sont impliqués dans la physiopathologie de la cirrhose et dans ses complications (hypertension portale, cardiomyopathie). L'ensemble de ces données suggèrent que des effets bénéfiques des antagonistes des récepteurs CB1 peuvent être anticipés à différentes étapes de la progression des maladies chroniques du foie (*figure 19*). Cependant, des données récentes démontrent une incidence accrue des troubles de l'humeur, des troubles dépressifs, et d'anxiété chez les patients traités par l'Accomplia® (Christensen, Kristensen et al. 2007). L'enjeu des prochaines années sera de développer des antagonistes ciblant les récepteurs CB1 périphériques.

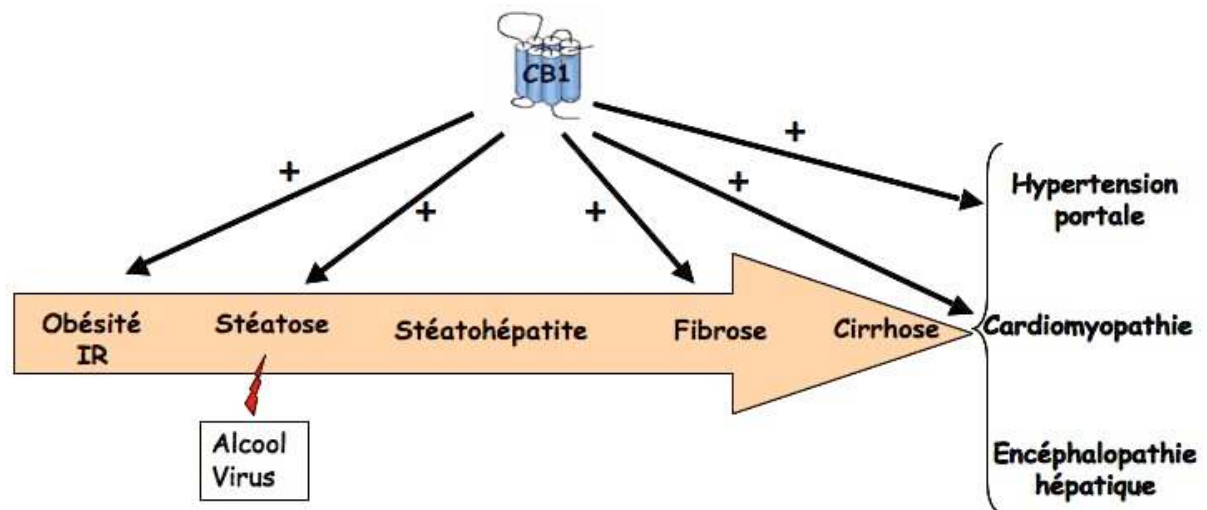


Figure 19 : Le récepteur CB1 exerce des effets délétères à différentes étapes de la progression des maladies chroniques du foie.

Le rôle du récepteur CB2 dans la physiopathologie hépatique est plus complexe. Il exerce des effets bénéfiques sur le développement de la fibrose et au cours de l'encéphalopathie hépatique, mais possède des propriétés pro ou anti inflammatoires selon les situations (pro-inflammatoires au cours de l'ischémie reperfusion et anti-inflammatoires au cours de la stéatopathie métabolique). Néanmoins nos résultats démontrent les propriétés stéatogènes du récepteur CB2 dans le contexte de l'obésité nous invitant à étudier son rôle dans le contexte de la stéatose d'origine alcoolique ou virale.

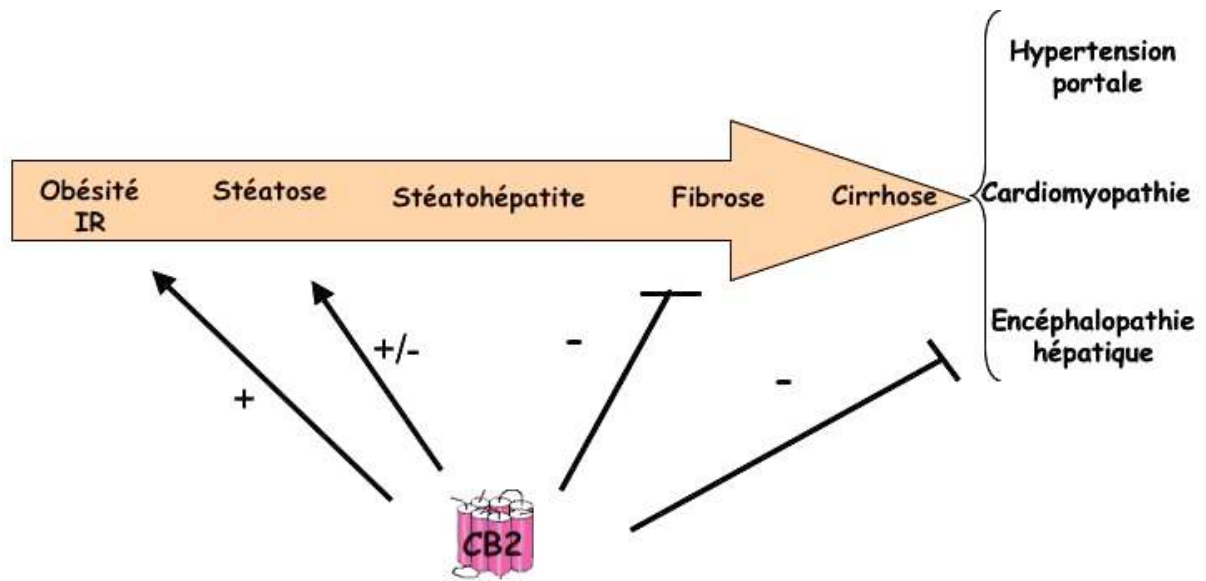


Figure 20 : Impact du récepteur CB2 aux différentes étapes de la progression des maladies chroniques du foie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, R. (1940). "Marihuana." Science **92**(2380): 115-119.
- Alberich Jorda, M., N. Rayman, et al. (2004). "The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner." Blood **104**(2): 526-34.
- Angulo, P. and K. D. Lindor (2002). "Non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol Hepatol **17 Suppl**: S186-90.
- Aquilante, C. L., L. A. Kosmiski, et al. (2008). "Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults." Metabolism **57**(4): 494-501.
- Arnone, M., J. Maruani, et al. (1997). "Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors." Psychopharmacology (Berl) **132**(1): 104-6.
- Arthur, M. J. (2000). "Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(2): G245-9.
- Assimakopoulos-Jeannet, F., S. Brichard, et al. (1995). "In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues." Metabolism **44**(2): 228-33.
- Atzmon, G., X. M. Yang, et al. (2002). "Differential gene expression between visceral and subcutaneous fat depots." Horm Metab Res **34**(11-12): 622-8.
- Avram, A. S., M. M. Avram, et al. (2005). "Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue." J Am Acad Dermatol **53**(4): 671-83.
- Avramoglu, R. K., H. Basciano, et al. (2006). "Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states." Clin Chim Acta **368**(1-2): 1-19.
- Bastard, J. P., C. Jardel, et al. (2000). "Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3338-42.
- Battaller, R. and D. A. Brenner (2001). "Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis." Semin Liver Dis **21**(3): 437-51.
- Batkai, S., Z. Jarai, et al. (2001). "Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis." Nat Med **7**(7): 827-32.
- Batkai, S., D. Osei-Hyiaman, et al. (2007). "Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury." Faseb J **21**(8): 1788-800.
- Batkai, S., P. Pacher, et al. (2004). "Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 or CB2 receptors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(2): H595-600.
- Bayewitch, M., M. H. Rhee, et al. (1996). "(-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase." J Biol Chem **271**(17): 9902-5.
- Bensaid, M., M. Gary-Bobo, et al. (2003). "The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells." Mol Pharmacol **63**(4): 908-14.
- Benyon, R. C. and M. J. Arthur (2001). "Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells." Semin Liver Dis **21**(3): 373-84.
- Benzinou, M., J. C. Chevre, et al. (2008). "Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations." Hum Mol Genet **17**(13): 1916-21.
- Bermudez-Siva, F. J., A. Serrano, et al. (2006). "Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats." Eur J Pharmacol **531**(1-3): 282-4.

- Bertola, A., V. Deveau, et al. (2008). "Elevated Expression of Osteopontin May Be Related to Adipose Tissue Macrophage Accumulation and Liver Steatosis in Morbid Obesity." Diabetes.
- Blanchard, D. K., C. Newton, et al. (1986). "In vitro and in vivo suppressive effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on interferon production by murine spleen cells." Int J Immunopharmacol **8**(7): 819-24.
- Blankman, J. L., G. M. Simon, et al. (2007). "A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." Chem Biol **14**(12): 1347-56.
- Bluher, M., S. Engeli, et al. (2006). "Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity." Diabetes **55**(11): 3053-60.
- Bornheim, L. M., K. Y. Kim, et al. (1995). "Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism." Biochem Pharmacol **50**(5): 677-86.
- Bouaboula, M., S. Perrachon, et al. (1997). "A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions." J Biol Chem **272**(35): 22330-9.
- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, et al. (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." Biochem J **312**(Pt 2): 637-41.
- Bouaboula, M., M. Rinaldi, et al. (1993). "Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes." Eur J Biochem **214**(1): 173-80.
- Bouloumie, A., C. A. Curat, et al. (2005). "Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **8**(4): 347-54.
- Bradbury, M. W. (2006). "Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(2): G194-8.
- Breivogel, C. S., G. Griffin, et al. (2001). "Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain." Mol Pharmacol **60**(1): 155-63.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." J Clin Invest **114**(2): 147-52.
- Brunt, E. M. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology." Semin Liver Dis **21**(1): 3-16.
- Buckley, N. E., S. Hansson, et al. (1998). "Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat." Neuroscience **82**(4): 1131-49.
- Cadas, H., E. di Tomaso, et al. (1997). "Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain." J Neurosci **17**(4): 1226-42.
- Cai, D., M. Yuan, et al. (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB." Nat Med **11**(2): 183-90.
- Calignano, A., I. Katona, et al. (2000). "Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids." Nature **408**(6808): 96-101.
- Calignano, A., G. La Rana, et al. (1998). "Control of pain initiation by endogenous cannabinoids." Nature **394**(6690): 277-81.
- Carrier, E. J., C. S. Kearn, et al. (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." Mol Pharmacol **65**(4): 999-1007.
- Casanova, M. L., C. Blazquez, et al. (2003). "Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors." J Clin Invest **111**(1): 43-50.

- Cassiman, D., L. Libbrecht, et al. (2002). "Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers." *J Hepatol* **36**(2): 200-9.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-24.
- Cavuto, P., A. J. McAinch, et al. (2007). "Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways." *Mol Cell Endocrinol* **267**(1-2): 63-9.
- Chen, J. K., J. Chen, et al. (2008). "Identification of novel endogenous cytochrome p450 arachidonate metabolites with high affinity for cannabinoid receptors." *J Biol Chem* **283**(36): 24514-24.
- Chen, P., S. Hu, et al. (2005). "Induction of cyclooxygenase-2 by anandamide in cerebral microvascular endothelium." *Microvasc Res* **69**(1-2): 28-35.
- Christensen, R., P. K. Kristensen, et al. (2007). "Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials." *Lancet* **370**(9600): 1706-13.
- Colombo, G., R. Agabio, et al. (1998). "Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716." *Life Sci* **63**(8): PL113-7.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med* **334**(5): 292-5.
- Consroe, P., R. Musty, et al. (1997). "The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis." *Eur Neurol* **38**(1): 44-8.
- Costa, B. and M. Colleoni (1999). "SR141716A induces in rats a behavioral pattern opposite to that of CB1 receptor agonists." *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **20**(12): 1103-8.
- Cota, D., G. Marsicano, et al. (2003). "The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis." *J Clin Invest* **112**(3): 423-31.
- Crabb, D. and M. S. Sozio (2008). "Alcohol and lipid metabolism." *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, et al. (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." *Nature* **384**(6604): 83-7.
- Croxford, J. L. and S. D. Miller (2003). "Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212." *J Clin Invest* **111**(8): 1231-40.
- Croxford, J. L. and S. D. Miller (2004). "Towards cannabis and cannabinoid treatment of multiple sclerosis." *Drugs Today (Barc)* **40**(8): 663-76.
- Daaka, Y., H. Friedman, et al. (1996). "Cannabinoid receptor proteins are increased in Jurkat, human T-cell line after mitogen activation." *J Pharmacol Exp Ther* **276**(2): 776-83.
- Dagon, Y., Y. Avraham, et al. (2007). "Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase." *Faseb J*.
- Darmani, N. A., A. A. Izzo, et al. (2005). "Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoyl-ethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: Review of the available pre-clinical data, and first human studies." *Neuropharmacology* **48**(8): 1154-63.
- Das, S. K., B. C. Paria, et al. (1995). "Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4332-6.
- Davaille, J., C. Gallois, et al. (2000). "Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway." *J Biol Chem* **275**(44): 34628-33.
- Davaille, J., L. Li, et al. (2002). "Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts." *J Biol Chem* **277**(40): 37323-30.

- Demuth, D. G., E. Gkoumassi, et al. (2005). "Arachidonic acid mediates non-capacitative calcium entry evoked by CB1-cannabinoid receptor activation in DDT1 MF-2 smooth muscle cells." *J Cell Physiol* **205**(1): 58-67.
- Dentin, R., F. Benhamed, et al. (2006). "Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice." *Diabetes* **55**(8): 2159-70.
- Derkinderen, P., E. Valjent, et al. (2003). "Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus." *J Neurosci* **23**(6): 2371-82.
- Derocq, J. M., M. Segui, et al. (1995). "Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations." *FEBS Lett* **369**(2-3): 177-82.
- Despres, J. P., A. Golay, et al. (2005). "Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia." *N Engl J Med* **353**(20): 2121-34.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." *Nature* **444**(7121): 881-7.
- Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* **258**(5090): 1946-9.
- Di Carlo, G. and A. A. Izzo (2003). "Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications." *Expert Opin Investig Drugs* **12**(1): 39-49.
- Di Marzo, V. (2008). "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?" *Nature Reviews Drug Discovery* **7**: 438-455.
- Di Marzo, V., T. Bisogno, et al. (1999). "Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids." *Curr Med Chem* **6**(8): 721-44.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, et al. (2005). "The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids." *Handb Exp Pharmacol*(168): 147-85.
- Di Marzo, V., A. Fontana, et al. (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." *Nature* **372**(6507): 686-91.
- Di Marzo, V., S. K. Goparaju, et al. (2001). "Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake." *Nature* **410**(6830): 822-5.
- Di Marzo, V. and I. Matias (2005). "Endocannabinoid control of food intake and energy balance." *Nat Neurosci* **8**(5): 585-9.
- Di Marzo, V. and S. Petrosino (2007). "Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease." *Curr Opin Lipidol* **18**(2): 129-40.
- Dinh, T. P., D. Carpenter, et al. (2002). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10819-24.
- Domenicali, M., J. Ros, et al. (2005). "Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors." *Gut* **54**(4): 522-7.
- Engeli, S., J. Bohnke, et al. (2005). "Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity." *Diabetes* **54**(10): 2838-43.
- Esposito, I., M. C. Proto, et al. (2008). "The cannabinoid CB1 receptor antagonist Rimonabant stimulates 2-deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating phosphatidylinositol-3-kinase activity." *Mol Pharmacol*.
- Fain, J. N., S. W. Bahouth, et al. (2004). "TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**(4): 616-22.
- Farooqui, A. A., K. W. Rammohan, et al. (1989). "Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain." *Ann N Y Acad Sci* **559**: 25-36.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1998). "LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation." *J Pharmacol Exp Ther* **284**(1): 291-7.

- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Mol Pharmacol **48**(3): 443-50.
- Felder, C. C., A. Nielsen, et al. (1996). "Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat." FEBS Lett **393**(2-3): 231-5.
- Fernandez-Rodriguez, C. M., J. Romero, et al. (2004). "Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis." Liver Int **24**(5): 477-83.
- Fong, T. M., X. M. Guan, et al. (2007). "Antiobesity efficacy of a novel cannabinoid-1 receptor inverse agonist, N-[(1S,2S)-3-(4-chlorophenyl)-2-(3-cyanophenyl)-1-methylpropyl]-2-methyl-2-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]propanamide (MK-0364), in rodents." J Pharmacol Exp Ther **321**(3): 1013-22.
- Forbes, S. J., F. P. Russo, et al. (2004). "A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis." Gastroenterology **126**: 955-64.
- Fox, A. and S. Bevan (2005). "Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents." Expert Opin Investig Drugs **14**(6): 695-703.
- Franklin, A. and N. Stella (2003). "Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors." Eur J Pharmacol **474**(2-3): 195-8.
- Friedman, S. L. (2003). "Liver fibrosis - from bench to bedside." J Hepatol **38**(Suppl 1): S38-53.
- Fruhbeck, G. (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." Biochem J **393**(Pt 1): 7-20.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-61.
- Galiegue, S., S. Mary, et al. (1995). "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." Eur J Biochem **232**(1): 54-61.
- Gallois, C., A. Habib, et al. (1998). "Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate Cells. Involvement of cyclooxygenase-2." J Biol Chem **273**(36): 23183-90.
- Gao, Z., A. Zuberi, et al. (2003). "Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases." J Biol Chem **278**(27): 24944-50.
- Gaoni, Y. and R. Mechoulam (1964). "Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent from hashish." J Am Chem Soc **86**: 1646-1647.
- Gardner, B., L. X. Zu, et al. (2002). "Autocrine and paracrine regulation of lymphocyte CB2 receptor expression by TGF-beta." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 91-6.
- Gary-Bobo, M., G. Elachouri, et al. (2007). "Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats." Hepatology **46**(1): 122-9.
- Gaskari, S. A., H. Liu, et al. (2005). "Role of endocannabinoids in the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats." Br J Pharmacol **146**(3): 315-23.
- Gatley, S. J., A. N. Gifford, et al. (1996). "123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors." Eur J Pharmacol **307**(3): 331-8.
- Gertsch, J., M. Leonti, et al. (2008). "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9099-104.

- Goldfine, A. B. and C. R. Kahn (2003). "Adiponectin: linking the fat cell to insulin sensitivity." Lancet **362**(9394): 1431-2.
- Gomez, R., M. Navarro, et al. (2002). "A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding." J Neurosci **22**(21): 9612-7.
- Gonthier, M. P., L. Hoareau, et al. (2007). "Identification of endocannabinoids and related compounds in human fat cells." Obesity (Silver Spring) **15**(4): 837-45.
- Gorelick, D. A., S. J. Heishman, et al. (2006). "The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant attenuates the hypotensive effect of smoked marijuana in male smokers." Am Heart J **151**(3): 754 e1-754 e5.
- Gressner, A. M., R. Weiskirchen, et al. (2002). "Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis." Front Biosci **7**: d793-807.
- Griffin, G., P. J. Atkinson, et al. (1998). "Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes." J Pharmacol Exp Ther **285**(2): 553-60.
- Guzman, M. (2005). "Effects on cell viability." Handb Exp Pharmacol(168): 627-42.
- Guzman, M., I. Galve-Roperh, et al. (2001). "Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action." Trends Pharmacol Sci **22**(1): 19-22.
- Gye, M. C., C. Kim, et al. (2001). "Postnatal changes in the calcium binding proteins of mouse testis." Arch Androl **46**(1): 51-5.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, et al. (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." Science **269**(5223): 543-6.
- Hanus, L., S. Abu-Lafi, et al. (2001). "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3662-5.
- Harada, J., M. Foley, et al. (2004). "Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells." J Neurochem **88**(4): 1026-39.
- Harrold, J. A., J. C. Elliott, et al. (2002). "Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food?" Brain Res **952**(2): 232-8.
- Hegde, V. L., S. Hegde, et al. (2008). "Attenuation of experimental autoimmune hepatitis by exogenous and endogenous cannabinoids: involvement of regulatory T cells." Mol Pharmacol **74**(1): 20-33.
- Henry, D. J. and C. Chavkin (1995). "Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes." Neurosci Lett **186**(2-3): 91-4.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1932-6.
- Hevener, A. L., J. M. Olefsky, et al. (2007). "Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones." J Clin Invest **117**(6): 1658-69.
- Hezode, C., F. Roudot-Thoraval, et al. (2005). "Daily cannabis smoking as a risk factor for fibrosis progression in chronic hepatitis C." Hepatology **42**(1): 63-71.
- Hezode, C., E. S. Zafrani, et al. (2008). "Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C." Gastroenterology **134**(2): 432-9.
- Higgs, H. N. and J. A. Glomset (1994). "Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9574-8.
- Hillard, C. J., W. S. Edgmond, et al. (1997). "Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion." J Neurochem **69**(2): 631-8.

- Hines, I. N. and M. D. Wheeler (2004). "Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(2): G310-4.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**(6913): 333-6.
- Ho, W. S. and C. R. Hiley (2003). "Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery." Br J Pharmacol **138**(7): 1320-32.
- Ho, W. S. and C. R. Hiley (2004). "Vasorelaxant activities of the putative endocannabinoid virodhamine in rat isolated small mesenteric artery." J Pharm Pharmacol **56**(7): 869-75.
- Hoehe, M. R., L. Caenazzo, et al. (1991). "Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15." New Biol **3**(9): 880-5.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-7.
- Hundal, R. S., K. F. Petersen, et al. (2002). "Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes." J Clin Invest **109**(10): 1321-6.
- Ibrahimi, A. and N. A. Abumrad (2002). "Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**(2): 139-45.
- Idris, A. I., R. J. van 't Hof, et al. (2005). "Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors." Nat Med **11**(7): 774-9.
- Iredale, J., R. Benyon, et al. (1998). "Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors." J Clin Invest **102**: 538-49.
- Ishida, J. H., M. G. Peters, et al. (2008). "Influence of cannabis use on severity of hepatitis C disease." Clin Gastroenterol Hepatol **6**(1): 69-75.
- Izzo, A. A. and M. Camilleri (2008). "Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects." Gut **57**(8): 1140-55.
- Izzo, A. A. and A. A. Coutts (2005). "Cannabinoids and the digestive tract." Handb Exp Pharmacol(168): 573-98.
- Jamshidi, N. and D. A. Taylor (2001). "Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats." Br J Pharmacol **134**(6): 1151-4.
- Jarai, Z., J. A. Wagner, et al. (1999). "Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14136-41.
- Jarvinen, T., D. W. Pate, et al. (2002). "Cannabinoids in the treatment of glaucoma." Pharmacol Ther **95**(2): 203-20.
- Jbilo, O., C. Ravinet-Trillou, et al. (2005). "The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance." Faseb J **19**(11): 1567-9.
- Jeong, W. I., D. Osei-Hyiaman, et al. (2008). "Paracrine Activation of Hepatic CB(1) Receptors by Stellate Cell-Derived Endocannabinoids Mediates Alcoholic Fatty Liver." Cell Metab **7**(3): 227-35.
- Johns, D. G., D. J. Behm, et al. (2007). "The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects." Br J Pharmacol **152**(5): 825-31.
- Juan-Pico, P., E. Fuentes, et al. (2006). "Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell." Cell Calcium **39**(2): 155-62.
- Julien, B., P. Grenard, et al. (2005). "Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver." Gastroenterology **128**(3): 742-55.
- Kahn, B. B. and J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." J Clin Invest **106**(4): 473-81.

- Kalra, S. P., M. G. Dube, et al. (1999). "Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight." Endocr Rev **20**(1): 68-100.
- Kamagate, A., S. Qu, et al. (2008). "FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice." J Clin Invest **118**(6): 2347-64.
- Kamei, N., K. Tobe, et al. (2006). "Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance." J Biol Chem **281**(36): 26602-14.
- Kanda, H., S. Tateya, et al. (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." J Clin Invest **116**(6): 1494-505.
- Kang, K., S. M. Reilly, et al. (2008). "Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity." Cell Metab **7**(6): 485-95.
- Karsak, M., M. Cohen-Solal, et al. (2005). "Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis." Hum Mol Genet **14**(22): 3389-96.
- Karsak, M., E. Gaffal, et al. (2007). "Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system." Science **316**(5830): 1494-7.
- Kellerer, M., R. Lammers, et al. (1999). "Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(2): 97-106.
- Kempf, K., J. Hector, et al. (2007). "Immune-mediated activation of the endocannabinoid system in visceral adipose tissue in obesity." Horm Metab Res **39**(8): 596-600.
- Kern, P. A., S. Ranganathan, et al. (2001). "Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(5): E745-51.
- Kim, J. H., J. E. Kim, et al. (2008). "Regulation of interleukin-6-induced hepatic insulin resistance by mammalian target of rapamycin through the STAT3-SOCS3 pathway." J Biol Chem **283**(2): 708-15.
- Kim, J. K., Y. J. Kim, et al. (2001). "Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate." J Clin Invest **108**(3): 437-46.
- Kim, J. Y., E. van de Wall, et al. (2007). "Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue." J Clin Invest **117**(9): 2621-37.
- Kimura, M., S. Tanaka, et al. (1998). "T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent." Life Sci **62**(14): 1243-50.
- Kirkham, T. C., C. M. Williams, et al. (2002). "Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol." Br J Pharmacol **136**(4): 550-7.
- Kishimoto, S., M. Gokoh, et al. (2003). "2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism." J Biol Chem **278**(27): 24469-75.
- Klein, T. W., C. Newton, et al. (1993). "Delta 9-tetrahydrocannabinol injection induces cytokine-mediated mortality of mice infected with *Legionella pneumophila*." J Pharmacol Exp Ther **267**(2): 635-40.
- Klein, T. W., C. A. Newton, et al. (1985). "The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol on T-lymphocyte and B-lymphocyte mitogen responses." J Immunopharmacol **7**(4): 451-66.
- Knittel, T., D. Kobold, et al. (1999). "Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair." Histochem Cell Biol **112**(5): 387-401.

- Kozak, K. R., B. C. Crews, et al. (2002). "Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides." *J Biol Chem* **277**(47): 44877-85.
- Kozak, K. R., S. W. Rowlinson, et al. (2000). "Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* **275**(43): 33744-9.
- Kunos, G., D. Osei-Hyiaman, et al. (2008). "Endocannabinoids and the control of energy homeostasis." *J Biol Chem*.
- Kusher, D. I., L. O. Dawson, et al. (1994). "Effect of the psychoactive metabolite of marijuana, delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), on the synthesis of tumor necrosis factor by human large granular lymphocytes." *Cell Immunol* **154**(1): 99-108.
- Lagathu, C., J. P. Bastard, et al. (2003). "Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone." *Biochem Biophys Res Commun* **311**(2): 372-9.
- Lago, R., R. Gomez, et al. (2008). "Leptin beyond body weight regulation--current concepts concerning its role in immune function and inflammation." *Cell Immunol* **252**(1-2): 139-45.
- Lan, R., J. Gatley, et al. (1999). "Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand." *AAPS PharmSci* **1**(2): E4.
- Lau, D. C., B. Dhillon, et al. (2005). "Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(5): H2031-41.
- Le Foll, B. and S. R. Goldberg (2005). "Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence." *J Pharmacol Exp Ther* **312**(3): 875-83.
- Ledent, C., O. Valverde, et al. (1999). "Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice." *Science* **283**(5400): 401-4.
- Lee, J. Y., K. H. Sohn, et al. (2001). "Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4." *J Biol Chem* **276**(20): 16683-9.
- Leff, P. (1995). "The two-state model of receptor activation." *Trends Pharmacol Sci* **16**(3): 89-97.
- Lehrke, M., M. P. Reilly, et al. (2004). "An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans." *PLoS Med* **1**(2): e45.
- Li, L., J. Tao, et al. (2001). "15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin j2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. a pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors." *J Biol Chem* **276**(41): 38152-8.
- Liu, J., S. Batkai, et al. (2003). "Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor." *J Biol Chem* **278**(45): 45034-9.
- Liu, Y. L., I. P. Connoley, et al. (2005). "Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice." *Int J Obes (Lond)* **29**(2): 183-7.
- Lopez-Moreno, J. A., G. Gonzalez-Cuevas, et al. (2008). "The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction." *Addict Biol* **13**(2): 160-87.
- Lotersztajn, S., B. Julien, et al. (2005). "Hepatic fibrosis : molecular mechanisms and drug targets." *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 605-628.

- Louvet, A., S. Naveau, et al. (2007). "The Lille model: a new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids." *Hepatology* **45**(6): 1348-54.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, et al. (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *J Clin Invest* **117**(1): 175-84.
- Lumeng, C. N., S. M. Deyoung, et al. (2007). "Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity." *Diabetes* **56**(1): 16-23.
- Lunn, C. A., J. S. Fine, et al. (2006). "A novel cannabinoid peripheral cannabinoid receptor-selective inverse agonist blocks leukocyte recruitment in vivo." *J Pharmacol Exp Ther* **316**(2): 780-8.
- Maccarrone, M., L. De Petrocellis, et al. (2001). "Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes." *Arch Biochem Biophys* **393**(2): 321-8.
- Maccarrone, M., T. Lorenzon, et al. (2000). "Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors." *J Biol Chem* **275**(41): 31938-45.
- Mackie, K. (2005). "Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization." *Life Sci* **77**(14): 1667-73.
- Maeda, K., K. Okubo, et al. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." *Biochem Biophys Res Commun* **221**(2): 286-9.
- Maestroni, G. J. (2004). "The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein." *Faseb J* **18**(15): 1914-6.
- Malfait, A. M., R. Gallily, et al. (2000). "The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9561-6.
- Mallat, A. (1998). "Hepatic stellate cells and intrahepatic modulation of portal pressure." *Digestion* **59**(4): 416-9.
- Mallat, A. and S. Lotersztajn (2006). "Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases." *Journal of Endocrinological Investigation* **29**(3(Suppl)): 58-65.
- Massa, F., G. Marsicano, et al. (2004). "The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation." *J Clin Invest* **113**(8): 1202-9.
- Matarese, G., S. Moschos, et al. (2005). "Leptin in immunology." *J Immunol* **174**(6): 3137-42.
- Mathias, S., K. A. Dressler, et al. (1991). "Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10009-13.
- Mathison, R., W. Ho, et al. (2004). "Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats." *Br J Pharmacol* **142**(8): 1247-54.
- Mathurin, P., C. L. Mendenhall, et al. (2002). "Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis (AH): individual data analysis of the last three randomized placebo controlled double blind trials of corticosteroids in severe AH." *J Hepatol* **36**(4): 480-7.
- Matias, I., M. P. Gonthier, et al. (2006). "Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(8): 3171-80.
- Matias, I., P. Pochard, et al. (2002). "Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells." *Eur J Biochem* **269**(15): 3771-8.

- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* **346**(6284): 561-4.
- Matsusue, K., J. M. Peters, et al. (2004). "PPARbeta/delta potentiates PPARgamma-stimulated adipocyte differentiation." *FASEB J* **18**(12): 1477-9.
- McClain, C. J., Z. Song, et al. (2004). "Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(3): G497-502.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." *Biochem Pharmacol* **50**(1): 83-90.
- Melis, M., M. Pistis, et al. (2004). "Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors." *J Neurosci* **24**(1): 53-62.
- Meschler, J. P., T. J. Conley, et al. (2000). "Cannabinoid and dopamine interaction in rodent brain: effects on locomotor activity." *Pharmacol Biochem Behav* **67**(3): 567-73.
- Mezey, E., Z. E. Toth, et al. (2000). "Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3655-60.
- Miller, A. M. and N. Stella (2008). "CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way." *Br J Pharmacol* **153**(2): 299-308.
- Montecucco, F., F. Burger, et al. (2008). "CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(3): H1145-55.
- Munoz-Luque, J., J. Ros, et al. (2008). "Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats." *J Pharmacol Exp Ther* **324**(2): 475-83.
- Munro, S., K. L. Thomas, et al. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* **365**(6441): 61-5.
- Murphy, F. R., R. Issa, et al. (2002). "Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by TIMP-1 is mediated via effects on MMP inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis." *J Biol Chem* **277**(13): 11069-11076.
- Muse, E. D., T. K. Lam, et al. (2007). "Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance." *J Clin Invest* **117**(6): 1670-8.
- Nakano, Y., S. H. Pross, et al. (1992). "Modulation of interleukin 2 activity by delta 9-tetrahydrocannabinol after stimulation with concanavalin A, phytohemagglutinin, or anti-CD3 antibody." *Proc Soc Exp Biol Med* **201**(2): 165-8.
- Nakata, M. and T. Yada (2008). "Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors." *Regul Pept* **145**(1-3): 49-53.
- Nakatani, Y., H. Kaneto, et al. (2004). "Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status." *J Biol Chem* **279**(44): 45803-9.
- Navasa, M., D. A. Gordon, et al. (1998). "Regulation of microsomal triglyceride transfer protein mRNA expression by endotoxin and cytokines." *J Lipid Res* **39**(6): 1220-30.
- Newton, C., T. Klein, et al. (1998). "The role of macrophages in THC-induced alteration of the cytokine network." *Adv Exp Med Biol* **437**: 207-14.
- Noe, S. N., C. Newton, et al. (2000). "Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes." *J Neuroimmunol* **110**(1-2): 161-7.
- Nomiyama, T., D. Perez-Tilve, et al. (2007). "Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice." *J Clin Invest* **117**(10): 2877-88.

- Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, et al. (2007). "Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance." *Nature* **447**(7148): 1116-20.
- Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, et al. (2008). "Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance." *Cell Metab* **7**(6): 496-507.
- Ofek, O., M. Karsak, et al. (2006). "Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(3): 696-701.
- Oka, S., S. Ikeda, et al. (2004). "2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils." *J Leukoc Biol* **76**(5): 1002-9.
- Osei-Hyiaman, D., M. DePetrillo, et al. (2005). "Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity." *J Clin Invest* **115**(5): 1298-305.
- Osei-Hyiaman, D., M. Depetrillo, et al. (2005). "Endocannabinoid activation at hepatic CB(1) receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity." *J Clin Invest* **115**(5): 1298-305.
- Osei-Hyiaman, D., J. Liu, et al. (2008). "Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice." *J Clin Invest* **118**(9): 3160-9.
- Otero, M., R. Lago, et al. (2006). "Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine." *Drug News Perspect* **19**(1): 21-6.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." *Science* **306**(5695): 457-61.
- Pagano, C., C. Pilon, et al. (2007). "The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(12): 4810-9.
- Pagotto, U., G. Marsicano, et al. (2006). "The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance." *Endocr Rev* **27**(1): 73-100.
- Paldyova, E., E. Bereczki, et al. (2008). "Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors." *Neurochem Int* **52**(1-2): 321-8.
- Pan, X., S. R. Ikeda, et al. (1998). "SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca²⁺ currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity." *Mol Pharmacol* **54**(6): 1064-72.
- Patel, K., C. Hezode, et al. (2003). "A non invasive serum fibrosis marker panel can consistently select chronic hepatitis C patients with minimal stage (F0 -F1) fibrosis from more advanced liver disease (F2-F4)." *J Hepatol* **38** (Suppl 2): 144.
- Patsos, H. A., D. J. Hicks, et al. (2005). "The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: a possible role for cyclooxygenase 2." *Gut* **54**(12): 1741-50.
- Patsouris, D., P. P. Li, et al. (2008). "Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals." *Cell Metab* **8**(4): 301-9.
- Pertwee, R. G. (1999). "Pharmacology of cannabinoid receptor ligands." *Curr Med Chem* **6**(8): 635-64.
- Pertwee, R. G. (2001). "Cannabinoid receptors and pain." *Prog Neurobiol* **63**(5): 569-611.
- Pi-Sunyer, F. X., L. J. Aronne, et al. (2006). "Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial." *Jama* **295**(7): 761-75.

- Pinto, J. C., F. Potie, et al. (1994). "Cannabinoid receptor binding and agonist activity of amides and esters of arachidonic acid." Mol Pharmacol **46**(3): 516-22.
- Pinzani, M. and F. Marra (2001). "Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells." Semin Liver Dis **21**(3): 397-416.
- Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." Nat Rev Neurosci **4**(11): 873-84.
- Piomelli, D., M. Beltramo, et al. (1999). "Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5802-7.
- Porter, A. C., J. M. Sauer, et al. (2002). "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 1020-4.
- Postic, C. and J. Girard (2008). "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice." J Clin Invest **118**(3): 829-38.
- Pross, S. H., Y. Nakano, et al. (1992). "Differing effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on murine spleen cell populations dependent upon stimulators." Int J Immunopharmacol **14**(6): 1019-27.
- Pryce, G. and D. Baker (2005). "Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis." Trends Neurosci **28**(5): 272-6.
- Raborn, E. S., F. Marciano-Cabral, et al. (2008). "The cannabinoid delta-9-tetrahydrocannabinol mediates inhibition of macrophage chemotaxis to RANTES/CCL5: linkage to the CB2 receptor." J Neuroimmune Pharmacol **3**(2): 117-29.
- Rajesh, M., H. Pan, et al. (2007). "Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis." J Leukoc Biol **82**(6): 1382-9.
- Ramos, J. A., S. Gonzalez, et al. (2005). "Therapeutic potential of the endocannabinoid system in the brain." Mini Rev Med Chem **5**(7): 609-17.
- Rangwala, S. M. and M. A. Lazar (2000). "Transcriptional control of adipogenesis." Annu Rev Nutr **20**: 535-59.
- Ravinet Trillou, C., M. Arnone, et al. (2003). "Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(2): R345-53.
- Ravinet Trillou, C., C. Delgorge, et al. (2004). "CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity." Int J Obes Relat Metab Disord **28**(4): 640-8.
- Rayman, N., K. H. Lam, et al. (2004). "Distinct expression profiles of the peripheral cannabinoid receptor in lymphoid tissues depending on receptor activation status." J Immunol **172**(4): 2111-7.
- Rieusset, J., K. Bouzakri, et al. (2004). "Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients." Diabetes **53**(9): 2232-41.
- Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, et al. (1994). "SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor." FEBS Lett **350**(2-3): 240-4.
- Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, et al. (1998). "SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor." J Pharmacol Exp Ther **284**(2): 644-50.
- Robertson, H., J. A. Kirby, et al. (2007). "Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis." Hepatology **45**(4): 977-81.

- Robichon, C., J. Girard, et al. (2008). "[Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP]." *Med Sci (Paris)* **24**(10): 841-6.
- Robson, P. (2005). "Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis." *Handb Exp Pharmacol*(168): 719-56.
- Roche, M., J. P. Kelly, et al. (2008). "Augmentation of endogenous cannabinoid tone modulates lipopolysaccharide-induced alterations in circulating cytokine levels in rats." *Immunology* **125**(2): 263-71.
- Roche, R., L. Hoareau, et al. (2006). "Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes." *Histochem Cell Biol* **126**(2): 177-87.
- Ronesi, J., G. L. Gerdeman, et al. (2004). "Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport." *J Neurosci* **24**(7): 1673-9.
- Ross, R. A., S. J. Craib, et al. (2002). "Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(3): 900-7.
- Ross, R. A., T. M. Gibson, et al. (2001). "Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens." *Br J Pharmacol* **132**(3): 631-40.
- Rossato, M., F. Ion Popa, et al. (2005). "Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 984-91.
- Rueda, D., I. Galve-Roperh, et al. (2000). "The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase." *Mol Pharmacol* **58**(4): 814-20.
- Ruiu, S., G. Marchese, et al. (2003). "In vitro evidence for the presence of [3H]-haloperidol uptake in rat brain." *Br J Pharmacol* **138**(1): 188-92.
- Russo, E. and G. W. Guy (2006). "A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol." *Med Hypotheses* **66**(2): 234-46.
- Russo, F. P., M. R. Alison, et al. (2006). "The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis." *Gastroenterology* **130**(6): 1807-21.
- Ryberg, E., N. Larsson, et al. (2007). "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor." *Br J Pharmacol*.
- Rygiel, K. A., H. Robertson, et al. (2008). "Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease." *Lab Invest* **88**(2): 112-23.
- Sacerdote, P., C. Martucci, et al. (2005). "The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro." *J Neuroimmunol* **159**(1-2): 97-105.
- Saile, B., N. Matthes, et al. (1999). "Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells." *Hepatology* **30**(1): 196-202.
- Sanchez, C., I. Galve-Roperh, et al. (1998). "Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes." *Mol Pharmacol* **54**(5): 834-43.
- Savinainen, J. R., S. M. Saario, et al. (2003). "An optimized approach to study endocannabinoid signaling: evidence against constitutive activity of rat brain adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors." *Br J Pharmacol* **140**(8): 1451-9.
- Schatz, A. R., M. Lee, et al. (1997). "Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system." *Toxicol Appl Pharmacol* **142**(2): 278-87.

- Scheen, A. J., N. Finer, et al. (2006). "Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study." Lancet **368**(9548): 1660-72.
- Schenk, S., M. Saberi, et al. (2008). "Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation." J Clin Invest **118**(9): 2992-3002.
- Schmid, K., N. Niederhoffer, et al. (2003). "Analysis of the respiratory effects of cannabinoids in rats." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **368**(4): 301-8.
- Schuppan, D., M. Ruehl, et al. (2001). "Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis." Semin Liver Dis **21**(3): 351-72.
- Schwarz, H., F. J. Blanco, et al. (1994). "Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis." J Neuroimmunol **55**(1): 107-15.
- Sheng, C. H., J. Di, et al. (2008). "Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance." Endocrine **33**(2): 135-43.
- Shimomura, I., R. E. Hammer, et al. (1998). "Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy." Genes Dev **12**(20): 3182-94.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, et al. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." Gastroenterology **132**(6): 2169-80.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2003). "Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S49-52.
- Shoemaker, J. L., B. K. Joseph, et al. (2005). "The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors." J Pharmacol Exp Ther **314**(2): 868-75.
- Shore, S. A. (2007). "Obesity and asthma: implications for treatment." Curr Opin Pulm Med **13**(1): 56-62.
- Showalter, V. M., D. R. Compton, et al. (1996). "Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands." J Pharmacol Exp Ther **278**(3): 989-99.
- Sim-Selley, L. J., L. K. Brunk, et al. (2001). "Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain." Eur J Pharmacol **414**(2-3): 135-43.
- Smart, D., M. J. Gunthorpe, et al. (2000). "The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1)." Br J Pharmacol **129**(2): 227-30.
- Smith, S. R., C. Terminelli, et al. (2000). "Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice." J Pharmacol Exp Ther **293**(1): 136-50.
- Srivastava, M. D., B. I. Srivastava, et al. (1998). "Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells." Immunopharmacology **40**(3): 179-85.
- Starowicz, K. M., L. Cristino, et al. (2008). "Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet." Obesity (Silver Spring) **16**(3): 553-65.
- Staton, P. C., J. P. Hatcher, et al. (2008). "The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain." Pain **139**(1): 225-36.
- Stefan, N. and M. Stumvoll (2002). "Adiponectin--its role in metabolism and beyond." Horm Metab Res **34**(9): 469-74.
- Steffens, S., N. R. Veillard, et al. (2005). "Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice." Nature Medicine **434**(7034): 782-6.

- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." *Nature* **388**(6644): 773-8.
- Szallasi, A. and P. M. Blumberg (1999). "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms." *Pharmacol Rev* **51**(2): 159-212.
- Taniguchi, C. M., B. Emanuelli, et al. (2006). "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2): 85-96.
- Teixeira-Clerc, F., B. Julien, et al. (2006). "CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis." *Nat Med* **12**(6): 671-6.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* **6**(10): 772-83.
- Tomida, I., R. G. Pertwee, et al. (2004). "Cannabinoids and glaucoma." *Br J Ophthalmol* **88**(5): 708-13.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2005). "Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1078-81.
- Ueda, N., K. Yamamoto, et al. (1995). "Oxygenation of arachidonylethanolamide (anandamide) by lipoxygenases." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **23**: 163-5.
- Valk, P. J., S. Hol, et al. (1997). "The genes encoding the peripheral cannabinoid receptor and alpha-L-fucosidase are located near a newly identified common virus integration site, Evi11." *J Virol* **71**(9): 6796-804.
- Van Gaal, L. F., A. M. Rissanen, et al. (2005). "Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study." *Lancet* **365**(9468): 1389-97.
- Ventre, J., T. Doebber, et al. (1997). "Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice." *Diabetes* **46**(9): 1526-31.
- Vickers, S. P., L. J. Webster, et al. (2003). "Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats." *Psychopharmacology (Berl)* **167**(1): 103-11.
- Virkamaki, A., K. Ueki, et al. (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance." *J Clin Invest* **103**(7): 931-43.
- Wagner, J. A., K. Varga, et al. (1999). "Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors." *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 429-34.
- Wahn, H., J. Wolf, et al. (2005). "The endocannabinoid arachidonyl ethanolamide (anandamide) increases pulmonary arterial pressure via cyclooxygenase-2 products in isolated rabbit lungs." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(6): H2491-6.
- Walker, J. M. and S. M. Huang (2002). "Cannabinoid analgesia." *Pharmacol Ther* **95**(2): 127-35.
- Walsh, D., K. A. Nelson, et al. (2003). "Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology." *Support Care Cancer* **11**(3): 137-43.
- Watzl, B., P. Scuderi, et al. (1991). "Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro." *Int J Immunopharmacol* **13**(8): 1091-7.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-808.
- Whan, L. B., M. C. West, et al. (2006). "Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro." *Fertil Steril* **85**(3): 653-60.
- White, R., W. S. Ho, et al. (2001). "Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries." *Br J Pharmacol* **134**(4): 921-9.

- Williams, C. M. and T. C. Kirkham (1999). "Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors." *Psychopharmacology (Berl)* **143**(3): 315-7.
- Williams, C. M., P. J. Rogers, et al. (1998). "Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC." *Physiol Behav* **65**(2): 343-6.
- Wisse, B. E. (2004). "The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity." *J Am Soc Nephrol* **15**(11): 2792-800.
- Wright, M. C., R. Issa, et al. (2001). "Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats." *Gastroenterology* **121**(3): 685-98.
- Xu, A., Y. Wang, et al. (2003). "The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice." *J Clin Invest* **112**(1): 91-100.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* **112**(12): 1821-30.
- Yin, M. J., Y. Yamamoto, et al. (1998). "The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta." *Nature* **396**(6706): 77-80.
- Yoshihara, S., H. Morimoto, et al. (2005). "Endogenous cannabinoid receptor agonists inhibit neurogenic inflammations in guinea pig airways." *Int Arch Allergy Immunol* **138**(1): 80-7.
- Yu, S. M., L. M. Hung, et al. (1997). "cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway [see comments]." *Circulation* **95**(5): 1269-77.
- Yuan, M., S. M. Kiertscher, et al. (2002). "Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells." *J Neuroimmunol* **133**(1-2): 124-31.
- Yuan, M., N. Konstantopoulos, et al. (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta." *Science* **293**(5535): 1673-7.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, et al. (1997). "The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation." *Cell* **91**(2): 243-52.
- Zhang, P. W., H. Ishiguro, et al. (2004). "Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse." *Mol Psychiatry* **9**(10): 916-31.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-32.
- Zheng, Z. M., S. Specter, et al. (1992). "Inhibition by delta-9-tetrahydrocannabinol of tumor necrosis factor alpha production by mouse and human macrophages." *Int J Immunopharmacol* **14**(8): 1445-52.
- Zhou, J., M. Febbraio, et al. (2008). "Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis." *Gastroenterology* **134**(2): 556-67.
- Zhu, W., H. Friedman, et al. (1998). "Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1." *J Pharmacol Exp Ther* **286**(2): 1103-9.
- Zimmer, A., A. M. Zimmer, et al. (1999). "Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5780-5.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, et al. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* **400**(6743): 452-7.

PUBLICATIONS ANNEXES

Elevated Expression of Osteopontin May Be Related to Adipose Tissue Macrophage Accumulation and Liver Steatosis in Morbid Obesity.

Adeline Bertola^{1,2} PhD student, Vanessa Deveaux^{3,4} PhD student, Stéphanie Bonnafous^{1,2,6} Research assistant, Déborah Rousseau^{1,2} PhD, Rodolphe Anty^{1,2,6} MD, PhD, Abdelilah Wakkach^{2,7} PhD, Moncef Dahman⁶ MD, Joan Tordjman⁸ PhD, Karine Clément⁸ MD, PhD, Siobhán E. McQuaid⁹ MD, Keith N. Frayn⁹ PhD, Pierre-Michel Huet^{1,2,6} MD, PhD, Jean Gugenheim^{1,2,6} MD, PhD, Sophie Lotersztajn^{3,4,5} PhD, Yannick Le Marchand-Brustel^{1,2,6} PhD, Albert Tran^{1,2,6} MD, PhD, Philippe Gual^{1,2,6} PhD.

¹ INSERM, U895, Team 8 « Hepatic complications in obesity », Nice, France;

² University of Nice-Sophia-Antipolis, Faculty of Medicine, Nice, France;

³ INSERM, U841, Créteil, France;

⁴ University of Paris 12, Faculty of Medicine, Créteil, France ;

⁵ AP-HP, Henri Mondor-Albert Chenevier group, Hepatology and Gastroenterology department, Créteil, France;

⁶ CHU of Nice, Digestive Center, Nice, France;

⁷ CNRS, FRE2943, Nice, France;

⁸ INSERM, U872, Cordelier Research Center, Team 7, Paris, France; Pierre et Marie-Curie-Paris 6, Paris, France ;

⁹ OCDEM, Churchill Hospital, Headington, UK;

§ Corresponding Author:

Philippe Gual
INSERM U895,
Bâtiment Universitaire ARCHIMED
Equipe 8 "Complications hépatiques de l'obésité"
151 route Saint Antoine de Ginestière
BP 2 3194
06204 Nice Cedex 03
FRANCE
gual@unice.fr

Submitted 21 March 2008 and accepted 16 October 2008.

This is an uncopyedited electronic version of an article accepted for publication in *Diabetes*. The American Diabetes Association, publisher of *Diabetes*, is not responsible for any errors or omissions in this version of the manuscript or any version derived from it by third parties. The definitive publisher-authenticated version will be available in a future issue of *Diabetes* in print and online at <http://diabetes.diabetesjournals.org>.

ABSTRACT

Objective: Osteopontin plays an important role in the development of insulin-resistance and liver complications in dietary murine models. We aimed to determine the expression pattern of OPN and its receptor CD44 in obese patients and mice according to insulin-resistance and liver steatosis.

Research design and methods: Osteopontin and CD44 expressions were studied in 52 morbidly obese patients and in mice. Cellular studies were performed in HepG2 cells.

Results: Hepatic OPN and CD44 expressions were strongly correlated with liver steatosis and insulin-resistance in obese patients and mice. This increased OPN expression could be due to the accumulation of triglycerides since fat loading in HepG2 promotes OPN expression. In contrast, OPN expression in adipose tissue (AT) was enhanced independently of insulin-resistance and hepatic steatosis in obese patients. The elevated OPN expression in AT was paralleled with the AT macrophage infiltration, and both phenomena were reversed following weight loss. The circulating OPN level was slightly elevated in obese patients and was not related to liver steatosis. Further, AT did not appear to secrete OPN. In contrast, bariatric surgery-induced weight loss induced a strong increase in circulating OPN.

Conclusions: The modestly elevated circulating OPN levels in morbidly obese patients were not related to liver steatosis and did not appear to result from adipose tissue secretion. In subcutaneous AT, expression of OPN was directly related to macrophage accumulation independently from liver complications. In contrast, hepatic OPN and CD44 expressions were related to insulin-resistance and steatosis, suggesting their local implication in the progression of liver injury.

The incidence of overweight and obesity is rapidly increasing in many Western countries. This epidemic of obesity is associated with the development of type 2 diabetes, hypertension and Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD). These often ignored hepatic abnormalities extend from simple steatosis to steatohepatitis (Non Alcoholic Steato-Hepatitis, NASH) and steatofibrosis leading, in some cases, to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. NAFLD are frequently observed in the setting of visceral obesity, insulin-resistance and metabolic syndrome (1). Obesity is associated with a low-grade chronic inflammation as evidenced by increased systemic concentrations of inflammatory markers and cytokines (2; 3). The accumulation of macrophages in obese adipose tissue, a key source of inflammation (4; 5), provides a causal link between the development of insulin-resistance and liver complications (6). The combined elevation of plasma glucose and insulin levels promotes *de novo* lipid synthesis and impairs lipid oxidation within hepatocytes (6-8). Moreover, insulin-resistance of adipose tissue leads to an enhanced delivery of free fatty acids to the liver contributing to the excessive fatty acids accumulation (6; 8). Recently, it has been proposed that osteopontin (OPN), a Th1 cytokine, could play an important role in the development of insulin-resistance and NAFLD in dietary murine models (9-11).

OPN binds to multiple receptors including the integrin receptors and CD44 (12; 13). This cytokine is involved in cell adhesion, chemo-attraction and immunomodulation (13-15). In particular, OPN is highly secreted by macrophages at inflammation sites where it mediates monocyte adhesion, migration and

differentiation as well as phagocytosis (16-18). Recently, an elevated expression of OPN has been detected in human and mice adipose tissue (19) (9) (20). Elevated plasma levels of OPN have been associated with human and mice obesity (9; 19) and weight loss following low caloric diets was associated with a reduction of OPN plasma levels in obese patients (19). Furthermore, PPAR ligands inhibited the OPN expression in macrophages (21; 22) and treatment with bezafibrate in type 2 diabetic patients was correlated with reduced OPN levels (21). Recently, Nomiya *et al.* have identified OPN as a link between adipose tissue inflammation and insulin-resistance in a murine model of diet-induced obesity (9). Similarly, OPN can also play an important role in the occurrence of liver complications, as suggested by Sahai *et al* in OPN null mice (10).

Based on the evidence that OPN can be considered as a potential actor in obesity-induced complications in mice (9; 10), we first analyzed the expression pattern of OPN and its receptor CD44 in morbidly obese patients according to steatosis and insulin-resistance. In addition, OPN and CD44 expressions were evaluated in human adipose tissue following a surgically-induced weight loss associated with a marked reduction of inflammation and insulin-resistance. We then looked for a direct effect of fat loading on OPN expression in a hepatocyte cell line.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals: Wild-type C57BL/6 male mice (7-10 weeks of age), obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France), had free access to water and were fed a standard chow diet (ND, n=8) (TD2016, Harlan) or a high fat diet (HFD, n=10)

containing 36% fat (TD99249, Harlan) for 15 weeks. At the time of sacrifice, white epididymal adipose tissue pads and liver samples were removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. Serum OPN levels were determined by ELISA (R&D Systems, Lille, France).

Isolation of hepatocytes and non parenchymal fraction from liver: Mouse livers were perfused first with a HEPES buffer containing 8 g/L NaCl, 33 mg/L Na_2HPO_4 , 200 mg/L KCl and 2,38 g/L HEPES, pH 7.65 for 2 min at 5 ml/min and then with HEPES buffer supplemented with 1,5g/L CaCl_2 and 25mg/L liberase (Roche Diagnostics) for 7 min at 5 ml/min. Livers were then carefully removed, minced and the resultant cell suspension was then filtered (100 μm). Hepatocytes were collected by centrifugation for 5 min at $50 \times g$ and then on a Percoll density gradient (20 min, $500 \times g$) (Sigma). Hepatocytes were then washed in NaCl 0.9%, isolated by centrifugation (5 min, $50 \times g$) and frozen at -80°C before RNA extraction as described below. The non parenchymal cells in the supernatant of first centrifugation were collected by centrifugation for 5 min at $450 \times g$ and then incubated in NaCl 0.9% buffer supplemented with 0,02% pronase E (Sigma) for 20 min at 37°C under gentle agitation. Finally, cells were collected by centrifugation at $450 \times g$ for 5 min and frozen at -80°C before RNA extraction as described below.

Study population: Patient population: The patient cohort included 52 morbidly obese patients. These patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity (Nice and Paris hospitals). Bariatric

surgery was indicated for these patients in accordance with the French Guidelines for obesity surgery. Briefly, they had a body mass index (BMI) $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ or $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ with at least one complication. Exclusion criteria were: presence of hepatitis B or hepatitis C virus infection, excessive alcohol consumption ($>20 \text{ g/d}$) or another cause of chronic liver diseases (primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, Wilson disease, genetic hemochromatosis or biliary disease). The clinical and biological characteristics of the study groups are described in Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine amino transferase (ALAT), glucose, insulin, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, and C-reactive protein (CRP) levels. Serum OPN levels were determined by ELISA (R&D Systems, Lille, France). The degree of insulin-resistance was calculated by using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index (23). Surgical liver biopsies were obtained at the time of bariatric surgery. Part of the biopsy was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed. The other part, was fixed in Bouin solution, paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin-safran and picro-sirius red. Steatosis was graded from 0 to 3 based on percent of hepatocytes in the biopsy affected: 0 for none (S0, $n=6$); 1 for $<30\%$ (S1, mild steatosis, $n=13$); 2 for $30-60\%$ (S2, moderate steatosis, $n=9$); and 3 for $>60\%$ (S3, severe steatosis, $n=24$). Subcutaneous and visceral adipose tissue samples were also obtained from 39 patients and frozen until analyzed. The percentage of macrophages in subcutaneous adipose tissue of 19 patients has been evaluated by immunohistochemical analysis as previously described (24). In addition,

abdominal subcutaneous adipose tissue was obtained from 6 women before (age, 40.7 ± 3.2 years; BMI, 42.7 ± 2.0 kg/m²) and 2 years after (BMI, 26.0 ± 1.6 kg/m²) weight loss following bariatric surgery (mean weight loss: 44.3 ± 11.4 kg). Serum was obtained from 25 patients before (BMI, 43.9 ± 5.3 kg/m²) and 1 year after (BMI, 27.9 ± 3.8 kg/m²) weight loss following bariatric surgery (mean weight loss: 42.3 ± 12.3 kg). The second surgery was performed for cosmetic purpose. *Control subjects:* Total RNA from 6 control livers was purchased from Stratagene (La Jolla, CA) (female, 34 years old, normal adjacent tissue to stromal sarcoma), Clontech (Mountain View, CA) (male, 51 years old, sudden death) and Biochain (Hayward, CA) (four males: 24, 26, 28 and 30 years old, sudden deaths). The Stratagene and Biochain companies confirmed that histological findings were completely normal with no evidence of fatty liver disease. No clinical or biological data were available for these individuals but the absence of inflammatory process was corroborated by low CRP mRNA expression levels, as previously reported (3; 25). *Control subcutaneous adipose tissue* was obtained from 7 lean subjects (5 females and 2 males; age, 36.7 ± 8.4 years; BMI, 21.5 ± 1.9 kg/m²) undergoing lipectomy for cosmetic purpose. Finally, serum was obtained from 8 lean healthy volunteers (6 females and 2 males; age, 31.6 ± 2.4 years; BMI, 21.2 ± 0.3 kg/m²) after an overnight fasting. All subjects gave their informed consent to participate in this research study according to French legislation regarding Ethic and Human Research (Huriet-Serusclet law, DGS 2003/0395).

Arteriovenous differences across the adipose tissue. The protocol was approved by the Oxfordshire Clinical

Research Ethics Committee, and all subjects gave written informed consent. Five overweight healthy subjects (4 men, 1 woman, BMI, 27 ± 1 kg/m²) were studied after an overnight fast. A 10 cm, 22 gauge Hydrocath catheter (Becton Dickinson, UK) was introduced over a guide wire into a superficial vein on the anterior abdominal wall and threaded toward the groin so that its tip lay just superior to the inguinal ligament. This provided access to the venous drainage from the subcutaneous abdominal adipose tissue, uncontaminated by muscle drainage and with a relatively minor contribution from skin (26). A retrograde cannula was placed in a vein draining the hand, which was warmed in a hot-air box maintained at 60°C to obtain arterialized blood. The cannulae were kept patent by a slow infusion of 0.9% (w/v) saline. After a resting period of at least 30 min, blood samples were taken simultaneously from the arterialized and adipose tissue venous lines.

Real-time quantitative PCR analysis: Total RNA was extracted from human and animal tissues using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Contraboeuf, France) and treated by Turbo DNA-free™ (Applied Biosystems, Contraboeuf, France) following the manufacturer's protocols. The quantity and quality of the isolated RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyser with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). One microgram of total RNA was reverse-transcribed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the ABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System and FAM™ dyes (Applied Biosystems, Contraboeuf, France) as previously described (3; 25). The

TaqMan[®] gene expression assays were purchased from Applied Biosystems: *OPN*, (Hs00167093_m1, Mm00436767_m1); *CD44*, (Hs00153304_m1; Mm01277163_m1), *CD11b* (Hs00355885_m1), *CD68* (Hs00154355_m1), *TNF α* (Hs00174128_m1), *F4/80* (Mm00802530_m1), *RPLP0* (large P0 subunit of the acidic ribosomal phosphoprotein, Hs99999902_m1) and *36B4*, (Mm99999223_gH).

OPN immunoblotting: Proteins were extracted from patient frozen liver samples using the NucleoSpin[®] RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, France) according to the manufacturer's protocol. Proteins (50 μ g) were separated by SDS-PAGE using a 10 % resolving gel. The Western blotting has been performed as previously described (27). The proteins were probed with anti-OPN (AKm2A1) or anti-GAPDH (FL-335) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at 1 μ g/ml.

Oleic acid-induced fat-loading in HepG2 cells: Human HepG2 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum under 5% CO₂ at 37°C. At 75% confluence, medium was exchanged for new medium with or without 1 mM oleic acid for 24h (28). Hepatic triglycerides were extracted with a methanol-chloroform mixture and measured using an enzymatic assay (Diagnostic Systems International, Germany). Results were normalized to protein content measured by BCA assay (Pierce, Perbio Science France, Brebières, France).

Statistical analysis: Results are expressed as means $\pm$ SEM. Statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test with the Δ Ct of each

group. Correlations were analyzed using the Pearson's correlation test. Other data were statistically analyzed using the Student's *t* test. *P* < 0.05 was considered as significant.

RESULTS

OPN and CD44 gene expressions in livers from morbidly obese patients.

We studied the OPN and CD44 gene expression in the whole cohort of 52 morbidly obese patients included in the study (Table 1), who were stratified according to the degree of the fat infiltration in liver. We report for the first time that the hepatic OPN and CD44 gene expression was significantly correlated with the grade of hepatic steatosis (from S0 to S3) (Figure 1A). Noteworthy, when compared to control values, OPN and CD44 gene expressions were markedly increased in S3 patients (9.2 $\pm$ 2.6 fold and 3.5 $\pm$ 0.3 fold, respectively, *P*<0.05), while CD44 expression was barely increased in S0 patients (Figure 1A). Furthermore, the hepatic OPN and CD44 gene expression was also significantly correlated with plasma ALAT levels (*r*=0.567, *P*<0.001 and *r*=0.549, *P*<0.001, respectively) and the insulin-resistance as evaluated by the HOMA-IR (*r*=0.474, *P*=0.001 and *r*=0.587, *P*<0.001, respectively)(data not illustrated). Finally, the OPN protein expression was evaluated by Western blot in total liver lysates obtained from 3 morbidly obese patients without steatosis (S0) and 6 with severe steatosis (S3). In accordance with mRNA expression level, the OPN protein level was barely detectable in livers from S0 patients, while strong signals were observed in livers from S3 patients (Figure 1B). Since TNF- α can stimulate the OPN gene expression in hepatocytes (10), we evaluated the TNF- α gene expression of

S3 patients (n=15) compared to S0 patients (n=6) and controls (n=5). Interestingly, the gene expression of TNF- α was 4 fold increased in S3 patients compared to S0 patients (P=0.004)(data not shown). Moreover, the OPN gene expression was positively correlated with the TNF α gene expression (Figure 1C). These findings indicate that TNF- α and OPN expressions were closely related *in vivo*.

Induction of OPN expression in fatty HepG2 cells. Since we show a correlation between OPN expression and steatosis, we wanted to determine if triglyceride accumulation was sufficient to induce OPN expression in cultured HepG2 cells. Triglyceride accumulation in HepG2 cells was induced by incubation with oleic acid for 24h. Interestingly, this was associated with a marked increase in the OPN mRNA expression compared to cells cultured in the control medium (Figure 2).

OPN and CD44 gene expressions in adipose tissue from morbidly obese patients. We next evaluated OPN and CD44 expressions in the adipose tissue that could be obtained in a set of patients without hepatic steatosis and insulin-resistance (S0/IR-, n=9) and in patients with severe hepatic steatosis and insulin resistance (S3/IR+, n=23), compared to adipose tissue obtained in 7 controls subjects. OPN mRNA expression level was significantly increased in the adipose tissue of morbidly obese patients (S0 and S3) compared to lean controls, but different from liver, independently from steatosis and insulin-resistance (Figure 3A). Although comparing mRNA expression from liver, subcutaneous and visceral adipose tissue has to be cautions, OPN mRNA expression was much higher in adipose tissues than in liver but did not significantly differ in both

adipose tissues (VAT versus Liver: 2.96 ± 0.54 , $P < 0.05$, n=16; SCAT versus Liver: 5.02 ± 1.92 , $P < 0.05$, n=16; SCAT versus VAT: 1.66 ± 0.40 , NS, n=16). There was no difference in CD44 mRNA expression levels in subcutaneous adipose tissue between lean controls and morbidly obese patients (S0 as well as S3) (Figure 3A). Noteworthy, the CD44 gene expression was much higher in both adipose tissues than in liver (VAT versus Liver: 2.48 ± 0.37 , $P < 0.05$, n=16; SCAT versus Liver: 3.20 ± 0.55 , $P < 0.05$, n=16).

Since invalidation of OPN prevents macrophages infiltration into mouse adipose tissue (9), we then compared the OPN gene expression in adipose tissue with those of a macrophages marker, CD68, in 39 patients from the cohort with a wide range of OPN expression. As shown in Figure 3B, the OPN mRNA expression level was strongly and significantly correlated with the macrophage infiltration, as evaluated by CD68 expression. In accordance with this result, macrophage infiltration was increased in subcutaneous adipose tissue from obese patients (n=19) versus lean subjects (n=4) (Figure 3C) and was correlated with the OPN gene expression ($r=0.579$, $P=0.009$, n=19)(data not shown).

Effect of weight loss on adipose gene expression. We then determined if weight loss could modify the gene expression of OPN, CD44, TNF α and the macrophage marker CD68 in abdominal subcutaneous adipose tissue. Six patients were re-evaluated 2 years after their bariatric surgery. As expected, these patients had a marked weight loss (-44.3 ± 11.4 kg), leading to a notable improvement of systemic inflammation as evaluated by the circulating levels of CRP and the insulin-resistance as evaluated by the HOMA-IR (Figure 4A).

Interestingly, in their adipose tissue, the expression of both OPN and CD44 was drastically decreased and was associated with an important decrease in the macrophage infiltration, as evaluated by the CD68 gene expression (Figure 4B). Furthermore, the OPN and CD44 mRNA expressions were significantly correlated with CD68 mRNA expression ($r=0.769$, $P=0.003$; $r=0.790$, $P=0.002$; respectively). In addition, while $TNF\alpha$ expression was increased in obese patients compared with the lean patients (2.69 ± 0.26 , $P<0.05$)(data not shown), it was markedly decreased following weight loss (Figure 4B) and was correlated with OPN mRNA expression ($r=0.741$, $P=0.006$)(data not shown). These findings indicate that OPN and CD44 expressions are strongly related to macrophage accumulation in adipose tissue.

Circulating OPN levels in morbidly obese patients. We then measured OPN serum levels in 52 morbidly obese patients without (S0, $n=6$) or with liver steatosis (S1, $n=13$; S2, $n=9$; S3, $n=24$) and control subjects ($n=8$). As shown in Figure 5A, circulating OPN concentrations were modestly but significantly elevated in morbidly obese patients compared to control subjects ($n=8$), in agreement with Gomez-Ambrosi *et al.* (19). However, the circulating OPN levels were not correlated with the grade of liver steatosis ($r=0.129$; $P=0.268$, $n=52$)(data not shown). The relative contribution of liver and adipose tissue in circulating OPN levels is difficult to estimate. To determine whether circulating OPN could be of adipose tissue origin, we determined the OPN levels in the arterialized and adipose tissue venous plasma in five overweight patients. As shown in Figure 5B, while adipose tissue enriched the circulating levels of leptin, no significant difference

between arterialized and venous adipose tissue samples was observed for OPN. We then investigated if weight loss could modify the circulating levels of OPN in 25 patients. In accordance with recent reports (29-31), the circulating OPN level was 1.8 fold increased one year after bariatric surgery in our patients (Figure 5C).

OPN and CD44 expressions in obese mice. To corroborate the human findings and to further explore the potential role of OPN in liver complications of morbid obesity, a series of experiments were performed in various animal models. As expected, mice exposed to HFD exhibited increased weight (45.1 ± 3.2 g vs 28.2 ± 1.6 g in low-fat diet fed controls), increased hepatic triglyceride content (73 ± 14 vs 37 ± 12 μ g/mg of liver), hyperglycaemia (208 ± 90 vs 100 ± 16 mg/dl) and hyperinsulinemia (2.31 ± 0.63 vs 0.95 ± 0.89 μ g/l). HFD-induced obesity resulted in increased OPN and CD44 gene expressions in both fatty liver and epididymal WAT (Figure 6A). Interestingly, the hepatic expressions of OPN and CD44 were also positively correlated with steatosis as evaluated by hepatic triglyceride content (Figure 6B). Similar findings were observed in genetic leptin-deficient (*ob/ob*) mice ($n=5$) since OPN and CD44 gene expressions were found to be significantly enhanced in both liver (3.3 ± 0.3 , $P<0.05$ and 1.6 ± 0.1 -fold $P<0.05$, respectively) and adipose tissue (23.4 ± 2.5 , $P<0.05$ and 5.2 ± 0.8 -fold, $P<0.05$, respectively) compared with lean littermates ($n=5$). In addition, the adipose tissue expressions of OPN and CD44 were correlated with expression of the macrophage marker F4/80 in HFD-induced obese mice ($r=0.820$, $P<0.01$ and $r=0.843$, $P<0.01$, respectively). Furthermore, serum OPN levels were also significantly increased but this

increase was moderate as occurred in liver and adipose tissue (Figure 6C).

We then investigated which liver cell population could be responsible for OPN and CD44 expression. Cells from livers of ob/+ mice were separated into hepatocytes and non-parenchymal fractions. As shown in Figure 6D, real-time PCR analysis revealed that OPN expression was seven times higher in hepatocytes than in the non-parenchymal fraction. In contrast, CD44 was predominantly expressed in the non-parenchymal fraction. In order to secure the quality of the separation procedure, albumin and CD11b expression was used as markers of hepatocyte and inflammatory cells, respectively. Albumin was predominantly expressed in the hepatocyte fraction (45 ± 11 , $P < 0.05$) as well as OPN, while CD11b was predominantly expressed in the non-parenchymal fraction (34 ± 27 , $P < 0.05$) (data not shown) as well as CD44.

DISCUSSION

We report here that the increased expression of OPN in adipose tissue was associated with the accumulation of macrophages in the adipose tissue. We also describe for the first time that, in patients with severe steatosis and insulin-resistance, the hepatic OPN gene expression, as well as the expression of its receptor CD44, were markedly increased and related to the severity of hepatic steatosis. This progressive up-regulation of the hepatic OPN gene was significantly associated with liver injury (as evaluated by plasma ALT levels) and hepatic insulin-resistance (as evaluated by the HOMA-IR). Local concentrations of OPN in liver and adipose tissue do not appear to impact its systemic levels. Indeed, the modest elevation of systemic

OPN in obese patients is not related to liver steatosis or to its marked increase in adipose tissue. Furthermore, weight loss following bariatric surgery was indeed associated with a strong decrease in OPN expression in the adipose tissue, while an opposite increase was observed in its systemic level.

OPN plays an important role in infiltration and accumulation of macrophages in adipose tissue in the early stages of obesity. *In vitro* chemotaxis assays have revealed that OPN amplified macrophage migration (9). In addition, endogenous OPN in macrophage is required to maintain macrophage function including chemotaxis, an effect mediated by the interaction with its receptor CD44 (9; 17; 32; 33). The increase in the production of such a pro-inflammatory adipokine could activate macrophages already present in the stromal vascular fraction of adipose tissue resulting in an increased production of migratory signal including OPN itself. This could contribute to the over-enrichment of adipose tissue in macrophages. However, the recruitment into adipose tissue of macrophages derived from the circulation in the early stage of obesity is a complex mechanism (5). Other chemokines may play an important role, such as Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (produced primarily by adipocytes) with elevated plasma levels in obese patients (34). Indeed, MCP1 exerts additive effects on chemotaxis in the presence of OPN and amplifies macrophage migration to the same extent than OPN (9).

It has been proposed that the accumulation of macrophages in adipose tissue mediated by OPN, *per se*, as well as by MCP1, resulting in an increased macrophage-related inflammatory activity, could be a link between inflammation and

insulin-resistance (9; 35-37). Indeed, the respective invalidation of OPN, MCP1 or its receptor CCR2 prevents the macrophage accumulation in adipose tissue, inflammation and insulin-resistance mediated by HFD induced obesity (9; 35-37). This appealing hypothesis was further supported by our studies confirming a marked increase in OPN as well as CD44 gene expressions in both liver and adipose tissue in two murine models of obesity. Of particular interest, in the HFD model, OPN and CD44 gene expressions were well correlated with the accumulation of macrophages in adipose tissue.

Since there is a direct link between OPN-induced macrophage accumulation and insulin-resistance, the beneficial effect of weight loss or treatment with anti-inflammatory drugs (PPAR agonists) on inflammation and glucose homeostasis should be associated with a decrease in OPN expression. Indeed, we have shown that weight loss following bariatric surgery resulted in a strong reduction in OPN expression in adipose tissue, together with the marked diminution in the accumulation of macrophages also reported in previous studies (38; 39). In these patients, weight loss was also associated with a decreased peripheral inflammation (as evaluated by plasma CRP levels) and an improvement in insulin-sensitivity. On the other hand, PPAR agonists can suppress the OPN expression in macrophages (22) (21) and decrease plasma levels in treated patients (21).

However, the role of circulating OPN in the macrophage infiltration into adipose tissue has not been yet established. We show here that in obese patients and mice OPN expression was modestly elevated in serum but markedly increased in adipose tissue compared with lean

subjects or mice. While weight loss following bariatric surgery resulted in a strong reduction in OPN and CD44 expression and macrophage accumulation in adipose tissue, the circulating levels of OPN were enhanced. In accordance with this result, recent reports have shown that elevated OPN plasma concentration one year after bariatric surgery was correlated with markers of bone turnover but not with insulin-resistance and inflammation (29; 30). In the contrary, diet-induced weight loss could decrease circulating OPN levels (19). Local concentrations of OPN might be different from systemic levels. Furthermore, the tissues or organs contributing to the modestly elevated circulating OPN levels in obese patients were very difficult to estimate. While we show for the first time that systemic OPN levels were not correlated with the grade of liver steatosis and that adipose tissue from overweight patients did not appear to secrete OPN, additional studies are required to know the organ origin of the circulating OPN.

It is currently accepted that insulin-resistance can contribute to the development of hepatic steatosis (35; 36) through the increased release of free fatty acids secondary to un-suppressed lipolysis (6; 8). In addition, the combined elevation of plasma glucose and insulin levels promotes *de novo* lipid synthesis and impairs lipid oxidation within hepatocytes, further promoting the excessive fatty acids accumulation (6-8). The present data clearly show that in obese patients and mice, the expression of OPN in adipose tissue was positively correlated with macrophage markers. In addition, the hepatic OPN and CD44 gene expressions were significantly increased in presence of severe steatosis and this increase was correlated with the

severity of steatosis. In parallel, the hepatic OPN protein itself was strongly elevated in obese patients with severe steatosis. Although direct cause-effect relationships cannot be inferred from our data, modification of all parameters could be linked to the severity of steatosis. While the role of OPN in the development of liver complications has not been fully elucidated, invalidation of the OPN gene reduces the plasma ALAT elevation as well as the hepatic inflammation and fibrosis in mice fed a choline-methionine deficient diet (10).

The cellular origin of the increased hepatic OPN expression has not been yet determined. Although an increased hepatic OPN gene expression has been reported in macrophages, Küpffer cells and stellate cells in response to carbon tetrachloride (40), we show here that hepatocytes versus the non hepatocyte cells are the main source of OPN in normal mouse liver. Most interestingly, our *in vitro* steatosis studies clearly demonstrate that human HepG2 cells cultured in presence of fatty acids rapidly accumulate triglycerides and concomitantly, the OPN gene expression is rapidly induced.

In summary, we have shown that OPN expression was increased in the adipose tissue early in the course of obesity-induced insulin-resistance and before the occurrence of liver steatosis. In morbidly obese patients, OPN could enhance macrophage infiltration and accumulation in the adipose tissue, thus contributing to inflammation and insulin-resistance. In presence of insulin-resistance, the accumulation of triglycerides in liver was then associated with an additional up-regulation of hepatic OPN and CD44 expression, well related to the severity of steatosis. In addition the hepatic gene expressions of OPN and of its receptor,

CD44, were related to the liver injury and hepatic insulin-resistance. Our original findings concerning the effects of triglyceride accumulation on hepatoma cells on OPN expression offer some interesting mechanistic explanations for the role of OPN in the development of NAFLD in humans and rodent models. Studies focusing on the behavior of hepatic OPN and CD44 signaling in the progression from normal liver toward steatosis, steatohepatitis and fibrosis are attractive approaches to acquire more insight into the pathogenesis of human NAFLD.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank B Bailly-Maitre for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France) (ANR-05-PCOD-025-02 and PNRHGE to PG), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (CHU of Nice and Paris (AOR02076), the Comité Doyen Jean Lépine (Nice, France), the French Research Ministry (ACI JC5327, to PG) and charities (ALFEDIAM and AFEF/Schering-Plough to PG and KC). This work is part of the project "Hepatic and adipose tissue and functions in the metabolic syndrome" (HEPADIP, see <http://www.hepadip.org/>), which is supported by the European Commission as an Integrated Project under the 6th Framework Programme (Contract LSHM-CT-2005-018734). AB was successively supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (CHU of Nice) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France). SB was supported by ANR-05-PCOD-025-02. YLMB and PG are the recipients of an Interface Grant from CHU of Nice. SL is the recipient of an Interface Grant from AP-HP.

Figure 1: The hepatic OPN and CD44 expression is significantly correlated with the grade of steatosis in morbidly obese patients. (A) Hepatic OPN and CD44 mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (Controls; n=6), in morbidly obese patients without liver steatosis (S0; n=6) and in morbidly obese patients with S1 (n=13), S2 (n=9) and S3 (n=24) steatosis. The gene expression of OPN and CD44 was normalized to the mRNA levels of RPLP0. Results are expressed relative to the expression level in controls and expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05, compared with controls; #P<0.05, compared with S0; \$P<0.05, compared with S1. **(B)** Total lysates from liver biopsies obtained from 3 morbidly obese patients without steatosis (S0) and 6 with severe steatosis (S3) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-OPN or anti-GAPDH antibodies. Representative immunoblot is shown. **(C)** Correlation between OPN and TNF α mRNA expression levels (Δ Ct) in lean subjects (n=5) and morbidly obese patients without (n=6) or with severe steatosis (n=14) was analyzed using the Pearson's correlation test.

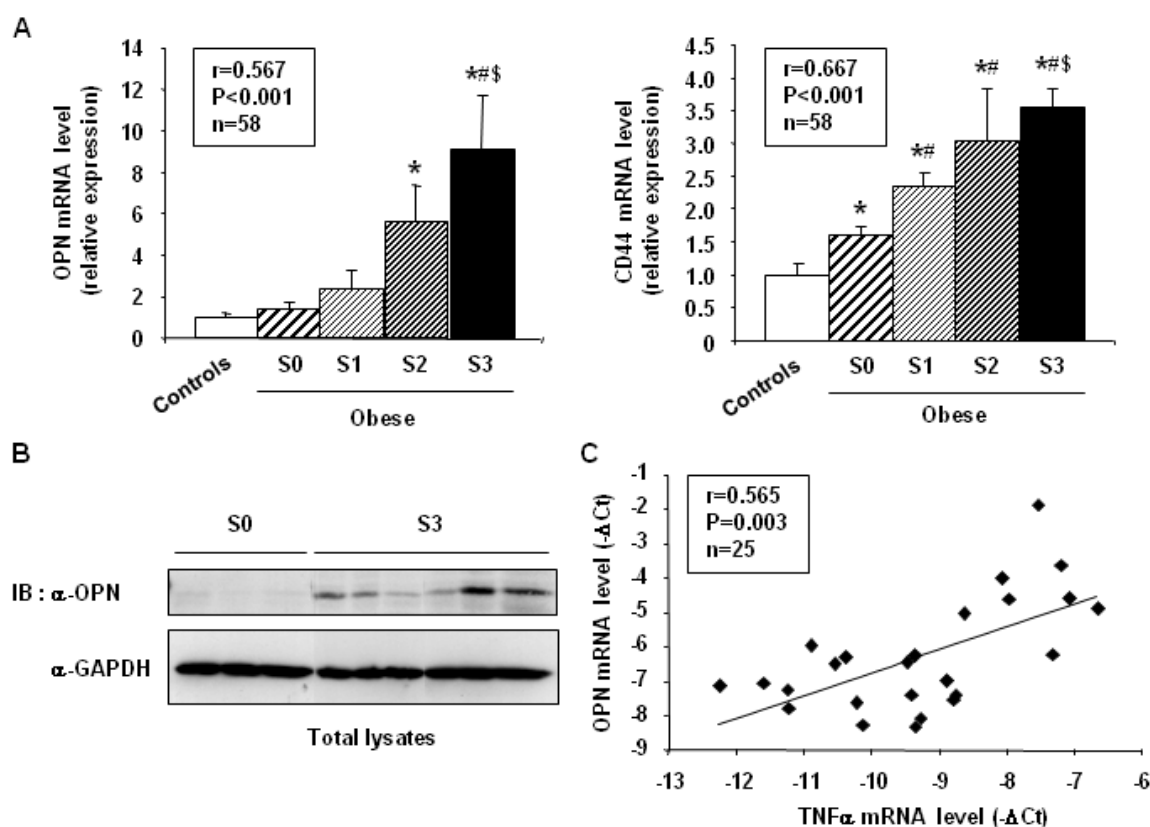


Figure 2: The OPN expression in human HepG2 cells is enhanced following the accumulation of triglycerides. HepG2 cells were incubated without (0) or with 1 mM oleic acid (OA) for 24h. Intracellular TG levels were determined and normalized to cell protein content. OPN mRNA expression was analyzed by real-time quantitative PCR. Data were expressed as means $\pm$ SEM of three independent experiments. *P<0.05.

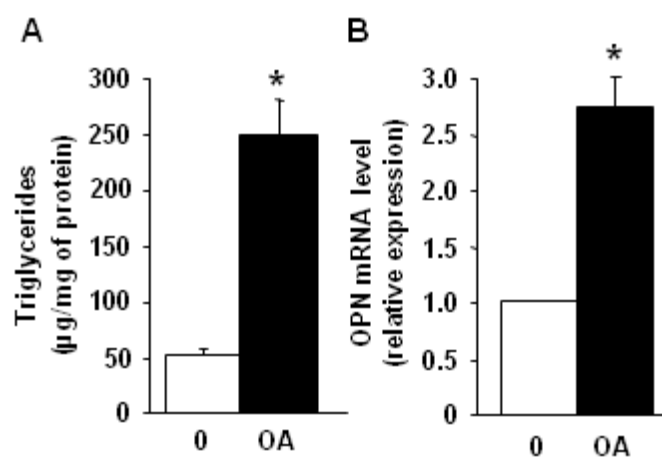


Figure 3: The OPN mRNA expression is increased in subcutaneous adipose tissue of morbidly obese patients and is significantly correlated with macrophage accumulation. (A) OPN and CD44 mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in subcutaneous adipose tissue of lean patients (Controls; n=7), morbidly obese patients without liver steatosis and insulin-resistance (S0/IR-; n=9) and morbidly obese patients with severe steatosis and insulin resistance (S3/IR+, n=23). Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05. **(B)** Correlation between OPN and CD68 mRNA expression levels (Δ Ct) was analyzed using the Pearson's correlation test. **(C)** The percentage of macrophages in subcutaneous adipose tissue has been evaluated in lean subjects (Controls; n=4), S0/IR- obese patients (n=4) and S3/IR+ obese patients (n=11).

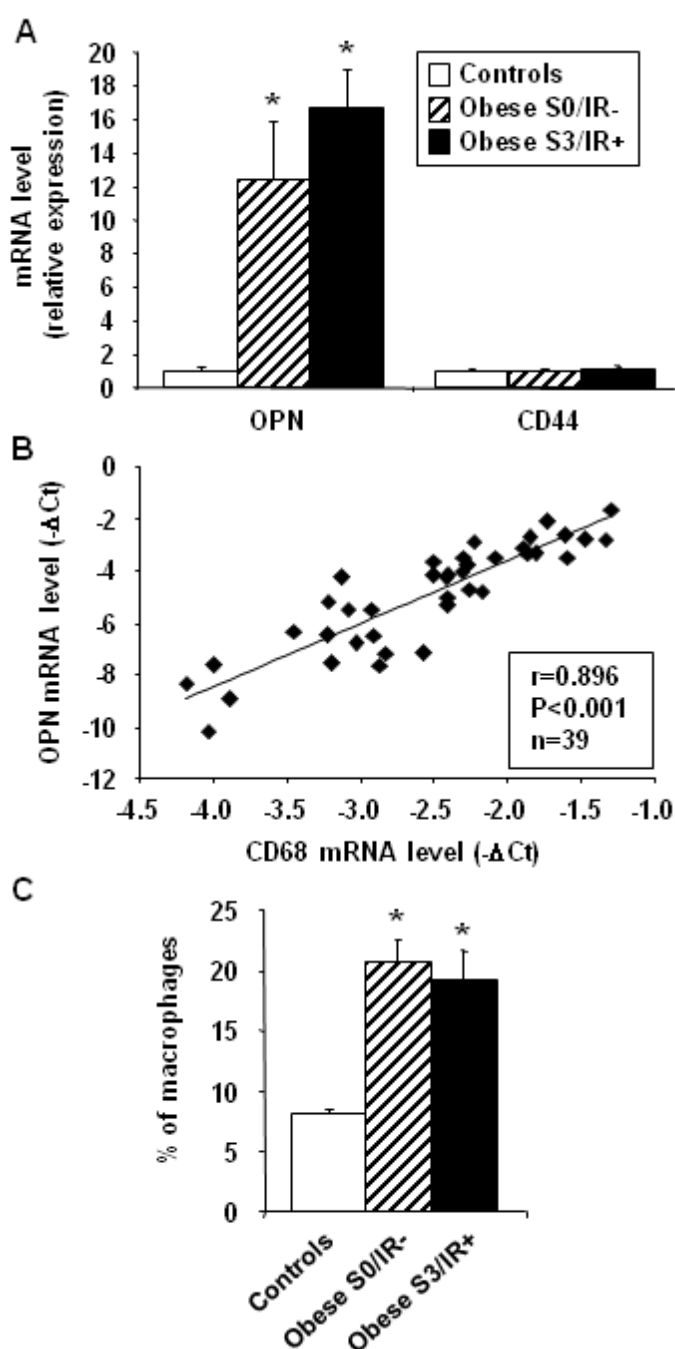


Figure 4: Weight loss is associated with a strong decrease in the gene expression of OPN, CD44, TNF α and the macrophage marker CD68 in subcutaneous adipose tissue. (A) Six patients were studied before and two years after bariatric surgery for BMI, insulin-resistance (as evaluated by the HOMA-IR) and systemic inflammation (as evaluated by the circulating levels of CRP). **(B)** OPN, CD44, CD68 and TNF α mRNA expressions were analyzed by real-time quantitative PCR in subcutaneous adipose tissue obtained from these patients before and after weight loss. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05.

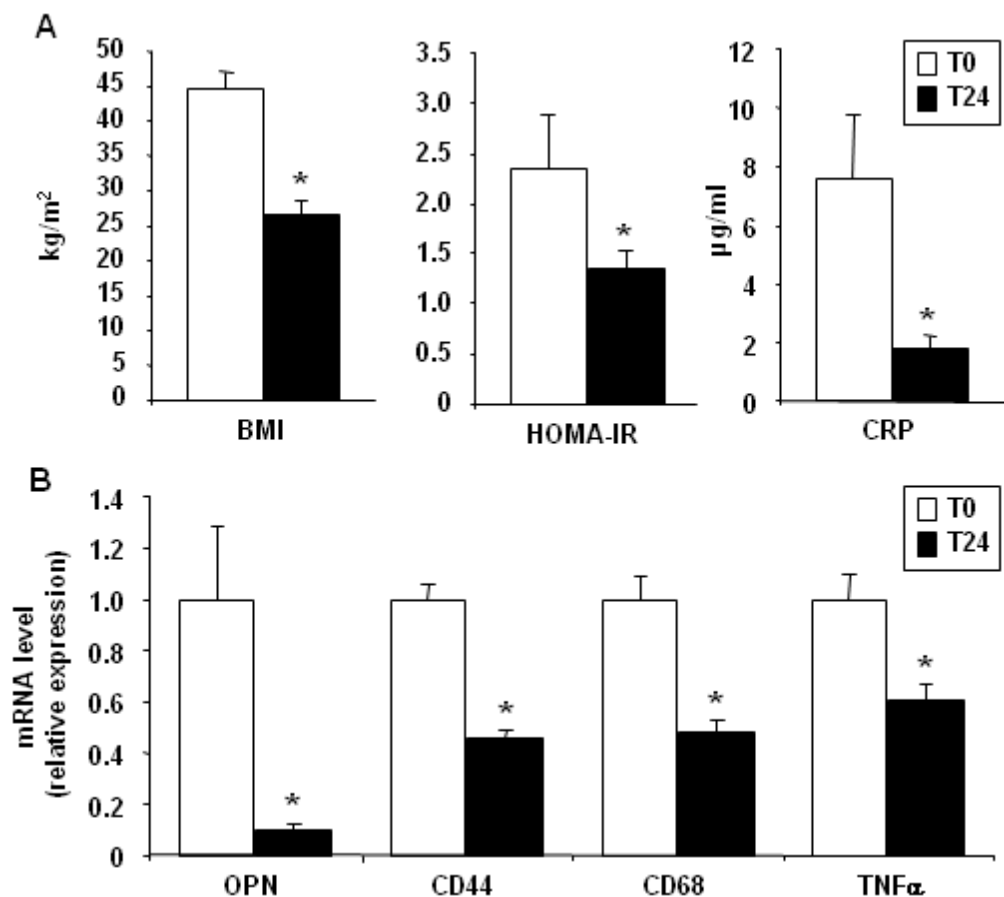


Figure 5: Circulating OPN levels are affected by obesity and weight loss but do not appear to be of adipose tissue origin. OPN levels were evaluated by ELISA **(A)** in serum of lean patients (Controls, n=8), and morbidly obese patients (Obese, n=52); **(B)** in the arterial(ized) and adipose tissue venous plasma in five overweight patients, and **(C)** in serum of 25 morbidly obese patients before and one year after bariatric surgery. Results are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05,

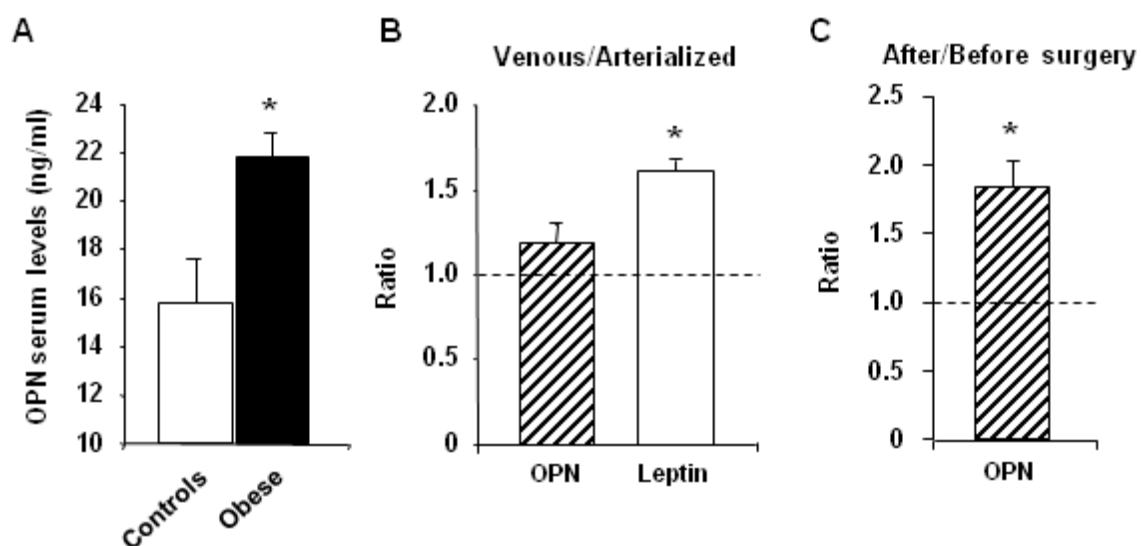


Figure 6: OPN and CD44 mRNA expression is increased in liver and adipose tissue of obese mice. (A) OPN and CD44 mRNA expressions were analyzed by real-time quantitative PCR in liver and epididymal white adipose tissue of mice fed a Normal Diet (ND; n=8) or High Fat Diet (HFD; n=10) for 15 weeks. Data are presented as relative mRNA normalized to 36B4 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. (B) Correlations between the expression levels of OPN or CD44 mRNA ($-\Delta$ Ct) and the hepatic triglyceride content were analyzed using the Person's correlation test. *P<0.05. (C) OPN levels were evaluated by ELISA in serum of HFD-induced obese mice (HFD, n=6) and serum of lean littermates (ND, n=6); (D) Relative expression of OPN and CD44 was analyzed by real-time quantitative PCR in the isolated hepatocytes versus non-parenchymal fraction in the liver of ob/+ mice. Results are expressed as means $\pm$ SEM of three independent experiments. P values were obtained using the nonparametric Kruskal-Wallis test.*P<0.05.

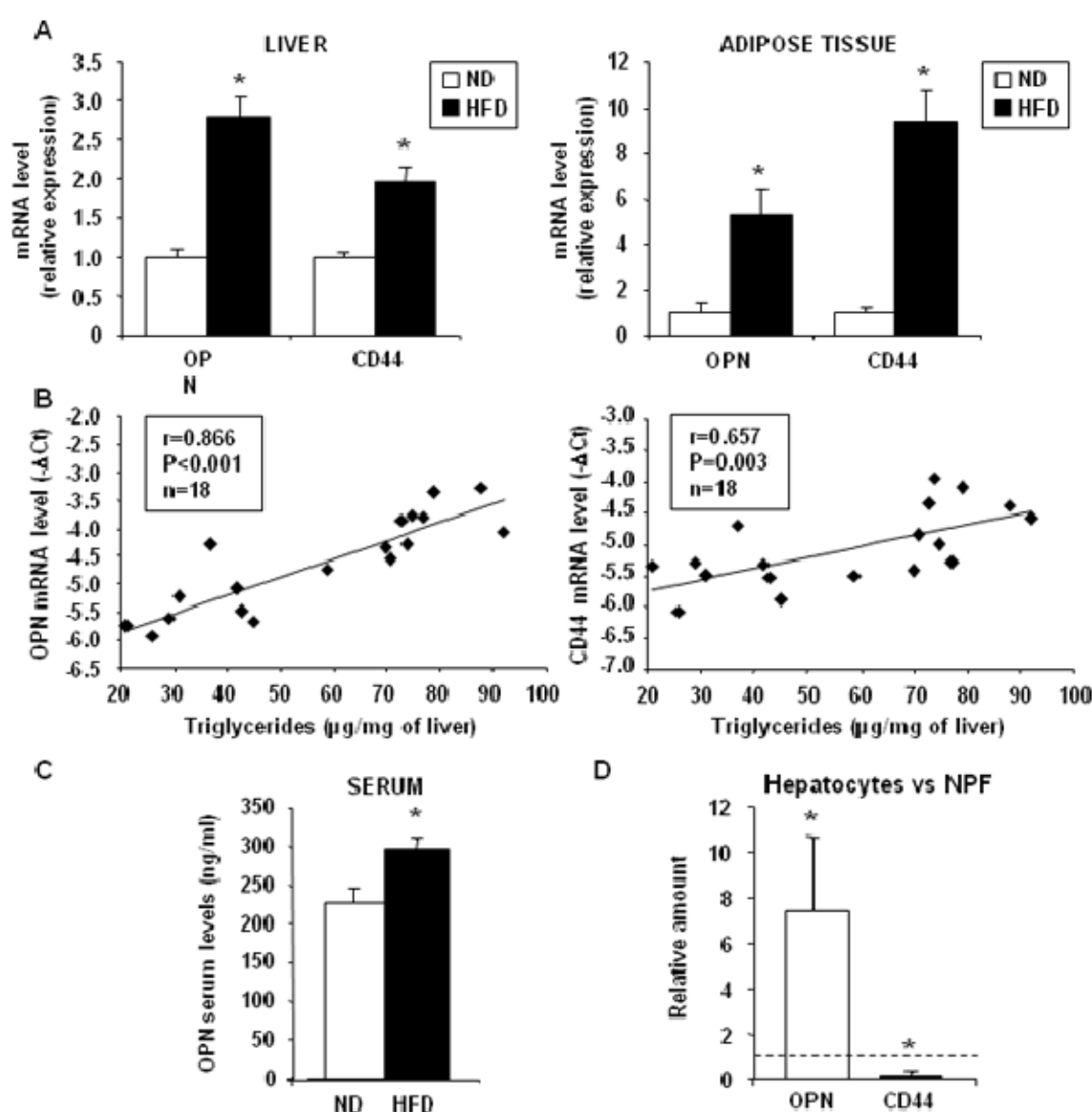


Table 1. Characteristics of the morbidly obese patients according to the grade of hepatic steatosis.

	S0 n=6	S1 n=13	S2 n=9	S3 n=24
Gender (F/M)	5/1	12/1	6/3	16/8
BMI (kg/m²)	42.1 ± 0.6	44.7 ± 1.5	45.0 ± 2.0	43.8 ± 1.1
Age (years)	41.8 ± 4.8	40.4 ± 2.3	43.2 ± 4.4	39.1 ± 1.9
ALAT (IU/L)	19.5 ± 4.4	19.8 ± 2.0	27.6 ± 3.6^{*/#}	57.0 ± 10.9^{*/#/\$}
Blood glucose (mmol/L)	5.1 ± 0.0	5.9 ± 0.9	7.5 ± 1.0^{*/#}	6.6 ± 0.5^{*/#}
Insulin (µmol/L)	8.0 ± 0.9	12.7 ± 3.9	14.4 ± 2.6	20.9 ± 2.7^{*/#}
HOMA-IR	1.8 ± 0.2	3.3 ± 1.2	5.0 ± 1.3[*]	6.1 ± 0.8^{*/#}
HDL cholesterol (mmol/L)	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
LDL cholesterol (mmol/L)	3.2 ± 0.5	3.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2
Triglycerides (mmol/L)	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.4[*]
CRP (mg/L)	8.8 ± 3.2	13.3 ± 1.6	9.1 ± 1.8	8.3 ± 1.1

Data are expressed as mean ± SEM and were compared by using the non parametric Kruskal-Wallis test.

Abbreviations: BMI, body mass index; ALAT, alanine aminotransferase; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; LDL cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; CRP, C-Reactive Protein. * $P < 0.05$ compared with S0 ; # $P < 0.05$ compared with S1 ; \$ $P < 0.05$ compared with S2.

REFERENCES

1. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH: Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 37:1202-1219, 2003
2. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A: Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169-2180, 2007
3. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, Ben Amor I, Staccini-Myx A, Huet PM, Gugenheim J, Sadoul JL, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P: The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 101:1824-1833, 2006
4. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830, 2003
5. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003
6. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343-1351, 2005
7. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N: Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107:450-455, 1999
8. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183-1192, 2001
9. Nomiya T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, Heywood EB, Jones KL, Kawamori R, Cassis LA, Tschop MH, Bruemmer D: Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 117:2877-2888, 2007
10. Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF: Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G264-273, 2004
11. Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF: Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G1035-1043, 2004
12. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H: Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271:509-512, 1996
13. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H: Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287:860-864, 2000
14. Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onoe K, Denhardt D, Rittling S, Uede T: Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21:539-550, 2004

15. Mimura S, Mochida S, Inao M, Matsui A, Nagoshi S, Yoshimoto T, Fujiwara K: Massive liver necrosis after provocation of imbalance between Th1 and Th2 immune reactions in osteopontin transgenic mice. *J Gastroenterol* 39:867-872, 2004
16. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M: Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 152:353-358, 1998
17. Nystrom T, Duner P, Hultgardh-Nilsson A: A constitutive endogenous osteopontin production is important for macrophage function and differentiation. *Exp Cell Res* 313:1149-1160, 2007
18. Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R: Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145:1450-1462, 1994
19. Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Fruhbeck G: Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3719-3727, 2007
20. Kiefer FW, Zeyda M, Todoric J, Huber J, Geyeregger R, Weichhart T, Aszmann O, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Stulnig TM: Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations. *Endocrinology* 149:1350-1357, 2008
21. Nakamachi T, Nomiyama T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Zhao Y, Fuentes L, Takebayashi K, Aso Y, Staels B, Inukai T, Bruemmer D: PPARalpha agonists suppress osteopontin expression in macrophages and decrease plasma levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:1662-1670, 2007
22. Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M: PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res* 90:348-355, 2002
23. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27:1487-1495, 2004
24. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Bar Hen A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K: Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55:1554-1561, 2006
25. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marchand-Brustel Y: Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131:788-796, 2006
26. Frayn KN, Coppack SW: Assessment of white adipose tissue metabolism by measurement of arteriovenous differences. *Methods Mol Biol* 155:269-279, 2001
27. Bertola A, Bonnafeous S, Cormont M, Anty R, Tanti JF, Tran A, Le Marchand-Brustel Y, Gual P: Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway. *J Biol Chem* 282:10325-10332, 2007
28. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Castell JV, O'Connor JE: A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 165:106-116, 2007
29. Riedl M, Vila G, Maier C, Handisurya A, Shakeri-Manesch S, Prager G, Wagner O, Kautzky-Willer A, Ludvik B, Clodi M, Luger A: Plasma osteopontin increases

- after bariatric surgery and correlates with markers of bone turnover but not with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2307-2312, 2008
30. Schaller G, Aso Y, Schernthaner GH, Kopp HP, Inukai T, Kriwanek S, Schernthaner G: Increase of Osteopontin Plasma Concentrations After Bariatric Surgery Independent from Inflammation and Insulin Resistance. *Obes Surg*, 2008
 31. Wucher H, Ciangura C, Poitou C, Czernichow S: Effects of weight loss on bone status after bariatric surgery: association between adipokines and bone markers. *Obes Surg* 18:58-65, 2008
 32. Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, Arora P, Glogauer M, McCulloch CA, Sodek J: Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol* 184:118-130, 2000
 33. Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, Rittling SR, Denhardt DT, McCulloch CA, Sodek J: Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *J Cell Physiol* 198:155-167, 2004
 34. Sartipy P, Loskutoff DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7265-7270, 2003
 35. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494-1505, 2006
 36. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116:115-124, 2006
 37. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T: Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281:26602-26614, 2006
 38. Cencello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K: Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277-2286, 2005
 39. Clement K, Langin D: Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *J Intern Med* 262:422-430, 2007
 40. Kawashima R, Mochida S, Matsui A, YouLuTu ZY, Ishikawa K, Toshima K, Yamanobe F, Inao M, Ikeda H, Ohno A, Nagoshi S, Uede T, Fujiwara K: Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 256:527-531, 1999



GROWTH ARREST-SPECIFIC PROTEIN 6 DEFICIENCY IMPAIRS LIVER TISSUE REPAIR AFTER ACUTE TOXIC HEPATITIS IN MICE

Journal:	<i>Journal of Hepatology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lafdil, Fouad; INSERM, U841 equipe 14; Université Paris 12 Val de Marne Chobert, Marie-noele; INSERM, U841 equipe 14 Deveaux, Vanessa; INSERM, U841 equipe 14 Zafrani, Elie-Serge; AP-HP, Groupe hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, Département de Pathologie; INSERM, U841 equipe 14 Mavier, Philippe; INSERM, U841 equipe 14; Université Paris 12 Val de Marne Nakano, Toru; Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co, Ltd Laperche, Yannick; INSERM, U841 equipe 14; Université Paris 12 Val de Marne Brouillet, Arthur; INSERM, U841 equipe 14; Université Paris 12 Val de Marne
Key Words:	Liver repair, Inflammation, Growth arrest-specific protein 6, Kupffer cells, Hepatic stellate cells
Abstract:	Background & Aims : Resident macrophages and myofibroblasts derived from hepatic stellate cells play a key role in liver wound healing. We previously reported that these sinusoidal cells secrete the growth arrest-specific protein 6 (Gas6) and express Axl, one of its receptors. We address now the role of Gas6 in healing process during acute liver injury. Methods : Toxic hepatitis was induced by a single carbon tetrachloride injection in Gas6-deficient (Gas6 ^{-/-}) mice and liver recovery was compared with wild type animals. Results : Gas6 deficiency did not cause any change in CCl ₄ -induced liver damage. At 72 hour, an efficient tissue repair was observed in wild type animals whereas in Gas6 ^{-/-} mice, we noticed a defective wound healing accounted by reduced Kupffer cell activation revealed by a decrease in the induction of CD14, TNF- α , IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. We also report a direct chemotactic effect of Gas6 on circulating monocytes which might explain defective macrophage infiltration in liver necrotic areas of Gas6 ^{-/-} mice. Conclusions : Gas6 controls the activation of resident Kupffer cells which triggers hepatocyte proliferation, recruitment of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	circulating monocytes and accumulation of myofibroblasts in healing areas, which are essential for an efficient liver repair.



For Review Only

GROWTH ARREST-SPECIFIC PROTEIN 6 DEFICIENCY IMPAIRS LIVER
TISSUE REPAIR AFTER ACUTE TOXIC HEPATITIS IN MICE

Fouad LAFDIL^{1,2}, Marie-Noële CHOBERT¹, Vanessa DEVEAUX¹, Elie-Serge ZAFRANI^{1,2,3},
Philippe MAVIER^{1,2}, Toru NAKANO⁴, Yannick LAPERCHE^{1,2} and Arthur BROUILLET^{1,2}.

¹ INSERM, U841-Equipe 14, Créteil, F-94010

² Université Paris 12 Val-de-Marne, Créteil, F-94010

³ AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Département de Pathologie, Créteil, F-94010

⁴ Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co, Ltd., Osaka, Japan

Short title : Gas6 deficiency impairs hepatic wound healing

Corresponding author: Yannick LAPERCHE, INSERM, U841-Equipe 14, Institut Mondor de
Recherche Biomédicale, Créteil, F-94010

Tel : +33 (0)1 49 81 35 44

e-mail : yannick.laperche@inserm.fr

Electronic Word Count : 3430

6 Figures and 1 Table

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Background & Aims : Resident macrophages and myofibroblasts derived from hepatic stellate cells play a key role in liver wound healing. We previously reported that these sinusoidal cells secrete the growth arrest-specific protein 6 (Gas6) and express Axl, one of its receptors. We address now the role of Gas6 in healing process during acute liver injury. **Methods :** Toxic hepatitis was induced by a single carbon tetrachloride injection in Gas6-deficient (Gas6^{-/-}) mice and liver recovery was compared with wild type animals. **Results :** Gas6 deficiency did not cause any change in CCl₄-induced liver damage. At 72 hour, an efficient tissue repair was observed in wild type animals whereas in Gas6^{-/-} mice, we noticed a defective wound healing accounted by reduced Kupffer cell activation revealed by a decrease in the induction of CD14, TNF- α , IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. We also report a direct chemotactic effect of Gas6 on circulating monocytes which might explain defective macrophage infiltration in liver necrotic areas of Gas6^{-/-} mice. **Conclusions :** Gas6 controls the activation of resident Kupffer cells which triggers hepatocyte proliferation, recruitment of circulating monocytes and accumulation of myofibroblasts in healing areas, which are essential for an efficient liver repair.

Electronic Word Count : 196

Keywords: Liver repair, Inflammation, Growth arrest-specific protein 6, Kupffer cells, Hepatic stellate cells.

Introduction

In response to acute injury, liver elicits a wound healing process characterized by proliferation of unaltered hepatocytes, clearance of cell debris and matrix remodeling leading to recovery of a normal hepatic structure. In various forms of hepatitis, Kupffer cells, the liver resident macrophages, are involved at one and the same time in hepatocyte death and initiation of wound healing (1). In addition to their phagocytic properties, Kupffer cells respond immediately to the injury by releasing proinflammatory mediators such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) that trigger hepatocyte proliferation (2) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) which drives monocyte/macrophage recruitment to the lesion (3). Evidence for a key role of liver macrophages in hepatic injury and repair has been provided by alteration in hepatic cytokine expression and delayed liver regeneration in animals depleted in Kupffer cells (4, 5). Resident and recruited monocytes/macrophages are also involved in activation of hepatic stellate cells (HSC) into myofibroblasts (HSC/MFB) (6, 7), which secrete proteases and matrix proteins necessary to tissue remodeling. The central role of HSC/MFB in liver repair was clearly shown in mice where reduced HSC-myofibroblastic transformation was associated with a defective liver regeneration (8, 9).

The protein product of the growth arrest-specific gene 6 (Gas6) and its tyrosine kinase receptors (Axl, Sky and Mer) have been implicated in growth and survival processes during development and tissue repair. Gas6/Axl signaling induces accumulation of mesangial cells in kidney fibrosis (10) and vascular smooth muscle cells in response to vascular injury (11) as well as proliferation of cardiac fibroblasts (12). Gas6 is known as a chemo-attractant protein for vascular smooth muscle cells (13), interfering with cell adhesion and stabilizing platelet aggregation (14). A recent study also demonstrates that Gas6 plays a pivotal role in leukocyte infiltration into inflamed tissue (15). In normal liver, we previously demonstrated that Gas6 is expressed by resident macrophages and, after hepatic injury, in HSC along with their transformation into HSC/MFB (16). In addition, we showed that Axl, the receptor with the highest affinity for Gas6, is expressed in liver macrophages and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

HSC/MFB and that Gas6 protects HSC/MFB from apoptosis *in vitro*. These results suggest that Gas6/Axl signaling might be involved in the wound healing response to liver injury.

In order to directly address the role of Gas6 produced by macrophages and HSC/MFB in liver repair, we studied the healing process in Gas6-deficient (Gas6^{-/-}) mice after a single carbon tetrachloride (CCl₄)-injection, a well-known model of acute hepatitis (8). We report an impairment of liver repair in Gas6-deficient mice, which was associated with delayed hepatocyte proliferation and reduced macrophage infiltration and HSC myofibroblastic transformation in necrotic areas. These effects are related to a default in Kupffer cell activation leading to a decrease in cytokine/chemokine synthesis in response to the injury. All these data demonstrate that Gas6 plays an important role in Kupffer cell activation and liver repair.

Materials and Methods

Animal model of liver injury : Studies were performed on 8 to 12 weeks of age male Gas6^{-/-} mice bred for 18 generations in the C57BL/6 genetic background (17) and wild type (WT) C57BL/6 mice (Janvier Animal Center, France). Mice treated with a single intraperitoneal injection of CCl₄ (4 ml/kg body weight) diluted in olive oil (1/1) and control mice injected with vehicle only, were killed at different time points (from 8 hours to 7 days) after the injection (4 to 8 animals per group). Livers were collected and treated as previously described (18). Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were measured using an Advia 1650 automate (Bayer Diasys). All animal manipulations were performed according to the recommendations of the French ethical committee and under the supervision of authorized investigators.

Histological and immunohistochemical analysis : Liver injury was assessed on 4 µm-thick paraffin-embedded liver sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). Necrosis was graded on a 4-point scale (0, 1, 2 and 3) in 20 random fields at 100X magnification : absence of necrotic area corresponded to index 0 and index 3 corresponded to the maximal value for necrosis observed in a field (up to 50% of the field area). Immunohistochemistry was carried out on paraffin-embedded or 5 µm-thick frozen sections as previously described (18). Primary antibodies were mouse monoclonal anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Santa Cruz), mouse monoclonal anti-α-smooth muscle actin (α-SMA) (Sigma), rat monoclonal directed against mouse F4/80 and CD68 (Serotec). For immunodetection with mouse monoclonal primary antibodies (PCNA, α-SMA), mouse IgG proteins were blocked using the MOM kit (Vector) and endogenous peroxidase activity by 3 % H₂O₂ in 1.5% horse serum in PBS; sections were revealed by the Vectastain system (Vector) using DAB (Pierce) as peroxidase substrate (18). For F4/80 staining, sections were revealed by the streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (GE Healthcare) and the FastRed

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

substrate system (Dako). Fluorescent labeling of CD68 was achieved using secondary FITC coupled anti-rat IgG STAR 80F (Serotec).

Western blot analysis : Fifty μ g of protein from snap frozen liver were used for western blotting as previously described (16) using anti-PCNA antibody and anti- β -actin clone AC15 monoclonal antibody (Sigma) to correct for unequal loadings.

RNA analysis : Total RNA (2 μ g) isolated from liver using the RNeasy mini kit (Qiagen) were reverse-transcribed from random hexamers using a first-stand synthesis kit (Fermentas, Life Sciences) and specific cDNA amplifications were performed as previously described (18) using primers listed in Table 1. Ratio of target mRNA relative to ribosomal 18S RNA was expressed as fold induction over values obtained from WT animals injected with vehicle.

Cell migration assays : Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) density gradient. Monocytes were purified from PBMC by an adhesion step (3). Purity, estimated by May Grünwald Giemsa staining of cytopspined cells, ranged from 80 to 90%. Migration assays were performed in Falcon inserts (3 μ m-pore diameter, BD Biosciences). Purified monocytes (5×10^5 cells) were transferred into the upper chamber in Ham's F12-medium and mouse recombinant Gas6 (1 μ g/ml) or human recombinant MCP-1 (20 ng/ml) (R&D systems) diluted in 10 μ g/ml BSA was added in the lower chamber. The same concentration of BSA was added in the upper chamber. After 20 hours of incubation at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, migrated monocytes were counted in the lower compartment. Chemotaxis toward Ham's F12 medium containing BSA only was considered as non specific effect.

Statistical analysis : All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis were performed using the non-parametric Mann-Whitney U-test for significance using PRISM (GraphPad). A *P*-value of less than or equal to 0.05 indicated a significant difference between groups.

Results

Liver healing is delayed in Gas6-deficient mice.

CCl₄ treatment induced hepatocellular necrosis revealed by an increase of serum ALT/AST activities, which reached their maximal values between 24 and 48 hours in WT and Gas6^{-/-} mice, and decreased thereafter to normal values at 96 hour (Figure 1A, B). Serum transaminase activities in both groups were not significantly different at each time point, indicating that Gas6 deficiency did not modify the extent of CCl₄-induced liver necrosis.

Analysis of liver sections from CCl₄-treated mice revealed a maximal centrilobular necrosis at 48 hour which represented up to 50% of the surface of the sections in WT and Gas6^{-/-} mice (Figure 2A). At 72 hour, necrotic areas were reduced by half in CCl₄-treated WT mice but remained unchanged in Gas6^{-/-} mice. (Figure 2A, B). A tissue repair was detected only one day later in deficient mice, at 96 hour, and was limited as compared to WT animals. Seven days after CCl₄ injection, the liver recovered a normal structure in both groups (data not shown). The significant delay in liver repair observed in deficient mice, reveals that Gas6 is involved in liver wound healing after an acute toxic hepatitis.

Gas6 deficiency delays hepatocyte proliferation in response to CCl₄-induced injury.

In WT mice, CCl₄ injury induced a significant increase in liver PCNA amount detected by western blotting 48 hours and 72 hours after injection (Figure 3A, B), in accordance with previous reports (19). Immunohistochemical detection of PCNA (Figure 3C) revealed hepatocytes with stained nuclei outside necrotic areas 48 and 72 hours after CCl₄ injury in agreement with western blot analysis. In Gas6^{-/-} mice, both induction in liver PCNA level and PCNA labeling of hepatocyte nuclei were only detected at 72 hour (Figure 3). Therefore defective wound healing in Gas6^{-/-} mice was associated with one-day delay in the hepatocyte proliferative response to acute liver injury.

Gas6 deficiency reduces Kupffer cell activation and cytokine synthesis in CCl₄-induced hepatitis.

We assessed hepatic expression of TNF- α and IL-6, two major cytokines which prime the proliferation of quiescent hepatocytes (2). In WT mice, TNF- α and IL-6 mRNA gradually increased from 16 to 48 hour after CCl₄ injection (up to 16 fold induction over basal level) and decreased thereafter (Figure 4A, B). This increase in cytokines synthesis precedes the hepatocyte proliferative response, as expected. By contrast in Gas6-deficient mice, TNF- α mRNA induction was delayed, starting from 24 hour to reach its maximal value at 72 hour and IL-6 mRNA induction was largely blunted following CCl₄ exposure. The lower level of these two cytokines in Gas6-deficient mice might explain the delayed hepatocyte proliferation in those animals (Figure 3).

As Kupffer cells are the primary source of TNF- α and IL-6, attenuated hepatic expression of these cytokines could reflect lower Kupffer cell activation. We explore this hypothesis by analyzing expression of CD14, a lipopolysaccharide co-receptor (20), which is up-regulated during the activation of Kupffer cell in response to CCl₄-induced injury (21). We observed a strong induction in hepatic CD14 mRNA level 16 hours after CCl₄ exposure in WT mice which decreased thereafter (Figure 4C). Such an induction was largely reduced in Gas6^{-/-} mice. We also analyzed the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Figure 4D), an essential chemokine secreted by activated Kupffer cells (22). In WT mice, hepatic MCP-1 mRNA level gradually increased from 16 hour, reached its maximal value (120 times over the basal level) 48 hours after CCl₄ injection and decreased thereafter. In Gas6-deficient mice, MCP-1 mRNA induction was delayed and strongly blunted since its maximal value at 48 hour represented only 30% of the level in treated-WT animals. Reduced hepatic expression of CD-14, MCP-1, TNF α , and IL6 is consistent with defective Kupffer cell activation which could explain delayed liver repair in Gas6^{-/-} mice.

Monocyte/macrophage infiltration in liver necrotic areas is reduced in Gas6^{-/-} mice.

To explore the consequence of reduced Kupffer cell activation and MCP-1 expression in CCl₄-treated Gas6^{-/-} mice, liver sections were first examined for the presence of monocytes/macrophages by F4/80 immunostaining (23). Forty-eight hours after injury, F4/80 staining revealed uniformly dispersed macrophages in the unaltered parts of the lobule as well as in necrotic areas in WT and Gas6-deficient mice (Figure 5A), a distribution which was not different from Kupffer cell labeling in control mice (data not shown). At 72 hour, the massive accumulation of F4/80-positive cells detected in the centrilobular areas in WT mice was strongly decreased in Gas6^{-/-} mice. This marked reduction of monocyte/macrophage infiltration in deficient mice was confirmed by the CD68 labeling, another classical macrophage-specific marker (Figure 5B) and was corroborated by real time RT-PCR analysis indicating reduced CD68 mRNA levels in liver of Gas6^{-/-} mice (Figure 5C). It is noteworthy that the early induction of CD14 mRNA levels, peaking at 16 and 24 hours in CCl₄-treated mice (Figure 4C), preceded accumulation of macrophages in injured liver confirming thus that the precocious induction of liver CD14 synthesis reflected an activation of resident macrophages, largely prevented in deficient mice.

Gas6/Axl signaling was reported to induce chemotaxis of rat vascular smooth muscle cells (13). Since blood monocytes express the Gas6-receptors Axl and Mer (24), we investigated whether Gas6 signaling could promote blood monocyte recruitment by a direct chemotactic effect. Migration assays conducted in Boyden's chambers showed that recombinant Gas6 induced migration of purified human peripheral blood monocytes, which represented 70 % of the migration obtained with recombinant MCP-1 (Figure 5D), the most powerful and specific chemotactic factor for monocytes/macrophages. Therefore, absence of Gas6 associated to reduced MCP-1 expression might explain defective macrophage infiltration and delayed wound healing in CCl₄-treated Gas6^{-/-} mice.

Gas6 deficiency reduces myofibroblastic activation of HSC in CCl₄-induced hepatitis.

Resident and recruited macrophages are the main sources of TGF- β , an activator of quiescent HSC into myofibroblasts (HSC/MFB) (6). The proliferative α -SMA positive HSC/MFB transiently

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

accumulate in healing areas and secrete cytokines, proteases and matrix proteins mandatory to recover of a normal liver architecture (25). Real time PCR analysis revealed an increase of hepatic TGF- β mRNA expression 24 hour after CCl₄ injection in WT mice (Figure 6A), peaking to 4-fold the basal level at 72 hour and decreasing thereafter. This synthesis was not observed in Gas6^{-/-} mice up to 72 hour and, at 96 hour, the amount of TGF- β mRNA was greater than that observed in WT mice, in agreement with the delayed repair in deficient mice. Real time PCR analysis revealed a 9-fold up-regulation of α -SMA mRNA 24 hours after CCl₄ exposure in WT mice (Figure 6B), peaking to 100-fold at 48 hour and decreasing thereafter. In Gas6^{-/-} mice, no change in α -SMA mRNA level was observed at 24 hour and the induction over basal level at 48 hour was strongly reduced as compared to WT animals. Immunohistochemical staining of α -SMA in liver sections from CCl₄-treated mice (Figure 6C) did not reveal activated HSC/MFB in WT and Gas6^{-/-} mice 48 hours after CCl₄ treatment. At 72 hour, a strong α -SMA staining was detected in healing areas of WT animals which decreased at 92 hour, in accordance with previous studies (8), whereas a faint α -SMA labeling was observed in necrotic areas of deficient mice. Desmin labeling, a hallmark of quiescent and activated HSC, showed an accumulation of positive cells in liver centrilobular areas that did not differ between WT and Gas6^{-/-} mice 72 hours after CCl₄ injection (Figure 6D).

We conclude that the lower number of α -SMA-positive HSC/MFB in Gas6^{-/-} mice cannot be explained by a reduced number of desmin-positive HSC but is rather due to a decreased myofibroblastic transformation of these cells. Defective myofibroblastic activation of HSC can be accounted by inhibition of TGF- β synthesis related to impaired activation of resident macrophages and subsequent defect in monocyte recruitment in Gas6^{-/-} mice.

Discussion

Wound healing is an intricately regulated sequence of cellular and molecular events. In the liver, a central component in this complex response is the activation of Kupffer cells. Unlike monocyte, Kupffer cells have low baseline expression of CD14, which is up-regulated during their activation by multiple stimuli (20), including CCl₄ (21). These resident macrophages respond immediately to the injury by releasing mediators which orchestrate the inflammatory response and the activation of HSC leading to the reparative process (1). In a previous study, we reported expression of Gas6 and its receptor Axl in Kupffer cells and HSC in their myofibroblastic phenotype (16). To investigate the functional importance of Gas6 in liver regeneration after toxic hepatitis, we induced acute injury in Gas6-deficient mice by a single CCl₄ injection and we analyzed the impact of this deficiency on liver necrosis and healing.

As previously observed (26-28), CCl₄ induced a centrilobular necrosis which was maximal at 48 hour and an efficient tissue repair observed at 72 hour in WT mice. Activation of Kupffer cells was revealed by a rapid and marked up-regulation of hepatic CD14 expression starting 16 hours after CCl₄ injection and a strong induction in synthesis of IL-6, TNF- α and MCP-1 cytokines released from activated Kupffer cells. Activation of resident Kupffer cells in response to CCl₄ injury appears as a primary event in liver repair that triggers hepatocyte proliferation at 48 hour, as well as recruitment of circulating monocytes and activation of HSC into myofibroblasts in necrotic areas 72 hours after injection.

Gas6 deficiency did not cause any significant change in CCl₄-induced liver damage, as shown by similar serum ALT and AST activities and similar extent of centrilobular necrotic areas in liver of both WT and deficient mice 2 days after the injury. However, repair of liver necrotic areas was clearly delayed in Gas6-deficient animals as compared to WT mice. Inhibition of CCl₄-induced CD14 synthesis in Gas6^{-/-} mice demonstrated a reduced activation of Kupffer cells that was associated with a decrease in liver TNF- α , IL-6, MCP-1 and TGF- β synthesis. This defective Kupffer cell activation can account for the inhibition of hepatocyte proliferation. Decreased

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

macrophage infiltration observed in Gas6-deficient mice at 72 hour can be explained by inhibition of MCP-1 synthesis as well as by the absence of Gas6 chemotatic effect on Axl-positive circulating monocytes. Moreover, a recent report demonstrated that Gas6 is involved in leukocyte extravasation (15), notably by up-regulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Accordingly, we observed an induction of VCAM-1 expression in CCl₄-treated WT mice, which was largely prevented in Gas6^{-/-} mice (data not shown). Finally, defective Kupffer cell activation and monocyte recruitment in deficient mice, through inhibition of TGF- β synthesis, is responsible for impairment of HSC myofibroblastic transformation and, consequently, for defective wound healing process. Mechanism by which Gas6 controls activation of Kupffer cells remains unclear. It could act through activation of NF- κ B (16), a transcriptional factor that controls positively TNF- α , IL-6, MCP-1 and VCAM-1 synthesis (29-31). Interestingly, a recent study demonstrates that NF- κ B inactivation in liver macrophages suppress the production of TNF α and IL6 in CCl₄-treated mice (32). Nevertheless we failed to induce synthesis of these cytokines/chemokines in RAW 246.7 macrophage cell line treated with recombinant Gas6 (unpublished data). Gas6 is also known as a protein that bridges phosphatidylserine on apoptotic cells to receptor tyrosine kinase Axl/Mer/Sky at the surface of macrophage and mediates clearance of apoptotic cells (33). In liver, engulfment of apoptotic bodies by Kupffer cells was shown to initiate a signaling cascade which promotes TNF- α synthesis (34). One can propose that Gas6 secreted by Kupffer cells, by mediating phagocytosis, contributes to their activation and inflammatory cytokines release and initiates the wound healing response. Moreover, it has been reported that defective clearance of apoptotic cells by HSC inhibits their myofibroblastic transformation (35), a mechanism that could also contribute to the impaired activation of HSC in Gas6^{-/-} mice.

In addition to its role as an activator of resident macrophages, and in the subsequent release of inflammatory cytokines, our results show that Gas6 exerts a late down-regulation of the inflammatory response. In CCl₄-treated mice, TNF- α , IL-6 and MCP-1 expression was decreased at 72 hour in WT mice in spite of a marked accumulation of monocytes/macrophages in healing areas,

whereas at the same time, Gas6-deficient mice display their highest level of liver TNF- α mRNA. These observations support the setting of a feedback negative control of TNF- α synthesis mediated by Gas6 signaling that tampers the inflammatory response during the late phase of tissue repair. Interestingly, Gas6 is an inducer of Twist, a transcription factor which limits TNF- α (36) and inhibits glycogen synthase kinase 3 activity (37), an activator of NF- κ B-dependent synthesis of pro-inflammatory cytokines (38). These data are in line with other studies reporting inhibition of TNF α and IL6 pro-inflammatory cytokines by Gas6/Axl signaling (39-41) and by hypersensitivity of triple mutant mice lacking Axl, Tyro-3 and Mer Gas6 receptors (TAM receptors) to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock and their susceptibility to auto-immune diseases attributed to hyperactivation of macrophages (42).

Therefore Gas6/Axl signaling exerts a dual effect on the inflammatory response, namely an activation of resident liver macrophages and a late inhibition of TNF- α synthesis in injured liver. Such an opposite effect could seem contradictory but has been described for most cytokines, including TNF- α , during the time-course of repair process (43). It underscores the complexity of inflammation control and is consistent with versatility of liver macrophages that can display sequentially pro and anti-inflammatory properties (44).

In conclusion, this study provides novel insights in the role of Gas6 as an important mediator of the inflammatory response and liver repair: first, Gas6 mediates Kupffer cell activation and subsequent cytokine release which triggers proliferation of quiescent hepatocytes, monocyte recruitment and myofibroblastic transformation of HSC. In parallel, Gas6 primes a negative control that will limit TNF- α synthesis when macrophage accumulation in healing area is maximal. Further studies will be required to precise whether Gas6, by these chronologically separated and opposite effects, is a part of the switch that drives macrophages from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory phenotype. Therefore Gas6, by initiating and damping the innate immune response, is involved in the fine tuning of liver inflammation required for normal wound healing.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

The authors thank B. Chazaud and F. Poron for fruitful discussion and M. Bouaziz for mouse breeding and nursing. This work was supported by INSERM, University Paris 12 and ANR (Agence Nationale pour la Recherche).

For Review Only

References

1. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006 Dec;26(10):1175-1186.
2. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 Oct;5(10):836-847.
3. Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S. Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 1999 Aug 1;94(3):875-883.
4. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, et al. Attenuation of CCl(4)-induced hepatic fibrosis by GdCl(3) treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Jul;281(1):G200-207.
5. Sturm E, Havinga R, Baller JF, Wolters H, van Rooijen N, Kamps JA, et al. Kupffer cell depletion with liposomal clodronate prevents suppression of Ntcp expression in endotoxin-treated rats. *J Hepatol* 2005 Jan;42(1):102-109.
6. Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005 Jan;128(1):138-146.
7. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005 Jan;115(1):56-65.
8. Kalinichenko VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, Gusarova GA, Kim W, Shin B, et al. Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury. *Hepatology* 2003 Jan;37(1):107-117.
9. Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75^{NTR}. *Science* 2007;315:1853-1856.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

10. Yanagita M, Arai H, Ishii K, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, et al. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001;158(4):1423-1432.

11. Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, et al. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res* 1998 Oct 5;83(7):697-704.

12. Stenhoff J, Dahlback B, Hafizi S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Jul 2;319(3):871-878.

13. Fridell YW, Villa J, Jr., Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998 Mar 20;273(12):7123-7126.

14. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med* 2001;7(2):215-221.

15. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood* 2008 Apr 15;111(8):4096-4105.

16. Lafdil F, Chobert MN, Couchie D, Brouillet A, Zafrani ES, Mavier P, et al. Induction of Gas6 protein in CCL4-induced rat liver injury and anti-apoptotic effect on hepatic stellate cells. *Hepatology* 2006;44:228-239.

17. Yanagita M, Ishimoto Y, Arai H, Nagai K, Ito T, Nakano T, et al. Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 2002;110(2):239-246.

18. Couchie D, Lafdil F, Martin N, Laperche Y, Zafrani ES, Mavier P. Expression and role of growth arrest-specific gene 6 protein and of its receptor axl in hepatic regeneration from oval cells. *Gastroenterology* 2005 2005;129(6):1633-1642.

19. Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, et al. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol* 2003 Oct;163(4):1653-1662.
20. Su GL, Goyert SM, Fan MH, Aminlari A, Gong KQ, Klein RD, et al. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Sep;283(3):G640-645.
21. Qiu DK, Hua J, Li JQ, Li EL. CD14 expression on Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-mediated liver injury. *Chin J Dig Dis* 2005;6(3):137-141.
22. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol* 1999 Dec 1;163(11):6148-6154.
23. Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, van Ewijk W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1994 Sep 14;174(1-2):5-19.
24. Lemke G, Lu Q. Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol* 2003 Feb;15(1):31-36.
25. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000 Jan 28;275(4):2247-2250.
26. Lee JJ, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003 Dec;39(6):960-966.
27. Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998 Aug;153(2):515-525.
28. Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* 1998 Jun;152(6):1577-1589.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

29. Teferedegne B, Green MR, Guo Z, Boss JM. Mechanism of action of a distal NF-kappaB-dependent enhancer. *Mol Cell Biol* 2006 Aug;26(15):5759-5770.

30. Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Brocker EB, Rapp UR, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood* 2001 Jan 1;97(1):46-55.

31. Simeonova PP, Gallucci RM, Hulderman T, Wilson R, Kommineni C, Rao M, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001 Dec 1;177(2):112-120.

32. Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Sep;293(3):G631-639.

33. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001 May 10;411(6834):207-211.

34. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003 Nov;38(5):1188-1198.

35. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003 May;83(5):655-663.

36. Sharif MN, Sasic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN, et al. Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med* 2006 Aug 7;203(8):1891-1901.

37. Goruppi S, Chiaruttini C, Ruaro ME, Varnum B, Schneider C. Gas6 induces growth, beta-catenin stabilization, and T-cell factor transcriptional activation in contact-inhibited C57 mammary cells. *Mol Cell Biol* 2001 Feb;21(3):902-915.

38. Woodgett JR, Ohashi PS. GSK3: an in-Toll-erant protein kinase? *Nat Immunol* 2005 Aug;6(8):751-752.

39. Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF- α production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol* 1999 Mar 15;162(6):3498-3503.
40. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007 Dec 14;131(6):1124-1136.
41. Tibrewal N, Wu Y, D'Mello V, Akakura R, George TC, Varnum B, et al. Autophosphorylation docking site Tyr-867 in Mer receptor tyrosine kinase allows for dissociation of multiple signaling pathways for phagocytosis of apoptotic cells and down-modulation of lipopolysaccharide-inducible NF- κ B transcriptional activation. *J Biol Chem* 2008 Feb 8;283(6):3618-3627.
42. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001 Jul 13;293(5528):306-311.
43. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003 Sep;3(9):745-756.
44. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005 Dec;142(3):481-489.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figures legends

Figure 1 : Time course of serum ALT and AST activities following acute CCl₄ injury. (A) ALT and (B) AST activities are not significantly different in blood sample of control (Cont) and CCl₄-treated WT and Gas6^{-/-} mice at any time point in the experiment (values are means ± SEM of 8 to 10 mice).

Figure 2 : Time course of hepatocellular necrosis following acute CCl₄ injection in WT and Gas6-deficient mice. (A) Representative micrographs of paraffin-embedded liver sections from WT and Gas6^{-/-} CCl₄-treated mice (H&E staining; original magnification X100). A single CCl₄ injection induces similar hepatocellular necrosis around central veins (CV) at 48 hour in WT and Gas6^{-/-} mice. At 72 hour, the surface of necrotic areas was reduced in WT but not in Gas6^{-/-} mice. (B) Semi-quantitative analysis of hepatocellular necrosis is performed as described in method section. Necrotic areas are reduced by 50% in WT mice at 72 hour and in Gas6^{-/-} mice at 96 hour. Values are means ± SEM of 6 to 10 mice and were identical at 48 hour in both types of mice. ** denotes significantly different values (P <0.01) between WT and deficient mice.

Figure 3 : Analysis of PCNA in liver from CCl₄-treated mice. (A) Representative western blots and (B) quantitative analysis of PCNA in liver extracts from WT and Gas6^{-/-} mice after CCl₄ injection. Ratio of PCNA to β-actin values are expressed as fold over values obtained from WT animals injected with vehicle only (oil). Values are means ± SEM of 4 to 8 animals. * denotes significant difference (P<0.05) between WT and deficient mice. † (P<0.05) and †† (P<0.01) denote significant difference from control group (Cont). (C) Immunohistochemical detection of PCNA in nuclei of hepatocytes (arrows) on representative paraffin sections (original magnification X200). An increase in PCNA-positive nuclei is detected from 48 hour in WT mice and at 72 hour in Gas6-deficient mice.

Figure 4 : Relative changes in hepatic TNF- α , IL-6, CD14 and MCP-1 mRNA expression after CCl₄-induced liver injury in Gas6^{-/-} and WT mice . (A) TNF- α mRNA, (B) IL-6 mRNA, (C) CD14 mRNA and (D) MCP-1 mRNA levels analyzed by real-time quantitative RT-PCR at different times after CCl₄ injection reveal defective Kupffer cell activation in deficient mice. Values are means $\pm$ SEM of 4 to 8 mice and * P<0.05 and ** P<0.01 denote significant difference between WT and Gas6^{-/-} mice.

Figure 5 : Effect of Gas6 deficiency on monocyte/macrophage recruitment after acute CCl₄ liver injury. (A) Immunohistochemical detection of F4/80-positive macrophages (arrows) around the central veins (CV) on liver paraffin sections (original magnification X400). Distribution of macrophages is similar in the liver of WT and Gas6^{-/-} mice at 48 hour and at 72 hour, the accumulation of F4/80-positive cells detected in the centrilobular areas in WT mice is strongly reduced in deficient mice. (B) Immunofluorescent detection of CD68-positive macrophages on liver frozen sections from WT and Gas6^{-/-} treated-mice (original magnification X200). At 72 hour, more macrophages are present in necrotic areas of WT mice than in Gas6^{-/-} mice. (C) Quantitative RT-PCR analysis shows that hepatic CD68 mRNA levels are reduced in Gas6^{-/-} mice corroborating the decreased recruitment of CD68-positive macrophages in deficient mice. Values are means $\pm$ SEM of 4 to 8 mice and * P<0.05 denotes significant difference between WT and deficient mice. (D) Gas6 chemotactic effect on monocytes performed in Boyden's chambers using 500,000 purified human blood monocytes seeded in the upper wells. Non-specific migration in the lower well in absence of Gas6 (BSA) corresponds to 1.5% of the cells. Addition of recombinant Gas6 protein in the lower chamber (Gas6) induces a significant increase in cell migration (**P<0.001) which represents 70% of the migration induced by recombinant MCP-1 (MCP-1) used as positive control. This specific Gas6 chemotactic effect is clearly reduced (*P<0.05) when recombinant Gas6 was added in upper and lower wells at a same concentration (Gas6/Gas6).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 6 : Effect of Gas6 deficiency on activation of HSC after CCl₄-induced liver injury. Quantitative RT-PCR analysis of hepatic (A) TGF-β and (B) α-SMA mRNA expression in Gas6^{-/-} mice is reduced and delayed as compared to WT (* P<0.05). Values are means ± SEM of 4 to 8 animals. (C) Immunohistochemical staining of α-SMA-positive cells in liver paraffin sections reveals activated HSC/MFB around the central veins (CV) from 72 hour after CCl₄ injection in WT animals (original magnification X400) which was largely blunted in Gas6^{-/-} mice (D) Desmin staining at 72 hour is similar in both types of mice . Arrows point desmin-positive cells (original magnification X400).

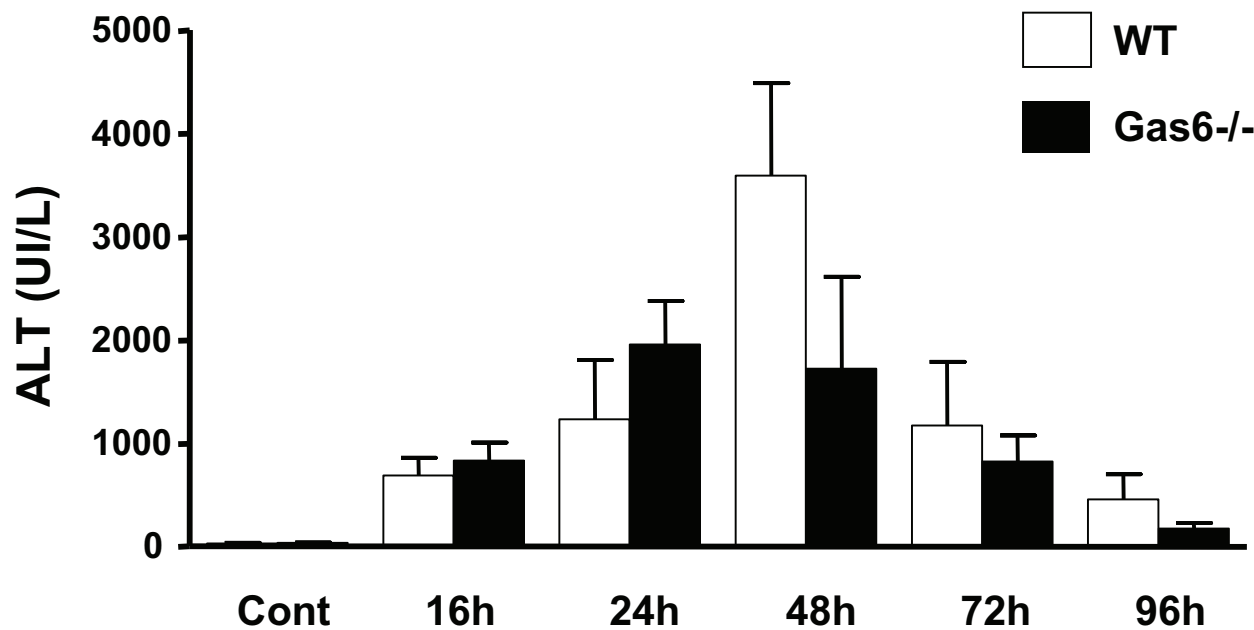
For Review Only

Table 1 : Sequence of primers

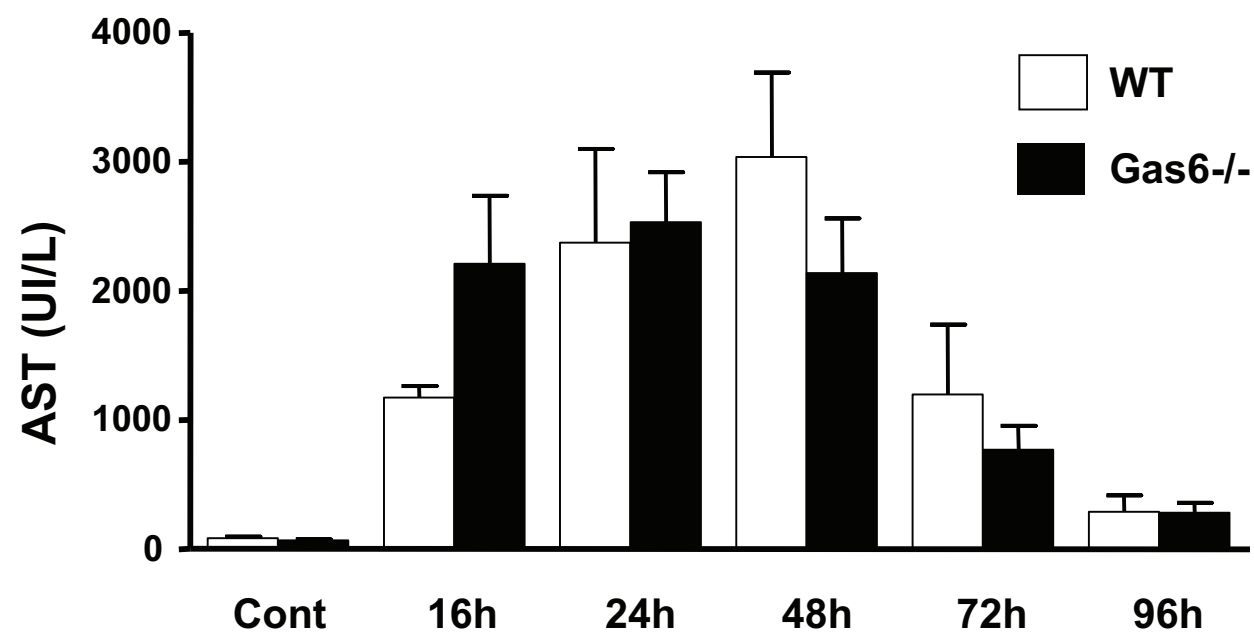
Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	GI	positions
α-SMA	GGACGTACAACCTGGTATTGTGC	CGGCAGTAGTCACGAAGGAAT	31982518	442; 619
CD14	GGCTTGTTGCTGTTGCTTC	CAGGGCTCCGAATAGAATCC	42476052	178; 481
CD68	ACAACGTGCACTCATAACCCTGC	GCCCTCTTTAAGCCCCACTTT	6753351	208; 486
IL-6	TTCCCTACTTCACAAGTCCGGAGA	ACTCCAGCTTATCTGTTAGGAG	13624310	104; 570
MCP-1	GGGCCTGCTGTTACAGTT	CCAGCCTACTCATTGGGA	110625629	110; 231
TGF-β	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTCATGGATGGTGC	6755774	1461; 1630
TNF-α	AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA	7305584	352; 460

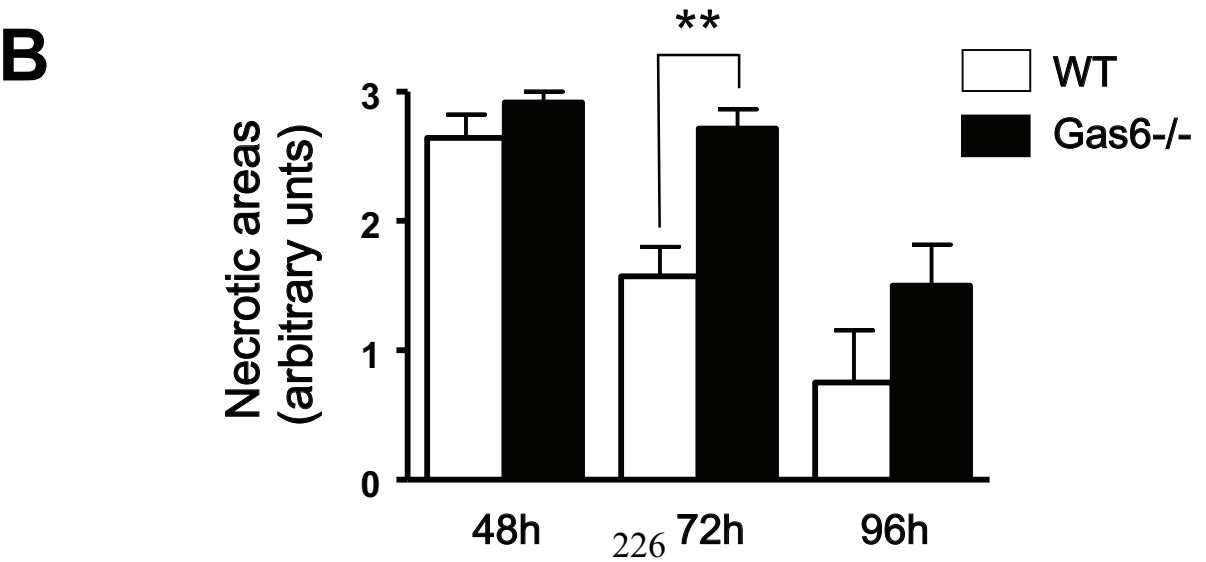
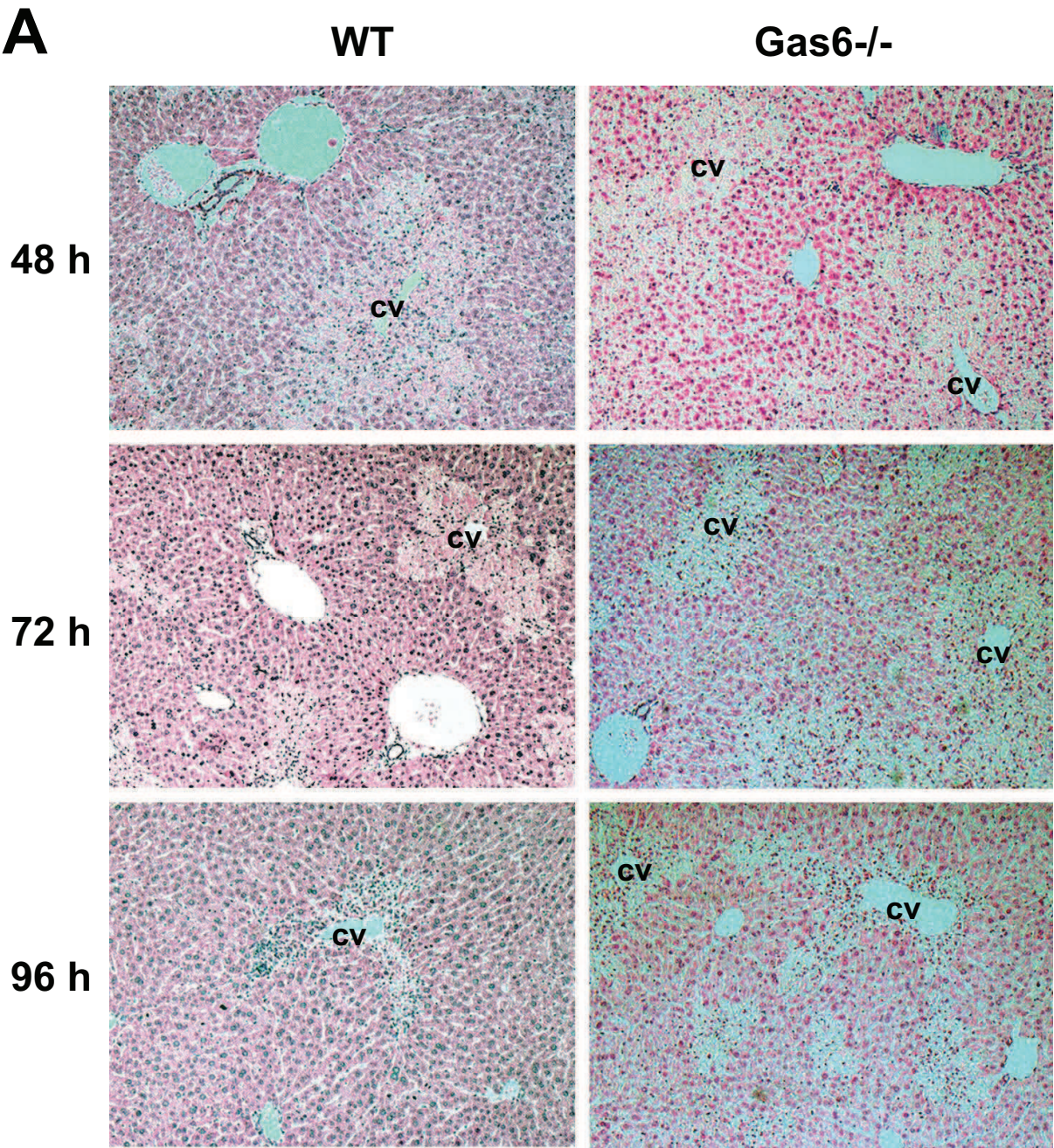
Sequence of primers designed for quantitative RT-PCR experiments from GenBank sequences identified by their accession number (GI) and their positions.

A



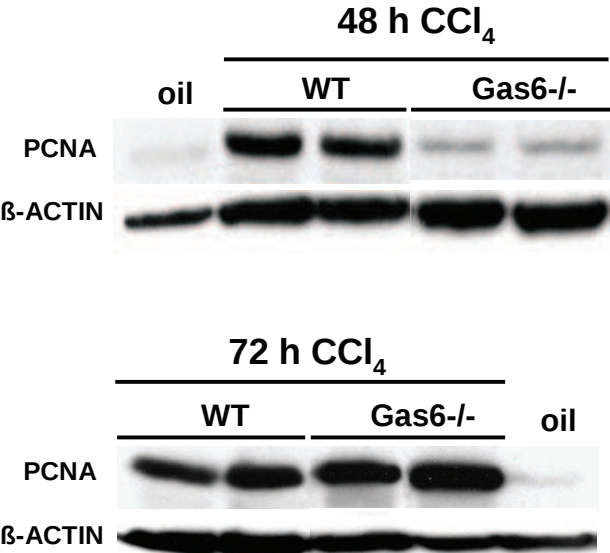
B



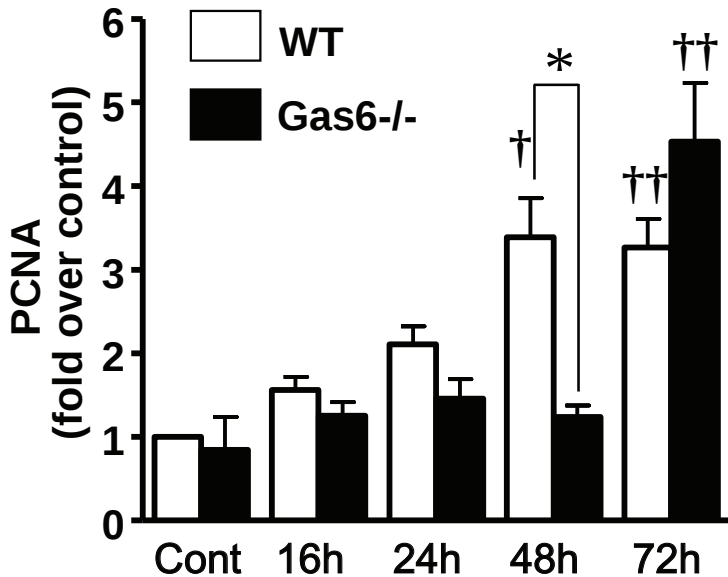


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

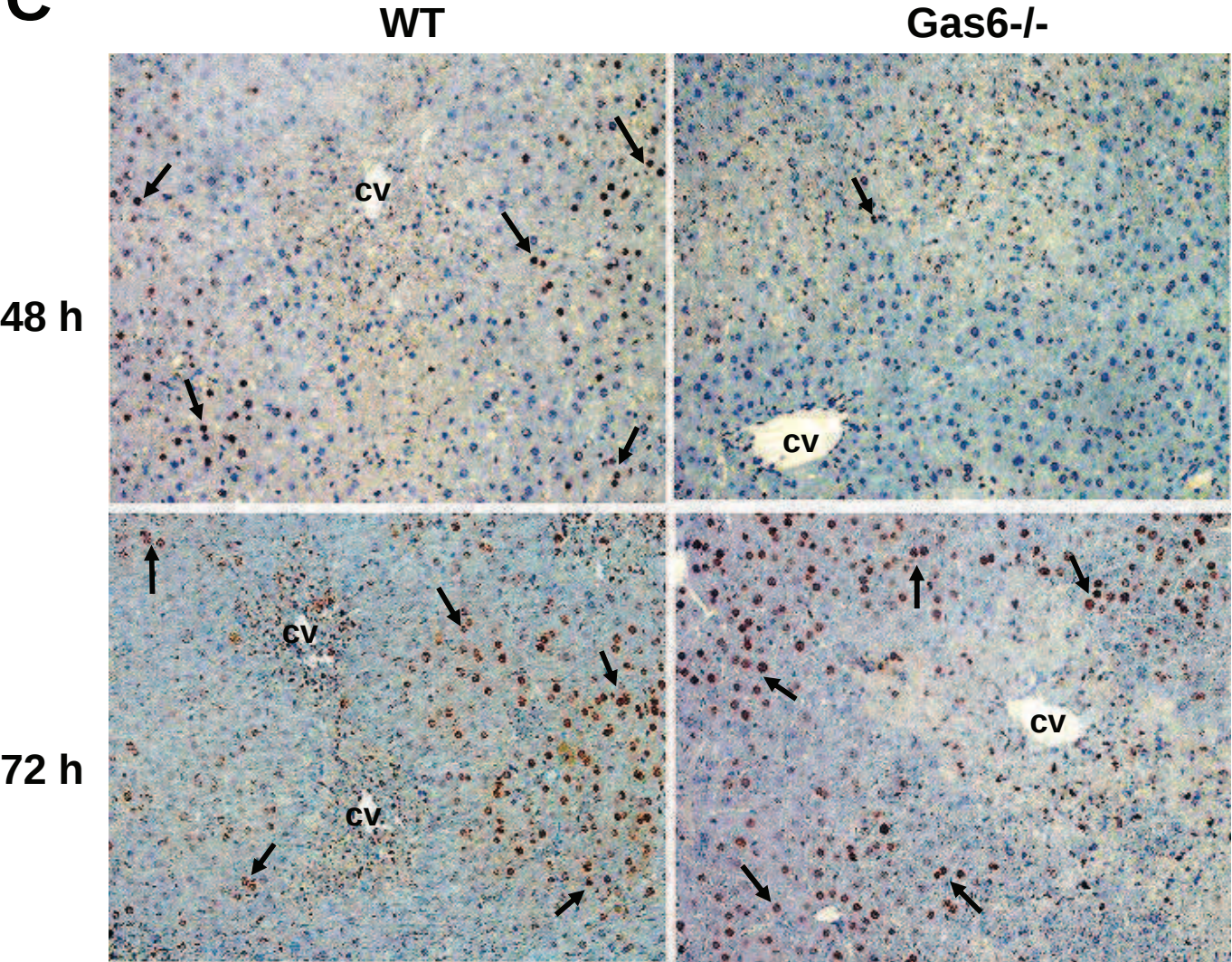
A

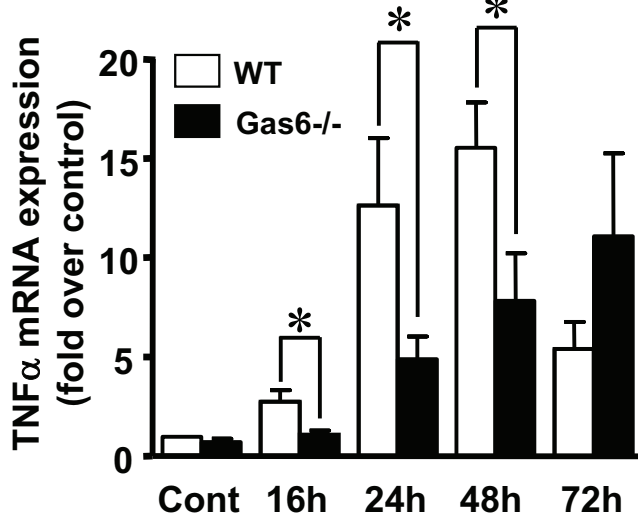
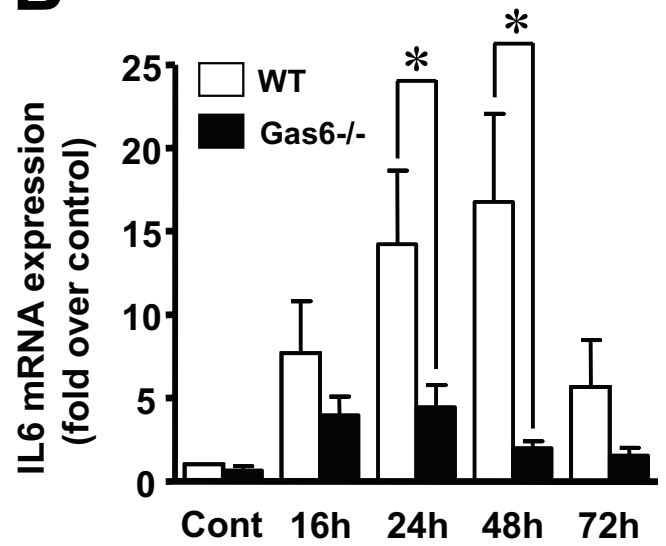
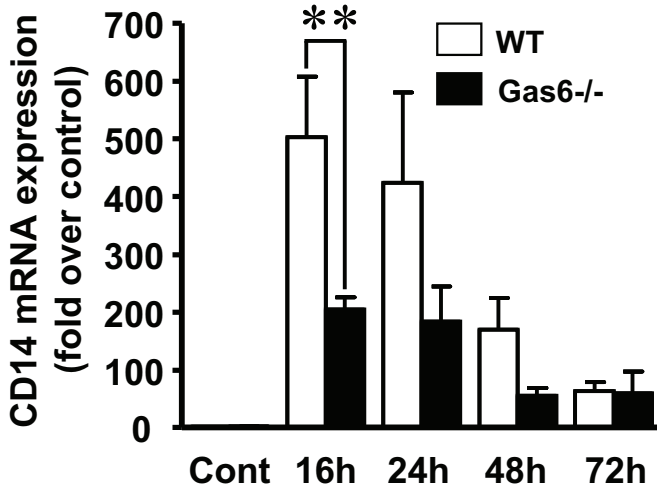
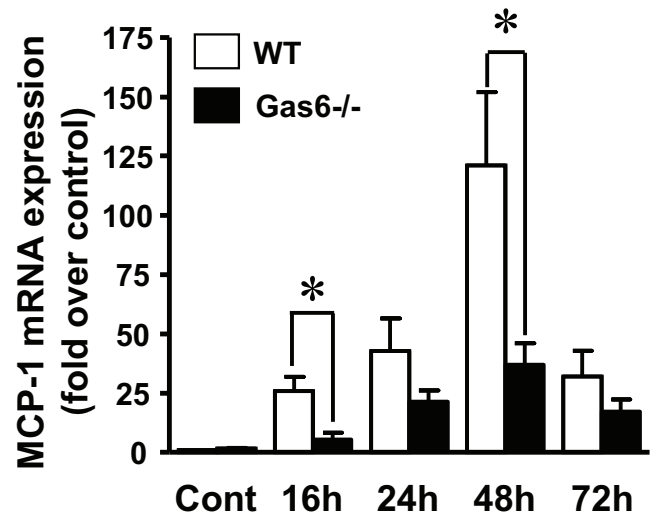


B



C



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

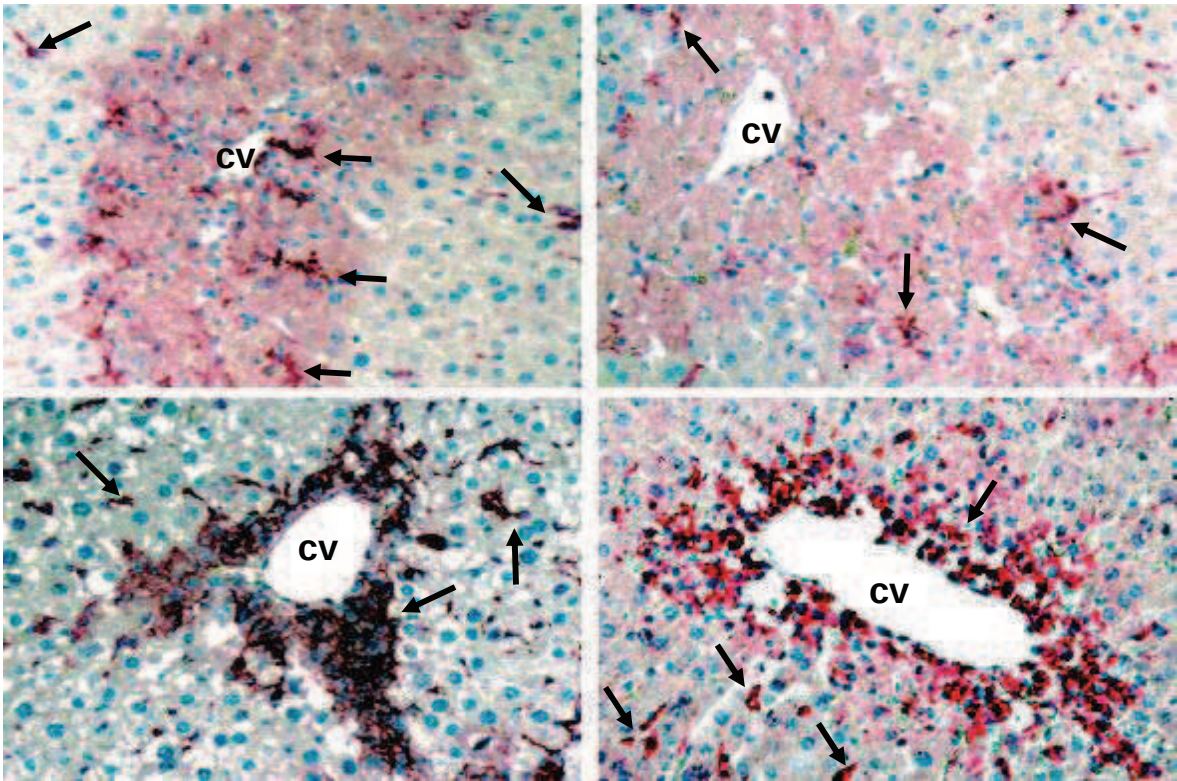
A

WT

Gas6^{-/-}

48h

72h

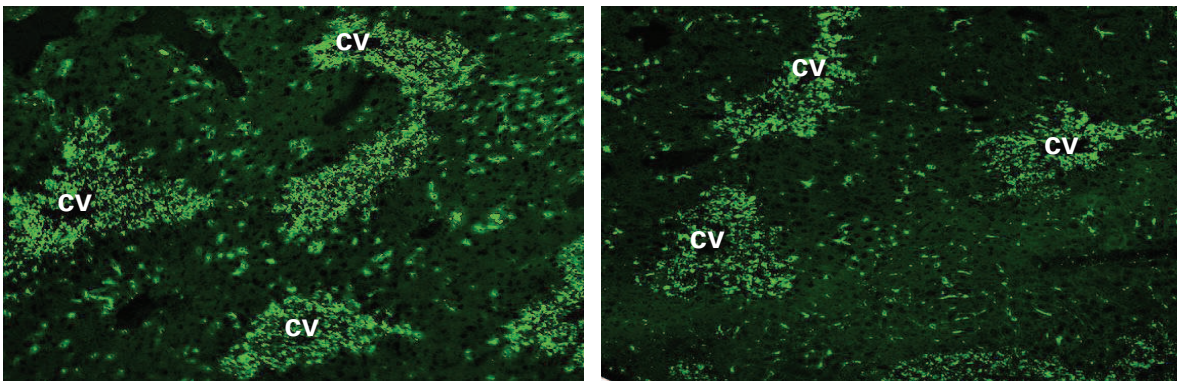


B

WT

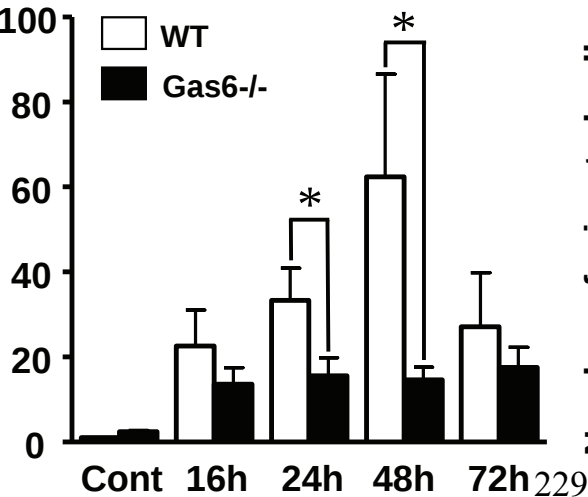
Gas6^{-/-}

72h



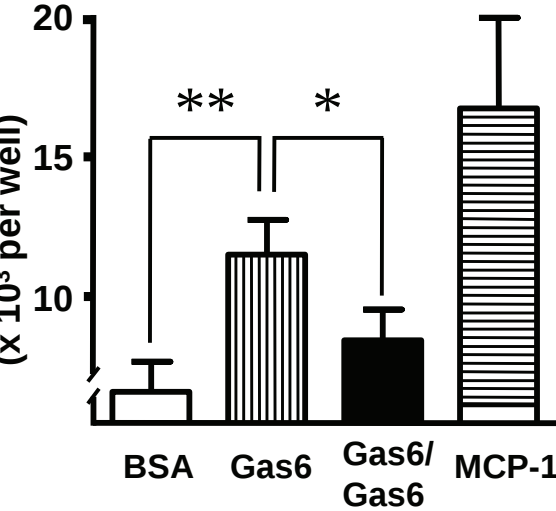
C

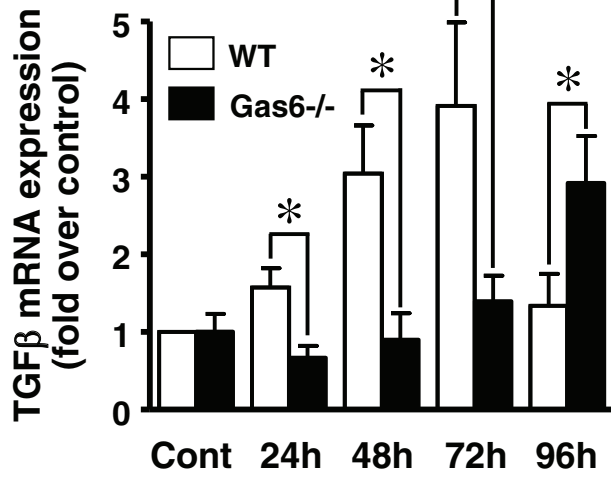
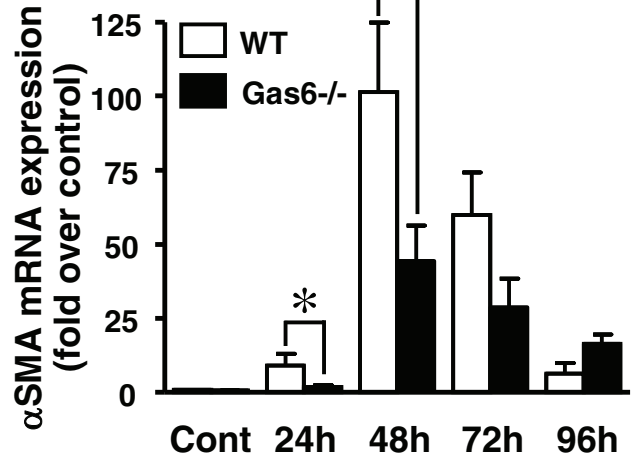
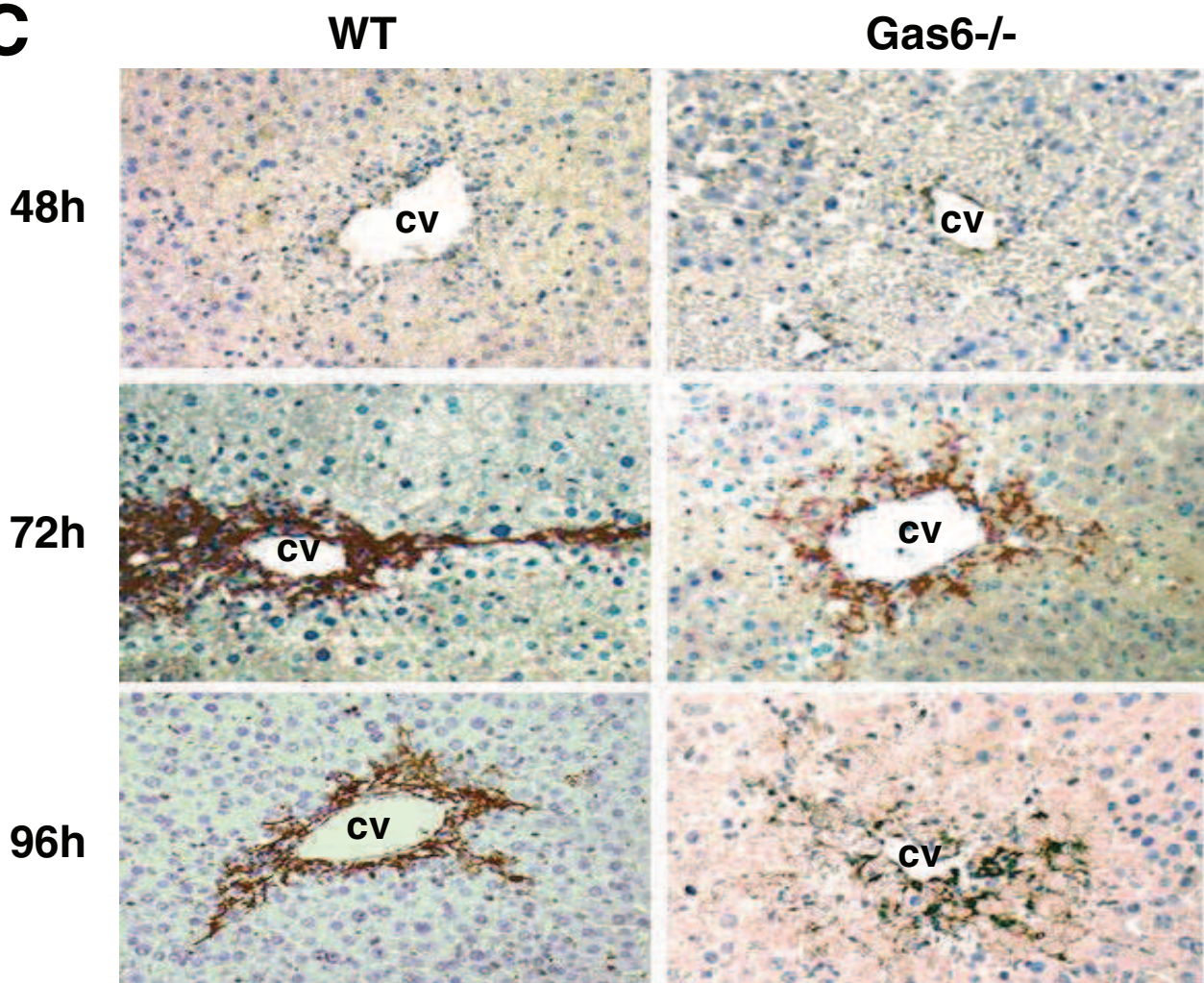
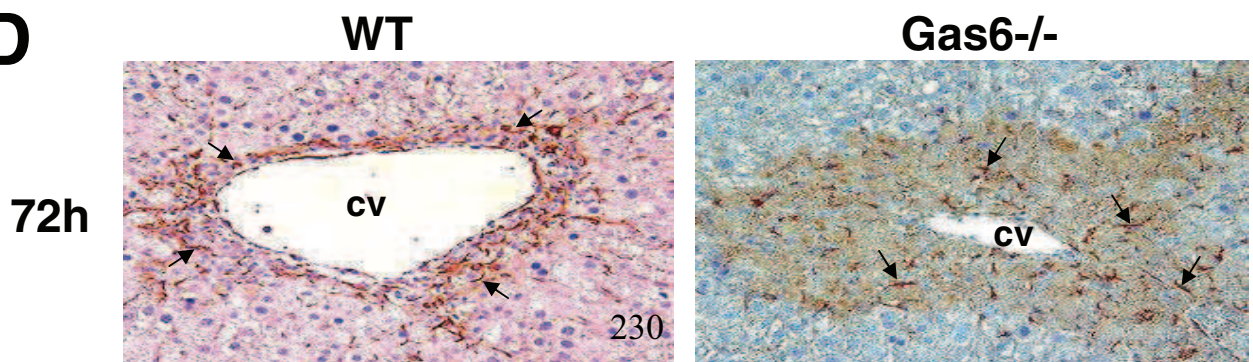
**CD68 mRNA expression
(fold over control)**



D

**Number of migrated cells
(x 10³ per well)**



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

Expert Opinion

1. Introduction
2. General properties of the cannabinoid system
3. The endocannabinoid system in liver pathophysiology
4. Conclusion
5. Expert opinion

informa
healthcare

General

Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases

Ariane Mallat, Fatima Teixeira-Clerc, Vanessa Deveaux & Sophie Lotersztajn[†]

[†]INSERM, Unité 841, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, F-94000, France

Chronic liver injury exposes the patient to liver fibrosis and its end stage, cirrhosis, is a major public health problem worldwide. In western countries, prevailing causes of cirrhosis include chronic alcohol consumption, hepatitis C virus infection and nonalcoholic steatohepatitis. Current treatment of hepatic fibrosis is limited to withdrawal of the noxious agent. Nevertheless, suppression of the cause of hepatic injury is not always feasible and numerous efforts are directed at the development of liver-specific antifibrotic therapies. Along these lines, the authors recently demonstrated that the endocannabinoid system shows promise as a novel target for antifibrotic therapy during chronic liver injury. Indeed, cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ promote dual pro- and antifibrogenic effects, respectively. Therefore, endocannabinoid-based therapies, combining CB₂ agonists and CB₁ antagonists may open novel therapeutic perspectives for the treatment of chronic liver diseases.

Keywords: cannabinoid receptor, CB₁, CB₂, cirrhosis, endocannabinoid, liver fibrosis, portal hypertension, steatosis

Expert Opin. Ther. Targets (2007) 11(3):xxx-xxx

1. Introduction

Cirrhosis is a leading cause of morbidity and mortality worldwide with ~ 800,000 deaths per year, owing to complications of portal hypertension and liver failure, and to a high incidence of hepatocellular carcinoma. In western countries, prevailing causes of cirrhosis include chronic alcohol consumption, hepatitis C virus (HCV) infection and, increasingly, non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Regardless of the cause, chronic liver injury triggers progressive accumulation of extracellular matrix proteins in the liver parenchyma, resulting in the development of a fibrous scar that progressively disrupts normal liver architecture, ultimately leading to cirrhosis [1].

Several studies have established that fibrosis components are produced by myofibroblastic cells that derive from distinct populations of nonparenchymal cells with close functional properties, known as activated hepatic stellate cells and hepatic myofibroblasts. In response to chronic liver injury, both cell types undergo phenotypic activation, proliferate and accumulate in injured areas, and synthesize fibrogenic cytokines (i.e transforming growth factor- β 1 [TGF- β 1]), growth factors and chemokines with autocrine and paracrine effects on myofibroblastic cells, parenchymal cells and inflammatory cells. In addition, activated fibrogenic cells synthesize fibrosis components and produce inhibitors of matrix catabolism, thereby amplifying the fibrogenic response [1]. Importantly, a number of recent studies have shown that fibrogenesis is a reversible process, at least at early stages, and that resolution of fibrosis may occur, provided that the offending agent is suppressed, or owing to a complex mechanism that associates myofibroblast apoptosis and activation of matrix degradation.

As eradication of the cause of chronic liver disease is not achieved in a number of patients, numerous efforts have been directed at the development of liver-specific antifibrotic therapies. Strategies targeting fibrogenic cells have been extensively investigated and schematically aim at: i) reducing fibrogenic cell accumulation by growth inhibitory or proapoptotic compounds; and/or ii) reducing fibrosis through inhibition of extracellular matrix synthesis or enhancement of its degradation. In addition, inhibition of parenchymal injury or reduction of liver inflammation has also shown some beneficial antifibrogenic effects [1]. Despite encouraging experimental results, proof of efficacy of potential antifibrogenic molecules in a clinical setting is currently lacking. The authors recently demonstrated that the endocannabinoid system shows promise as a novel target for antifibrotic therapy.

2. General properties of the cannabinoid system

The cannabinoid system currently comprises specific G-protein-coupled receptors (CB₁ and CB₂), a variety of exogenous (marijuana-derived cannabinoids) and endogenous (endocannabinoids) ligands, and a machinery dedicated to endocannabinoid synthesis and degradation.

CB₁ and CB₂ receptors share low (44%) sequence homology and a similar ligand binding profile. CB₁ receptors predominate in the CNS, whereas CB₂ receptors are primarily expressed in cells of the immune system, although they were recently detected in the brain [2]. In addition, both receptors are also expressed in a number of peripheral tissues, as shown in recent studies [3]. As members of the seven transmembrane G-protein-coupled receptor family, CB₁ and CB₂ receptors mainly signal through G_i/G_o proteins, and affect several classical intracellular pathways, such as inhibition of adenylyl cyclase and activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways. Additional G-protein-independent pathways have been identified, including activation of sphingomyelinase and induction of nitric oxide synthase or COX-2. Finally, cannabinoids may also bind other receptors, such as vanilloid receptors, and also promote receptor-independent effects that may be linked to their high lipophilicity.

Identification of specific receptors for plant-derived cannabinoids was followed by the characterization of endocannabinoids, a growing family of endogenous arachidonic acid-derived ligands (for reviews see [4,5]). Among these, anandamide (arachidonoyl-ethanolamide) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) are best known. Anandamide shows higher affinity for CB₁ over CB₂ receptors and also binds the vanilloid VR₁ receptors, whereas 2-AG binds both CB₁ and CB₂ receptors with similar affinity. Both anandamide and 2-AG derive from distinct precursors, via phospholipid-dependent pathways, involving phospholipase D and diacylglycerol lipase, respectively. Clearance of anandamide relies on its cellular uptake by a mechanism that may involve a specific

anandamide transporter [6] or additional pathways [7]. Catabolism of anandamide and 2-AG is ensured by fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase, respectively. Additional fatty acid ligands with cannabinoid receptor binding activity are increasingly identified, including noladin ether (2-arachidonoyl glyceryl ether), virodhamine (*O*-arachidonoyl ethanolamine), *N*-arachidonoyl dopamine, and docosateranylethanolamide; biological functions of these latter compounds remain largely unknown [4,5].

Recognition of specific functions associated with cannabinoid receptors has been gained from the development of subtype-selective receptor agonists and antagonists [8-12], and the availability of mice invalidated for CB₁ or CB₂ receptors [13-15]. Thus, in addition to known CB₁-dependent psychoactive, analgesic and orexigenic properties, a variety of CB₁ or CB₂ receptor-dependent peripheral effects have been characterized, including regulation of immune and inflammatory responses, regulation of bone mass, antitumoral properties and vasoregulatory or lipogenic effects [3-5,16,17]. Delineation of specific cannabinoid receptor functions has been the source of novel therapeutic strategies. Thus, synthetic Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC, dronabinol) has been approved in the US for treatment of emesis associated with chemotherapy, and as an appetite stimulant in AIDS patients. Sativex, a standardized cannabis extract containing equal quantities of Δ^9 -THC and cannabidiol, has been approved in Canada for the treatment of multiple sclerosis. Regarding molecules selectively modulating specific cannabinoid receptors, rimonabant recently received approval from the European Drug Agency as the first generation of CB₁ antagonists for the treatment of obesity and metabolic syndrome [18-21]. In addition, rimonabant is currently under evaluation in large, controlled, randomized trials for the prevention of withdrawal symptoms associated with alcohol or tobacco cessation. The growing interest of pharmaceutical companies in the therapeutic potential of CB₁ antagonists has also led to the development of several other novel compounds with CB₁ antagonistic properties [22-24]. Although still at a preclinical stage, there is growing interest in the development of CB₂ receptor agonists for the prevention of atherosclerosis [25], osteoporosis [26] or, as described below, for the treatment of liver fibrosis during chronic liver diseases. Finally, preclinical studies recently identified FAAH inhibitors as compounds with potential applications as analgesics and antidepressants [27,28].

3. The endocannabinoid system in liver pathophysiology

The role of endocannabinoids in liver pathophysiology came into focus only very recently, probably owing to the low level of expression of CB₁ and CB₂ receptors in the normal liver. However, the authors and others recently showed that the endocannabinoid system is markedly upregulated during chronic liver diseases [29]. Thus, CB₁ receptor expression is

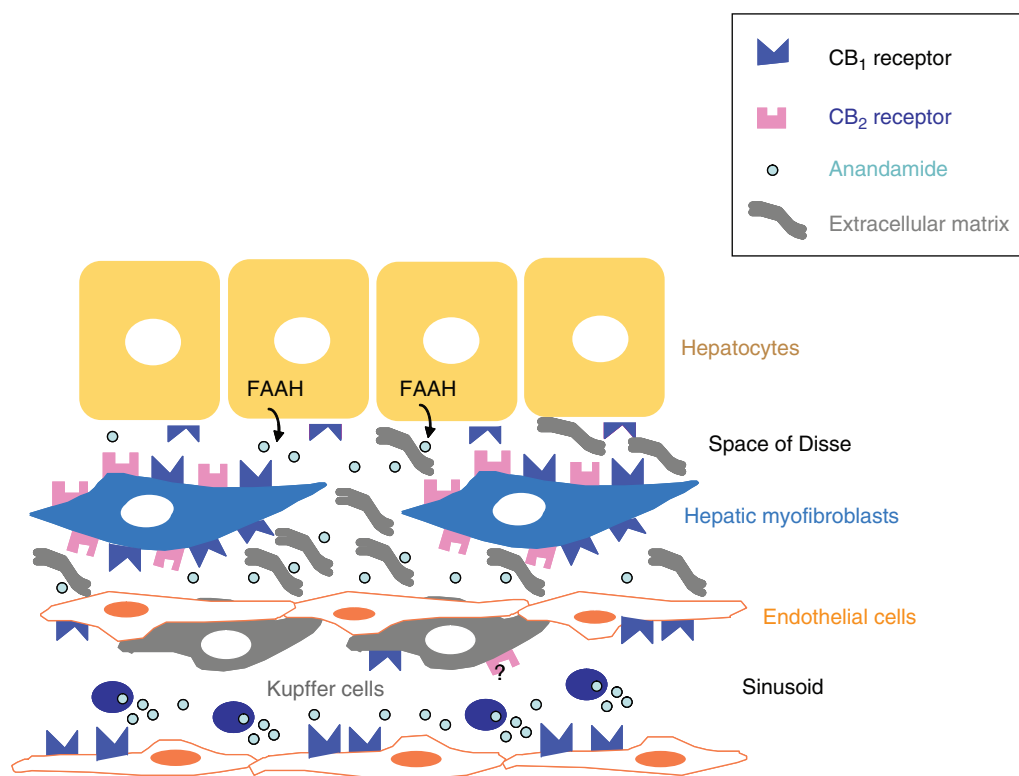


Figure 1. Cellular expression of the endocannabinoid system in the fibrotic liver.

CB: Cannabinoid; FAAH: Fatty acid amide hydrolase.

induced in the endothelial cells of the cirrhotic liver (Figure 1) and anandamide production is increased in monocytes from cirrhotic patients [30-33]. In addition, the authors recently showed that CB₁ and CB₂ receptors undergo marked upregulation in cirrhotic human liver, predominating in hepatic myofibroblasts within fibrotic septa (Figure 1) [34,35], in sharp contrast to the faint expression of these receptors in normal liver. These findings led the authors to investigate the role of the upregulated cannabinoid system during liver fibrogenesis. Strikingly, they found that CB₁ and CB₂ receptors display opposite pro- and antifibrogenic effects, respectively [34,35].

3.1 Antifibrogenic role of the CB₂ receptors

The antifibrogenic role of CB₂ receptors was unraveled in mice invalidated for CB₂ receptors (CB₂ knockout) undergoing chronic carbon tetrachloride intoxication. The authors found that CB₂ knockout mice developed significantly enhanced liver fibrosis compared with wild-type mice, as assessed by morphometric analysis of Sirius-red stained slides, and by quantification of collagenous proteins in the liver. Enhanced fibrosis was associated with increased accumulation of hepatic myofibroblasts, as shown by increased expression of smooth muscle α -actin [34]. Subsequent experiments in cultured cells showed that activation of CB₂ receptors in liver fibrogenic cells (hepatic myofibroblasts and activated hepatic

stellate cells) triggers both growth inhibition and apoptosis of these cells [34] (Figure 2). The authors also studied molecular mechanisms underlying the effects of CB₂ receptors on fibrogenic cells and showed that growth inhibition depends on COX-2 and that oxidative stress mediates apoptosis (Figure 2). Indeed, THC increased COX-2 protein expression and activity and inhibition of COX-2 blunted the growth inhibitory effect of THC [34], extending previous data demonstrating the central role of COX-2 in growth inhibition of hepatic myofibroblasts [36-39]. In contrast, apoptotic concentrations of THC stimulated production of reactive oxygen species and, accordingly, CB₂ receptor-mediated apoptosis was blocked by antioxidants [34].

Overall, the authors' results indicate that during experimental liver fibrogenesis, endogenous activation of CB₂ receptors limits progression of fibrosis by reducing accumulation of liver fibrogenic cells [34] (Figure 2).

3.2 Impact of cannabis use on fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C.

In order to investigate the relevance of their experimental findings in a human setting, the authors examined the impact of cannabis use on progression of liver fibrosis in a cohort of patients with chronic hepatitis C of known duration [40]. The study included 270 consecutive untreated patients with a

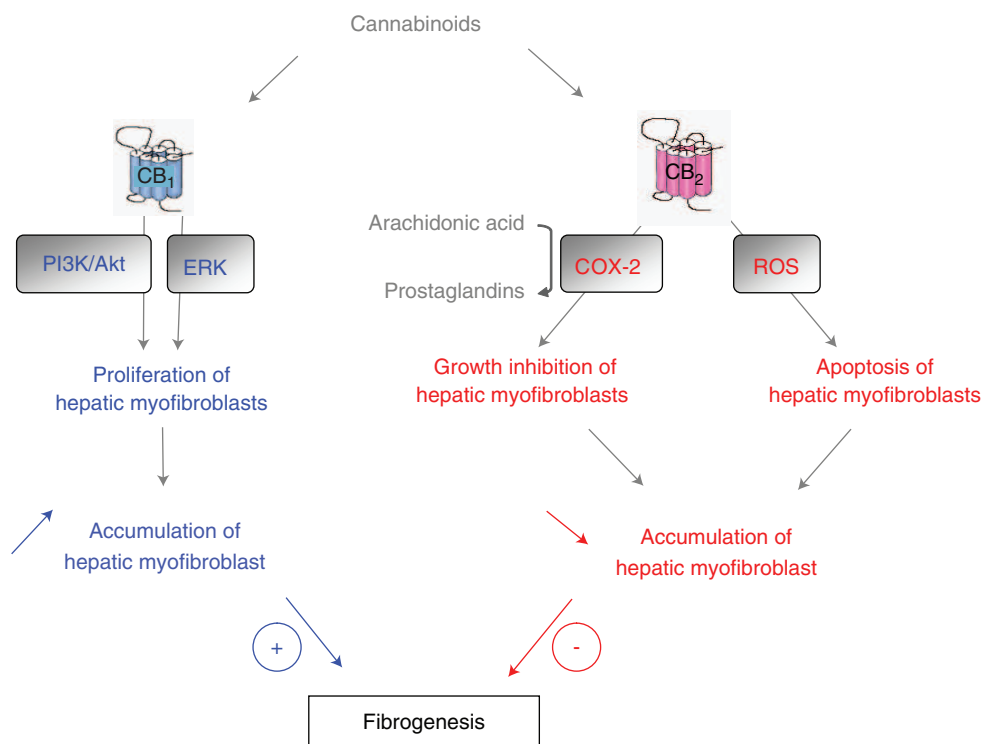


Figure 2. Opposite regulation of liver fibrogenesis by CB₁ and CB₂ receptors. CB₁ receptors enhance liver fibrogenesis by inducing fibrogenic cell accumulation, following activation PI3K-Akt and ERK. In contrast, activation of CB₂ receptors limits fibrosis progression by reducing hepatic myofibroblast accumulation through growth inhibition and apoptosis of these cells. Growth inhibition involves COX-2 and apoptosis results from oxidative stress.

CB: Cannabinoid; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; ROS: Reactive oxygen species.

single dated risk factor for chronic hepatitis C. Exclusion criteria included hepatitis B virus, HIV co-infection or previous immunosuppression. Patients were classified according to cannabis smoking habits over the span of HCV infection as non-smokers, occasional (less than one joint per week) or daily users (at least one joint per day during the course of the disease). By multivariate analysis, daily cannabis use was a significant independent predictor of the severity of liver fibrosis, as assessed by fibrosis stage or by fibrosis progression rate defined as the ratio between fibrosis stage (Metavir scale ranging 0 – 4) and the duration of disease in years [40]: additional independent predictors included previously known risk factors of fibrosis severity, such as excessive alcohol intake, older age at contamination, moderate-to-severe steatosis and histological activity grade. This study disclosed a positive relationship between regular cannabis use and fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C, in contrast to the authors' experimental results showing antifibrogenic properties of CB₂ receptors [34]. The authors, therefore, raised the hypothesis of a profibrogenic role of CB₁ receptors, and performed experiments in mice treated with the CB₁ receptor antagonist rimonabant and in mice genetically deficient in CB₁ receptors.

3.3 CB₁ receptors enhance liver fibrogenesis

The impact of CB₁ receptors was assessed in three distinct models of fibrosis: carbon tetrachloride or thioacetamide intoxications and bile duct ligation. In every instance, administration of rimonabant concurrent to liver injury was associated with a reduction in liver fibrosis [35]. Rimonabant-treated mice also displayed reduced hepatic expression of the pro-fibrogenic cytokine TGF-β1, and a decrease in the number of fibrogenic cells. As expected, CB₁ receptor-deficient mice showed reduced fibrosis and lesser accumulation of fibrogenic cells in the three models.

Studies in cultured hepatic myofibroblasts were conducted in order to identify molecular pathways driven by rimonabant [35]. Rimonabant caused a strong reduction of hepatic myofibroblast proliferation, that was associated with inhibition of the PI3K-Akt and extracellular signal-regulated kinase (ERK), two pathways that promote mitogenic and survival signals for hepatic myofibroblasts (Figure 2). Altogether, these results demonstrate that CB₁ receptors enhance liver fibrogenesis, and that a CB₁ receptor antagonist may prove useful in the treatment of fibrosis associated with chronic liver injury (Figure 3).

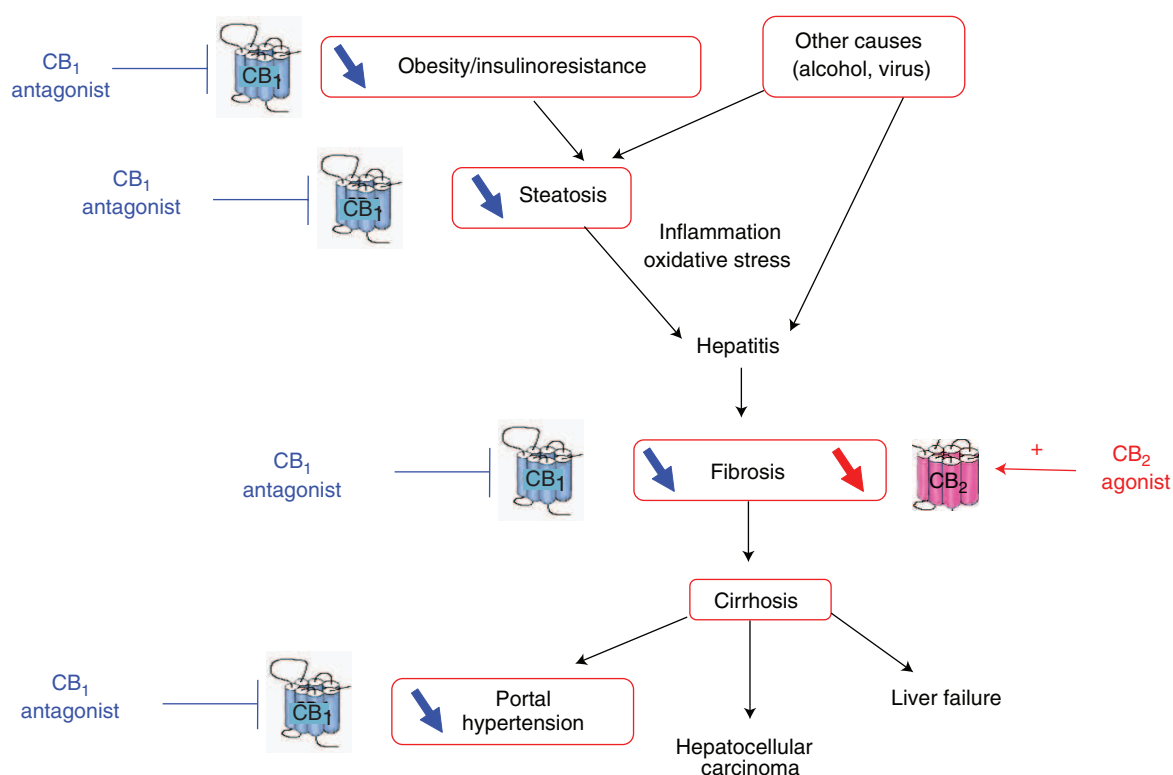


Figure 3. Therapeutic potential of CB₁ antagonists and CB₂ agonists for the treatment of chronic liver diseases. CB₁ antagonists may be beneficial for the treatment of chronic liver diseases, by acting at multiple steps of the disease progression. Thus, steatogenic and profibrogenic properties of CB₁ receptors suggest that CB₁ antagonists might be particularly beneficial in patients with non-alcoholic steatohepatitis, who are exposed to fibrosis progression. In addition, CB₁ antagonists may also reduce the adverse hemodynamic consequences of cirrhosis. Selective CB₂ agonists acting on hepatic myofibroblasts are also expected to reduce fibrosis progression.

CB: Cannabinoid.

4. Conclusion

In conclusion, the authors' studies demonstrate that the endocannabinoid system plays a dual role during chronic liver injury, which associates antifibrogenic properties of CB₂ receptors and profibrogenic effects of CB₁ receptors. These findings identify CB₁ and CB₂ receptors as potential novel targets for antifibrogenic therapy during chronic liver diseases, and suggest that combined therapy with selective CB₁ antagonists and/or CB₂ agonists might open new therapeutic perspectives for the treatment of liver fibrosis.

5. Expert opinion

Research on cannabinoids is increasingly opening several therapeutic avenues in the field of chronic liver diseases (Figure 3). Hence, CB₁ receptors recently emerged as crucial mediators of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a rising cause of cirrhosis associated with obesity and metabolic syndrome. Indeed, NAFLD can present as simple steatosis or evolve towards inflammation and steatohepatitis (NASH), with a

20% risk of cirrhosis after 20 years. It has recently been shown that activation of CB₁ receptors enhances experimental steatosis in a model of obesity induced by high-fat diet. The CB₁-dependent steatogenic effect associates central orexigenic actions, and peripheral lipogenic effects mediated by CB₁ receptors present in hepatocytes and adipocytes [41,42]. Steatogenic and profibrogenic properties of CB₁ receptors, therefore, suggest that CB₁ antagonists might be particularly beneficial in patients with NASH, who are exposed to fibrosis progression (Figure 3). In addition, CB₁ receptors have also been implicated in the development of portal hypertension [30,31] (Figure 3). Indeed, it has been shown in experimental models of cirrhosis, that endocannabinoids acting at CB₁ receptors promote splanchnic vasodilation, thereby participating to the increase in portal pressure observed in cirrhotic animals [30,31]. Altogether, these results indicate that CB₁ antagonists may be beneficial for the treatment of chronic liver diseases, by acting at multiple steps of the disease progression (Figure 3).

Elucidation of the role of CB₂ receptors is at an exciting starting point. Although still at a preclinical stage, long-term

use of CB₂ agonists as antifibrogenic compounds is particularly attractive because these substances will be devoid of psychoactive activity. However, CB₂ agonists with established efficiency *in vivo* are still lacking. Additional exciting developments may be expected, particularly related to the anti-inflammatory properties of CB₂ receptors, described in many tissues. Thus, further studies should delineate whether, in addition to direct antifibrogenic effects, CB₂ receptors may also drive anti-inflammatory effects during chronic liver injury.

Future studies should also characterize the nature of the endogenous ligands for hepatic CB₁ and CB₂ receptors. These ligands may differ from anandamide or 2-arachidonoyl-glycerol, as both lipids also trigger CB₁ and CB₂-independent effects in liver fibrogenic cells [34,43]. Alternatively, activation of CB₁ and CB₂ receptors during chronic liver diseases could

result from constitutive activation, independently of ligand occupation of the receptor [44,45].

In summary, the endocannabinoid system is steadily rising as a crucial mediator of liver diseases. It is likely that the next few years will allow one to delineate whether or not molecules targeting this system, and in particular CB₂ agonists and CB₁ antagonists, are useful therapeutic agents for the treatment of chronic liver diseases.

Acknowledgements

This work was supported by the INSERM, the Université Paris-Val-de-Marne, and by grants (to S Lotersztajn) of the Agence Nationale de la Recherche, the Association pour la Recherche sur le Cancer and Sanofi-Aventis.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. LOTERSZTAJN S, JULIEN B, TEIXEIRA-CLERC F, GRECARD P, MALLAT A: Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2005) 45:605-628.
2. VAN SICKLE MD, DUNCAN M, KINGSLEY PJ *et al.*: Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* (2005) 310(5746):329-332.
3. PACHER P, BATAI S, KUNOS G: The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* (2006) 58(3):389-462.
4. PIOMELLI D, GIUFFRIDA A, CALIGNANO A, RODRIGUEZ DE FONSECA F: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* (2000) 21(6):218-224.
5. DI MARZO V, BIFULCO M, DE PETROCELLIS L: The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2004) 3(9):771-784.
6. MOORE SA, NOMIKOS GG, DICKASON-CHESTERFIELD AK *et al.*: From The Cover: Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102(49):17852-17857.
7. ALEXANDER JP, CRAVATT BF: The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases. *J. Am. Chem. Soc.* (2006) 128(30):9699-9704.
8. THAKUR GA, NIKAS SP, MAKRIYANNIS A: CB₁ cannabinoid receptor ligands. *Mini-Rev. Med. Chem.* (2005) 5(7):631-640.
9. HUFFMAN JW: CB₂ receptor ligands. *Mini-Rev. Med. Chem.* (2005) 5(7):641-649.
10. PERTWEE RG: Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* (1999) 6(8):635-664.
11. RINALDI-CARMONA M, BARTH F, MILLAN J *et al.*: SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1998) 284(2):644-650.
12. RINALDI-CARMONA M, PIALOT F, CONGY C *et al.*: Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB₁) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci.* (1996) 58(15):1239-1247.
- **First description of the CB₁ antagonist SR-141716A (rimonabant, Accomplia).**
13. LEDENT C, VALVERDE O, COSSU G *et al.*: Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science* (1999) 283(5400):401-404.
- **First description of CB₁-deficient mice (with [12]).**
14. ZIMMER A, ZIMMER AM, HOHMANN AG, HERKENHAM M, BONNER TI: Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96(10):5780-5785.
15. BUCKLEY NE, MCCOY KL, MEZEY E *et al.*: Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 396(2-3):141-149.
- **First description of CB₂-deficient mice.**
16. GUZMAN M: Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* (2003) 3(10):745-755.
17. KLEIN TW: Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* (2005) 5(5):400-411.
18. PI-SUNYER FX, ARONNE LJ, HESHMATI HM, DEVIN J, ROSENSTOCK J: Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* (2006) 295(7):761-775.
19. VAN GAAL LE, RISSANEN AM, SCHEEN AJ, ZIEGLER O, ROSSNER S: Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* (2005) 365(9468):1389-1397.
20. DESPRES JB, GOLAY A, SJOSTROM L: Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* (2005) 353(20):2121-2134.
21. SCHEEN AJ, FINER N, HOLLANDER P *et al.*: Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with Type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* (2006) 368(9548):1660-1672.

22. LANGE JHM, KRUSE CG: Keynote review: medicinal chemistry strategies to CB₁ cannabinoid receptor antagonists. *Drug Discov. Today* (2005) **10**(10):693-702.
23. MUCCIOLI GG, LAMBERT DM: Current knowledge on the antagonists and inverse agonists of cannabinoid receptors. *Curr. Med. Chem.* (2005) **12**(12):1361-1394.
24. MUCCIOLI GG, WOUTERS J, CHARLIER C *et al.*: Synthesis and activity of 1,3,5-triphenylimidazolidine-2,4-diones and 1,3,5-triphenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one s: characterization of new CB₁ cannabinoid receptor inverse agonists/antagonists. *J. Med. Chem.* (2006) **49**(3):872-882.
25. STEFFENS S, VEILLARD NR, ARNAUD C *et al.*: Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* (2005) **434**(7034):782-786.
26. OFEK O, KARSAK M, LECLERC N *et al.*: Peripheral cannabinoid receptor, CB₂, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) **103**(3):696-701.
27. KATHURIA S, GAETANI S, FEGLEY D *et al.*: Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* (2003) **9**(1):76-81.
28. LICHTMAN AH, LEUNG D, SHELTON CC *et al.*: Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004) **311**(2):441-448.
29. MALLAT A, LOTERSZTAJN S: Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *J. Endocrinol. Invest.* (2006) **29**(3 Suppl.):58-65.
30. BATKAI S, JARAI Z, WAGNER JA *et al.*: Endocannabinoids acting at vascular CB₁ receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat. Med.* (2001) **7**(7):827-832.
- **First description (together with [31]) of the role of the endocannabinoid system in portal hypertension.**
31. ROS J, CLARIA J, TO-FIGUERAS J *et al.*: Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* (2002) **122**(1):85-93.
- **First description (together with [30]) of the role of the endocannabinoid system in the development of portal hypertension.**
32. BISWAS KK, SARKER KP, ABEYAMA K *et al.*: Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology* (2003) **38**(5):1167-1177.
33. FERNANDEZ-RODRIGUEZ CM, ROMERO J, PETROS TJ *et al.*: Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver Int.* (2004) **24**(5):477-483.
34. JULIEN B, GRENARD P, TEIXEIRA-CLERC F *et al.*: Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB₂ in the liver. *Gastroenterology* (2005) **128**(3):742-755.
- **First description of the antifibrogenic properties of CB₂ receptors.**
35. TEIXEIRA-CLERC F, JULIEN B, GRENARD P *et al.*: CB₁ cannabinoid receptor antagonism: a novel strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat. Med.* (2006) **12**(6):671-676.
- **First description of the profibrogenic properties of CB₁ receptors and of the therapeutic potential of CB₁ antagonists in the treatment of liver fibrosis during chronic liver diseases.**
36. MALLAT A, FOUASSIER L, PREAUX AM *et al.*: Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J. Clin. Invest.* (1995) **96**(1):42-49.
37. MALLAT A, GALLOIS C, TAO J *et al.*: Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**(42):27300-27305.
38. GALLOIS C, HABIB A, TAO J *et al.*: Role of NF- κ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor- α in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**(36):23183-23190.
39. DAVAILLE J, GALLOIS C, HABIB A *et al.*: Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**(44):34628-34633.
40. HEZODE C, ROUDOT-THORAVALL F, NGUYEN S *et al.*: Daily cannabis smoking as a risk factor for fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* (2005) **42**(1):63-71.
- **Epidemiological study showing that daily cannabis smoking is a risk factor for fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C.**
41. OSEI-HYIAMAN D, DEPETRILLO M, PACHER P *et al.*: Endocannabinoid activation at hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* (2005) **115**(5):1298-1305.
- **Study showing the steatogenic properties of CB₁ receptors.**
42. BENSALD M, GARY-BOBO M, ESCLANGON A *et al.*: The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol. Pharmacol.* (2003) **63**(4):908-914.
43. SIEGMUND SV, UCHINAMI H, OSAWA Y, BRENNER DA, SCHWABE RF: Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* (2005) **41**(5):1085-1095.
44. BOUABOULA M, PERRACHON S, MILLIGAN L *et al.*: A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J. Biol. Chem.* (1997) **272**(35):22330-22339.
45. PORTIER M, RINALDI-CARMONA M, PECCEU F *et al.*: SR 144528, an antagonist for the peripheral cannabinoid receptor that behaves as an inverse agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1999) **288**(2):582-589.

Affiliation

Ariane Mallat^{1,2},
 Fatima Teixeira-Clerc¹,
 Vanessa Deveau¹
 & Sophie Lotersztajn^{†1,2} PhD
[†]Author for correspondence
¹INSERM, Unité 841, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Université Paris XII – Val de Marne, Créteil, F-94000, France
 Tel: +33 (0)1 49 81 35 34;
 Fax: +33 (0)1 48 98 09 08;
 E-mail: Sophie.Lotersztajn@creteil.inserm.fr
²AP-HP, Groupe Hospitalier Henri-Mondor-Albert Chenevier, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Créteil, F-94000 France

REVIEW

CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases

S Lotersztajn^{1,2,3}, F Teixeira-Clerc^{1,2}, B Julien^{1,2}, V Deveaux^{1,2}, Y Ichigotani^{1,2}, S Manin^{1,2}, J Tran-Van-Nhieu^{1,2,4}, M Karsak⁵, A Zimmer⁵ and A Mallat^{1,2,3}

¹INSERM, U841, Créteil, France; ²Université Paris XII-Val de Marne, Créteil, France; ³AP-HP, Groupe hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Créteil, France; ⁴Département de Pathologie, AP-HP, Groupe hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, Créteil, France and ⁵Institute of Molecular Psychiatry, University of Bonn, Bonn, Germany

Cannabinoid type-1 (CB1) and type-2 (CB2) receptors belong to the family of G protein-coupled receptors and mediate biological effects of phyto-derived and endogenous cannabinoids. Whereas functions of CB1 receptor have been extensively studied, the CB2 receptor has emerged over the last few years as a critical player in regulation of inflammation, pain, atherosclerosis and osteoporosis. Therefore, although still at a preclinical stage, the development of selective CB2 molecules has gained of interest as new targets in drug discovery. Recent data have unravelled a key role of CB2 receptors during chronic and acute liver injury, including fibrogenesis associated to chronic liver diseases, ischaemia-reperfusion-induced liver injury, and hepatic encephalopathy associated to acute liver failure. This review summarizes the latest advances on the recently identified role of CB2 receptors in the pathophysiology of liver diseases.

British Journal of Pharmacology (2008) **153**, 286–289; doi:10.1038/sj.bjp.0707511; published online 22 October 2007

Keywords: cannabinoid receptors; liver fibrosis; cirrhosis; ischaemia/reperfusion injury; liver diseases

Abbreviations: 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; COX-2, cyclooxygenase-2; I/R injury, ischaemia/reperfusion injury

Introduction

Although phytocannabinoids have long been used for recreational and therapeutic purposes, understanding the mechanisms involved came with the identification of an endocannabinoid system comprising at least two specific G-protein-coupled receptors (cannabinoid type-1 (CB1) and type-2 (CB2)), their endogenous ligands and a machinery dedicated to endocannabinoid synthesis and degradation (for reviews, see Mallat and Lotersztajn, 2006; Pacher *et al.*, 2006; Mallat *et al.*, 2007).

Over the last few years, the CB2 receptor has emerged as a critical target for regulation of inflammation, pain, bone loss and more recently in liver pathophysiology, including fibrogenesis associated with chronic liver diseases, ischaemia/reperfusion (I/R)-induced liver injury and hepatic encephalopathy-associated with acute liver failure. Therefore, although still at a preclinical stage, the development of selective CB2 molecules has gained interest as new targets in drug discovery.

The gene encoding the human CB2 receptor encodes a 360-amino-acid protein, which shares 44% homology to the CB1 receptor (Munro *et al.*, 1993), and displays distinct but overlapping distribution. CB2 receptors show rather low levels of expression compared to CB1 receptors, predominating in cells of the immune system. In addition, expression of CB2 receptors is increasingly detected in a variety of peripheral tissues, particularly under pathological conditions. Intracellular CB2-dependent signalling pathways include Gi/o-dependent inhibition of adenylyl cyclase, stimulation of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase pathways, and activation of *de novo* ceramide production or cyclooxygenase-2 (COX-2) induction (Guzman *et al.*, 2001).

Among the growing family of endocannabinoids identified (for reviews, see Piomelli *et al.*, 2000; Di Marzo *et al.*, 2004), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) has been proposed to serve as the endogenous CB2 ligand, although it is also a full agonist for CB1 receptors. 2-AG is synthesized from diacylglycerol lipase and degraded intracellularly by monoacylglycerol lipase. CB2 receptors may also bind other endocannabinoid ligands; however, the signalling consequences of this binding is poorly known (Piomelli *et al.*, 2000; Di Marzo *et al.*, 2004).

Correspondence: Dr S Lotersztajn, INSERM U 841, Institut Mondor de recherche Biomédicale, Hôpital Henri Mondor, Créteil 94010, France.

E-mail: Sophie.Lotersztajn@creteil.inserm.fr

Received 2 July 2007; revised 3 September 2007; accepted 20 September 2007; published online 22 October 2007

Identification of functions associated with CB2 receptors has gained from the development of pharmacological agents specifically targeting CB2 receptors, including agonists (JWH-133 and analogues, HU-308 and AM 1241) and antagonists (SR 144528, AM 630) (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998; Pertwee, 1999; Huffman, 2005), as well as from the availability of mice invalidated for CB2 (Buckley *et al.*, 2000). However, hepatic effects of the CB1 and CB2 receptors have long remained unknown, probably owing to their low level of expression in the normal liver. Nonetheless, recent studies unravelled the major role of the endocannabinoid system in various liver pathological conditions (Mallat and Lotersztajn, 2006; Mallat *et al.*, 2007).

Hepatic effects of CB2 receptors

The embryo liver shows a high expression of CB2 receptor that declines during development (Buckley *et al.*, 1998). In contrast, adult normal liver shows a faint expression of CB2 receptors, although substantial amounts of 2-AG are produced (Kondo *et al.*, 1998). Nevertheless, it has recently been shown that hepatic CB2 receptors are highly upregulated in several pathological conditions, including experimental and human liver fibrogenesis (Julien *et al.*, 2005) and acute experimental I/R injury (Batkai *et al.*, 2007). These observations stimulated investigations as to their pathophysiological significance.

Antifibrogenic properties of CB2 receptors

Chronic liver injury is associated with liver fibrogenesis, ultimately leading to cirrhosis (Lotersztajn *et al.*, 2005). The latter is a prominent cause of morbidity and mortality worldwide with about 800 000 deaths per year, owing to complications of portal hypertension and liver failure, and to a high incidence of hepatocellular carcinoma. In western countries, prevailing causes of cirrhosis include chronic alcohol consumption, chronic hepatitis C infection, and, increasingly, non-alcoholic steatohepatitis (Lotersztajn *et al.*, 2005).

Liver fibrogenesis is driven by a heterogeneous population of non-parenchymal cells expressing smooth muscle α -actin that originate from hepatic stellate cells and hepatic myofibroblasts. In response to chronic liver injury, both cell types proliferate and accumulate in injured areas, synthesize fibrogenic cytokines (that is, transforming growth factor- β 1, TGF β 1), growth factors, chemokines, fibrosis components and inhibitors of matrix degradation (Lotersztajn *et al.*, 2005). The frequent inability to eradicate the cause of chronic liver disease warrants the development of liver-specific antifibrotic strategies. Strategies targeting fibrogenic cells have been extensively investigated and schematically aim at (i) reducing fibrogenic cell accumulation by growth inhibitory or proapoptotic compounds, and/or (ii) reducing fibrosis through inhibition of extracellular matrix synthesis or enhancement of its degradation. In addition, inhibition of parenchymal injury or reduction of liver inflammation has also shown some beneficial antifibrogenic effects (Lotersztajn *et al.*, 2005). However, despite encouraging experimental results, proof of efficacy of potential antifibrogenic molecules in a clinical setting is currently lacking.

We recently showed that CB1 and CB2 receptors are marginally expressed in the normal liver and undergo marked upregulation in the cirrhotic human liver, predominating in hepatic myofibroblasts (Julien *et al.*, 2005), an observation that was subsequently confirmed by others (Xu *et al.*, 2006). These findings led us to investigate the function of CB2 receptors during liver fibrogenesis, owing to the use of an established liver fibrosis model induced by chronic carbon tetrachloride intoxication. Mice invalidated for CB2 receptors developed significantly enhanced liver fibrosis compared to wild-type mice, as assessed by morphometric analysis of Sirius red-stained slides, and by quantification of collagenous proteins in the liver. Enhanced fibrosis was associated with an increased density of hepatic myofibroblasts, as shown by enhanced expression of smooth muscle α -actin (Julien *et al.*, 2005). The mechanisms involved were further investigated in cell cultures of liver fibrogenic cells. Activation of CB2 receptors in hepatic myofibroblasts and activated hepatic stellate cells reduced cell accumulation by triggering both growth inhibition and apoptosis (Julien *et al.*, 2005). We further demonstrated that CB2-dependent growth inhibition is mediated by a COX-2 pathway, and that CB2-dependent apoptosis involves oxidative stress. Indeed, THC increased COX-2 protein expression and activity, and inhibition of COX-2 by a selective COX-2 inhibitor blunted the growth-inhibitory effect of THC (Julien *et al.*, 2005). These observations corroborated our previous data demonstrating the central role of COX-2 in growth inhibition of hepatic myofibroblasts (Mallat *et al.*, 1995, 1998; Gallois *et al.*, 1998; Davaille *et al.*, 2000). In contrast, apoptotic concentrations of THC stimulated production of reactive oxygen species, and, accordingly, CB-receptor-mediated apoptosis was blocked by antioxidants (Julien *et al.*, 2005).

Endogenous ligands of hepatic CB2 receptors remain to be identified among the increasing number of endocannabinoids. In this respect, we showed that 2-AG exerts CB1- and CB2-independent apoptotic effects in liver fibrogenic cells (Julien *et al.*, 2005), thereby suggesting that other endocannabinoids may be responsible for CB2 activation during liver fibrogenesis. Alternatively, CB2 receptors might be constitutively activated, independently of ligand occupation of the receptor (Portier *et al.*, 1999).

Taken together, our results indicate that during experimental liver fibrogenesis, endogenous activation of CB2 receptors limits progression of fibrosis by reducing accumulation of liver fibrogenic cells (Julien *et al.*, 2005). These findings identify CB2 receptors as a potential novel therapeutic target for the control of fibrogenesis during chronic liver diseases (Figure 1). In a parallel study, we also demonstrated that CB1 receptors accelerate liver fibrogenesis (Hezode *et al.*, 2005; Teixeira-Clerc *et al.*, 2006), following enhanced accumulation of hepatic myofibroblasts. Overall, our data therefore suggest that combined therapy with selective CB1 antagonists and CB2 agonists might open new therapeutic avenues for the treatment of liver fibrosis.

CB2 activation protects against liver I/R injury

I/R injury is a pathophysiological process observed in several conditions, whereby hypoxic organ damage is accentuated

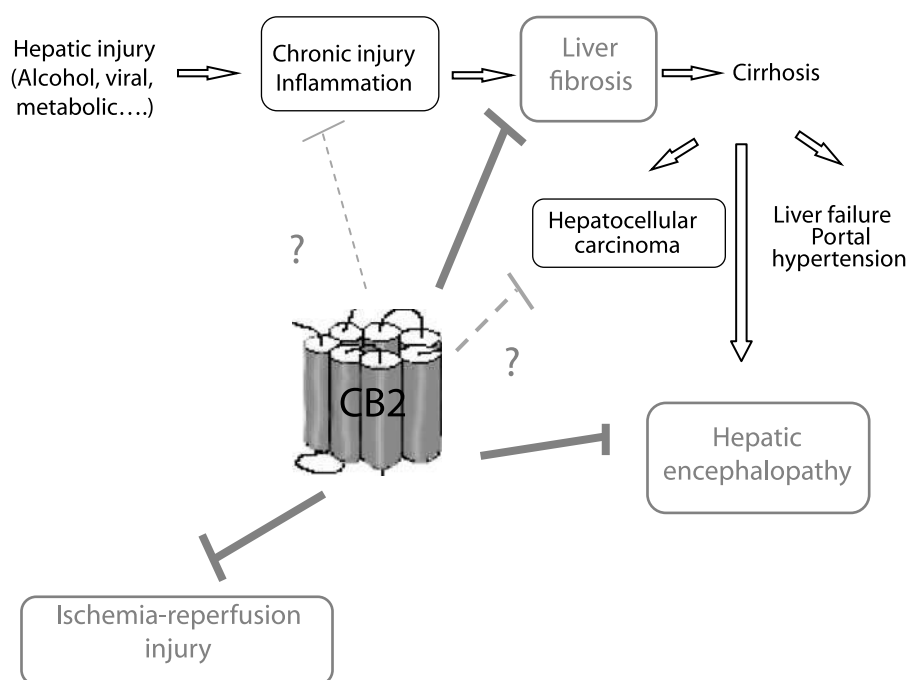


Figure 1 CB2 receptors as novel targets for the treatment of liver diseases.

following return of blood flow and oxygen delivery to the compromised tissue. Transient episodes of hepatic ischaemia occur during organ transplantation, trauma, hypovolaemic shock and selective liver resection, following inflow occlusion or total vascular exclusion. The pathophysiology of liver I/R injury includes both direct cellular damage as a result of the ischaemic insult, as well as delayed dysfunction and damage resulting from activation of inflammatory pathways. Histopathologic changes include cellular swelling, vacuolization, endothelial cell disruption, neutrophil infiltration and hepatocellular necrosis. Key events of the inflammatory reaction associated with liver damage include activation of Kupffer cells leading to oxidative stress, upregulation of the inducible nitric oxide synthase in hepatocytes, activation of c-jun terminal kinase, upregulation of proinflammatory cytokines and neutrophil accumulation.

Recent data have shown that CB2 receptors play a key role in the limitation of liver injury induced by I/R (Batkai *et al.*, 2007). Indeed, the reperfusion phase is associated with an increase in hepatic synthesis of anandamide and 2-arachidonoyl glycerol. Parenchymal and non-parenchymal cells, including hepatocytes, Kupffer and endothelial cells contribute to enhanced endocannabinoid synthesis, as shown in isolated cell fraction from I/R-injured mice. Administration of the selective CB2 agonist, JWH-133, prior to the vascular occlusion protected against hepatic I/R injury, by a complex mechanism involving decreased inflammatory cell infiltration, reduced lipid peroxidation and expression of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Moreover, mice invalidated for CB2 receptors displayed enhanced liver injury and inflammation following I/R (Batkai *et al.*, 2007). Liver cells overexpressing CB2 receptors during I/R injury were not identified in this study. However,

experiments in cultured sinusoidal endothelial cells indicated that CB2 activation reduced tumour necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression and decreased adhesion of neutrophils to endothelial cells. Taken together, these data suggest that CB2 agonists may offer novel perspectives in prevention of hepatic I/R injury.

Hepatic encephalopathy

Hepatic encephalopathy is a major complication of chronic or acute liver failure. Pathogenesis remains partially understood, and involves multiple mechanisms, including altered production of neurotransmitters, astrocyte dysfunction and abnormalities in cerebral perfusion. A recent study showed that brain levels of CB2 receptors and of its ligand 2-AG are increased in the model of fulminant liver failure induced by thioacetamide (Avraham *et al.*, 2005; Dagon *et al.*, 2007). Moreover, neurological dysfunction was improved both by the non-selective CB1/CB2 agonist Δ^9 -THC (Dagon *et al.*, 2007) and the CB2 agonists HU308 and 2AG, as well as by the CB1 antagonist rimonabant (Avraham *et al.*, 2005). The neuroprotective effect of Δ^9 -THC was not associated with an improvement of liver functions, and was lost in CB2 KO mice, suggesting that neuroprotection results from a direct effect of THC on brain CB2 receptors. CB2-mediated improvement of cerebral dysfunction was related to stimulation of brain AMP-activated protein kinase (Dagon *et al.*, 2007), a key regulator of energy balance that also controls cognitive function via regulation of neurogenesis and neuroapoptosis. These results identify CB2 as a novel protective target of encephalopathy. However, further studies are awaited to fully clarify the respective contribution of CB1 and CB2 receptors in this process.

In conclusion, recent studies have unravelled pleiotropic functions of CB2 receptors under physiological and pathological conditions, including acute and chronic liver diseases (Figure 1). Additional functions may soon arise, since recent studies have reported an upregulation of CB2 receptors in non-alcoholic fatty liver disease and in hepatocellular carcinoma (Xu *et al.*, 2006). These findings may open novel therapeutic avenues, upon clinical development of CB2-specific molecules.

Acknowledgements

This work was supported by the INSERM, the Université Paris-Val-de-Marne, and by grants (to SL) of the Agence Nationale de la Recherche, Fondation pour la Recherche Médicale and Sanofi-Aventis.

Conflicts of interest

Part of the work described in this review was supported by a grant from Sanofi-Aventis (to SL).

References

- Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, Okun A, Zolotarev O, Silberman I *et al.* (2005). Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol Dis* 12: 12.
- Batkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P *et al.* (2007). Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J* 21: 1788–1800.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82: 1131–1149.
- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC *et al.* (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 396: 141–149.
- Dagon Y, Avraham Y, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM (2007). Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase. *FASEB J* (in press).
- Davaille J, Gallois C, Habib A, Li L, Mallat A, Tao J *et al.* (2000). Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J Biol Chem* 275: 34628–34633.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3: 771–784.
- Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A *et al.* (1998). Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate Cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 273: 23183–23190.
- Guzman M, Galve-Roperh I, Sanchez C (2001). Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* 22: 19–22.
- Hezode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES *et al.* (2005). Daily cannabis smoking as a risk factor for fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 42: 63–71.
- Huffman JW (2005). CB2 receptor ligands. *Mini Rev Med Chem* 5: 641–649.
- Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Tran-Van-Nhieu J, Li L, Karzak M *et al.* (2005). Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 128: 742–755.
- Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K *et al.* (1998). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett* 429: 152–156.
- Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A (2005). Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 45: 605–628.
- Mallat A, Fouassier L, Preaux AM, Gal CS, Raufaste D, Rosenbaum J *et al.* (1995). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor mediated pathway. *J Clin Invest* 96: 42–49.
- Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Maclouf J, Mavier P *et al.* (1998). Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 273: 27300–27305.
- Mallat A, Lotersztajn S (2006). Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *J Endocrinol Invest* 29: 58–65.
- Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Lotersztajn S (2007). Cannabinoid receptors as new targets of antifibrotic strategies during chronic liver diseases. *Expert Opin Ther Targets* 11: 403–409.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58: 389–462.
- Pertwee RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635–664.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez De Fonseca F (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21: 218–224.
- Portier M, Rinaldi-Carmona M, Pecceu F, Combes T, Poinot-Chazel C, Calandra B *et al.* (1999). SR 144528, an antagonist for the peripheral cannabinoid receptor that behaves as an inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 582–589.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C *et al.* (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 644–650.
- Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran-Van-Nhieu J, Deveaux V, Serriere-Lanneau V *et al.* (2006). CB1 cannabinoid receptor antagonism: a novel strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 12: 671–676.
- Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J *et al.* (2006). Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 171: 31–38.