

**ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la vie et de la Santé**  
**Laboratoire de Neurobiologie et de Pharmacologie Cardiovasculaire**

# THÈSE présentée par :

**Maud WEISS**

soutenue le : **30 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé, spécialité pharmacologie

**Etudes des effets cardio-métaboliques d'une  
aminopyrroline sympatho-inhibitrice dans un modèle  
de syndrome métabolique chez le primate non humain.  
Mise en évidence des mécanismes d'action impliqués.**

## THÈSE dirigée par :

Monsieur **Pascal BOUSQUET**

Co-directeur

PU-PH, Université de Strasbourg

Madame **Nathalie NIEDERHOFFER**

Directeur

MCU-HDR, Université de Strasbourg

## RAPPORTEURS :

Madame **Céline DEMOUGEOT**

Rapporteur externe

PU, Université de Franche-Comté

Monsieur **Atul PATHAK**

Rapporteur externe

PU-PH, Clinique Pasteur, Toulouse

---

## AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame **Séverine SIGRIST**

Examineur

PhD, CEED, Strasbourg

Madame **Lyne FELLMANN**

Examineur

PhD, SILABE, Strasbourg

## Remerciements

Mon travail de thèse a commencé en octobre 2012 et constitue l'aboutissement de quatre années de travail au LNPCV. La rédaction de ce manuscrit m'a permis de me rendre compte que les personnes rencontrées au cours de mon parcours m'ont apporté la générosité, la bonne humeur, et tout l'intérêt nécessaire à la réalisation de mes travaux de recherche et à mon épanouissement personnel. Je tiens donc à témoigner toute ma reconnaissance à ceux qui ont cru en moi et qui ont, d'une certaine manière, constitué « le moteur » de mes recherches.

A ma directrice de thèse, le Docteur Nathalie NIEDERHOFFER, merci pour tout ! Vous êtes, comme je vous l'ai déjà dit, bien plus que ma directrice de thèse, un peu comme ma « maman de labo » ! Votre soutien, votre dynamisme (même en cas de pipotension), vos conseils et vos coups de nerf ont participé grandement à la réussite de cette thèse. J'ai également apprécié à juste titre vos qualités humaines. Nous avons partagé bien plus qu'un travail de thèse au cours de ces 4 années passées ensemble mais je ne donnerai pas de détails ... Pour faire court, même si cela est difficile et que mon départ ne changera pas notre complicité : Nathalie, tu vas me manquer ☺ ☺ ☺ !!!!

Au Professeur Pascal BOUSQUET, mon second directeur de thèse, qui m'a accueilli au sein de son équipe de recherche en 2012. Vous m'avez accordé votre confiance pour la prise en charge d'un projet cher à vos yeux, et j'en ai été honorée. Vous m'avez également transmis votre savoir et votre désir de toujours mieux faire. Malgré mes difficultés à communiquer, vous avez pris le temps de m'expliquer à quel point cela pouvait être enrichissant. Vous m'avez donné l'opportunité de m'accomplir professionnellement et personnellement, et pour cela, un grand merci.

Au professeur Laurent MONASSIER, directeur du LNPCV, qui a participé à ma formation en me procurant de nombreux conseils et anecdotes et en me formant (un certain nombre de fois) aux échographies cardiaques. Malgré vos nombreuses responsabilités, vous trouviez le temps de nous écouter et de participer à nos débats, pas toujours scientifiques je l'avoue, lors du déjeuner. Encore merci, et plein de bonnes choses pour la suite du labo.

Aux Docteurs et Professeurs Lyne FELLMANN, Céline DEMOUGEOT, Séverine SIGRIST et Atul PATHAK. Merci de m'avoir fait l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail en tant qu'examineurs ou rapporteurs.

Merci plus particulièrement à Lyne FELLMANN, ou « Mamie » pour les intimes, qui m'a soutenu et a grandement participé à la réussite d'un des volets de cette thèse. Tu as été un pilier, une personne sur qui me reposer quand j'ai été confrontée à des difficultés. Merci pour tout ! Ils nous en auront fait baver ces ouistitis (Chopper et compagnie ...), des après-midi entiers tous enfermés dans la salle de chirurgie. J'en profite pour remercier Pierrick, Laurent et Fred pour leur disponibilité et leur participation active à la gestion du projet. Merci également au centre de primatologie de Strasbourg et à la plateforme SILABE ADUEIS, en la personne de Fanélie WANERT, sans qui ma rencontre avec les primates aurait été impossible.

J'aimerais à présent remercier toute l'équipe du LNPCV pour ces superbes années :

Sylvia 2.0, ou mamie Suze, on se connaît depuis peu finalement, puisque tu es arrivée bien après moi ... Mais si notre amitié n'avait pas existé, il aurait fallu l'inventer. Nous avons peu travaillé ensemble, et c'est bien dommage, je vais donc me pencher sur notre amitié. Toi et moi, nous sommes comme les doigts de la main (bon j'avoue, ça dépend des jours, voir même de l'heure, toi-même tu sais, et Nathalie aussi d'ailleurs !!!). Tu fais partie de ces personnes qui méritent d'être connues et appréciées à leur juste valeur. Ta bonne humeur, ton humour, ta gentillesse font de toi une de mes plus proches amies. Tu as égayé les journées de ces deux dernières années de thèse et je t'en remercie. Tout comme Nathalie, tu comptes beaucoup pour moi et vas beaucoup me manquer !! Mais ne t'en fais pas, nous irons promener Toby ensemble.

Merci à Hugues ! Je suis ton père ... ☺ ☺ Vous m'avez appris de nombreuses choses, les bases de la biologie moléculaire, le binding, et avez rendu la pharmacologie plus attrayante et accessible... J'aimerais également vous remercier pour nos discussions et nos remarques plus que pertinentes sur notre petit tableau blanc, nous avons même pu en tirer un dicton : ça vaut le coup de chercher pour trouver. Merci pour tous ces moments !

Merci à Gaëlle et Estelle, pour les moments, qu'ils aient été tristes ou joyeux, passés ensemble. Nos relations, qui ont pu être quelques fois houleuses, m'ont permis de grandir. Gaëlle, quelques unes de tes remarques resteront gravées dans mon esprit et elles m'auront faites énormément rire. Estelle, certaines de tes anecdotes pendant nos repas de midi resteront également mythiques. Je vous remercie pour vos conseils scientifiques et votre expertise en pharmaco, cela m'a souvent été d'une grande aide. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour la suite.

Merci à Houda, pour ta culture, ton ouverture d'esprit et les supers moments que nous avons passé ensemble. Je te souhaite beaucoup de courage et de réussite pour ton futur.

Merci à Sylvia M. pour la résolution de problèmes administratifs et les commandes souvent passées au dernier moment.

Denise, je retiendrai votre gentillesse et votre disponibilité quelque soit le problème concerné. Je garderai également en tête nos congrès, vos bonbons, les sticks qu'Hugues ramenait dans mon bureau en cas de coup dur, et nos restaurants avec M. Bousquet pendant lesquels nous faisions connaissance différemment. Merci encore !

J'aimerais également remercier des « anciens » du LNPCV, qu'ils aient été personnel technique ou stagiaires :

Magali ! Un petit bout de femme comme il est rare d'en rencontrer. Tu es au top, toujours enjouée, de bonne humeur... Ton rire reconnaissable parmi des milliers résonne encore dans ma tête à la seule prononciation de ton prénom ! Sans toi, certaines manips auraient été beaucoup plus longues et ennuyantes. Je me souviens d'ailleurs de la petite souris qui tousse et de nos fous rires ... Magali, un énorme merci pour tout ce que nous avons partagé !

Afin de rebondir sur la petite souris qui tousse, j'en profite pour remercier Florian ! Je crois qu'on a vécu des moments inoubliables : les 24h du rat, la manipulation des souris...Merci pour tout ! Je garde un excellent souvenir de ton passage au labo et un ami, vos départs à toi et à Magali ont laissé un grand vide ! Je te souhaite une thèse et une carrière brillante, tu le mérites !!!

Djamil, ou magic Djamil, ton passage au labo ne nous a pas permis de faire connaissance mais nous nous sommes rapidement rattrapés ! Ta soutenance fut un moment mémorable !

Alizée, tu es arrivée à la fin de ma thèse et je n'ai pas suffisamment eu de moments disponibles pour passer du temps avec toi au labo. Néanmoins, je pense que certains moments sont déjà devenus mythiques. Je te souhaite tout le bonheur et toute la réussite dont tu auras besoin ! Soit courageuse, tu es faite pour ça, je te le garantis.

J'aimerais à présent adresser mes sincères remerciements à tous les membres de ma famille, qui n'ont très certainement toujours pas compris en quoi consistaient mes études mais qui ont été présents lorsque c'était nécessaire. Je remercie plus particulièrement mes parents et ma sœur. Vous avez fait de moi ce que je suis actuellement et vous devez une grande partie de ce travail. Vous m'avez apporté votre soutien tout au long de mes études et je vous dis merci. Audrey, toi-même tu sais le lien qui nous unit ! Je te dis Merci pour le soutien que tu m'apportes au quotidien,



mais plus particulièrement pour ta présence en ce dernier jour de rédaction. Tu as su trouver les mots pour me réconforter et me faire reprendre confiance en moi. Vous êtes tout pour moi et même si je ne suis pas du genre à montrer mes sentiments, je vous aime.

Enfin, merci à Loïc qui partage mon quotidien depuis 10 ans. Tu as soutenu mes choix et m'a suivi lorsqu'il a fallu changer de vie pour entreprendre de nouvelles études. Tu as supporté mes changements d'humeurs et mon caractère de cochon lors de ces quatre années de thèse, et plus particulièrement ces dernières semaines qui ont été synonymes de doutes, d'angoisse et de remise en question. Ta présence fut un élément essentiel à ma réussite, merci pour tout !

A mes collègues, ma famille, mes amis, à vous tous, je vous dis merci !

## Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Première partie : Données bibliographiques .....</b>	<b>2</b>
 I. Le syndrome métabolique.....	3
I.1. Définitions et classification.....	3
I.2. Symptômes, diagnostic et complications cardiovasculaires et métaboliques .....	7
II. Epidémiologie.....	9
II.1. Etats Unis.....	9
II.2. Europe.....	11
II.3. Pays en voie de développement : Asie et Afrique.....	13
III. Physiopathologie du Syndrome métabolique.....	15
III.1. Métabolisme glucidique.....	16
III.1.1. Insuline et transmission du signal insulinique.....	16
III.1.2. Insulino résistance.....	18
III.2. Métabolisme lipidique.....	24
III.3. Anomalies associées.....	25
III.3.1. Hypertension artérielle.....	25
III.3.2. Hyperactivation du système nerveux sympathique (SNS).....	26
III.3.3. Hyperactivité du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	26
III.3.4. Dysfonctionnement du baroréflexe.....	27
III.3.5. Dysfonctions endothéliales.....	29
III.3.6. Les anomalies de la fibrinolyse.....	31
III.3.7. Inflammation métabolique chronique.....	31
III.3.8. Dérèglements du microbiote intestinal.....	32
IV. Le syndrome métabolique et le système nerveux sympathique.....	37
IV.1. Généralités sur le système nerveux autonome.....	37

IV.2. Effet direct du système nerveux sympathique sur la régulation de l'activité métabolique.	
IV.2.1. Au niveau du tissu adipeux.....	40
IV.2.2. Au niveau hépatique.....	43
IV.2.3. Le pancréas.....	44
IV.3. SNS et syndrome métabolique.....	47
IV.3.1. SNS et obésité.....	47
IV.3.2. SNS et insulino-résistance.....	48
IV.3.3. SNS et troubles lipidiques.....	50
IV.4. SNS et hypertension artérielle.....	51
V. Prise en charge actuelle du syndrome métabolique.....	53
V.1. Mesures hygiéno-diététiques.....	53
V.1.1. Alimentation.....	53
V.1.2. Activité physique.....	54
V.2. Prise en charge médicamenteuse.....	56
V.2.1. Sensibilisants à l'insuline.....	56
V.2.2. Les anti-hypertenseurs.....	57
V.2.3. Hypolipémiants.....	61
V.2.4. Limites thérapeutiques et conclusion.....	65
VI. Le récepteur des imidazolines de type 1 : nouvelle cible thérapeutique ?.....	66
VI.1. Les différents sous-types de récepteurs des imidazolines.....	66
VI.2. Le récepteur des imidazolines de type 1.....	67
VI.3. Le récepteur des imidazolines de type 1 et le syndrome métabolique.....	68

## **Deuxième partie : Objectifs .....71**

## **Troisième partie : Travaux Personnels .....75**

**1<sup>ère</sup> étude** : Etude des effets d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP599) dans un modèle de troubles métaboliques chez le primate non humain (marmouset, *Callithrix jacchus*) .....76

I. Contexte et objectifs.....77

II. Méthodologie.....79

    II.1. Le modèle de syndrome métabolique chez le primate non humain (marmouset, *Callithrix jacchus*):.....79

II.2. Mesures/Dosages/Analyses statistiques.....	79
III. Principaux résultats.....	81
III.1. Validation du modèle de troubles métaboliques chez le marmouset.....	81
III.2. Evaluation des effets bénéfiques du LNP599 chez les animaux présentant certains symptômes d'un SMet.....	81
1 <sup>ère</sup> publication (à soumettre).....	83
<b>2<sup>ème</sup> étude</b> : Amélioration de la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin d'intolérance au glucose grâce à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et à l'activation de la cascade de signalisation de l'AMPK .....	103
I. Contexte et objectifs.....	104
II. Méthodologie.....	105
II.1. Le modèle d'intolérance au glucose :.....	105
II.2. Etudes in vitro.....	105
II.2.1. Cellules rin m5F.....	105
II.2.2. Adipocytes primaires.....	106
II.2.3. Cellules HepG2.....	106
II.3. Mesures/Dosages/Analyses statistiques.....	106
III. Principaux résultats.....	108
2 <sup>ème</sup> publication (acceptée).....	109
<b>3<sup>ème</sup> étude</b> : Un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipidique en stimulant l'AMPK Méthodologie.....	118
I. Contexte et objectifs.....	120
II. Méthodologie.....	122
II.1. AMPK.....	122
II.2. AKT.....	122
II.3. Association entre AMPK et AKT.....	122
II.4. ACC.....	123
II.5. Stéatose hépatique.....	123
II.6. Statistiques.....	124
III. Principaux résultats.....	125
3 <sup>ème</sup> publication (à soumettre).....	126

<b>Quatrième partie : Discussion générale, perspectives, conclusions .....</b>	<b>142</b>
<b>I. Résumé des résultats.....</b>	<b>143</b>
I.1. Etude des effets d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP599) dans un modèle de troubles métaboliques chez le primate non humain (marmouset, <i>Callithrix jacchus</i> ).....	143
I.1.1. Validation du modèle accéléré de troubles métaboliques associés au SMet chez le marmouset.....	143
I.1.2. Evaluation des effets bénéfiques du LNP599 chez les animaux présentant certains symptômes d'un SMet.....	144
I.2. Etude des effets périphériques d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP509) - Amélioration de la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin d'intolérance au glucose grâce à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et à l'activation de la cascade de signalisation de l'AMPK.....	145
I.3. Un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipidique grâce à son action sur l'AMPK, un acteur clé de l'homéostasie énergétique.....	146
<b>II. Conclusion / perspectives.....</b>	<b>148</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>14851</b>

## Liste des abréviations

<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone	<b>Foxo1</b>	Forkhead box protein O1
<b>AACE</b>	American Association of Clinical Endocrinologists	<b>GLP-1</b>	Glucagon like peptide 1
<b>ACC</b>	Acétyl-CoA carboxylase	<b>Glut</b>	Transporteur de glucose
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate	<b>GS</b>	Glycogen synthase
<b>AGL</b>	Acides gras libres	<b>GS-GP</b>	Glycogen synthase-glycogen phosphorylase kinase
<b>AgRP</b>	Agouti related protein	<b>GSK3</b>	Glycogen synthase kinase 3
<b>AKT/PKB</b>	Protein kinase B	<b>G-6-P</b>	Glucose-6-phosphate
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique	<b>G6Pase</b>	Glucose-6-phosphatase
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase		
<b>ARC</b>	Noyau arqué	<b>HbA1c</b>	Hémoglobine glyquée
<b>ARA2</b>	Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II	<b>HDL</b>	High density lipoprotein
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger	<b>HK</b>	Hexokinase
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>HTA</b>	Hypertension artérielle
<b>AT1</b>	Récepteur de l'angiotensine II de sous type 1	<b>HTCZ</b>	Hydrochlorothiazide
		<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>CART</b>	Cocain and amphetamin related transcript	<b>IEC</b>	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
<b>CBP</b>	CREB binding protein	<b>IKK</b>	I $\kappa$ B kinase
<b>CCK</b>	Cholécystokinine	<b>IL</b>	Interleukine
<b>CREB</b>	C-AMP response element-binding protein	<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>ChREBP</b>	Carbohydrate response element-binding protein	<b>IML</b>	Colonne inter-médio-latérale
<b>CRP</b>	C-reactive protein	<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1-4-5-triphosphate
<b>CRTC2</b>	CREB regulated transcription coactivator 2	<b>IRAS-1</b>	Imidazoline receptor antisera-selected
		<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
		<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>DAG</b>	Diacylglycérol	<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>DECODE</b>	Diabetes epidemiology: collaborative analysis of diagnostic criteria in Europe	<b>LDL-R</b>	Low density lipoprotein receptor
		<b>LH</b>	Hypothalamus lateral
<b>DESIR</b>	Data epidemiological study on the insulin resistance syndrome	<b>LHS</b>	Lipase hormono-sensible
<b>DMV</b>	Noyau dorsal moteur du nerf vague	<b>LPL</b>	Lipoprotéine lipase
<b>DT2</b>	Diabète de type 2	<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>EC</b>	Enzyme de conversion	<b>MC</b>	Mélanocortine
<b>EDHF</b>	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium	<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>EGIR</b>	European Group for the study of Insulin Resistance	<b>MONICA</b>	Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease
<b>ENNS</b>	Etude nationale nutrition santé	<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase	<b>NADH</b>	forme réduite du NAD
<b>ET<sub>1</sub></b>	Endothéline 1	<b>NCEP/ATP</b>	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase	<b>NHANES</b>	National Health and Nutrition Examination Survey
<b>FIAF</b>	Fasting induced adipose factor	<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
		<b>NPC1L1</b>	Niemann-Pick C1-Like 1

<b>NPY</b>	Neuropeptide Y	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>NFS</b>	Noyau du faisceau solitaire	<b>RVLM</b>	Partie rostro-ventro-latérale du bulbe rachidien
<b>PA</b>	Pression artérielle	<b>SCFA</b>	Acide gras à courte chaîne
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor-1	<b>SHHF</b>	Spontaneously hypertensive, heart failure
<b>PC-PLC</b>	Phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine	<b>SHR</b>	Spontaneously hypertensive rats
<b>PCSK9</b>	Proprotein-convertase subtilisein/kexin type 9	<b>SMet</b>	Syndrome métabolique
<b>PDH</b>	Pyruvate déshydrogénase	<b>SN</b>	Système Nerveux
<b>PEPCK</b>	Phosphoénol pyruvate carboxykinase	<b>SNA</b>	Système nerveux autonome
<b>PFK-1</b>	Phosphofructokinase-1	<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandine	<b>SNP</b>	Système nerveux parasympathique
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostacycline	<b>SNS</b>	Système nerveux sympathique
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol biphosphate	<b>SRAA</b>	Système rénine-angiotensine-aldostérone
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl-inositol 3 kinase	<b>SREBP</b>	Sterol response element-binding protein
<b>PKA</b>	Protéine kinase A		
<b>PKC</b>	Protéine kinase C	<b>TA</b>	Tissu adipeux
<b>PLC</b>	Phospholipase C	<b>TAV</b>	Tissu adipeux viscéral
<b>POMC</b>	Pro-opiomélanocortine	<b>TC</b>	Tronc cérébral
<b>PPAR</b>	<a href="#">Peroxisome proliferator-activated receptor</a>	<b>TG</b>	Triglycérides
<b>PVN</b>	Noyau paraventriculaire	<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>PYY</b>	Peptide YY	<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxane A2
<b>RI<sub>1</sub></b>	Récepteur des imidazolines de type 1	<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein
<b>RI<sub>2</sub></b>	Récepteur des imidazolines de type 2	<b>VMN</b>	Noyau ventromédian
<b>RI<sub>3</sub></b>	Récepteur des imidazolines de type 3	<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>RMN</b>	Résonnance magnétique nucléaire		





## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Cascade de signalisation de l'insuline / GSK3	17
<b>Figure 2</b> : Implication de l'insuline dans la régulation de la néoglucogenèse	18
<b>Figure 3</b> : Le cycle glucose-acide gras de Randle	20
<b>Figure 4</b> : Reformulation des mécanismes biochimiques du cycle de Randle	21
<b>Figure 5</b> : Mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline	22
<b>Figure 6</b> : Mécanismes d'action du système rénine-angiotensine-aldostérone	27
<b>Figure 7</b> : Schéma de la boucle baroréflexe	28
<b>Figure 8</b> : Molécules impliquées dans la régulation de la fonction endothéliales	30
<b>Figure 9</b> : Mécanisme de régulation de stockage des acides gras par le microbiote intestinal	34
<b>Figure 10</b> : Régulation de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus	40
<b>Figure 11</b> : Lipolyse et récepteurs $\beta$ -adrénergiques	41
<b>Figure 12</b> : Lipolyse médiée par les récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques	42
<b>Figure 13</b> : Cascade de signalisation de la régulation de la glycogène phosphorylase activée par la noradrénaline dans le foie	44
<b>Figure 14</b> : Régulation locale de la sécrétion d'insuline	45
<b>Figure 15</b> : Les inhibiteurs du SRAA	58
<b>Figure 16</b> : Formule chimique du LNP599	69

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Tableau récapitulatif des définitions du syndrome métabolique	7
<b>Tableau 2</b> : Affinité du LNP599 déterminée par des études de liaison spécifique sur des préparations membranaires de cellules PC12	69
<b>Tableau 3</b> : caractéristiques des différents régimes	79
<b>Tableau 4</b> : Effets d'un régime enrichi en graisse et en glucose et d'un traitement par le LNP599 chez le primate non humain	144

## Publications et communications scientifiques

Publications dans des journaux internationaux: 1 acceptée, 3 à soumettre

1. **Weiss M**, Bouchoucha S, Aiad F, Ayme-Dietrich E, Dali-Youssef N, Bousquet P, Greney H, and Niederhoffer N. Imidazoline-like receptor drugs improve glucose tolerance and insulin sensitivity through stimulation of adiponectin pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309(2):E95-E104, 2015.
2. **Weiss M**, Aubertin G, Traversi F, Dali-Youssef N, Choquet P, Monassier L, Bousquet P, Niederhoffer N. Effects of a type 1 imidazoline receptor ligand in fa/fa Zucker rats. Publication en préparation, à soumettre en septembre 2016.
3. **Weiss M**, Fellmann L, Wanert F., Monassier L, Bousquet P, Niederhoffer N. Effects of a type 1 imidazoline receptor ligand in an accelerated model of metabolic disorders in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Publication en préparation, à soumettre en juillet 2016.
4. **Weiss M**, Benameur D, Monassier L, Greney H, Bousquet P, Niederhoffer N, I<sub>1</sub> Imidazoline receptor ligand improves insulin sensitivity and lipid metabolism in HepG2 cells through an action on the cellular energy sensor AMPK. Publication en préparation, à soumettre en juillet 2016.

Communications aux congrès (\* : communications orales) :

1. **Weiss M.**, Aubertin-Kirch G., Greney H., Monassier L., Bousquet P., Niederhoffer N. “Imidazoline-like drug improves lipid metabolism in hepatic cell through a direct action on the cellular energy sensor AMPK”. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 8(3):214, 2016.
2. Aubertin-Kirch G., **Weiss M.**, Bousquet P., Monassier L., Niederhoffer N. “Involvement of the sympathetic nervous system in the development of carbohydrate metabolism disorders”. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 8(3):210, 2016.

3. **Weiss M.**, Aubertin-Kirch G., Greney H., Monassier L., Bousquet P., Niederhoffer N. "I<sub>1</sub> Imidazoline receptor ligand improves lipid metabolism and steatosis in HepG2cells through an action on the cellular energy sensor AMPK". *Fundamental and clinical pharmacology*. 30(1):31, 2016.
4. Aubertin G., **Weiss M.**, Bousquet P., Monassier L., Niederhoffer N. "The role of the sympathetic hyperactivity in the development and modulation of glucose metabolism". *Fundamental and clinical pharmacology*. 30(1):20, 2016.
5. **Weiss M\***, Traversi F, Bousquet P, Greney H, Niederhoffer N. "Imidazoline-like drug improve insulin sensitivity through a direct stimulation of adiponectin secretion in primary adipocytes" *Archives of cardiovascular diseases supplements*, 7 (2):140, 2015.
6. Aubertin-Kirch G., **Weiss M.**, Traversi F., Bousquet P., Monassier L., Niederhoffer N. "Involvement of the sympathetic nervous system in the development of metabolic disorders". *Archives of cardiovascular diseases supplements*, 7 (2):139, 2015.
7. **Weiss M**, Traversi F, Bousquet P, Greney H, Niederhoffer N. "Imidazoline-like drug improve insulin sensitivity through a direct stimulation of adiponectin secretion in primary adipocytes". *Fundamental and clinical pharmacology*. 2015.
8. **Weiss M\***, Benameur D, Bousquet P, Niederhoffer N, Greney H. "I<sub>1</sub> receptor ligands activate hepatic adiponectin pathways and thus improve insulin sensitivity". *Fundamental and clinical pharmacology*, 28(1):p4, 2014.
9. **Weiss M**, Benameur D, Aubertin G, Bousquet P, Niederhoffer N, Greney H. "Imidazoline I<sub>1</sub> receptor ligands activate hepatic adiponectin pathways and thus improve insulin sensitivity". *Archives of cardiovascular diseases supplements*, 26(1):p13, 2014.

10. Niederhoffer N, Bouchoucha S, **Weiss M**, Greney H, and Bousquet P. “Effects of imidazoline-like drugs on insulin sensitivity and adiponectin pathway”. *Fundamental and clinical pharmacology*, 27 (suppl.1), p17, 2013.

## Introduction générale

Le syndrome métabolique (SMet) est caractérisé par la conjonction de divers troubles cardiovasculaires (hypertension artérielle entre autres) et métaboliques (résistance à l'insuline, intolérance au glucose, hypercholestérolémie, obésité abdominale). La conjonction de ces symptômes est unanimement reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire et métabolique majeur, les principales complications du SMet étant l'athérosclérose, la maladie coronaire, l'insuffisance rénale, l'insuffisance cardiaque, le diabète et l'obésité. Une hyperactivité du système nerveux sympathique pourrait être impliquée dans le développement du SMet. Nos travaux visent à tester les hypothèses selon lesquelles (1) il pourrait y avoir une relation de cause à effet entre l'hyperactivité sympathique et le SMet, et (2), l'hyperactivité sympathique pourrait constituer un axe de recherche pour le développement de nouveaux médicaments. Les récepteurs  $I_1$  des imidazolines ( $RI_1$ ) identifiés par notre équipe (Bousquet et al, 1984) ont une action sympatho-inhibitrice et représentent donc une cible de choix pour le développement de nouveaux médicaments. Dans notre laboratoire, des études de pharmaco-chimie ont permis de synthétiser une série d'amino-pyrrolines sélectives des  $RI_1$  induisant une diminution de la pression artérielle. Cette sélectivité permet de s'affranchir des effets métaboliques délétères liés à l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, cibles des médicaments antihypertenseurs sympatho-inhibiteurs actuels. Des études réalisées sur un modèle murin de SMet nous ont permis de sélectionner un chef de file, le LNP599, qui diminue la pression artérielle et présente en parallèle des effets bénéfiques sur plusieurs paramètres métaboliques. Des effets périphériques additionnels ont également été remarqués et semblent faire intervenir l'adiponectine. Cette molécule sympatho-inhibitrice a été brevetée par notre université (brevet initial déposé le 19/04/11). Le premier objectif de ma thèse a consisté au développement d'un modèle original de SMet chez le primate non humain (PNH / marmouset) pour y tester l'intérêt thérapeutique du LNP599. Ce modèle représente une alternative plus pertinente que les modèles murins utilisés habituellement. En effet, les dyslipidémies observées chez les rongeurs sont différentes de celles de l'Homme alors que celles du primate en sont proches puisque la proportion de HDL cholestérol par rapport au cholestérol total (HDLchol/TOTchol) est diminuée. Des différences au niveau de la balance sympatho-vagale sont également observées entre le rongeurs et l'Homme alors que celle du primate non humain est semblable. De plus, le passage à l'étude des effets du LNP599 chez le primate représente une étape importante avant le développement clinique de la molécule. Le second objectif majeur fut d'étudier les effets périphériques potentiels des ligands  $RI_1$ . Ces études ont été menées (1) chez le rat âgé, un modèle d'insulino-résistance modérée, en utilisant un ligand  $RI_1$  incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique, le LNP509, et (2) sur une des cellules cibles de l'insuline dérivant d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2.

**1<sup>ère</sup> partie :**  
**Données bibliographiques**

# I. Le syndrome métabolique

## I.1. Définitions et classification

La notion de syndrome métabolique (SMet) a été abordée pour la première fois dans les années 20 en tant que « concept ». C'est un médecin suédois, Kylin, qui a décrit ce syndrome comme la conjonction de divers symptômes : hypertension artérielle (HTA), hyperglycémie et concentration sanguine élevée en acide urique, pathologie plus communément appelée « la goutte » (Kylin, 1923). En 1965, Avogaro et Crepaldi confirment l'existence d'un syndrome regroupant HTA, hyperglycémie et obésité [1]. C'est en 1988 que le concept de « syndrome X » fut proposé par Reaven [2] afin de regrouper des anomalies métaboliques (intolérance au glucose, résistance à l'insuline, dyslipidémies) et cardiovasculaires (HTA). Par la suite, d'autres critères tels que l'obésité [3], se sont ajoutés à la définition de ce syndrome, actuellement plus connu sous le nom de « syndrome métabolique ». En 1992, une corrélation est établie entre le syndrome X et une concentration plasmatique d'insuline élevée [4]. Haffner et son équipe deviennent ainsi les premiers à établir le lien entre insulino-résistance et troubles métaboliques et parlent de « syndrome d'insulino-résistance ». Quelques années plus tard, Vague met en évidence l'importance de l'obésité viscérale presque systématiquement associée à des anomalies métaboliques retrouvées dans le diabète de type 2 (DT2) et certaines maladies cardiovasculaires [5].

Rapidement, les communautés scientifiques et médicales tentent de développer des critères diagnostiques nécessaires à l'établissement de la définition exacte du SMet. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, WHO, World Health Organization) propose en 1998 la première définition officielle du SMet [6]. Cette définition initiale place la résistance à l'insuline comme composant majeur du SMet, chacun des autres symptômes représentant un risque supplémentaire de complications cardiovasculaires. Dans cette définition, au moins deux des critères suivants doivent s'ajouter à une anomalie du métabolisme glucidique (intolérance au glucose, augmentation de la glycémie à jeun, DT2, insulino-résistance) : augmentation de la pression artérielle (PA), de la concentration plasmatique de triglycérides (TG), obésité abdominale et micro-albuminurie.

### Définition de la WHO :

- PA  $\geq 140/90$  mmHg
- Dyslipidémies Triglycérides  $\geq 1.7$  mmol/L ou  
HDL  $< 0.9$  mmol/L ♂  
HDL  $< 1$  mmol/L ♀
- Indice de Masse Corporelle (IMC)  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>
- Ratio taille/hanche  $> 0.9$  ♂ et  $> 0.85$  ♀
- Microalbuminémie  $> 20$  µg/min

En 1999, l'EGIR (European Group for the study of Insulin Resistance) propose une définition plus simple à utiliser en clinique [7]. Le SMet est alors décrit sous le nom de « syndrome de résistance à l'insuline » en raison du rôle central de l'insulino-résistance. Le SMet est défini par ce groupe comme une résistance à l'insuline ou une hyperinsulinémie à jeun à laquelle sont ajoutés 2 des critères suivants : hyperglycémie à jeun, HTA, dyslipidémies et obésité abdominale. Dans le cadre de la définition proposée par la WHO, la mesure de la résistance à l'insuline était réalisée grâce à la technique du clamp euglycémique, plus difficile à mettre en œuvre qu'une mesure de l'insulinémie à jeun. Dans la définition proposée par l'EGIR, les valeurs seuils de la PA et les niveaux plasmatiques de TG et de HDL-C (*High density lipoprotein cholesterol*) sont modifiées. De plus, l'obésité abdominale est dorénavant évaluée par la mesure du tour de taille plutôt que par le rapport taille/hanche, le tour de taille reflétant mieux l'accumulation de masse grasse au niveau abdominal.



**Définition de l'EGIR :**

- Glycémie à jeun (excluant diabète)  $\geq 6.1$  mmol/L
- PA (ou patient sous traitement anti-hypertenseur)  $\geq 140/90$  mmHg
- Dyslipidémies Triglycérides  $\geq 2$  mmol/L ou  
HDL  $< 1$  mmol/L
- Tour de taille  $\geq 94$  cm ♂ et  $\geq 85$  cm ♀

En 2001, la NCEP/ATP (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel) crée une nouvelle définition [8]. Le diagnostic se fait dorénavant lorsqu'un patient présente 3 facteurs de risque sur les 5 retenus par la NCEP/ATP : obésité abdominale, hypertriglycéridémie, diminution du HDL-C, PA élevée et hyperglycémie à jeun. Par rapport à la définition fournie par l'EGIR, les valeurs seuils du tour de taille sont revues à la hausse tandis que les valeurs diagnostiques de PA, d'HDL-C et de TG sont abaissées.

**Définition de la NCEP/ATP :**

- Glycémie à jeun  $\geq 6.1$  mmol/L
- PA  $\geq 130/85$  mmHg
- Dyslipidémies Triglycérides  $\geq 1.7$  mmol/L ou  
HDL  $< 1$  mmol/L ♂  
HDL  $< 1.3$  mmol/L ♀
- Tour de taille  $> 102$  cm ♂  
 $> 88$  cm ♀

En 2003, l'AACE (American Association of Clinical Endocrinologists) repositionne le rôle de la résistance à l'insuline. Ce trouble était jusque là considéré comme un facteur de risque de développer le SMet et non comme un trouble inhérent à celui-ci. Dans sa nouvelle définition, l'AACE ne fournit pas de définition précise du SMet [9]. L'AACE met l'accent sur l'élévation des TG, un faible taux de HDL-C, une augmentation de la PA et de la glycémie à jeun et exclut l'obésité abdominale. Cette définition permet au clinicien d'utiliser les critères diagnostiques qui lui semblent les plus appropriés. Au vu de la prolifération des définitions du SMet, il apparaît clairement qu'une unique définition internationale devient nécessaire au diagnostic du SMet.

Dans le but d'harmoniser les définitions déjà disponibles, l>IDF (International Diabetes Federation) propose un consensus international à partir de la définition du NCEP/ATP. Selon les experts, l'obésité reprend une position centrale en raison de sa prévalence grandissante et des corrélations établies avec le risque cardiovasculaire. Elle devient un symptôme indispensable à l'établissement du diagnostic de SMet et doit être associée à deux des quatre paramètres suivants : augmentation des TG plasmatiques, de la PA, de la glycémie à jeun et diminution du taux de HDL-C. De plus, les mesures de tour de taille et l'évaluation du niveau d'obésité abdominale prennent désormais en compte l'origine ethnique des patients.

### Définition de l'IDF, tour de taille en fonction des ethnies :

- |                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| • Européens                        | ♂ $\geq 94$ cm  |
|                                    | ♀ $\geq 80$ cm  |
| • Non européens                    | ♂ $\geq 102$ cm |
|                                    | ♀ $\geq 88$ cm  |
| • Sud-asiatique, chinois, japonais | ♂ $\geq 90$ cm  |
|                                    | ♀ $\geq 80$ cm  |

Le SMet est donc défini comme la conjonction de troubles physiologiques, biochimiques, cliniques et métaboliques augmentant le risque de maladies cardiovasculaires, d'athérosclérose et de DT2 [10], l'ensemble contribuant à la morbi-mortalité de ce syndrome. Toutes les définitions proposées regroupent des anomalies métaboliques et cardiovasculaires semblables, mais des seuils de détection variables. Les définitions de l'AACE, de l'EGIR et de la WHO sont essentiellement basées sur le diagnostic d'une insulino-résistance, mise en évidence grâce à la technique du clamp euglycémique, test plus aisément utilisé en laboratoire de recherche qu'en clinique. La définition fournie par la NCEP/ATP utilise quant à elle des données plus facilement applicables à la clinique et aux études épidémiologiques. En proposant une définition tenant compte de l'origine ethnique des patients, l'IDF solutionne un problème majeur concernant l'établissement du seuil d'obésité et des risques associés. En effet, le risque de développer un DT2 apparaît à un niveau d'obésité inférieur dans la population asiatique comparée aux européens. Par rapport aux autres définitions, la définition de l'IDF prend en compte des différences de tour de taille et de poids en fonction des ethnies, et donc d'un risque différent de développer des maladies métaboliques et/ou cardiovasculaires associées. L'ensemble des définitions sont récapitulées dans le tableau 1.

	WHO	EGIR	NCEP/ATP	AACE	IDF
<b>Critère obligatoire</b>	Troubles du métabolisme glucidique	Hyperinsulinémie à jeun			Obésité abdominale
<b>Nombre de critères secondaires</b>	2 ou +	2	3 ou +	3 ou +	2
<b>Glycémie</b>	Intolérance au glucose, augmentation de la glycémie à jeun ou diabète de type 2	≥ 6,1 mmol/L (110 mg/dl) (excluant diabète)	≥ 5,6 mmol/L (100 mg/dl)	≥ 5,6 mmol/L (100 mg/dl)	≥ 5,6 mmol/L (100 mg/dl) ou diabète de type 2
<b>Hypertension</b>	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg (ou anti-hypertenseur)	≥ 135/80 mmHg	≥ 135/80 mmHg	≥ 135/80 mmHg (ou anti-hypertenseur)
<b>Dyslipidémies</b>	Triglycérides : ≥ 1,7 mmol/L (150 mg/dl) ET/OU HDL cholestérol : < 0,9 mmol/L (35 mg/dl) ♂ < 1 mmol/L (39 mg/dl) ♀	Triglycérides : ≥ 2 mmol/L (178 mg/dl) ET/OU HDL cholestérol : < 1 mmol/L (39 mg/dl)	Triglycérides : ≥ 1,7 mmol/L (150 mg/dl) HDL cholestérol : < 1 mmol/L (39 mg/dl) ♂ < 1,3 mmol/L (50 mg/dl) ♀	Triglycérides : ≥ 1,7 mmol/L (150 mg/dl) HDL cholestérol : < 1 mmol/L (39 mg/dl) ♂ < 1,3 mmol/L (50 mg/dl) ♀	Triglycérides : ≥ 1,7 mmol/L (150 mg/dl) HDL cholestérol : < 1 mmol/L (39 mg/dl) ♂ < 1,3 mmol/L (50 mg/dl) ♀
<b>Obésité</b>	Taille/hanche : > 0,9 ♂ > 0,85 ♀ ET/OU IMC > 30 kg/m²	Tour de taille : ≥ 94 cm ♂ ≥ 80 cm ♀	Tour de taille : ≥ 102 cm ♂ ≥ 88 cm ♀	Tour de taille : ≥ 102 cm ♂ ≥ 88 cm ♀	Variable en fonction des ethnies
<b>Microalbuminurie</b>	≥ 20 µg/min				

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des définitions du syndrome métabolique

## I.2. Symptômes, diagnostic et complications cardiovasculaires et métaboliques

Le SMet se caractérise par la conjonction de troubles physiologiques et biochimiques, asymptomatiques dans la plupart des cas. Le diagnostic se fait lors d'un bilan médical de routine et est alors établi en fonction de la présence de facteurs de risques décrits précédemment : obésité abdominale, résistance à l'insuline, hyperglycémie à jeun, dyslipidémie et HTA. La définition du SMet varie en fonction du pays concerné ou de l'organisme de santé considéré. Parmi les nombreuses définitions citées, celle de l'IDF permet de répondre à des besoins cliniques et de recherches. Elle fournit également un outil de diagnostic simple et précis incluant des critères d'obésité propres et spécifiques aux ethnies. Les patients doivent présenter une obésité centrale basée sur la mesure du tour de taille dont la valeur seuil dépend du pays/de l'origine ethnique du

patient associée à deux des facteurs suivants : un taux élevé de TG ( $\geq 1.7$  mM), des faibles taux de HDL-C ( $< 1.03$  mM chez les hommes et  $< 1.29$  mM chez les femmes), une HTA (systolique  $\geq 135$  mmHg, diastolique  $\geq 80$  mmHg) et une hyperglycémie à jeun ( $\geq 5.6$  mM)/DT2 diagnostiqué précédemment).

## II. Epidémiologie

Les définitions du SMet les plus utilisées sont celles fournies par la WHO, la NCEP/ATP et l'IDF. L'existence de plusieurs définitions du SMet, qui diffèrent au niveau de détails cliniques et de l'établissement des valeurs seuils, rend l'évaluation de sa prévalence difficile. De plus, les études disponibles dans la littérature dépendent du pays considéré, du genre, du groupe ethnique, et de l'année de publication. Ces différences entraînent des variations épidémiologiques importantes et rendent difficile l'application d'une politique de santé publique adaptée. Cependant, il existe un consensus sur le fait que la prévalence mondiale du SMet est en constante augmentation. En 2014, Kaur et son équipe [11] rapporte une prévalence mondiale oscillant entre 10 et 84% en fonction de la région, de l'environnement (urbain/rural), de l'ethnie, de la définition utilisée, de l'âge et du sexe, tandis que l'IDF estime que le SMet touche 25% de la population. Dans le monde, les études épidémiologiques concernant le SMet sont de plus en plus fréquentes et se basent sur un ou plusieurs des critères cités précédemment. Dans ce paragraphe, une analyse des études les plus récentes est réalisée et classée en fonction des différentes régions du globe.

### II.1. Etats Unis

D'après les plus récentes estimations, et quelle que soit la définition utilisée, la population américaine compterait près de 50 millions de personnes atteintes du SMet. Aux Etats Unis, plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées au cours des 15 dernières années. En 2002, Ford et coll. [12] réalisent une étude observationnelle au sein d'une cohorte représentative de la population américaine dont les participants ont plus de 20 ans. Ils étudient les données recueillies à partir de la *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III, 1988-1994, 8814 personnes) et sont les premiers à évaluer la prévalence du SMet en fonction de plusieurs critères. En se basant sur la définition de la NCEP/ATP, ils estiment à ce moment que 47 millions d'américains, soit une personne sur quatre, sont atteints de SMet. La prévalence globale est semblable entre les hommes (24%) et les femmes (23.4%) bien qu'une élévation des TG et de la PA soit plus fréquemment observée chez les hommes. La prévalence du SMet est de 6.7% chez les personnes âgées de 20 à 29 ans, puis augmente à 43.5% et 42.0% pour les participants âgés de

60 à 69 ans et les plus de 70 ans, respectivement. Cependant, la prévalence globale dépend du groupe ethnique d'appartenance : 31.9% pour les américains d'origine hispanique, 31.9% pour les caucasiens, 23.8% chez les américains d'origine africaine et 21.6% pour les personnes appartenant à une autre ethnie. De plus, la prévalence du SMet est 57% plus élevée chez les femmes d'origine africaine qu'elle ne l'est chez les hommes de la même ethnie et 26% plus élevée chez les femmes américaines d'origine hispanique comparée aux hommes du même groupe. Ces résultats mettent en évidence qu'au sein d'un même pays, la prévalence du SMet varie en fonction du genre, de l'appartenance ethnique et de l'âge. Les variabilités épidémiologiques peuvent également s'expliquer par l'absence de consensus entre les différentes définitions du SMet.

Avec l'apparition d'une nouvelle définition de l'IDF, dont les valeurs seuils sont inférieures à celle de la NCEP/ATP, il fut nécessaire d'établir une nouvelle évaluation de la prévalence du SMet afin de rendre compte de la mortalité et de la morbidité du SMet au sein de la population américaine. C'est ainsi que Ford [13] identifie en 2005 des incohérences liées aux définitions utilisées. En utilisant les données de la NHANES de 1999 à 2002, la définition de la NCEP/ATP permet d'identifier 34.5% de personnes atteintes (♂ : 33.7%, ♀ : 38.1%) tandis que la définition de l'IDF identifie 39% de la population comme présentant un SMet (♂ : 39.9%, ♀ : 38.1%). En 2009 [14], une étude supplémentaire reposant sur l'utilisation des données de la NHANES 2003-2006 permet d'évaluer la prévalence du SMet en fonction de l'âge et en divisant les effectifs en trois groupes : 20-39 ans, 40-59 ans et plus de 60 ans. En se basant sur la définition fournie par la NCEP/ATP, la prévalence globale s'élève à 34%. Pour les 20-39 ans, 20% des hommes et 16% des femmes présentent un SMet. Dans le groupe des 40-59 ans, 41% des hommes et 37% des femmes ont un SMet. Chez les plus de 60 ans, la prévalence du SMet s'élève à 52% chez les hommes et 54% chez les femmes. Ces résultats démontrent que la prévalence augmente avec l'âge sans différence entre les genres. Cependant, lorsque les groupes sont divisés en fonction des ethnies, il apparaît que les femmes d'origine africaine non-hispaniques et les américaines d'origine mexicaine ont 1.5 fois plus de risque de développer un SMet comparativement aux femmes blanches non-hispaniques. Par la suite, les nouvelles données de la NHANES montrent une diminution de la prévalence du SMet aux Etats Unis : 25.5% en 1999-2000 et 22.9% en 2009-2010. Cependant, ces chiffres sont corrélés à une augmentation de l'utilisation des médicaments anti-hypertenseurs et hypolipémiants, faussant les chiffres réels de la prévalence du SMet. En

2011, Mozumdar et Liguori [15] comparent l'étude NHANES III décrite aux nouvelles données issues de la NHANES entre 1999 et 2006. Ils observent une augmentation de la prévalence du SMet chez les hommes et chez les femmes, passant de 47 à 68 millions de personnes atteintes.

## II.2. Europe

Une des toutes premières études menée en Europe est celle réalisée par le groupe EGIR : elle a comparé la fréquence d'apparition du SMet dans des populations européennes, chez des sujets âgés de 22 à 81 ans non diabétiques en se basant sur la définition fournie par l'OMS et le groupe EGIR en 1999 [16]. 8200 hommes et 9363 femmes ont été inclus afin d'évaluer la prévalence du SMet en fonction de l'âge et du genre. Comme aux Etats Unis, une augmentation de la prévalence du SMet est observée avec l'âge, avec une fréquence plus élevée chez les hommes que chez les femmes lorsque l'on considère une même tranche d'âge. Cependant, une augmentation de la fréquence est systématiquement observée avec la définition de l'OMS. Chez les sujets non-diabétiques, la fréquence du SMet selon la définition de l'OMS varie de 7% à 36% chez les hommes de 40 à 55 ans et de 5% à 22% chez les femmes du même âge. La prévalence du SMet demeure moins élevée selon l'EGIR : 1 % à 22 % chez les hommes et 1 % à 14 % chez les femmes. Cette variabilité semble s'expliquer par le recrutement de cohortes différentes et donc de l'utilisation de techniques de mesures différentes. De plus, la définition de l'OMS tient compte de l'indice de masse corporelle tandis que la définition de l'EGIR est centrée sur l'obésité abdominale en se fiant principalement au tour de taille.

En Europe, une autre étude a été réalisée à partir des cohortes DECODE (Diabetes epidemiology : collaborative analysis of diagnostic criteria in Europe) (Quiao et al, 2005). Cette dernière avait pour but de comparer la prévalence du SMet en fonction de la définition considérée. L'étude s'est donc focalisée sur les définitions fournies par la WHO, par l'EGIR, et par la NCEP/ATP. Chez des personnes âgées de 30 à 77 ans, la prévalence globale varie de 16.5 à 24.7% chez les hommes, de 15.2 à 20% chez les femmes, en fonction de la définition utilisée et augmente avec l'âge. Lorsque ces définitions sont corrélées au genre et à l'âge, elle est supérieure chez les femmes âgées de moins de 60 ans et chez les hommes âgés de plus de 70 ans. Cette étude met en évidence une prévalence élevée du SMet malgré l'absence de consensus entre les définitions. La définition de la WHO identifie principalement des hommes âgés (33.2% des plus de 70 ans vs 19.8% et 23.3% pour l'EGIR et la NCEP/ATP respectivement) comme étant atteints



du SMet. Contrairement à la définition de la NCEP/ATP, la résistance à l'insuline constitue un critère essentiel à la définition du SMet selon l'EGIR et la WHO. 1.6% des patients sont insulino-résistants selon la définition de la NCEP/ATP tandis que 10 et 33% le sont selon les définitions de l'EGIR et de la WHO, respectivement. La définition de la NCEP/ATP permet quant à elle d'identifier plus de personnes atteintes d'obésité et d'HTA. On notera donc la nécessité d'une définition unifiée puisque seulement 31% des hommes et 34% des femmes présentant divers symptômes du SMet seraient diagnostiqués quelle que soit la définition utilisée.

En ce qui concerne la population française, quelques données sont disponibles, notamment au travers des études DESIR (Data Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome) et MONICA. L'étude DESIR [17] avait pour objectif principal l'analyse de la prévalence du SMet lors de l'inclusion des patients et sa persistance 3 ans plus tard selon la définition de la NCEP/ATP. Elle a été réalisée chez plus de 4000 sujets (2109 hommes et 2184 femmes) âgés de 30 à 64 ans. Tout d'abord, cette étude rend compte d'une prévalence 2.5 fois plus faible dans notre pays qu'aux Etats Unis. Lors de l'inclusion, la prévalence était estimée à 10 % (homme) et 7 % (femme). Quand les traitements médicamenteux sont inclus dans la définition des anomalies cardiovasculaires et métaboliques, la fréquence du SMet atteint 16% et 11%. L'anomalie observée la plus fréquemment à l'examen d'inclusion était l'HTA : 70 et 47 % des hommes et des femmes, respectivement, présentaient une PA supérieure à 130/80 mmHg. L'anomalie la plus persistante dans le temps a été le tour de taille élevé (80% présentaient un tour de taille élevé après 3 ans). L'anomalie la moins stable étant l'hyperglycémie puisque 60% des sujets ont conservé une hyperglycémie à jeun. Cette étude montre des résultats en contradiction avec les études américaines dans laquelle la prévalence du SMet était nettement plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Enfin, l'étude DESIR n'a pas permis d'établir de lien entre le SMet et l'hyperinsulinémie.

L'étude MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular disease) a quant à elle été initiée dans les années 70 et a duré jusqu'en 1990 et a inclus les données issues de 39 centres répartis dans 27 pays, dont 3 en France. Les objectifs principaux de cette étude étaient de mesurer la fréquence des maladies cardio-vasculaires dans le temps, d'évaluer l'utilité des nouveaux traitements et d'assurer le suivi des politiques nationales de santé. Les données présentées sont celles recueillies de 1995 à 1997 dans les 3 centres français : Strasbourg, Lille et Toulouse. L'étude MONICA a été réalisée sur des échantillons représentatifs

de la population française et constitués de 1778 hommes et 1730 femmes âgés de 35 à 64 ans (Gamila et Dallongeville, 2003). Elle met en évidence une prévalence globale de 23.5% chez les hommes et de 17.9% chez les femmes. La prévalence du SMet varie en fonction de la ville considérée (Lille : ♂ = 26.9%, ♀ : 21.4% ; Strasbourg : ♂ = 26.4%, ♀ : 19.9% ; Toulouse : ♂ = 17.8%, ♀ : 12.4%) et met en exergue une grande disparité nord/sud : environ 26 % pour les Lillois, contre 15 % pour les Toulousains.

En France, une étude plus récente a permis d'établir la prévalence du SMet. L'étude nationale Nutrition Santé (ENNS) a porté sur 1856 sujets âgés de 18 à 74 ans entre 2006 et 2007 [18]. En fonction de la définition employée, la prévalence du SMet varierait entre 14,1% (définition du NCEP/ATP), 20,3% (définition de l'IDF) et 21,1% (définition du Joint Interim Statement) sans établir de différence hommes/femmes. Ces résultats sont donc un peu moins pessimistes que ceux obtenus dans l'étude DESIR. De plus, la prévalence du SMet serait donc plus modérée en France que dans d'autres pays industrialisés (28% au Luxembourg en 2007-2008 par exemple). Comme d'autres études l'ont suggéré, le risque de SMet augmente avec l'âge, quelle que soit la définition utilisée. Chez les femmes, la prévalence du SMet diminue quand le niveau d'éducation augmente. Chez les hommes, aucun lien avec le statut socio-économique n'a pu être établi. En revanche, la prévalence du SMet augmente chez les hommes immigrés par rapport à ceux nés en France.

### **II.3. Pays en voie de développement : Asie et Afrique**

Selon la définition de la NCEP/ATP, l'Iran [19] et la Turquie [20] sont les plus touchés par le SMet avec une prévalence se rapprochant de celle observée aux Etats Unis, touchant environ un quart de leur population avec une large dominance chez les femmes. Dans les pays asiatiques, la définition fournie par la NCEP/ATP est la plus représentée et permet d'établir de manière semblable la prévalence du SMet. Environ 10 à 15% de la population Taiwanaise [21,22], de Hong Kong [23] et Thaïlandaise [24] est touchée par le SMet. Concernant la Chine, le SMet (♂ = 9.8%, ♀ : 17.8%) et l'obésité (: ♂ = 26.9%, ♀ : 31.1%) semblent être plus présents au nord qu'au sud du pays, et touchent d'avantage les zones urbaines que les zones rurales [25]. Comme dans d'autres pays, la prévalence augmente avec l'âge et est plus élevée chez les femmes. Chez les indiens d'Asie, une autre étude a démontré que le développement d'un SMet et d'un DT2 requiert un tour de taille supérieur à celui observé dans les populations caucasiennes moyennes [26]. En Afrique, les données disponibles sont peu nombreuses. Cependant, dans certains pays, quelques

études s'intéressent au dépistage du SMet. C'est par exemple le cas des travaux réalisés chez des sujets diabétiques au Centre hospitalo-universitaire de Bobo-Dioulasso au Burkina Faso. En se basant sur les critères de l'IDF, Marceline et coll ont observé que l'obésité abdominale était présente chez 61.9% de ces sujets et que l'HTA l'était dans 56.4% des cas. La prévalence du SMet était de 48.9% [27]. Chez des sujets sains, une étude réalisée en Côte d'Ivoire et en se basant sur la définition de la NCEP/ATP, a montré une prévalence globale du SMet de 4.94 %. Dans la population étudiée, 4.42 % des sujets présentaient 3 critères et 0.52 % en manifestaient 4 ; la modalité associative la plus retrouvée était celle regroupant obésité abdominale, hypocholestérolémie HDL et PA élevée. Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le sexe, l'âge et la prévalence du SMet [28].

Pour conclure, le SMet concerne toute la population mondiale, pays industrialisés et en voie développement tels que les pays asiatiques et africains. De manière générale, on remarque que la prévalence du SMet augmente avec l'âge et va dépendre de l'origine ethnique des populations considérées. La variabilité de la prévalence du SMet entre les pays peut également être attribuée à des prévalences variables de certains composants du SMet. Ainsi, en France, l'HTA est le trouble le plus souvent associé au SMet tandis qu'aux Etats Unis, c'est l'obésité. Notons également que les prévalences du SMet au sein d'un même pays sont difficilement comparables de par la variabilité méthodologique. En effet, la définition choisie, le recrutement de cohortes au sein de pays différents, les techniques de mesures et de dosages utilisées peuvent induire des écarts importants et rendre délicate l'évaluation de la prévalence du SMet.

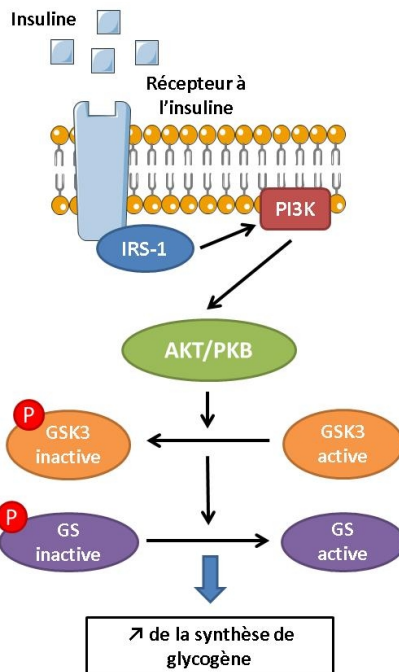
### III. Physiopathologie du Syndrome métabolique

Actuellement, aucun argument n'est en faveur d'une cause unique responsable de l'intégralité des anomalies observées dans le SMet, même si de nombreuses équipes suggèrent qu'une hyperactivité du système nerveux sympathique (SNS) pourrait être mise en cause dans l'apparition des troubles associés [29]. De plus, de nombreux arguments suggèrent un rôle causal de l'obésité dans la genèse et le maintien des anomalies associées au SMet. En effet, dans une étude réalisée aux Etats Unis, Park et coll. [30] montrent que le SMet se développe chez 4.6% des personnes normales, 22.4% des personnes en surpoids et 59.6% des personnes obèses. Cette étude rend compte de l'importance du TA dans les troubles associés au SMet. Chez l'Homme, on distingue plusieurs types de TA en fonction de sa localisation anatomique. Le tissu adipeux viscéral (TAV), entre autres, est impliqué dans le métabolisme énergétique et est le seul à être relié indépendamment à tous les composants du SMet, validant ainsi son implication dans la physiopathologie du SMet [31]. Le TA permet le stockage des lipides et leur libération à la demande, à distance des repas, sous forme d'acides gras libres (AGL) pour permettre le fonctionnement du foie et des muscles. Le TA a également la capacité de sécréter une adipokine connue pour son rôle insulino-sensibilisant et sa capacité à favoriser l'utilisation des AGL au niveau hépatique et musculaire : l'adiponectine. De nombreuses études ont montré que les taux d'adiponectine plasmatique sont inversement corrélés au niveau d'obésité et aux risques liés au SMet [32]. Dans le cadre d'un SMet, les adipocytes sont hypertrophiés, ce qui provoque une sécrétion locale de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires capables de provoquer le recrutement des cellules macrophagiques qui vont amplifier la sécrétion cytokinique : TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), IL-6 (interleukine) [33]... Il en résulte une inflammation chronique responsable d'une résistance à l'insuline, d'une diminution de la sécrétion d'adiponectine et d'une augmentation de la production d'AGL. Ce déséquilibre se répercute au niveau hépatique (stéatose) et musculaire (accumulation de TG et résistance à l'insuline). Dans cette partie, nous allons décrire les modifications cardiovasculaires et métaboliques associées à l'obésité et observées dans le cadre d'un SMet.

## III.1. Métabolisme glucidique

### III.1.1. Insuline et transmission du signal insulinique

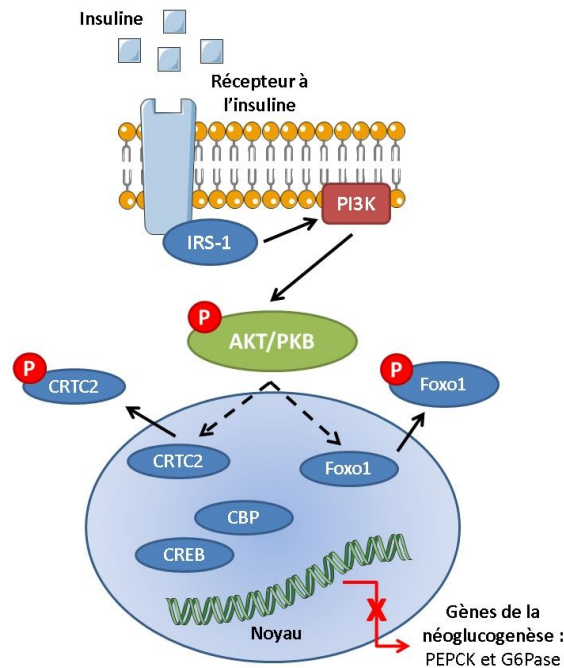
Le métabolisme glucidique est en grande partie régulé par l'insuline qui joue un rôle anabolique majeur dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats glucidiques et lipidiques : utilisation du glucose sous forme de lipide et de glycogène, inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse, activation de la lipogenèse et synthèse de glycogène. Cette hormone est produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Les taux de glucose circulants modulent sa sécrétion. Ainsi, après un repas, le glucose est absorbé au niveau intestinal et induit une hyperglycémie rapidement contrôlée par l'insuline pour rétablir une glycémie normale. L'ensemble de ces effets résulte de la liaison de l'hormone à son récepteur membranaire spécifique présent en priorité au niveau des hépatocytes, des myocytes et des adipocytes. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de facteur de croissance possédant une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. L'activation du récepteur conduit à son autophosphorylation mais également à une phosphorylation des résidus tyrosine des protéines substrats nommées IRS (*insulin receptor substrat*). L'une des principales voies de signalisation associée à l'insuline est celle de la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K). Elle est responsable de la médiation des effets métaboliques de l'hormone. Au niveau hépatique, l'insuline joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie glucidique en permettant, entre autre, la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène : elle lève l'inhibition de la glycogène synthase (GS) par inhibition de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et induit la synthèse de glycogène (figure 1).



**Figure 1** : Cascade de signalisation de l'insuline / GSK3

En se fixant sur son récepteur, l'insuline induit la phosphorylation activatrice d'AKT/PKB. Elle induit la phosphorylation inhibitrice de GSK3 et la diminution de la phosphorylation inhibitrice de la GS qui ont pour conséquence une augmentation de la synthèse de glycogène. (IRS-1 : *insulin receptor substrate 1*, PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase, AKT/PKB : AKT/protéine kinase B, GSK3: glycogène synthase kinase 3, GS: glycogène synthase).

L'insuline est également impliquée dans la modulation de l'activité d'un facteur de transcription, Foxo1, responsable de l'activation ou de l'inhibition de protéines clés de la néoglucogenèse telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) ou la glucose-6-phosphatase (G6Pase) [34] (figure 2).



**Figure 2** : Implication de l'insuline dans la régulation de la néoglucogenèse

Après le repas et la libération d'insuline, la cascade de signalisation IRS-1/PI3K/AKT/PKB est activée et induit la phosphorylation de Foxo1 et du complexe CREB/CBP/CRTC2. Cette phosphorylation empêche la fixation des facteurs de transcriptions CREB et Foxo1 et est responsable de l'inhibition de l'expression des gènes de PEPCK et de la G6Pase, impliqués dans la néoglucogenèse. (IRS-1: *insulin receptor substrate 1*, PI3K : *phosphatidyl-inositol 3 kinase*, AKT/PKB : AKT/protéine kinase B, Foxo1 : *Forkhead box protein O1*, CBP : *CREB binding protein*, CREB : *C-AMP Response Element-binding protein*, CRTC2 : *CREB regulated transcription coactivator 2*).

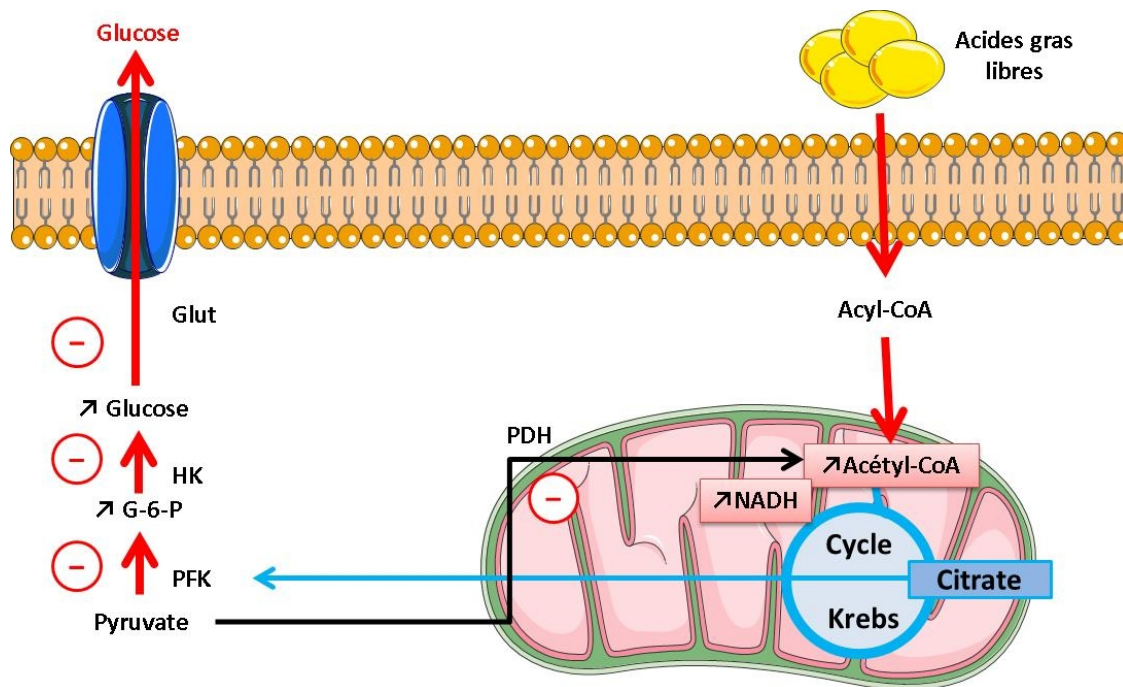
L'altération du signal insulinaire induit l'insulino-résistance et implique de nombreux mécanismes détaillés ci-dessous.

### III.1.2. Insulino résistance

Un des mécanismes impliqués dans l'insulino-résistance met en jeu la phosphorylation inhibitrice de résidus sérine ou thréonine au niveau du récepteur et surtout des protéines substrats IRS. Cette phosphorylation bloque la transmission du signal insuline vers la voie métabolique PI3K. Parmi les signaux capables d'induire l'arrêt de la cascade de signalisation de l'insuline figure la phosphokinase C  $\zeta$  (PKC), le diacylglycérol (DAG), qui serait produit via l'activation de la phospholipase C (PLC), les AGL, le glucose, et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ . Ainsi, lorsque des patients sont obèses comme c'est le cas dans le SMet, le TA hypertrophié sécrète en excès des AGL et des cytokines impliqués dans la résistance à l'insuline hépatique, musculaire et pancréatique. Comme indiqué précédemment, chez des patients obèses,

la libération plus importante d'AGL dans la circulation participe à l'apparition d'une insulino-résistance [35,36]. En 1963, les hypothèses de Randle concernant l'existence d'un cycle « glucose-acide gras » ont permis d'établir les prémices des causes de l'insulino-résistance au niveau musculaire [37]. En effet, il semblait qu'un excès d'AGL plasmatiques diminuait l'utilisation cellulaire du glucose et participait à l'installation d'un DT2. A l'inverse, l'élévation des taux de glucose exerce un effet inhibiteur sur l'oxydation des AGL. Dans sa description initiale, Randle et coll. ont suggéré que l'oxydation excessive d'AGL dans les muscles serait à l'origine de l'accumulation de certains produits de dégradation des lipides comme l'acétyl-CoA (augmentation du rapport acétyl-CoA/CoA), l'ATP (rapport ATP/ADP) et le NADH intra-mitochondrial (forme réduite du NAD, nicotinamide adénine dinucléotide), inhibant ainsi la pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'oxydation du glucose. Cela reste vrai. En revanche, Randle et coll postulaient également que l'oxydation lipidique entraîne une augmentation du citrate mitochondrial, en raison de l'afflux d'acétyl-CoA et de l'augmentation de l'ATP et du NADH. Le citrate en excès passait alors dans le cytosol où il est responsable de l'inhibition allostérique d'une enzyme du métabolisme glucidique : la phosphofructokinase-1 (PFK-1). Ainsi, l'accumulation cytosolique du glucose-6-Phosphate (G-6-P) inhibe l'hexokinase (HK) conduisant à l'accumulation intracellulaire du glucose et à l'inhibition de son transport vers l'intérieur de la cellule (figure 3).



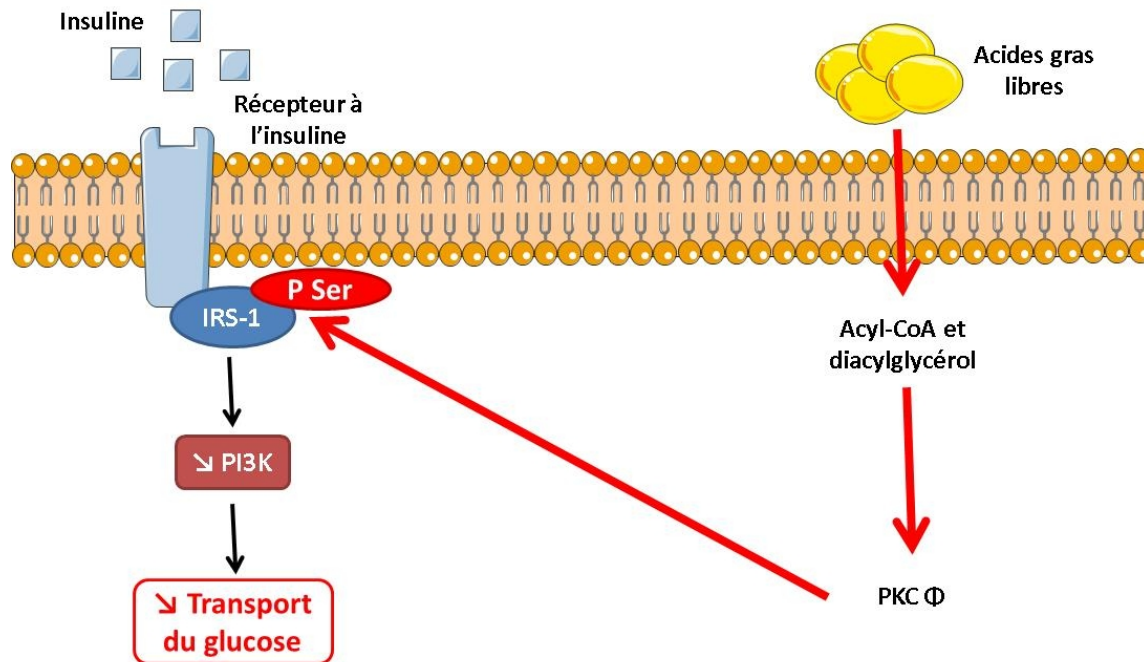


**Figure 3 : Le cycle glucose-acide gras de Randle**

Selon les premières hypothèses de Randle, l'accumulation de citrate, en inhibant la phosphofructokinase, entraînerait une augmentation de fructose-6-phosphate et de glucose-6-phosphate (G-6-P). Cette accumulation de glucose-6-phosphate inhiberait l'hexokinase, conduisant à l'augmentation du glucose intracellulaire et à l'inhibition du transport de glucose. (Glut : transporteur de glucose, G-6-P : glucose-6-phosphate, F-6-P : fructose-6-phosphate, HK : hexokinase, PFK : phosphofructokinase, PDH : pyruvate déshydrogénase).

De nouvelles études ont permis de démentir ces derniers résultats. L'accès à de nouvelles techniques, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), a permis de mesurer la quantité de certains métabolites dans des muscles squelettiques exposés à de fortes concentrations en AGL. Lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique, Roden et coll. observent que des sujets exposés pendant 5h à des concentrations élevées d'AGL présentent une diminution des concentrations musculaires de G-6-P et de glucose, contrairement aux hypothèses émises par Randle [38]. Chez ces mêmes personnes, l'oxydation du glucose et la synthèse de glycogène est réduite de 50% [38]. Ainsi, les concentrations de G-6-P et de glucose sont en réalité diminuées contrairement à ce qui avait été décrit. Depuis, de nouvelles hypothèses concernant l'effet des AGL sur la signalisation insulinique ont été proposées : il semblerait que les excès d'AGL perturbent les mécanismes de la transmission du signal insulinique [39]. L'augmentation des AGL au niveau musculaire conduit à l'accumulation de métabolites tels que l'acyl-CoA et le DAG. Ces derniers activent la PKC $\Phi$  (sérine/thréonine kinase) pour phosphoryler des protéines

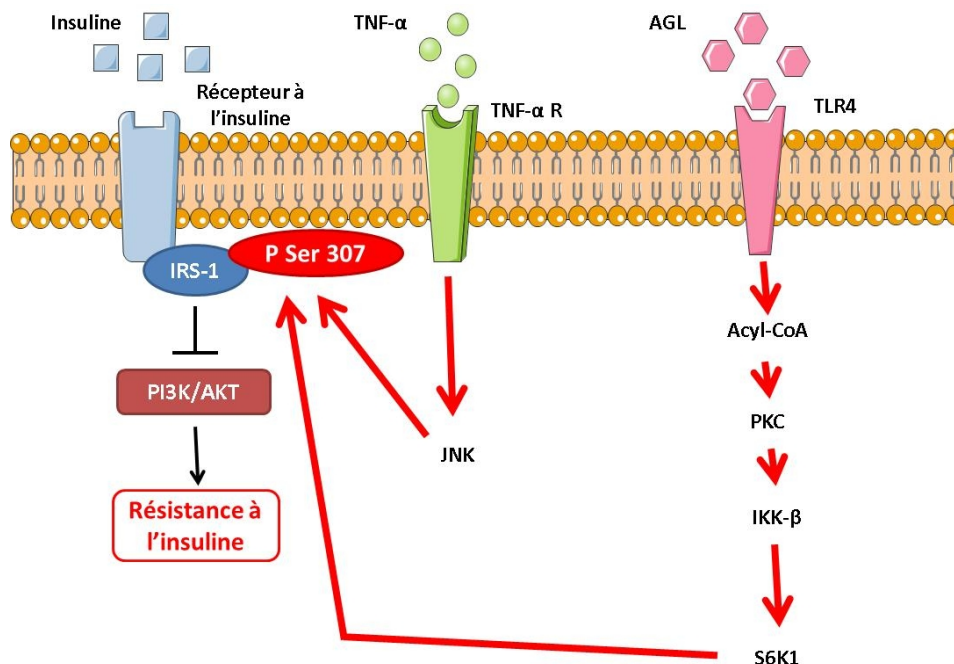
substrats IRS au niveau de résidus sérine-thréonine (sérine 307 par exemple) bloquant le recrutement et la transmission du signal insuline vers la PI3K [38,40,41,42] (figure 4).



**Figure 4 : Reformulation des mécanismes biochimiques du cycle de Randle**

L'excès d'acides gras libres entraîne une altération du signal insulinaire. L'accumulation de métabolites dérivés des acides gras libres, acyl-CoA et diacylglycérol, active la protéine kinase C  $\Phi$  qui, en phosphorylant un résidu sérine (Ser) au niveau de l'IRS-1, entraîne une diminution du recrutement de la PI3K et une réduction du transport de glucose. (PKC  $\Phi$  : Protéine kinase C  $\Phi$ , IRS-1 : insulinerécepteur substrat 1, PI3K : *phosphatidylinositol 3 kinase*, Ser : Sérine).

Il semblerait qu'une autre kinase soit impliquée dans la cascade de signalisation de l'insuline : IKK- $\beta$  (IkB Kinase  $\beta$ ). En effet, IKK- $\beta$  est activée par la PKC, elle-même activée par l'augmentation de la concentration des acyl-CoA intramusculaires, lors de l'administration d'un régime hyperlipidique à des souris (figure 5) [39]. De plus, des souris transgéniques surexprimant IKK- $\beta$  présentent une profonde insulino-résistance hépatique associée à une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires corrigées par l'administration de salicylate [43]. Plusieurs études ont démontré la capacité du TNF- $\alpha$  à inhiber la signalisation insulinaire en augmentant la phosphorylation de l'IRS-1 sur son résidu inhibiteur sérine 307 ; JNK (Jun NH(2)-terminal kinase) semble être la kinase sollicitée par le TNF- $\alpha$  (figure 5), Hirosumi et coll. ont observé une augmentation de l'expression de JNK dans l'obésité. De plus, des souris invalidées pour le gène codant JNK présentent une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une signalisation cellulaire insulinaire amplifiée [44].



**Figure 5 : Mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline**

L'excès d'acide gras libres entraîne une altération du signal insulinaire en se fixant sur le récepteur TLR4. L'accumulation de métabolites dérivés des acides gras libres, tel que l'acyl-CoA, active la PKC, IKK- $\beta$  et S6K1 qui, en phosphorylant un résidu sérine inhibiteur en position 307 au niveau de l'IRS-1, entraîne une résistance à l'insuline. De la même manière, l'inflammation, par le biais du TNF- $\alpha$ , active JNK pour qui phosphoryle le même résidu et entraîne une résistance à l'insuline (IKK- $\beta$  : inhibitor of kappaB kinase- $\beta$ , IRS-1 : insulin receptor substrate 1, JNK : c-Jun N-terminal kinase, PI3K : *phosphatidylinositol 3 kinase*, PKC : Protéine kinase C, S6K1 : S6 kinase 1, Ser : Sérine, TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$  R : tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor, TLR4 : toll like receptor 4).

Il semblerait également que l'augmentation de la concentration intracellulaire des AGL soit responsable d'une inhibition du transporteur du glucose GLUT4, empêchant ainsi l'incorporation du glucose dans les cellules musculaires (Dresner et coll. 1999). Des souris invalidées pour GLUT4 présentent une augmentation de l'insulinémie postprandiale et une résistance à l'insuline [45]. La restauration de GLUT4 dans le muscle suffit à rééquilibrer le métabolisme du glucose, validant l'importance de ce mécanisme pathologique dans le développement de la résistance à l'insuline [46]. De cette manière, l'augmentation d'AGL circulants empêche l'utilisation du glucose par les cellules musculaires, inhibant la synthèse de glycogène et l'oxydation du glucose. L'insulino-résistance créée est entretenue par un excès permanent d'AGL empêchant l'insuline d'exercer son action d'inhibition de la lipolyse sur le TA devenu également insulino-résistant. L'insulinorésistance se retrouve également au niveau hépatique. L'obésité, et plus particulièrement la présence excessive de TAV, favoriserait l'apport d'AGL dans la veine porte

[47] [48]. A titre d'exemple, la suppression de la graisse viscérale chez le rat restaure la sensibilité du foie à l'insuline [49]. Associées à une diminution de l'utilisation musculaire du glucose, la réduction des effets inhibiteurs de l'insuline sur la production de glucose et la génération de cofacteurs nécessaires à cette voie métabolique (ATP, acétyl-CoA et NADH) sont à l'origine d'une hyperglycémie chronique. En effet, l'insulino-résistance se traduit par l'inhibition de deux enzymes impliquées dans la glycolyse, la phosphofructo-2-kinase et la pyruvate kinase, conduisant à l'inhibition de cette voie métabolique et à l'activation de la néoglucogenèse [50]. Dans un premier temps, l'insulinosécrétion accrue permet de conserver une glycémie normale. Même si les AGL sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule  $\beta$  des îlots de Langerhans, il semblerait qu'une exposition prolongée induise une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* et *in vitro* sur des pancréas isolés et perfusés [51,52]. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'inhibition de la sécrétion d'insuline. 1) En condition physiologique, les acyl-CoA stimulent un canal  $K^+$  dépendant de l'ATP en se liant à la protéine kir6.2 qui forme le canal. En réponse à une exposition prolongée aux AGL, les acyl-CoA s'accumulent dans la cellule  $\beta$ , empêchent la fermeture du canal et sont responsables d'une perte de sensibilité des cellules au glucose (Girard et al, 2003) ; 2) Suite à une sécrétion d'insuline soutenue, les besoins en pro-insuline augmentent, provoquent un stress du réticulum endoplasmique et induisent l'apoptose des cellules  $\beta$  via une surproduction de monoxyde d'azote (NO) [53] ; 3) Une hyperglycémie chronique augmente le flux métabolique dans la mitochondrie et génère la production de ROS (*reactive oxygen species*) responsables d'un stress oxydatif chronique et altérant la biosynthèse et la sécrétion de l'insuline [54]. La perte de fonction des cellules  $\beta$  est responsable d'une glucotoxicité pancréatique et accentue l'hyperglycémie chronique déjà provoquée par la lipotoxicité hépatique. Ces anomalies métaboliques vont précipiter l'apparition du DT2, d'autant plus rapidement qu'elles surviendront sur un terrain génétiquement prédisposé (Ducluzeau et Laville 2004).

L'insulino-résistance peut donc être attribuée à la rupture de la balance dépense énergétique/apports caloriques qui provoque une surconsommation de nourriture et le développement de l'obésité. Le surplus de calories est stocké dans le TA, qui, sous l'action d'une inflammation grandissante, devient insulino-résistant et libère des AG dans la circulation sanguine et vers les organes cibles. Le foie, les muscles squelettiques et le pancréas sont alors

victimes de lipotoxicité, laissant la place au développement de nombreuses maladies chroniques telles que le DT2.

### III.2. Métabolisme lipidique

Le SMet est caractérisé par une très grande fréquence des anomalies lipidiques, tant au niveau quantitatif que qualitatif.

D'un point de vue quantitatif, on observe une augmentation des TG et une diminution du HDL-C. Un des mécanismes impliqué dans l'hypertriglycémie met en jeu une augmentation de la production hépatique de VLDL (*very low density lipoprotein*), une lipoprotéine essentiellement constituée de TG et impliquée dans le transport des lipides endogènes. L'hypertriglycémie peut s'expliquer d'une part par l'augmentation de la production hépatique des VLDL de grande taille [55]. Chez les patients obèses, celle-ci pourrait résulter d'une augmentation du flux hépatique des substrats, glucose et AGL permettant la synthèse des TG [56]. De plus, chez ces patients et ceux atteints de DT2, la résistance à l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'activité de la lipoprotéine lipase, impliquée dans l'hydrolyse des TG, induit une augmentation de la production et de la sécrétion des VLDL [57]. Chez les diabétiques de type 2, il est aussi suggéré qu'une augmentation de la lipogenèse de novo dans l'hépatocyte soit responsable de la surproduction des TG [56]. Par ailleurs, chez les personnes diabétiques et obèses, il semblerait que le catabolisme des VLDL soit diminué, reflétant une baisse d'activité de la lipoprotéine lipase et de la clairance des lipoprotéines riches en TG [58]. Ainsi, les AG circulants qui ne sont pas captés par les adipocytes sont utilisés au niveau hépatique pour fabriquer des VLDL qui ne seront pas internalisés par les adipocytes après hydrolyse.

Les anomalies qualitatives comprennent la présence de VLDL de grande taille et un enrichissement des LDL-C (*low density lipoprotein cholesterol*) et HDL-C en TG. La composition des particules riches en TG est modifiée : le volume des VLDL augmente et la quantité de TG internalisés est plus grande. Chez les obèses et les diabétiques de type 2, les niveaux plasmatiques de LDL-C sont le plus souvent inchangés du fait de la diminution de la conversion des VLDL en LDL, même si des modifications de leur métabolisme sont constatées [59]. En effet, des patients atteints de DT2 présentent une diminution du catabolisme des LDL de 28% comparativement à des patients normaux. Cette modification semble liée à une diminution

de l'expression des récepteurs au LDL, secondaire à la résistance à l'insuline [60]. Ainsi, les LDL stagnent au niveau plasmatique et deviennent plus athérogènes. De plus, l'augmentation de la quantité des VLDL riches en TG (dont l'hydrolyse est diminuée) accroît le transfert des TG entre ces lipoprotéines et les HDL et le LDL grâce à l'activité de la protéine de transfert des TG (Cholesteryl Ester Transfer Protein). Ces transferts entraînent 1) un enrichissement des HDL en TG et la diminution de leur efficacité pour le transport réverse du cholestérol et 2) un enrichissement des LDL en TG et l'apparition des petites et denses LDL-C, particulièrement athérogènes [55]. Le SMet et le DT2 sont associés à une diminution plasmatique du HDL-C attribuable à plusieurs mécanismes physiopathologiques. En premier lieu, le ralentissement du catabolisme des VLDL entraîne une diminution de la production de particules HDL. De plus, l'absence d'inhibition de la lipoprotéine lipase par l'insuline rend compte d'une diminution du cholestérol. Les mécanismes impliqués semblent faire intervenir l'adiponectine. Celle-ci pourrait intervenir directement dans l'accélération du catabolisme des HDL. D'après Vergès et son équipe, l'augmentation du catabolisme des HDL-C au cours du SMet et du DT2 serait expliquée pour 43% par la réduction de l'adiponectine, et pour 19% par l'enrichissement des HDL-C en TG. De plus, le catabolisme des apolipoprotéines A-I des HDL est négativement corrélé aux taux plasmatiques de l'adiponectine [61].

L'obésité et le DT2 semblent pouvoir expliquer en partie les désordres du métabolisme lipidique même si de nombreux mécanismes restent à élucider. L'insulinorésistance, en partie provoquée par une trop forte quantité d'AGL circulants, entretient le surpoids et le dérèglement de l'homéostasie lipidique et glucidique.

### **III.3. Anomalies associées**

#### **III.3.1. Hypertension artérielle**

Le lien entre le poids et l'augmentation de la PA a été démontré pour la première fois dans l'étude de Framingham [62]. Dans le cadre du SMet, l'HTA n'a pas d'étiologie connue. Elle est alors appelée HTA essentielle ou primaire. Actuellement, plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans la physiopathologie de l'HTA chez le patient atteint de SMet : une hyperactivation

du SNS, une hyperactivité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), des dysfonctionnements du baroréflexe et des dérèglements de la fonction endothéliale.

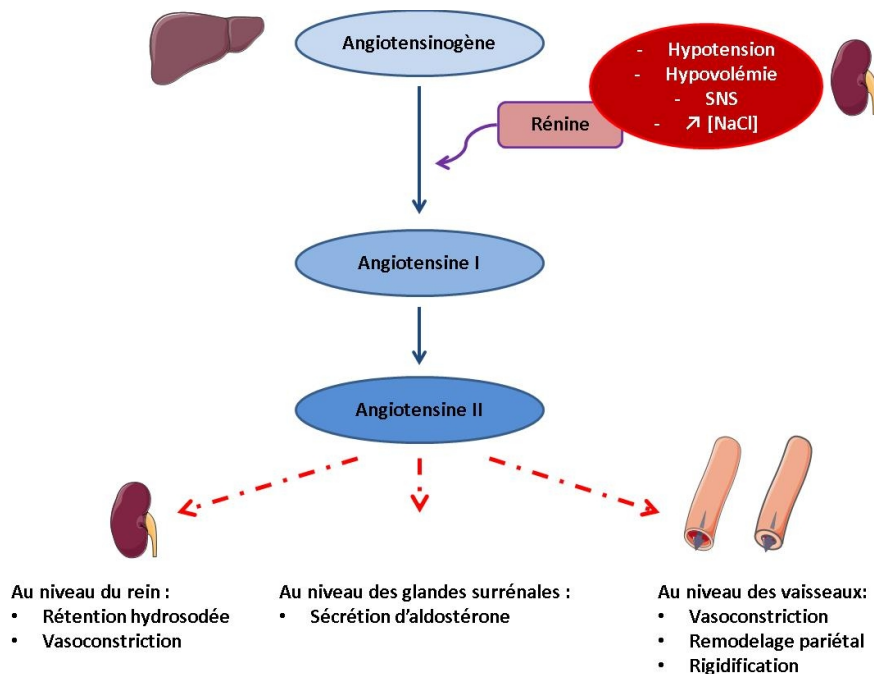
### **III.3.2. Hyperactivation du système nerveux sympathique (SNS)**

Cette partie sera développée page 37

### **III.3.3. Hyperactivité du système rénine-angiotensine-aldostérone**

Le rein joue un rôle clé dans le développement de l'HTA du sujet obèse. En effet, de nombreuses études ont établi le lien entre l'obésité abdominale en particulier, et les modifications des fonctions rénales associées à une augmentation de la PA. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ce dysfonctionnement sont nombreux. La rénine est sécrétée au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire en réponse à divers stimuli : l'hypovolémie ou la baisse de la PA ; l'activation du SNS ; l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium au niveau rénal (macula densa). La rénine active l'angiotensinogène circulant d'origine hépatique par protéolyse. L'enzyme de conversion (EC) transforme ensuite l'angiotensine I libérée en angiotensine II. L'angiotensine II exerce des effets vasoconstricteurs puissants (via son récepteur AT1) responsables d'une stimulation inappropriée de la réabsorption de sodium et d'une diminution de la natriurèse en agissant directement au niveau tubulaire (figure 6). Le SRAA est normalement inhibé par un peptide à l'action vasodilatatrice, le peptide natriurétique [63]. Enfin, malgré l'installation d'une résistance globale à l'insuline, celle-ci agirait tout de même de manière directe au niveau des tubules pour favoriser la réabsorption du sodium [64]. Une hyperactivité de ce système provoque une augmentation de la PA.





**Figure 6** : Mécanismes d'action du système rénine-angiotensine-aldostérone

### III.3.4. Dysfonctionnement du baroréflexe

La PA est fonction du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique. La détection de variation de la PA fait intervenir des récepteurs sensoriels au niveau du système circulatoire : ce sont les barorécepteurs. Ils fournissent des informations sur le niveau de pression dans les cavités cardiaques, les artères et les grosses veines. Les barorécepteurs cardiaques sont situés au niveau des parois des oreillettes et des ventricules tandis que les barorécepteurs vasculaires sont localisés au niveau de l'arc aortique et des sinus carotidiens. Les barorécepteurs des sinus carotidiens sont reliés au système nerveux (SN) par le nerf de Hering et les barorécepteurs de la crosse aortique sont reliés au SN par le nerf de Cyon, tous deux également appelés nerfs sensitifs. Les barorécepteurs constituent le point de départ de la boucle baroréflexe. Ils ne réagissent pas à la PA elle-même mais à la distension de la paroi provoquée par les variations de pression du sang éjecté du ventricule gauche à chaque systole. La détection d'une variation de PA induit une modification du rythme et du débit cardiaque qui aboutit, à la correction de la variation de la PA. Lorsque la PA augmente dans la crosse aortique ou dans les sinus carotidiens, les nerfs sensitifs transmettent cette information au niveau de noyaux du bulbe rachidien afin d'induire une réponse



adaptée : vasodilatation, diminution de la fréquence et de la force de contraction cardiaque. Il existe de nombreux mécanismes d'adaptation cardiovasculaire qui agissent de manière complémentaire : ils peuvent avoir des effets vasoconstricteurs (SNS, SRAA, endothéline) ou vasodilatateurs (NO). L'innervation cardiaque est réalisée par 2 types de nerfs qui prennent naissance dans le bulbe rachidien au niveau des centres nerveux cardiaques. Le nerf sympathique est un nerf rachidien relié à la moelle épinière et le nerf parasympathique est un nerf crânien relié à l'encéphale. Ces deux types de nerfs ont des effets antagonistes : les messages nerveux circulant dans les nerfs sympathiques ont une action cardio-accélératrice tandis que ceux qui circulent dans les nerfs parasympathiques ont une action cardio-modératrice (figure 7).

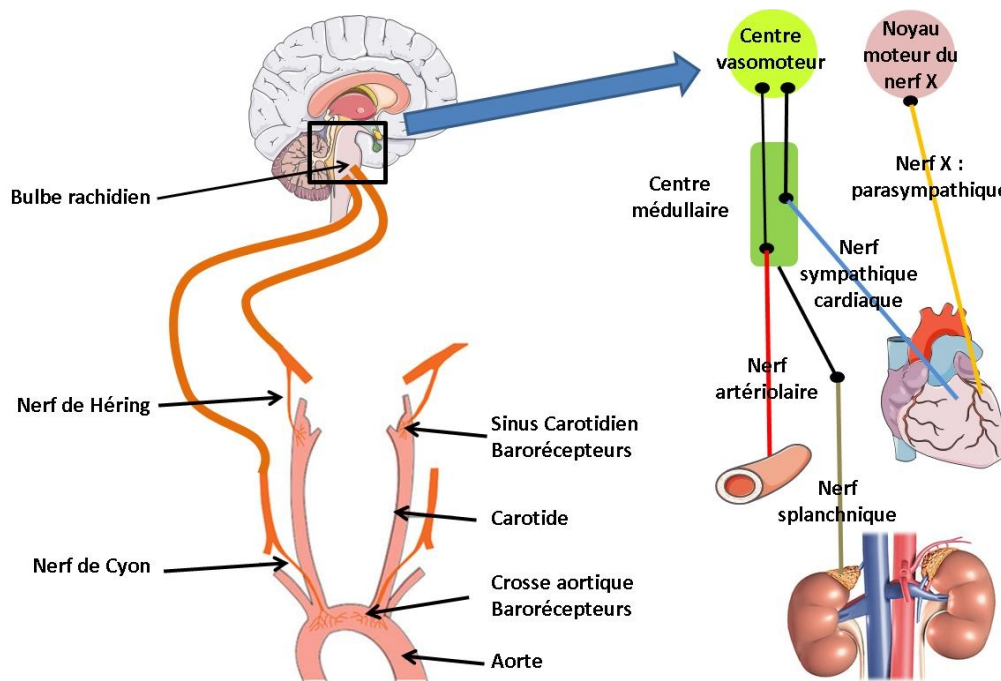


Figure 7 : Schéma de la boucle baroréflexe

- $\nearrow$  PA  $\rightarrow$   $\nearrow$  des potentiels récepteur des barorécepteurs carotidiens et aortiques  $\rightarrow$   $\nearrow$  fréquence des décharges des nerfs afférents  $\rightarrow$   $\searrow$  activité des nerfs sympathiques cardiaques,  $\searrow$  activité des nerfs sympathiques vasoconstricteurs,

↗ activité parasympathique → ↘ fréquence cardiaque, ↘ volume d'éjection, vasodilatation artériolaire et veineuse → ↘

débit cardiaque et de la résistance vasculaire systémique → ↘ PA.

- ↘ PA → ↘ des potentiels récepteur des barorécepteurs carotidiens et aortiques → ↘ fréquence des décharges des

nerfs afférents → ↗ activité des nerfs sympathiques cardiaques, ↗ activité des nerfs sympathiques vasoconstricteurs,

↘ activité parasympathique → ↗ fréquence cardiaque, ↗ volume d'éjection, vasoconstriction artériolaire et veineuse

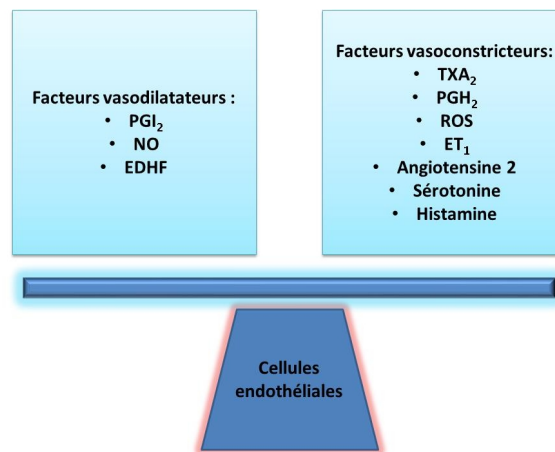
→ ↗ débit cardiaque et de la résistance vasculaire systémique → ↗ PA.

La connexion entre le SNS et la PA se fait grâce à la présence de neurotransmetteurs et de récepteurs adrénergiques et muscariniques. Le SNS agit par l'intermédiaire d'un neurotransmetteur excitateur : la noradrénaline. L'adrénaline est sécrétée par la glande médullosurrénale tandis que la noradrénaline est stockée sous forme de granules au niveau des nerfs efférents sympathiques cardio-accélérateurs. En réponse à un stimulus, la noradrénaline est libérée dans la fente synaptique et provoque une augmentation de la PA [65]. Le système nerveux parasympathique (SNP) agit quant à lui grâce à l'acétylcholine, un neurotransmetteur cardio-inhibiteur. Elle est libérée par les fibres parasympathiques du nerf vague et exerce son action cardio-modératrice en se liant aux récepteurs muscariniques.

En cas d'HTA chronique, les barorécepteurs deviennent incapables de faire baisser la PA puisqu'ils s'adaptent pour fonctionner à un régime de PA supérieur à la normale. Ils continuent à assurer la régulation à court terme mais à un plus haut niveau de pression moyenne.

### III.3.5. Dysfonctions endothéliales

Les principales pathologies cardiovasculaires, dont l'HTA, sont associées à l'apparition d'une dysfonction endothéliale et d'une réduction de la vasodilatation d'origine endothéliale, c'est-à-dire l'existence d'un déséquilibre entre facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Les cellules endothéliales constituent la couche la plus interne de la paroi artérielle. Elles ont une fonction clé dans le maintien de l'homéostasie vasculaire grâce à la synthèse de nombreuses molécules vasoactives. En effet, elles sont à l'origine de la formation de facteurs vasodilatateurs tels que le NO, la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Ces molécules permettent aux cellules endothéliales de lutter contre la thrombose, la prolifération des cellules musculaires lisses dans la paroi vasculaire et permettent la vasodilatation (figure 8). Le stress oxydant, par l'intermédiaire des ROS joue un rôle délétère dans la dysfonction endothéliale en diminuant la disponibilité en NO. En effet, des expériences réalisées sur des artères isolées issues de carotides de souris ont démontré que lorsque la pression intraluminaire est augmentée, la vasodilatation endothélium-dépendante à l'acétylcholine est réduite et l'activité de la NADPH oxydase et de ce fait, la production de ROS, sont augmentées [66].



**Figure 8 :** Molécules impliquées dans la régulation de la fonction endothéliales

(EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium,  $\text{ET}_1$  : endothéline 1, NO : monoxyde d'azote,  $\text{PGI}_2$  : prostacycline,  $\text{PGH}_2$  : prostaglandine, ROS : espèces réactives de l'oxygène,  $\text{TXA}_2$  : thromboxane A2)

Les facteurs impliqués sont sécrétés en réponse à de nombreux agonistes tels que : les neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline, adénosine tri-phosphate, substance P), les hormones circulantes (catécholamines, vasopressine, insuline), les produits dérivant des plaquettes ou de la coagulation sanguine (sérotonine, adénosine diphosphate, thrombine). Ces agonistes exercent leurs effets en se liant à des récepteurs couplés aux protéines G et en induisant

un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule endothéliale. En cas d'anomalie de la fonction endothéliale, la libération de NO est diminuée, avec pour résultat l'apparition d'une HTA et un effet vasoconstricteur accru de la noradrénaline, de l'angiotensine II et de l'endothéline.

Un certain nombre d'études réalisées chez l'Homme et l'animal ont démontré que la dysfonction endothéliale, caractérisée par une diminution des relaxations endothélium-dépendantes et par la réduction de la biodisponibilité du NO, apparaissait précocement dans l'HTA (Mombouli et Vanhoutte, 1999). De plus, dans un modèle de rats spontanément hypertendus, les SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), la relaxation induite par l'EDHF est inhibée (Fujii et al., 1992; oto et al., 2000).

L'obésité et l'inflammation semblent également jouer un rôle important dans le développement de l'HTA liée au dysfonctionnement endothélial. Des études réalisées chez des souris obèses et présentant une inflammation périvasculaire ont démontré la présence d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales se traduisant par une augmentation de la production de ROS et une diminution de la disponibilité de NO [67]. L'hypoadiponectinémie est fréquemment observée chez les sujets souffrant de SMet et constitue le lien entre obésité, résistance à l'insuline, HTA et DT2. De plus, un faible taux d'adiponectine plasmatique est fortement corrélé à l'HTA et il semblerait que son action sur la fonction endothéliale soit mise en cause [68]. En 2007, Fésüs et coll démontrent que l'adiponectine induit de manière directe une vasorelaxation d'anneaux d'aorte issus de rats. De plus, des souris génétiquement invalidées pour le gène de l'adiponectine présentent une vasodilatation altérée et une production de NO moindre comparée aux souris contrôle [69,70]. Dans les cellules endothéliales, elle stimule la vasodilatation de manière indirecte en activant la cascade de signalisation de l'AMPK (*AMP-activated-protein-kinase*) stimulant la synthèse et la biodisponibilité de NO. Dans le cadre d'un SMet, chez les sujets étant obèses et souffrant d'hypoadiponectinémie, la synthèse de NO est altérée [71].

### **III.3.6. Les anomalies de la fibrinolyse**

Le SMet est associé à des altérations du système fibrinolytique impliqué dans la régulation anti-thrombotique. Ce processus physiologique permet la destruction du thrombus ou d'un caillot sanguin dans une veine ou une artère lorsque l'hémostase est rétablie. Le développement de

maladies cardiovasculaires est associé à l'augmentation de la concentration circulante d'un inhibiteur de la fibrinolyse : le plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [72]. Trois sources de PAI-1 sont actuellement décrites chez l'Homme : hépatocytes, cellules endothéliales et adipocytes. Cependant, le SMet est caractérisé par une inflammation de bas grade et il semblerait que dans ces conditions, le PAI-1 provienne essentiellement des adipocytes [73]. Chez le patient obèse, la stimulation de l'expression et de la sécrétion du PAI-1 est provoquée entre autres par une hyperinsulinémie, les AGL et par les VLDL associés au TG [74]. Bien que les mécanismes d'activation de la coagulation soient bien décrits pour d'autres maladies, l'étiologie précise dans le SMet reste à découvrir et résulte peut être de la participation simultanée de facteurs métaboliques et hormonaux.

### III.3.7. Inflammation métabolique chronique

L'inflammation métabolique se définit comme un état inflammatoire chronique, de bas grade, qui s'installe lors du développement des désordres métaboliques associés à l'obésité. Dans ce cas, des taux anormalement élevés de marqueurs plasmatiques inflammatoires sont observés. Une élévation des concentrations plasmatiques de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires, telles que la CRP (*C-Reactive Protein*), et certaines cytokines telles que l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-8 est retrouvée en cas de SMet ([Shoelson et al., 2007](#)) et d'obésité [75]. La CRP, protéine majoritairement produite au niveau hépatique, est l'un des marqueurs plasmatiques utilisés pour caractériser l'inflammation de bas grade. En situation d'obésité, l'IL-6 est sécrétée en quantité importante par le TA et est impliquée dans la production de CRP. En effet, la concentration de CRP dans le TA serait 10 fois supérieure chez les sujets obèses comparativement aux sujets normo-pondérés [76]. L'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  sont également sécrétés de manière abondante par le TA en cas d'obésité et participent au maintien de l'inflammation métabolique [77]. Enfin, d'autres molécules sont impliquées de manière indirecte. C'est par exemple le cas de la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) produite par les adipocytes et les macrophages. Elle permet de caractériser le niveau d'inflammation du TA, et plus particulièrement de l'état d'infiltration macrophagique du tissu [78]. Au-delà de leurs effets dans le processus inflammatoire, ces cytokines engendrent divers dysfonctionnements métaboliques. Certaines études suggèrent que l'IL6 et le TNF, *via* le recrutement de macrophages, joue un rôle dans l'insulinorésistance du TA.

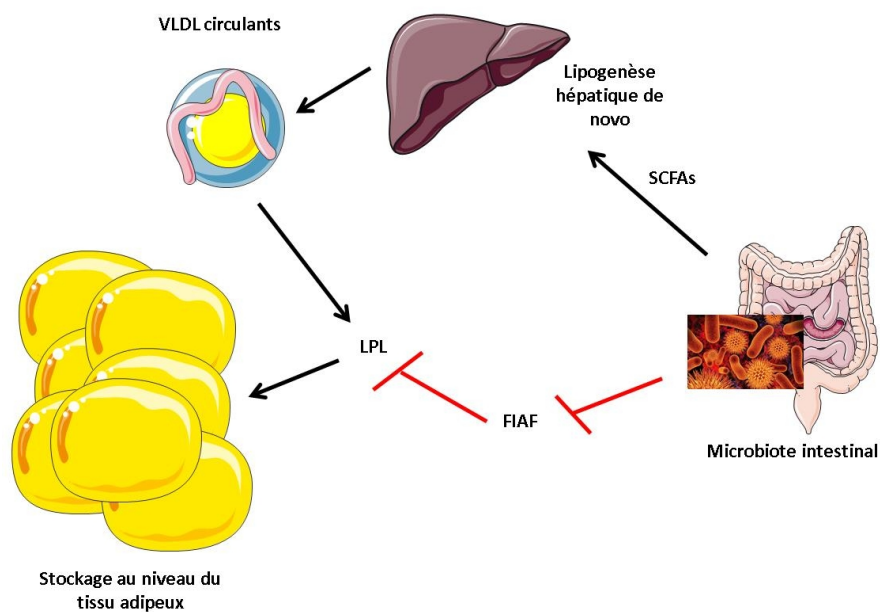
Cette résistance progresserait par la suite au niveau d'autres organes et provoquerait une perte de sensibilité à l'insuline et une inflammation chronique au niveau systémique [79]. Ainsi, l'obésité et l'inflammation qu'elle induit concourent au déclenchement de l'insulinorésistance et au développement du risque cardiovasculaire : l'état inflammatoire associé à une augmentation de l'expression de PAI-1 prédispose à l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou la mort subite d'origine coronarienne [80].

### III.3.8. Dérèglements du microbiote intestinal

De plus en plus d'études probantes démontrent qu'il existe une différence de composition entre le microbiote intestinal de sujets obèses, porteurs de SMet, et celui d'un individu mince. Le microbiote intestinal est un ensemble important de bactéries ( $100000.10^9$  réparties en plus de 3000 espèces) se trouvant le long du tractus digestif et dont la composition varie selon divers facteurs (localisation, sujets, âge, périodes de la vie d'un même individu...). L'ensemble constitue un écosystème qui fonctionne comme un organe à part entière en étroite symbiose avec l'organisme de chacun [81]. Le microbiote exerce des fonctions majeures au niveau du système immunitaire (effet barrière, maturation du système immunitaire et de la barrière intestinale...) [82,83,84,85], du métabolisme, avec une fonction comparable à celle du foie (hydrolyse des polysides végétaux, production d'acides gras (AG) à chaînes courtes, de vitamines, d'enzymes détoxifiant les xénobiotiques...) [86] et dans la régulation de l'appétit et le stockage des lipides [87]. De plus, d'autres études ont rapporté son interaction avec le SNC [88], sa capacité à induire l'angiogenèse [89], et son implication dans la régulation de la pression sanguine via la production d'AG à chaîne courte, notamment le propionate, exerçant son action au niveau d'un récepteur rénal chimiosensible (Olfr 78) responsable d'une modulation de la production de rénine [90]. Un dérèglement du microbiote intestinal, par son rôle majeur dans l'homéostasie lipidique, concourt au développement de nombreux troubles comme l'obésité et peut participer au développement d'un SMet. La régulation de la lipogenèse se fait de différente manière (figure 9) :

- Le microbiote va entraîner une expression accrue de gènes codant pour ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*) et SREBP-1 (*sterol response element-binding protein-1*) qui à leur tour activent des enzymes lipogéniques telles que l'ACC (*acétyl-CoA carboxylase*) et FAS (*fatty acid synthase*).

- La fermentation d'hydrates de carbone réalisée par le microbiote génère des AG à courte chaîne (SCFA), en particulier le propionate, qui peuvent également jouer le rôle de substrats dans la lipogenèse hépatique.
- L'inhibition des FIAFs (*fasting induced adipose factor*) qui est un inhibiteur circulant de la lipoprotéine lipase (LPL) responsable de l'incorporation des TG dans les adipocytes.
- Un microbiote normal permet de libérer une quantité d'énergie plus importante, ce qui désactive l'AMPK, et conduit à une diminution de l'oxydation des AG.



**Figure 9 :** Mécanisme de régulation de stockage des acides gras par le microbiote intestinal (FIAF : *fasting induced adipose factor*; LPL : *lipoprotéine lipase*, SCFA : *acides gras à courte chaîne*, VLDL: *very long density lipoprotein*).

Une des premières études s'intéressant au rôle du microbiote intestinal fut réalisée en 2004 par Backed et son équipe. En effet, ils ont comparé des souris sans bactérie (germ-free) à des souris rendue génétiquement obèses. Lorsque les souris germ-free reçoivent une transplantation de bactéries issues du ceacum (1<sup>ère</sup> partie du colon) des souris rendues génétiquement obèses, les souris germ-free prennent du poids (+ 60 %), développent une résistance à l'insuline malgré une diminution de leur consommation de nourriture de 29% et une augmentation de l'activité physique de 27% comparées au souris germ-free dont le microbiote n'a pas été modifié [91]. Ces études ont validé le rôle majeur du microbiote dans la régulation de l'homéostasie énergétique et

la transmissibilité du phénotype métabolique d'un individu à un autre. Les mécanismes impliqués sont nombreux.

La LPL joue un rôle central dans l'hydrolyse des TG et la libération des AG qui sont transportés dans les adipocytes. Une fois introduits dans les adipocytes, ces AG sont réestérifiés en TG et stockés sous forme de graisse. Sécrétée par le TA, l'intestin et le foie, l'angiopoïétine-like 4, faisant partie des FIAF et induite par le jeun, antagonise l'activité de la LPL, empêchant ainsi le stockage des TG sous forme de graisse. Bäckhead et ses collègues ont mis en évidence une augmentation de 122 % de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux (TA) et une diminution simultanée de l'expression de l'angiopoïétine-like 4 induisant une augmentation de la graisse corporelle chez des souris germ-free ayant reçu le microbiote de souris rendues génétiquement obèses. Par la suite, Bäckhead et coll ont évalué l'effet de l'angiopoïétine-like 4 sur le catabolisme en comparant la sensibilité des souris germ-free invalidées pour l'angiopoïétine-like 4 à des souris germ-free sauvages. Comparées aux souris sauvage germ-free, les souris KO ne sont pas résistantes à l'obésité induite par un régime alimentaire enrichi (représentant un régime « occidental »). Ces expériences ont donc permis de développer un modèle dans lequel le microbiote intestinal supprime l'expression de l'angiopoïétine-like 4 en réponse à la sensibilité de l'hôte à un régime enrichi, et ce, en augmentant l'activité de la LPL et le dépôt graisseux au niveau adipocytaire [92,93]. Des études menées chez des souris germ-free ayant reçu le microbiote de souris rendue génétiquement obèses ont permis de mettre en évidence une augmentation accrue de la lipogenèse. Le glucose active le ChREBP, l'ACC, la FAS et le SREBP-1, pour activer la lipogenèse et participer à la mise en place de l'insulinorésistance [92].

La restauration d'un microbiote efficace peut se faire via différentes façons. Des modifications alimentaires peuvent favoriser l'apparition de bactéries bénéfiques, tout comme la consommation de prébiotiques (polysaccharides favorisant la croissance de la flore intestinale) et de probiotiques (micro-organismes permettant de repeupler la flore intestinale). Chez la souris, l'addition de prébiotiques permettant la croissance de bactéries de type *bifidobacterium* permet de réduire la résistance à l'insuline et l'obésité en diminuant l'état pro-inflammatoire produit par le microbiote en réponse à un régime enrichi [94]. De la même manière, Ma et coll ont évalué l'effet des probiotiques sur l'obésité, la stéatose et la résistance à l'insuline. Dans cette étude, des souris sauvages ont reçu un régime enrichi, supplémenté ou non par un mélange de probiotiques (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*). Les souris recevant le régime enrichi seul ont développé une



stéatose et une résistance à l'insuline. En revanche, celles qui avaient reçu une supplémentation en probiotiques ont présenté une amélioration de ces symptômes [95]. Enfin, la dernière technique permettant de restaurer un microbiote sain est la transplantation fécale. Cette méthode est connue depuis plus de 50 ans mais a récemment montré son efficacité dans le cadre de l'éradication d'une infection à *Clostridium difficile* responsable d'une diarrhée d'intensité grave ainsi que d'une maladie inflammatoire du colon (colite pseudo-membraneuse) [96]. Actuellement, des études portant sur cette méthode visent à évaluer ses effets bénéfiques sur la résistance à l'insuline chez des patients atteints de SMet. Ils ont reçu une infusion intestinale provenant de donneurs sains ou malades. Après 6 semaines, les sujets ayant reçu l'échantillon provenant de donneurs sains présentaient une augmentation de la sensibilité à l'insuline (clairance du glucose : 26.2 au début du traitement, à 45.3 mmol/kg/min à la fin du traitement;  $p < 0.05$ ) comparée à celle observée chez les sujets recevant les fèces de donneurs malades. Cette technique doit donc être développée comme un nouveau moyen thérapeutique capable d'améliorer certains troubles du SMet [97].

## **IV. Le syndrome métabolique et le système nerveux sympathique**

### **IV.1. Généralités sur le système nerveux autonome**

Le SNS et le SNP sont les 2 composantes du système nerveux autonome (SNA). Le SNA permet la régulation de l'homéostasie interne de l'organisme, en assurant les fonctions végétatives comme les fonctions cardiovasculaires, respiratoires ou digestives. Dans des conditions physiologiques, le SNS et le SNP fonctionnent en équilibre. L'activation du SNS prépare l'organisme à l'activité tandis que le SNP amène un ralentissement général des fonctions de l'organisme. Ainsi, devant un stress important, le SNS, via l'activité d'un neurotransmetteur et d'une hormone, la noradrénaline et l'adrénaline respectivement, orchestre la réponse de fuite ou de combat. A l'inverse, l'activation du SNP ralentit le rythme cardiaque et l'activité respiratoire, diminue la PA, et favorise les fonctions digestives et sexuelles via l'action de l'acétylcholine.

Le SNS prend naissance dans des centres bulbaires d'où partent des fibres pré-ganglionnaires en provenance du tronc cérébral (TC) et de la moelle épinière. Elles aboutissent aux ganglions para- et pré-vertébraux de chaque côté de la moelle épinière, mais également au niveau de la glande médullo-surrénale qui synthétise et sécrète essentiellement, dans les conditions physiologiques, de l'adrénaline. C'est à partir des ganglions que partent les fibres post-ganglionnaires sympathiques pour libérer de la noradrénaline afin de stimuler deux grands types de récepteurs au niveau des organes innervés, les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques. L'activation du SNS provoque également la mise en jeu de la médullosurrénale responsable de la sécrétion de l'adrénaline dans la circulation sanguine. L'action conjointe de l'adrénaline et de la noradrénaline induit de nombreuses réactions: augmentation de la fréquence cardiaque et de la fréquence respiratoire, dilatation des vaisseaux musculaires, constriction des vaisseaux de la peau, transpiration, analgésie, dilatation pupillaire, augmentation du tonus musculaire, diminution du temps de coagulation, mobilisation d'énergie (augmentation de captage du sucre par les muscles et du métabolisme hépatique du glucose), diminution des autres voies consommatrices d'énergie (diminution de la digestion, diminution de la croissance, baisse de l'immunité...). La modulation

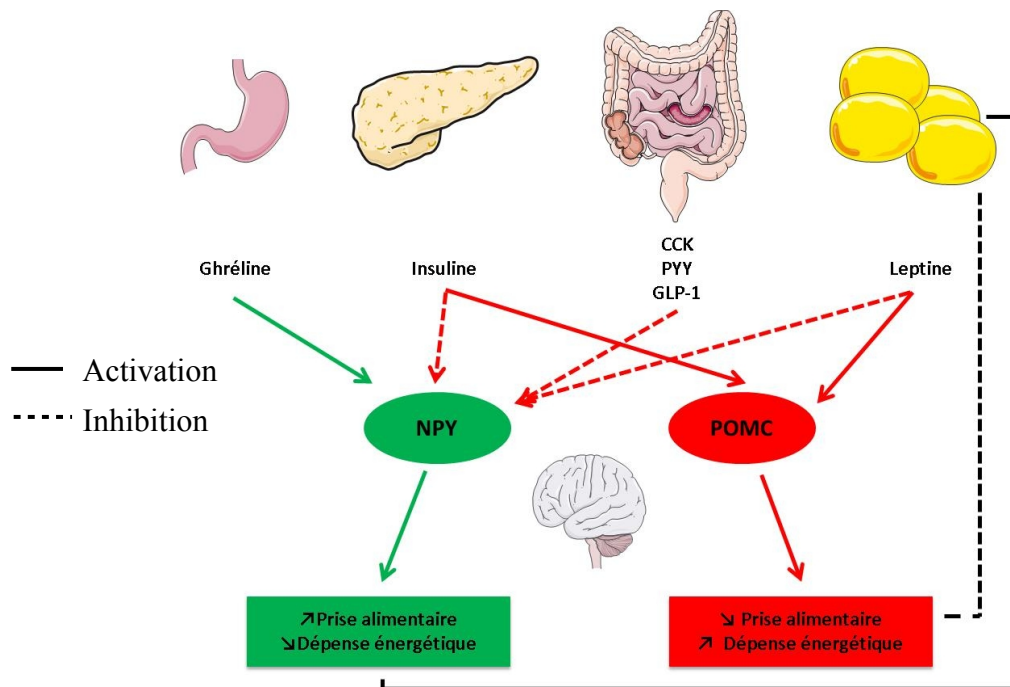
de l'activité des centres sympathiques bulbaires s'effectue grâce à plusieurs types de récepteurs : des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, des récepteurs  $I_1$  aux imidazolines ( $RI_1$ , au niveau du noyau réticulaire latéral en particulier) et des récepteurs de la sérotonine. La stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques ou  $RI_1$  a la capacité d'inhiber l'activité du SNS.

Le maintien de l'homéostasie énergétique permet de conserver un équilibre dynamique entre les dépenses (activité physique et métabolisme basal) et les apports d'énergie (alimentation). Ainsi, cet équilibre permet de conserver un poids corporel stable. En cas de dérèglement homéostatique, un système de régulation se met en place afin de rétablir l'équilibre. Les mécanismes biologiques de l'homéostasie énergétique font intervenir plusieurs acteurs : les organes périphériques (foie, pancréas, muscle, TA...) et le système nerveux central (SNC). La régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique implique que le SNC soit informé de manière instantanée du statut énergétique de l'organisme par des signaux provenant de la périphérie. Les structures du SNC impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique sont le TC et l'hypothalamus [98]. En effet, ils permettent l'intégration des informations provenant des organes périphériques et arrivant principalement au niveau du bulbe rachidien. Le TC est constitué de noyaux-relais primordiaux entre l'hypothalamus et le SNA, comme le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMV) et le noyau du faisceau solitaire (NFS). Il contient la majorité des neurones pré-ganglionnaires vagues cibles des projections issues de l'hypothalamus [99]. Son organisation lui permet d'être ainsi relié aux organes du métabolisme par le nerf vague. Tout dérèglement de cette cascade peut conduire à l'apparition de troubles métaboliques observés dans le SMet. Il existe une communication permanente entre la périphérie et le SNC grâce à des signaux de nature hormonale (insuline, leptine, ghréline,...), métabolique (glucose, AG, protéines...) et nerveuse (SNA). En cas d'anomalies, le SNC peut rapidement déclencher des réponses comportementales (ajustement de la prise alimentaire), neuro-endocrines (système hypothalamo-hypophysaire) et végétatives (au niveau périphérique sous l'action du SNA). Le SNA est l'un des acteurs essentiels à la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, l'augmentation du tonus parasympathique a lieu en situation d'excès énergétique et son action est anabolique : il induit le stockage du glucose et des AGL (glycogénèse et lipogénèse). A l'inverse, celle du SNS induit la mobilisation de ces composés à partir des tissus périphériques impliqués dans la dépense ou le stockage de l'énergie (TA, foie, muscle). Des variations dans les apports énergétiques provoquent des changements d'activité du SNA. En effet, l'absence d'apports lipidiques provoque une activation

du SNS alors qu'un épisode hypoglycémique engendre celle du SNP. Les effets du SNA sont soit directs, sur les tissus cibles qu'il innerve, soit indirects par la libération d'hormones que son activation provoque [100]. La région cérébrale la plus impliquée dans la régulation de la balance énergétique est l'hypothalamus, et plus particulièrement le noyau arqué (ARC). Ce dernier joue un rôle fondamental dans l'intégration des signaux de satiété et de faim. L'ARC contient 2 populations de neurones impliquées dans la régulation du comportement alimentaire : les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) et les neurones à neuropeptide Y (NPY) et Agouti related protein (AgRP), régulant de manière opposée le métabolisme énergétique. L'activation des neurones POMC induit la production d' $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) et de cocaine and amphetamine related transcript (CART) qui vont activer les récepteurs à la mélanocortine (MC) au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus afin d'induire un effet anorexigène. En revanche, l'activation des neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY/AgRP) induit un état orexigène par l'action antagoniste de l'AgRP sur les récepteurs MC, inhibant l'action des neurones POMC [101]. Ces deux populations neuronales agissent de manière antagoniste et projettent vers des neurones situés dans d'autres régions de l'hypothalamus (le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau ventromédian (VMN) ou l'hypothalamus latéral (LH) afin de permettre la transmission des informations au SNA [102]. Les fibres du LH sont reliées au noyau dorsal moteur du nerf vague, au noyau du faisceau solitaire et aux noyaux ambigus qui contiennent les fibres pré-ganglionnaires du SNP. Le VMN est connecté aux fibres pré-ganglionnaires sympathiques situées dans la colonne inter-médio-latérale (IML) de la moelle épinière. Les noyaux dorso-médian (DMN) et PVN modulent également l'activité du SNA. Le DMN reçoit des projections du LH et du VMN et se projette sur le DMV, alors que le PVN émet des projections à la fois au niveau parasympathique et sympathique dans la zone thoraco-lombaire [103,104].

L'intégration de signaux antagonistes permet l'élaboration d'une réponse complexe afin de rétablir la balance énergétique. Les neurones POMC/CART réduisent l'apport alimentaire et augmentent la dépense énergétique en activant les récepteurs MC, tandis que les neurones NPY/AgRP ont une action opposée en exerçant une inhibition des neurones POMC/CART et au niveau du PVN.

L'ensemble des mécanismes détaillés ci-dessus sont récapitulés dans la figure 10.



**Figure 10 : Régulation de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus**

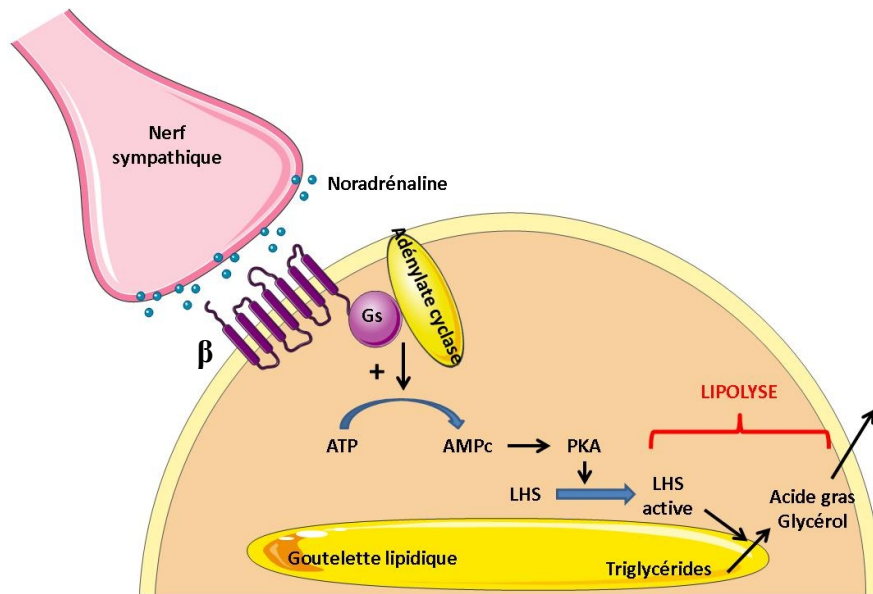
Les signaux de régulation à court terme (signaux de satiété) provenant du tractus gastro-intestinal et les signaux de régulation à long terme tels que la leptine et l'insuline sont sécrétés proportionnellement au degré d'adiposité, puis intégrés au niveau de l'hypothalamus. Une boucle de régulation s'établit entre le système nerveux central et la périphérie via le système nerveux autonome. (CCK : cholécystokinine, GLP-1 : glucagon like peptide 1, NPY : neurone à neuropeptides Y, POMC : neurones à pro-opiomélanocortine, PYY : peptide YY).

## **IV.2. Effet direct du système nerveux sympathique sur la régulation de l'activité métabolique**

### **IV.2.1. Au niveau du tissu adipeux**

Dans les années 1990, Bartness et son équipe démontrent pour la première fois l'existence d'une innervation directe du TA [105]. Ces travaux mettent en évidence la présence de terminaisons en faible nombre mais ayant la capacité de libérer de la noradrénaline en de nombreux sites. Par la suite, d'autres travaux réalisés chez le rat ont permis, grâce à des traceurs neuronaux rétrogrades, l'identification de fibres reliant certaines zones du cerveau à de nombreux dépôts adipeux. Des résultats ultérieurs sont venus étayer et confirmer l'hypothèse d'une communication entre le TA et le SNS [106]. Afin d'agir de manière coordonnée, Stanley et coll ont démontré que les fibres sympathiques innervant le TA projetaient également au niveau du foie, un autre organe clé du

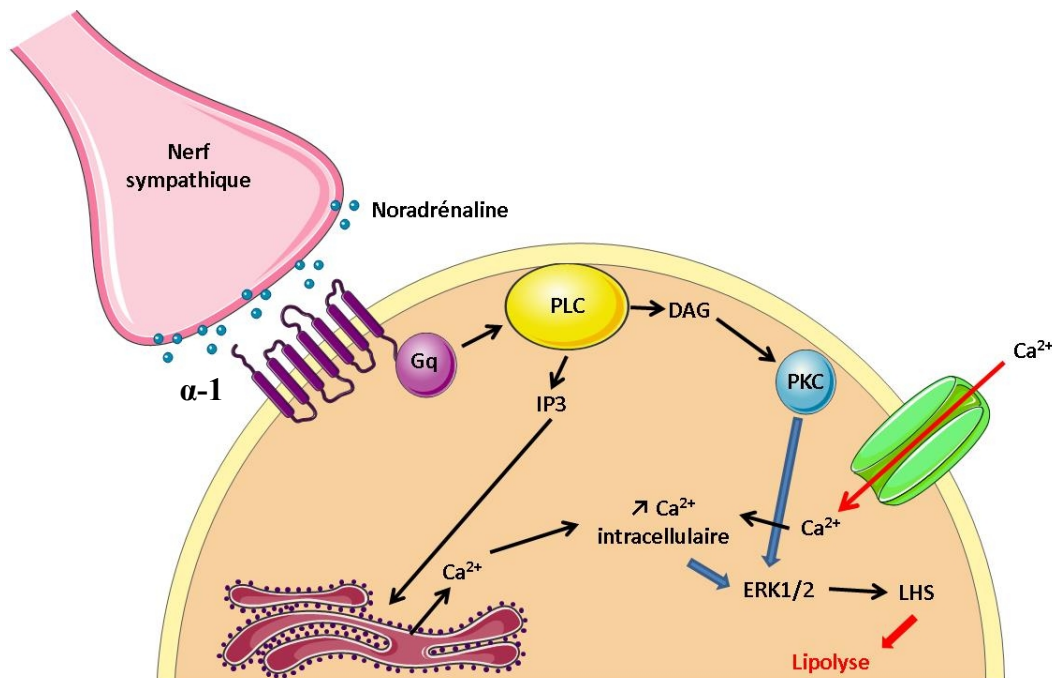
métabolisme [107]. Le TA blanc est presque exclusivement innervé par des fibres sympathiques, bien que des fibres parasympathiques aient également été identifiées. Les terminaisons nerveuses sympathiques sont essentiellement localisées au niveau vasculaire, même si certains adipocytes reçoivent directement des afférences noradrénergiques. Les récepteurs  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -adrénergiques sont couplés à une protéine Gs. Ils induisent l'augmentation de la production de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), provoquant l'activation de la PKA (protéine kinase A) et de la lipase hormonosensible (LHS) pour provoquer la lipolyse [108]. Ce processus induit la lyse des TG en glycérol et en AGL (figure 11).



**Figure 11 : Lipolyse et récepteurs  $\beta$ -adrénergiques**

(AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate,  $\beta$  : récepteur  $\beta$ -adrénergique, Gs : protéine G stimulatrice, LHS : lipase hormono-sensible).

Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques sont, quant à eux, couplés à une protéine Gi et vont diminuer la quantité d'AMPc intracellulaire afin d'exercer une action anti-lipolytique [109]. Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont couplés à une protéine Gq. Leur activation est observée dans le TA sous cutané hypertrophié des sujets obèses. Leur activation stimule la phospholipase C pour hydrolyser le phosphatidylinositol biphosphate membranaire (PIP2) en DAG et inositol-1-4-5-triphosphate (IP3). Le calcium intracellulaire est libéré, ce qui active la PKC, stimule la LHS et induit la lipolyse [110] (figure 12).



**Figure 12** : Lipolyse induite par les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques

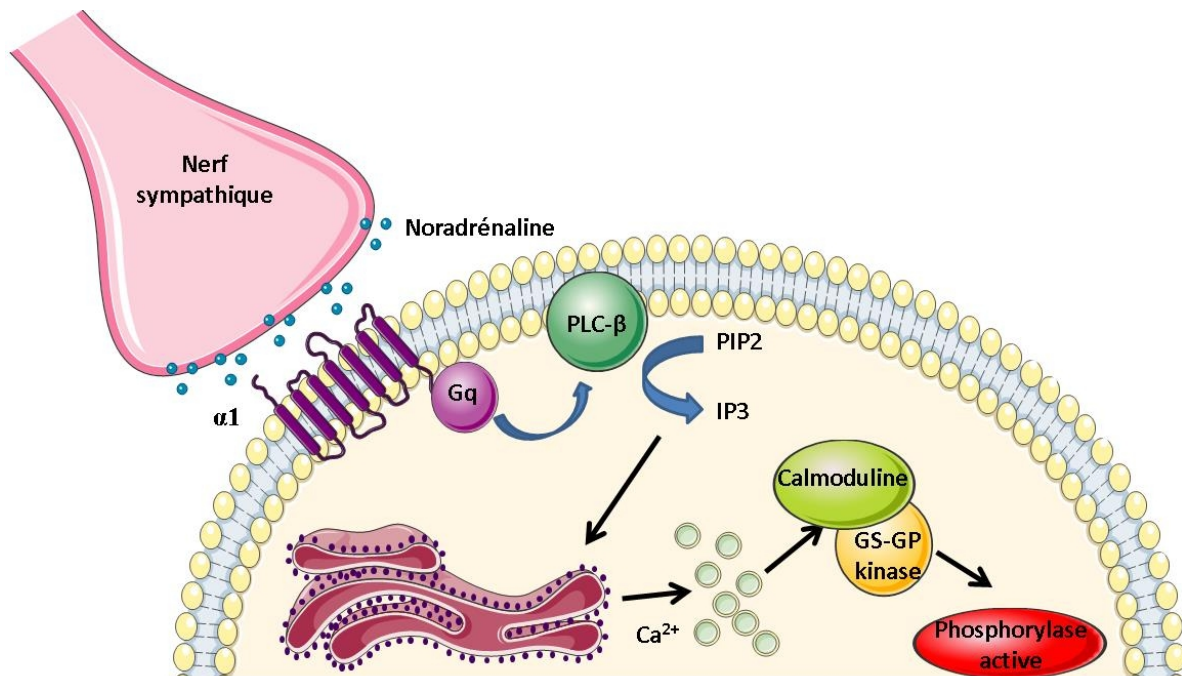
( $\alpha-1$  : récepteur  $\alpha 1$ -adrénergique, DAG : diacylglycérol, IP3 : inositol triphosphate, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, LHS : lipase hormono-sensible).

L'action lipolytique des catécholamines est possible lorsque les niveaux d'insuline sont bas puisque cette dernière possède un effet anti-lipolytique prédominant. L'activité lipolytique dépend essentiellement de la proportion de récepteurs adrénergiques présents à la surface de l'adipocyte : les récepteurs  $\beta$  ( $\beta_1$  et/ou  $\beta_3$ ) activent la lipolyse tandis que les récepteurs  $\alpha$  l'inhibent dans la majorité des cas, sauf chez le sujet obèse [110,111]. En fonction de la quantité de chacun des récepteurs présents à la surface de la cellule, l'activation du SNS induira ou non une activité lipolytique. L'hyperactivité sympathique pourrait jouer un rôle adaptatif en réaction à la surcharge pondérale. Une hyperactivité sympathique chronique conduit à une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Ainsi dans l'obésité, l'effet potentiellement régulateur de l'activation du SNS par une dérégulation de la balance énergétique n'aurait pas lieu. D'ailleurs, les traitements prolongés par les  $\beta$ -bloquants non sélectifs tels que le propranolol induisent un effet hyperlipémiant se traduisant par une augmentation du taux de TG plasmatiques [112].

#### IV.2.2. Au niveau hépatique

Le foie est un organe richement innervé par le nerf vague (parasymphatique) et par le nerf splanchnique (sympathique ou parasymphatique). Les fibres nerveuses sympathiques pénètrent au niveau du hile et trouvent leur origine dans le TC. Le noyau ventromédian et le noyau paraventriculaire (PVN) reçoivent des projections hypothalamiques permettant la régulation de l'homéostasie énergétique. Les nerfs sympathiques et parasymphatiques se rejoignent pour former le plexus antérieur au niveau de l'artère hépatique et le plexus postérieur au niveau de la veine porte. Les premières expériences ayant permis d'établir les conséquences de l'innervation sympathique au niveau hépatique ont été réalisées par l'équipe de Jungermann en Allemagne. Dans une préparation *ex vivo* de foies perfusés isolés, ils ont démontré le rôle du SNS dans le contrôle de l'activité des enzymes hépatiques [113]. Quelques années plus tard, une équipe japonaise apporte de nouveaux résultats et observe que l'activation sympathique de la glycogénolyse est un phénomène indépendant de l'AMPc et qu'elle n'implique pas l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. En effets, la stimulation du SNS permet de libérer de la noradrénaline venant se fixer au niveau de récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques situés à la surface des hépatocytes. La voie de signalisation concernée implique ensuite la production d'inositol triphosphate (IP3) et l'augmentation cytosolique de calcium. Ce dernier active la glycogène phosphorylase kinase en se liant à la sous-unité calmoduline de cette enzyme et induit la phosphorylation activatrice de la glycogène phosphorylase (GP) et de la glycogène synthase (GS) [114]. Il en résulte une diminution des réserves de glycogène par activation de la GP et une diminution de sa production par activation de la GS (figure 13). La noradrénaline relarguée, en plus de son action au niveau hépatocytaire, semble également agir au niveau de cellules non parenchymateuses sécrétant des prostaglandines de différents types (F2, D2 et E2). Ces dernières se fixent au niveau de leurs récepteurs mis en évidence à la surface des hépatocytes et activent également la glycogénolyse [115].



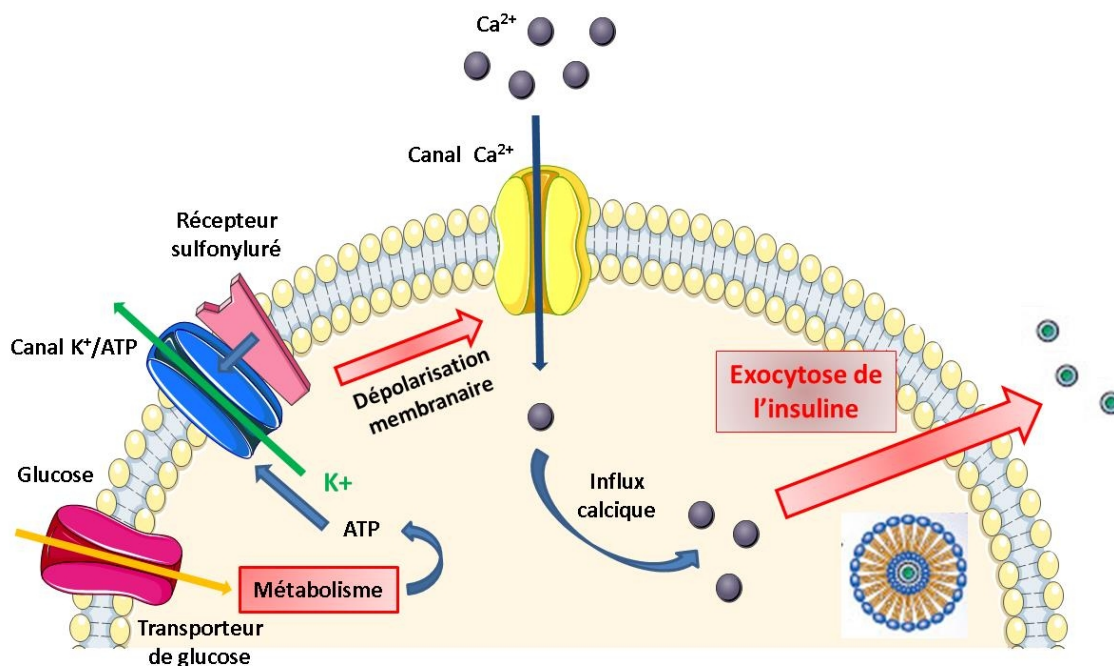


**Figure 13 :** Cascade de signalisation de la régulation de la glycogène phosphorylase activée par la noradrénaline dans le foie

( $\alpha 1$  : récepteur  $\alpha 1$ -adrénergique, GS-GP kinase : glycogen synthase-glycogen phosphorylase kinase,  $IP_3$  : inositol-1,4,5-trisphosphate, PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PLC- $\beta$  : phospholipase C- $\beta$ ).

### IV.2.3. Le pancréas

Le pancréas est un organe situé entre la rate et le foie. Cette glande est dite exocrine et endocrine. Elle est exocrine parce qu'elle est impliquée dans la sécrétion du suc pancréatique qui est déversé dans le tube digestif et permet la digestion des lipides et des glucides et la neutralisation de l'acidité provenant des sécrétions gastriques. Le pancréas est également dit endocrine parce qu'il sécrète des hormones dans le sang, dont l'insuline qui est produite par les îlots de Langerhans. Elle participe à la régulation de l'homéostasie glucidique et au stockage de l'énergie. Les mécanismes responsables de la sécrétion d'insuline sont présentés dans la figure 14. Les îlots de Langerhans ont été décrits pour la première fois à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Langerhans (Langerhans, 1869 Langerhans P. Beitrage zur Mikroskopischen Anatomie der Bauchspeichel Druse. Berlin: Gustav Lange, 1869). Au cours de ses expériences, il a pu observer chez le lapin et chez le chat la présence de fibres nerveuses non myélinisées au niveau des îlots pancréatiques.



**Figure 14** : Régulation locale de la sécrétion d'insuline

(ATP : adénosine triphosphate, canal K<sup>+</sup>/ATP : canal potassique dépendant de l'ATP).

Porte fut le premier à démontrer chez l'Homme que la stimulation  $\alpha$ -adrénergique inhibait la sécrétion au niveau local [116], tandis que des agonistes  $\beta$ -adrénergiques stimulaient la sécrétion d'insuline [117]. Ces résultats suggéraient que la sécrétion d'insuline était sous l'influence directe d'un contrôle sympathique. Quelques années plus tard, Campfield et ses collaborateurs ont démontré que la sécrétion d'insuline est stimulée par l'acétylcholine, indiquant l'implication du SNP, la libération d'insuline dépendante de la stimulation cholinergique étant diminuée en présence d'adrénaline [118]. Ces résultats impliquent l'existence d'un contrôle neuronal complexe mettant en jeu à la fois le contrôle parasympathique et sympathique sur les cellules  $\beta$ . D'autres études ont permis de confirmer ces observations. Chez le chien, l'activation électrique des nerfs sympathiques induit un relargage de noradrénaline dans les veines pancréatiques [119]. Des observations antérieures faisaient état de l'effet de traitements exogènes avec de la noradrénaline : elle inhibait de manière directe la sécrétion d'insuline induite par le glucose [116]. Il fut donc conclu qu'au niveau pancréatique, l'adrénaline était le médiateur de l'inhibition induite par l'activation du SNS. De plus, le blocage non-spécifique des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques par la phentolamine [120] et le blocage spécifique des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques par la clonidine [121] ont validé leur implication directe dans l'inhibition observée. Cependant, la noradrénaline a également la capacité d'induire la sécrétion d'insuline. En effet, la stimulation

des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques au niveau des îlots de Langerhans provoque la sécrétion d'insuline [122]. De même, la stimulation simultanée des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et  $\beta_2$ -adrénergiques situés sur les cellules  $\alpha$  pancréatiques provoque la sécrétion de glucagon qui à son tour induit la libération d'insuline [123,124]. Les mécanismes impliqués sont variés et font intervenir les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques mais également des phénomènes indépendants de l'adrénaline.

#### *IV.3.1.1. Mécanismes adrénériques-dépendants*

- Récepteur  $\alpha_2$ -adrénergiques

Comme décrit précédemment, la sécrétion d'insuline induite par le glucose est inhibée par la noradrénaline ou par l'activation directe des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques par la clonidine. Cette inhibition est provoquée par une hyperpolarisation des cellules  $\beta$  pancréatiques. L'hyperpolarisation est provoquée par l'ouverture des canaux potassique ATP dépendants. Ceux-ci permettent ainsi la sortie des ions  $K^+$ , réduisent l'influx de calcium et diminuent la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  [125]. L'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques exerce également son effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline en réduisant la formation d'AMPc [126] et en inhibant l'exocytose [127].

- Récepteur  $\beta_2$ -adrénergiques

L'activation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques augmente la formation d'AMPc dans les cellules  $\beta$  pancréatiques et la sécrétion d'insuline [128].

#### *IV.3.1.2. Mécanismes indépendants de l'adrénaline*

Les effets non-adrénériques inhibiteurs de la sécrétion d'insuline sont induits par la galanine et par le neuropeptide Y (NPY). Ces neuropeptides sont tous deux localisés dans les terminaisons des nerfs sympathiques des îlots pancréatiques et constituent les principaux co-médiateurs de la noradrénaline. Ils inhibent la sécrétion d'insuline en activant les canaux potassiques inhibés par l'ATP [129,130].

### **IV.3. SNS et syndrome métabolique**

Les mécanismes décrits précédemment nécessitent que le cerveau soit informé de manière permanente des dérèglements de l'homéostasie énergétique se produisant à la périphérie. Des mécanismes permettent la transmission des informations vers le SNC : les afférences nerveuses provenant des organes impliqués dans le métabolisme qui véhiculent des signaux de diverses origines (mécaniques, osmotiques, chimiques et hormonales), et des signaux métaboliques et hormonaux (glucose, AG, leptine, ghréline...) qui agissent directement au niveau de l'hypothalamus.

#### **IV.3.1. SNS et obésité**

Selon l'OMS, le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé [131]. L'indice de masse corporelle (IMC) est un moyen qui permet de mesurer l'obésité chez les hommes et chez les femmes adultes : il correspond au poids de la personne (en kilogrammes) divisé par le carré de sa taille (en mètres). Lorsque l'IMC est égal ou supérieur à 30, le sujet est considéré comme obèse. Une personne dont l'IMC est compris entre 25 et 29 est considérée en surpoids.

Parce que le SNS joue un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique, du système cardiovasculaire et de la sécrétion d'insuline, plusieurs équipes ont émis l'hypothèse qu'un dysfonctionnement du SNS pourrait être associé à l'obésité. Les modèles expérimentaux de l'obésité ont émergé au cours des années 80 et ont permis d'émettre des hypothèses à propos du rôle du SNS dans le développement de l'obésité. Contrairement aux observations faites aujourd'hui, les premières hypothèses émises suggéraient qu'une diminution de l'activité du SNS induisait un gain de poids par inhibition de la thermogenèse (Bray GA. 1986). Des études plus récentes, réalisées chez des patients obèses, ont montré que l'activité du SNS est augmentée comparativement à des patients de poids normal [131] et que cette hyperstimulation est importante dans le développement de l'HTA liée à l'obésité. Dans le cadre d'une HTA liée à l'obésité, des traitements antihypertenseurs tels que la clonidine, bloquant l'activité adrénergique, permettent de réduire le poids des patients [132]. Le lien entre hyperactivité du SNS et HTA est maintenant bien décrit : de nombreuses études ont montré une augmentation des catécholamines circulantes chez des patients obèses et hypertendus, ces dernières tendant à se normaliser lors

d'une perte de poids [133,134]. Cependant, il est intéressant de noter que cette association obésité/hyperactivité du SNS existe en l'absence d'une HTA. Par ailleurs, l'activité sympathique de patients présentant une obésité abdominale serait plus importante que celle de patients présentant une obésité périphérique, soulignant une fois encore l'importance de la disposition anatomique du TA [135].

L'origine de cette activation sympathique exagérée semble être plurifactorielle. Par exemple, chez des jeunes hommes en bonne santé, l'exposition au stress de longue durée augmente l'activité du SNS et induit une augmentation de la quantité de graisse abdominale malgré un suivi alimentaire et sportif. Les sujets développent également des troubles associés au SMet : augmentation de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), de l'insuline, des TG et du LDL-C [136]. Il semblerait aussi que les mécanismes de régulation du SNS soient altérés chez les obèses. En effet, lorsque l'on compare des sujets obèses non hypertendus à des sujets non obèses non hypertendus, ils présentent la même fréquence cardiaque et le même taux de noradrénaline plasmatique, mais chez les obèses, au niveau musculaire, l'activité sympathique est augmentée. De plus, après certaines manipulations pharmacologiques, la réponse du SNS est disproportionnée chez les sujets obèses [137]. Notons qu'une prise de poids modeste chez des sujets sains augmente l'activité du SNS sans modifier d'autres paramètres tels que les taux d'insuline [138]. L'hyperactivation du SNS chez les obèses pourrait également être en relation avec l'augmentation des concentrations plasmatiques de la leptine. Une concentration élevée de leptine augmente de 1.6 fois le risque de développer un SMet [139]. De plus, une administration de leptine au niveau intracérébroventriculaire et de l'ARC de l'hypothalamus augmente considérablement l'activité du SNS [140]. Enfin, l'insuline serait également responsable d'une suractivation du SNS, observée chez des patients obèses hyperinsulinémiques.

L'association de l'hyperactivité du SNS avec l'obésité est clairement établie chez l'Homme. Cependant, il semble difficile d'établir une relation de cause à effet entre les deux entités.

#### **IV.3.2. SNS et insulino-résistance**

L'insuline est la première hormone dont l'implication dans le contrôle nerveux du poids corporel a été démontrée [141]. Les récepteurs de l'insuline sont exprimés dans le SNC, mais avec une

plus grande densité dans l'aire hypothalamique. Dans ce dernier, ils sont présents en grand nombre dans le NA et en quantité moindre dans les DMN, VMN et dans le LH [142]. Par son action centrale, l'insuline inhibe la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques. Cette inhibition est régulée par le réseau neuronal du NA de l'hypothalamus, impliquant la voie de la mélanocortine et les neurones NPY/AgRP. En effet, des travaux réalisés chez les rongeurs et chez les primates ont mis en évidence d'une part, une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle après des injection d'insuline au niveau de l'hypothalamus, et d'autre part, une hyperphagie et une obésité après injection d'anticorps dirigés contre les récepteurs à l'insuline [142]. Au niveau du PVN, elle diminue la synthèse et la libération du NPY. En effet, chez le rat, l'administration d'insuline dans l'hypothalamus diminue l'expression de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) codant le NPY ainsi que sa libération. Chez l'Homme, la résistance à l'insuline est en règle générale associée à l'obésité abdominale et à l'ensemble des autres troubles du SMet, il paraît donc difficile d'évaluer l'activité sympathique de patients insulino-résistants de manière indépendante des autres troubles. La résistance à l'insuline se caractérise comme l'incapacité pour cette hormone de produire ses nombreuses actions, en dépit d'une sécrétion normale par les cellules pancréatiques  $\beta$  [143]. L'insuline induit diverses réactions biologiques en se liant à un récepteur spécifique capable de s'autophosphoryler puis de phosphoryler des substrats intracellulaires de façon à induire une réponse cellulaire. Les deux principales voies de signalisation activées par la liaison de l'insuline à son récepteur sont celles impliquant la PI3K et la protéine mitogen activated protein kinase (MAPK) [144]. Les effets de l'insuline sont multifactoriels et comprennent, entre autres, l'activation sympathique. L'association physiologique entre l'insuline et l'activation du SNS est particulièrement complexe. Masuo et coll, dans une étude prospective menée pendant 10 ans, ont dans un premier temps démontré qu'un niveau élevé de noradrénaline plasmatique était un facteur prédictif du développement d'une insulino-résistance [145]. Cependant, les études réalisées chez l'Homme indiquent que la réponse sympathique induite par l'insuline est hétérogène. En effet, en comparant des patients présentant un SMet, associé ou non à une résistance à l'insuline, il a été montré que l'activité sympathique est plus importante chez les patients insulino-résistants, de manière indépendante du relargage de noradrénaline [138]. Une hyperactivation du SNS peut engendrer de manière indirecte une insulino-résistance. En effet, il en résulterait une lipolyse accrue et une augmentation du relargage des AGL.

### **IV.3.3. SNS et troubles lipidiques**

#### ***IV.3.3.1. Rôle du SNS dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau hépatique***

Des études *in vivo* ont démontré qu'une activation sympathique stimule la production des complexes VLDL/TG pour permettre le transport des TG du foie vers les tissus extra-hépatiques. Chez le rat, une dénervation hépatique induit une diminution de noradrénaline disponible au niveau du foie et l'incorporation d'AG, administrés de manière exogène, dans les complexes VLDL/TG [146].

De manière intéressante, certaines hormones produites au niveau périphérique régulent le métabolisme lipidique en agissant au niveau du SNS. C'est par exemple le cas de l'incrétine glucagon-like peptide 1 (GLP-1), exerçant son effet au niveau de récepteurs exprimés dans plusieurs tissus, notamment dans l'hypothalamus. Chez les patients atteints de SMet, on retrouve une altération de la sécrétion de GLP-1 par les cellules intestinales qui est corrélée à une augmentation de l'incidence du diabète, des dyslipidémies et de l'insulinorésistance [147]. Des rats dont la concentration plasmatique de GLP-1 est élevée de manière chronique présentent une diminution de l'expression des gènes lipogéniques et du contenu hépatique en lipides [148]. Une injection de GLP-1 au niveau de l'hypothalamus induit les mêmes effets, suggérant que GLP-1 régule le métabolisme lipidique via des mécanismes centraux [149]. La leptine, une hormone produite par le TA blanc, diminue également l'expression des gènes lipogéniques et le contenu hépatique en lipides chez la souris [150]. Ces effets sont dépendants du SNS comme le prouve l'augmentation de la quantité de noradrénaline au niveau hépatique. La leptine est présente en grande quantité chez les obèses. Cependant, chez ces sujets, il semblerait qu'une résistance à la leptine se mette en place progressivement. La résistance à leptine est provoquée par un défaut de transport de l'hormone du TA blanc jusqu'à sa cible, augmentant sa concentration plasmatique et empêchant l'inhibition de l'expression de gènes lipogéniques [151].

#### ***IV.3.1.1. Role du SNS dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau du TA***



L'insuline et la leptine sont également impliquées dans la régulation de l'activité du SNS. Ces deux hormones sont des inhibiteurs des neurones NPY/AgRP. La leptine augmente l'activité du SNS au niveau du TA, induisant ainsi une activation de l'activité lipolytique [152]. Cependant, l'insuline a une action inhibitrice sur le SNS, il en résulte une diminution de la quantité d'AMPc intracellulaire. Elle diminue ainsi l'expression de gènes lipolytiques et augmente l'expression de gènes lipogéniques, induisant une inhibition nette de la lipolyse [153,154]. Ainsi, dans le SMet, une insulïnémie élevée favorise la lipogénèse. De plus, chez des souris, une étude récente démontre qu'une insulïnémie élevée favorise le stockage des AG au niveau du TA via une action sur le SNS [155]. Chez les patients atteints de SMet, ces deux hormones ont des effets délétères puisqu'elles augmentent les lipides circulants et favorisent la rétention des AG au niveau du TA.

#### **IV.4. SNS et hypertension artérielle**

Les mécanismes qui rendent compte d'un lien entre l'obésité et l'HTA sont multiples et font intervenir des facteurs hémodynamiques (non détaillés ici), hormonaux et métaboliques. On sait par exemple que l'hyperinsulïnémie, l'insulino-résistance et l'hyperactivation du SNS sont fortement corrélés au développement d'une HTA [156]. Plusieurs mécanismes semblent être à l'origine de ce phénomène :

Le premier mécanisme impliqué met en jeu les effets cardiaques des catécholamines sur les récepteurs  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ - adrénergiques au niveau du muscle cardiaque et au niveau du tissu nodal, les récepteurs  $\beta_1$ - adrénergiques étant exprimés de manière majoritaire chez l'Homme [157]. La stimulation de ces récepteurs a des effets inotropes positifs (augmentation de la contraction cardiaque), chronotropes positifs (augmentation de la fréquence cardiaque), dromotropes positifs (augmentation de la vitesse de conduction) et bathmotropes positifs (augmentation de l'excitabilité cardiaque). Dans le cas d'une hyperactivité du SNS, le « spillover » de noradrénaline est augmenté (mesure du taux de noradrénaline entrant dans la circulation sanguine) et est responsable des effets cités précédemment. Grâce à cette technique, il a été démontré que le SNS augmente la fréquence cardiaque au repos et par conséquent, la PA [158].

Le second mécanisme mis en jeu fait intervenir le SRAA. Une activité sympathique soutenue favorise la réabsorption tubulaire de sodium et d'eau en agissant directement au niveau des tubules, mais également en augmentant la libération de rénine au niveau des cellules



juxtaglomérulaires et l'hyperréactivité vasculaire à l'angiotensine II. Les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques sont ensuite activés pour permettre la rétention sodée, ce qui induit une hypervolémie plasmatique, une augmentation du débit cardiaque et de la PA [159]. Enfin, un dysfonctionnement du baroréflexe est également impliqué dans le développement de l'HTA. Cette partie est développée page 27.

Dans le cadre du SMet, les troubles métaboliques observés sont également impliqués dans l'entretien de l'hyperactivité du SNS et influence ainsi les niveaux de la PA. Les AGL semblent également interagir avec le SNS. Ainsi, Gosmanov et coll démontrent qu'une administration (orale ou i.v.) d'AGL chez des sujets obèses augmente la PA et l'activité du SNS de manière indépendante de la leptine, de l'insuline et de la glycémie des patients [160]. Une autre explication potentielle d'une hyperactivité du SNS et de l'HTA serait la résistance à la leptine établie chez les sujets obèses. En effet, des patients obèses de sexe masculin recevant des injections périphériques ou centrales de leptine présentent une augmentation de la PA et de l'activité sympathique au niveau des nerfs rénaux [161]. L'insulino-résistance/hypersulinémie peut aussi influencer la PA par ses effets stimulants du SNS. De plus, il semblerait que l'HTA dans une situation d'insulino-résistance corresponde à une résistance sélective retrouvée au niveau de certains organes (TA, foie, muscle squelettique) avec préservation de la sensibilité au niveau du rein et du SNS [162]. C'est ainsi que chez le rat, l'administration d'insuline au niveau du SNC induit une augmentation de l'activité du SNS [163], l'activation de la PI3K et d'une MAPK responsables de la transmission de l'activité sympathique au niveau des organes cibles.

## **V. Prise en charge actuelle du syndrome métabolique**

### **V.1. Mesures hygiéno-diététiques**

La prise en charge du SMet vise à cibler les différents composants du SMet afin de limiter les risques d'apparition de complications cardiovasculaires et/ou de DT2. Elle doit tout d'abord se faire par une prise en charge nutritionnelle visant une perte de masse grasse abdominale. Elle consistera en la modification des facteurs nutritionnels et l'adoption de nouvelles règles d'hygiène de vie (exercice physique régulier, arrêt du tabagisme...) [164]. La prise en charge se fera ensuite de manière plus spécifique en intervenant sur différents composants du SMet à l'aide de médicaments.

#### **V.1.1. Alimentation**

De nombreuses études encouragent les patients atteints de SMet à perdre du poids en alliant modifications des habitudes alimentaires et du mode de vie [165]. Les démarches entreprises doivent alors s'accompagner d'un support psychologique afin de limiter le stress, connu pour ses effets néfastes sur le gain de poids [166], d'exercices physiques réguliers et d'une modification du régime alimentaire. La plupart des recommandations actuelles préconise une perte de poids de 5 à 10% du poids total pour obtenir des améliorations cardiovasculaires et métaboliques [167]. Une étude réalisée sur près de 230 volontaires révèle qu'une perte de poids modérée ( $8 \pm 8.7$ kg) permet de réduire la prévalence du SMet de 7.6% (34.8% avant régime, 27.2% après régime) [168]. De plus, des études réalisées à court terme ont démontré qu'une perte de poids de 5% suffisait à améliorer le profil lipidique et la glycémie à jeun [169]. Les mécanismes responsables de l'amélioration du statut cardio-métabolique des patients ayant perdu du poids sont controversés mais impliquent probablement des modifications du niveau d'inflammation du TA. En effet, une expansion anormale du TA entraîne une augmentation de l'inflammation qui se manifeste par une augmentation de l'expression de gène codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des chemokines. Ces modifications entraînent ainsi une inflammation systémique et une résistance à l'insuline [170].

Afin d'obtenir une perte de poids modérée mais durable, il est nécessaire d'associer une restriction calorique à une alimentation équilibrée. En France, selon l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, notre alimentation doit être constituée de 35 à 40% de lipides totaux, avec une réduction des AG saturés essentiellement constitués de graisses animales ; 10 à 27% de protéines ; 50 à 55% de glucides en réduisant la proportion des glucides simples. Un certain nombre d'équipes se sont intéressés à la composition de la ration alimentaire. Pour avoir un effet positif sur le SMet, un régime pauvre en graisses et en glucides est souvent recommandé, mais un apport plus élevé d'AG insaturés au détriment d'une quantité importante de glucides semble être bénéfique. C'est par exemple le cas du régime dit « méditerranéen ». Cette alimentation est riche en huile d'olive, fruits, légumes, légumineuses, avec une consommation modérée d'alcool, de produits laitiers et de viandes. Plusieurs études ont mis en avant la capacité de ce régime à réduire le risque de contracter un SMet, les maladies cardiovasculaires et la mortalité liée à ces dernières [171,172]. En 2007, Esposito et coll montrent que le régime méditerranéen diminue de 51% le risque de développer un SMet. D'autres avantages sont attribués à ce régime, il diminue l'incidence du diabète, le risque cardiovasculaire et améliore le métabolisme lipidique [173].

Pour conclure, une alimentation variée et riche en fruits et légumes, légumineuse, céréales complètes et pauvre en graisses animales, s'accompagnant d'une restriction sodée et d'une hygiène de vie correcte, peut suffire à réduire considérablement le risque de développer un SMet.

### **V.1.2. Activité physique**

La plupart des études ont comparé des groupes avec activité physique (résistance, endurance, ou les deux) à des groupes sans entraînement. L'intégralité des études met en évidence les effets positifs d'une activité sportive. En effet, chaque composant du SMet peut être amélioré par la pratique sportive : diminution de la graisse viscérale [174], augmentation du HDL-C et diminution des TG [175], diminution de la PA [176] et augmentation de la sensibilité à l'insuline [177]. Ces améliorations sont d'autant plus soutenues que l'activité sportive est associée à une réévaluation du régime alimentaire. Dans la population française (étude MONICA), la prévalence du SMet est significativement inférieure chez les personnes pratiquant une activité physique régulière comparée aux sédentaires (Gamila et Dallongeville, 2003). Dans la cohorte de Lanksonen (étude randomisée), 612 hommes indemnes de toutes pathologies ont été suivis

pendant quatre ans. Au terme de l'étude, 107 sujets avaient développé un SMet. L'évaluation du niveau d'activité montre que les sujets ayant une durée totale d'activité physique dans le tiers supérieur ont moins de risque de développer un SMet que ceux dans le tiers inférieur, quelque soit l'intensité de l'activité physique réalisée. Les sujets faisant au moins trois heures par semaine d'activité physique modérée (ce qui correspond aux recommandations internationales d'activité physique) ont un risque diminué de 48 % par rapport aux sédentaires (< 60 minutes d'activité physique par semaine). De plus, la réalisation d'au moins 60 minutes d'activité physique vigoureuse par semaine diminue de deux tiers le risque de développer le SMet [178]. Ces deux études démontrent donc que la pratique d'une activité sportive permet de prévenir le développement d'un SMet. Il semblerait également que l'activité physique puisse « traiter » le SMet. L'étude HERITAGE a suivi 621 sujets sédentaires (hommes et femmes, 17 à 65 ans) dont 105 présentaient un SMet. Ils ont bénéficié d'un entraînement d'endurance pendant 20 semaines. A la fin, seules 32 personnes avaient toujours un SMet, soit une diminution de 30,5 %. Chez les sujets présentant un SMet au début de l'étude, 43 % ont présenté une diminution des TG, 16 % une augmentation du HDL-C, 38 % une diminution de la PA, 9 % une diminution de la glycémie et 28 % une diminution du tour de taille, tous ces chiffres atteignant des valeurs inférieures aux valeurs seuils de diagnostique du SMet [175].

Aux Etats Unis, le programme de prévention du diabète (Diabetes Prevention Program) a comparé les effets de la metformine à une modification de l'hygiène de vie (régime diététique + exercices) et à un groupe placebo. L'incidence est la plus élevée dans le groupe placebo : à trois ans, 53 % des participants ont développé un SMet contre 47 % dans le groupe metformine et 38 % dans le groupe exercice + diététique [179]. Les études comparant différents types d'activité physique (endurance ou résistance ou les deux) ont montré des effets bénéfiques au niveau métabolique et cardiovasculaire, quelque soit l'activité pratiquée. Cependant, il semblerait que la combinaison de sport d'endurance et de résistance soit plus efficace pour améliorer le SMet. Elles permettront de contrôler la PA systolique, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline [177].

Quelle que soit la population concernée, population générale ou personnes présentant des facteurs de risques, l'activité physique régulière permet de retarder ou d'améliorer le SMet. L'exercice est associé à des améliorations métaboliques et cardiovasculaires : poids, composition corporelle,

PA, homéostasie glucidique et lipidique, et retarde l'apparition de troubles associés au SMet (DT2, HTA, cholestérol, surpoids). Les mécanismes impliqués dans les améliorations observées suite à la pratique d'une activité sportive sont nombreux, parmi lesquelles l'amélioration des fonctions endothéliales et cardiovasculaires. Un mode de vie sédentaire est associé à des dysfonctionnements des cellules endothéliales et est corrélé au risque de maladies cardiovasculaires. Le TA est un organe endocrine métaboliquement actif et une source importante de molécules pro-inflammatoires et de nombreuses cytokines. La leptine est une adipokine dont le taux plasmatique augmente au cours de l'obésité et contribue aux dysfonctions endothéliales induites par les ROS (voir page 29). Le lien spécifique entre la leptine et les ROS lors de l'obésité n'est pas encore élucidé. Cependant, une étude menée par Varady et coll en 2010, a démontré que les concentrations de leptine circulante sont diminuées à la suite d'une perte de poids liée à l'exercice physique et associées à une amélioration de la fonction endothéliale au niveau artériel [180]. Nous avons déjà évoqué le fait que la dysfonction endothéliale était principalement induite par la réduction de la biodisponibilité du NO. Plusieurs études suggèrent que les effets protecteurs de l'exercice sur la dysfonction endothéliale sont soit induites par une augmentation de production du NO, soit par une diminution de sa dégradation, par activation de la voie de la NOS endothéliale. En effet, chez la souris, l'exercice physique volontaire augmente l'expression de l'ARNm-eNOS au niveau aortique par rapport aux souris inactives [181]. L'exercice physique peut à ce titre être considéré comme une pratique importante. Les recommandations actuelles préconisent une activité d'intensité modérée 30 minutes par jour, au moins 5 fois par semaine, idéalement chaque jour de la semaine.

## **V.2. Prise en charge médicamenteuse**

### **V.2.1. Sensibilisants à l'insuline**

Le traitement de l'hyperglycémie chez les patients atteints de SMet repose sur l'utilisation de molécules insulino-sensibilisantes telle que la metformine (diméthylbiguanide). Elle est actuellement le seul représentant de la classe des biguanides et constitue le traitement de première intention du DT2, en particulier en cas de surcharge pondérale, lorsque les mesures hygiéno-diététiques n'ont pas suffi à rétablir l'homéostasie glucidique. La metformine est une molécule

anti-hyperglycémiant et très rarement hypoglycémiant, sauf en cas d'association avec les sulfamides hypoglycémiant ou l'insuline, ou le risque d'hypoglycémie augmente. Elle réduit la glycémie à jeun et postprandiale en inhibant la néoglucogenèse. Elle a également la capacité d'inhiber la glycogénolyse, elle favorise la capture et l'utilisation périphérique du glucose au niveau musculaire et retarde l'absorption intestinale du glucose. Son mécanisme d'action cellulaire repose sur l'activation de l'AMPK, senseur métabolique capable d'ajuster les besoins et les dépenses des cellules insulino-sensibles [182]. Lorsque la metformine seule n'est pas suffisante, elle peut être prescrite en combinaison avec un autre anti-diabétique oral, l'association metformine + sulfamide hypoglycémiant étant à privilégier.

Le dosage de l'HbA1c est l'examen de référence dans le suivi du diabète. Il permet d'estimer de façon rétrospective l'équilibre glycémique des patients sur une durée d'environ 3 mois. L'HbA1c est une forme d'hémoglobine circulante ayant une très forte affinité pour le glucose et dont la quantité est proportionnelle à la glycémie. Chez un individu sain, la valeur normale est comprise entre 3.5 et 6.5%. On parle de diabète non équilibré lorsque le niveau d'HbA1c est supérieur à 7%. Les objectifs thérapeutiques sont variables et doivent être adaptés et individualisés en fonction du profil de chaque patient (Recommandations de la Haute Autorité de Santé, 2013) :

- Pour la plupart des sujets diabétiques de type 2, une cible d'HbA1c  $\leq 7\%$  est recommandée.
- Pour les sujets dont le diabète est nouvellement diagnostiqué, sans antécédent cardiovasculaire et dont l'espérance de vie est  $> 15$  ans, un objectif  $\leq 6,5\%$  est recommandé.
- Pour les sujets diabétiques de type 2 ayant une espérance de vie  $< 5$  ans ou ayant des complications macrovasculaires évoluées, ou un diabète ancien mal équilibré, un objectif  $\leq 8\%$  est recommandé.
- Pour les personnes âgées de 75 ans ou plus, dont l'état de santé est fragilisé, l'objectif recommandé est compris entre 8 % et 9 %

## **V.2.2. Les anti-hypertenseurs**

### ***V.2.2.1. Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone***

Le SRAA est une cascade de régulation endocrinienne et enzymatique permettant la régulation de la PA via ses effets sur l'homéostasie hydrosodée (c'est-à-dire l'équilibre entre les ions  $\text{Na}^+$  et l'eau), le tonus vasculaire et le remodelage cardiovasculaire. Le principal polypeptide actif,

l'angiotensine II, dérive de l'angiotensine I par clivage par l'enzyme de conversion (EC) et agit via les récepteurs AT1 [183]. Un dysfonctionnement du SRAA a été associé à l'apparition de troubles de la PA et de la constriction vasculaire, une inflammation, une hypercoagulabilité et une dysfonction endothéliale. Ce système est également impliqué dans le développement de l'insulino-résistance. En effet, au niveau vasculaire et musculaire, l'angiotensine II inhibe le signal insulinique et induit un stress oxydatif aggravant l'hyperglycémie et l'athérosclérose [184]. Dans des cultures de myocytes (lignée L6), elle interagit avec la cascade signalisation de l'insuline via l'activation de son récepteur AT-1 et l'activation de la JNK. Cette dernière induit la phosphorylation de l'IRS-1 au niveau de résidu sérine inhibiteur (312 et 616 chez l'humain) et inhibe la phosphorylation d'AKT, la translocation des transporteurs de glucose et la production de NO par les cellules endothéliales [185]. L'angiotensine II agit également au niveau des adipocytes en inhibant leur différenciation et en favorisant la sécrétion de cytokines inflammatoires et d'adipokines diabéto-gènes responsables de l'altération de la cascade de l'insuline et de la mise en place d'une insulino-résistance [186]. Les deux principales catégories de molécules modulant la fonction du SRAA sont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (ARA2) (figure 15).

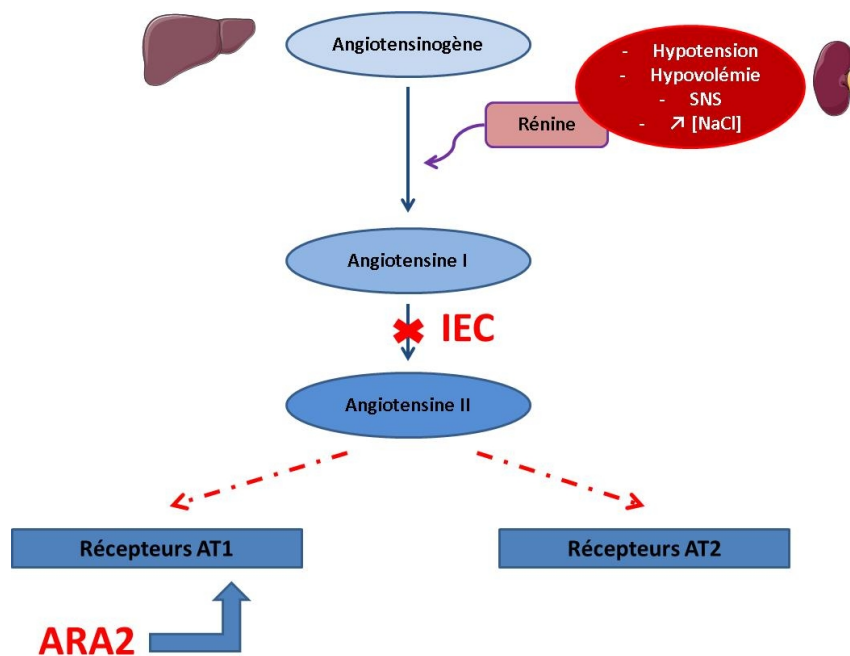


Figure 15 : Les inhibiteurs du SRAA

Les IEC représentent une voie d'inhibition de la production de l'angiotensine II tandis que les ARA2 ne limitent pas la production de l'angiotensine II mais bloquent son action par antagonisme compétitif sur les récepteurs AT1. (ARA2 : antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion)

Une des premières études à s'être intéressée aux effets métaboliques des inhibiteurs du SRAA a été réalisée en 1997. Elle visait à comparer les effets d'un IEC (lisinopril) à ceux d'un diurétique thiazidique (hydrochlorothiazide, HCTZ) sur la PA, l'objectif principal étant d'atteindre une PA diastolique inférieure à 90 mmHg. 60% des personnes recevant l'IEC (à la plus faible dose, 10 mg) ont atteint l'objectif versus 43% des patients recevant l'HCTZ (à la plus forte dose, 50 mg). De manière très intéressante, l'HCTZ induit des effets métaboliques néfastes tels qu'une augmentation de la glycémie à jeun, absents dans le groupe IEC [187]. D'autres études ont ensuite conforté ces premières observations. Par exemple, le fosinopril a démontré un effet favorable sur la constitution en lipoprotéines, sur le cholestérol total et sur la tolérance au glucose. Le mécanisme impliqué paraît lié à une augmentation du flux plasmatique musculaire entraînant à son tour une amélioration du transport du glucose, insulino-dépendant [188]. Dans une étude en intention de traiter, les effets d'un ARA2 (irbesartan) seul ont été comparés à ceux obtenus en combinaison avec l'HCTZ. En plus des effets sur la PA, la combinaison des deux molécules augmentait le HDL-C, diminuait les TG, la glycémie à jeun et le tour de taille. L'ARA2 a donc diminué les effets métaboliques négatifs liés à l'administration de l'HCTZ [189]. Par leurs effets positifs sur la PA, et de manière plus inattendue, sur le métabolisme, les IEC et les ARA2 constituent des agents thérapeutiques majeurs et doivent être utilisés en première intention dans le traitement de l'HTA chez les personnes atteintes de Smet [190].

### ***V.2.2.2. Les inhibiteurs calciques***

Les inhibiteurs calciques permettent d'inhiber le transfert membranaire du calcium dans les cellules musculaires vasculaires, diminuant ainsi les résistances périphériques vasculaires et donc la PA. Certains exercent également une action inhibitrice au niveau des cellules musculaires cardiaques, à l'origine d'une bradycardie et d'un effet inotrope négatif. Ils sont indiqués en cas d'HTA, d'angor et de crises de tachycardie jonctionnelles paroxystiques ou en traitement préventif. Les inhibiteurs calciques paraissent neutres sur le plan métabolique. Ils ne favorisent pas, mais ne réduisent pas non plus, le risque de développer des dyslipidémies et un diabète. L'étude AC-COMPLISH, qui a comparé les associations hydrochlorothiazide/benazépril



(diurétique thiazidique/IEC) et amlodipine/benazépril (inhibiteurs calcique/IEC) sur une période de 36 mois a montré que l'incidence des maladies rénales chroniques et des maladies coronariennes était inférieure dans le groupe amlodipine/benazépril [191]. Les inhibiteurs calciques étant dépourvus d'effets métaboliques délétères et n'augmentant pas le risque de maladies cardiovasculaires, conviennent au traitement de l'HTA chez le patient atteint d'un SMet.

### ***V.2.2.3. Les bêtabloquants***

Chez les patients atteints de SMet, on observe une hyperactivité du SNS, il pouvait donc paraître logique de prescrire des bêtabloquants. L'utilisation de ces molécules pour le traitement de l'HTA chez les patients obèses ou atteints de SMet est très controversée à cause des effets néfastes observés, incluant intolérance au glucose, dyslipidémie et prise de poids [192,193]. Les bêtabloquants peuvent être divisés en 2 catégories : les antagonistes non sélectifs des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques (propranolol) ou sélectifs des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (météoprolol, aténolol) ; et les bêtabloquants vasodilatateurs, présentant un effet additionnel antagoniste  $\alpha_1$ -adrénergique (carvédilol, labétalol), agoniste  $\beta_2$ -adrénergique (céliprolol) ou NO-dépendant (nébivolol). Un certain nombre d'essais a mis en évidence le risque de développer des troubles métaboliques lors de l'utilisation de bêtabloquants non sélectifs. Ainsi, les essais INVEST [194], LIFE [195] et ARIC [196] ont montré que, chez les patients obèses ou atteints d'un SMet, la prescription de ces bêtabloquants induit un risque de 15 à 28% de développer un diabète. C'est le blocage des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (et peut-être  $\beta_3$ -adrénergiques) qui est responsable de l'apparition des altérations métaboliques. Les bêtabloquants vasodilatateurs auraient des effets neutres voire positifs sur le profil métabolique et l'inflammation [197].

Ces données ont conduit à contre-indiquer la plupart des bêtabloquants en première intention pour traiter les patients obèses ou atteints d'un SMet. Concernant les bêtabloquants vasodilatateurs, des analyses complémentaires devraient permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

### ***V.2.2.4. Les diurétiques thiazidiques***

Les diurétiques thiazidiques réduisent la réabsorption de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{Na}^+$  au niveau de la partie initiale du tube contourné distal rénal. Par ce mécanisme, ils augmentent l'élimination urinaire de sodium, de chlorure, et dans une moindre mesure, de potassium, et abaissent la PA. Les avis

concernant la prescription de diurétiques thiazidiques contre l'HTA chez des patients obèses ou ayant un SMet divergent. En effet, un certain nombre d'études se sont intéressées aux effets indésirables rencontrés chez ces sujets. Les diurétiques induiraient des troubles de l'homéostasie glucidique, une augmentation des TG et de l'acide urique et pourraient accélérer la conversion du SMet en diabète [198,199]. Par la suite, d'autres essais ont été entrepris. Après la publication initiale de ALLHAT, Barzilay et coll ont étudié les effets de la chlorthalidone (diurétique thiazidique), versus lisinopril (IEC) ou amlodopine (inhibiteur calcique). La glycémie à jeun augmente dans les trois groupes même si la plus forte progression est observée avec la chlorthalidone. Cependant, quel que soit le groupe, les auteurs ne parviennent pas à mettre en évidence une augmentation du risque cardiovasculaire [200]. Une seconde analyse des données de l'ALLHAT a montré que la chlorthalidone augmente le risque de développer un diabète chez les patients ayant un SMet préexistant, mais également chez ceux qui n'avaient pas de SMet préexistant. En résumé, les données concernant les diurétiques thiazidiques divergent mais en observant les effets secondaires occasionnés, ces médicaments ne semblent pas être très appropriés au traitement de l'HTA chez des patients atteints de SMet.

#### **V.2.2.5. Conclusion**

Chez les patients atteints d'un SMet, le traitement de l'HTA doit faire appel à un bloqueur du SRAA, en ajoutant si besoin un antagoniste calcique ou un diurétique thiazidique à faible dose, sauf indication formelle pour une pathologie associée. Les  $\beta$ -bloquants doivent être évités chez ces patients parce qu'ils favorisent l'incidence d'un diabète et ont un effet délétère sur le poids, la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique. L'objectif thérapeutique n'est pas clairement défini chez ces patients même si les valeurs de PA devront se rapprocher de 140/90 mmHg.

#### **V.2.3. Hypolipémiants**

Dans le SMet, les dyslipidémies sont associées à une hypertriglycéridémie, une diminution du taux de HDL-C et une augmentation du taux de LDL-C. Actuellement, les statines et les fibrates sont des agents pharmacologiques de choix dans le traitement des dyslipidémies chez les patients atteints de SMet.

Les statines sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase. Elles induisent la diminution de la synthèse endogène de cholestérol, ce qui active le facteur de transcription SREBP-2 (*sterol response element binding-protein 2*), dont le rôle est de détecter les variations du contenu intracellulaire en cholestérol. Au niveau hépatique, SREBP-2 stimule la transcription du récepteur au LDL-C (LDLR) pour induire le catabolisme du LDL-C [201]. En 2010, une méta-analyse rassemblant 170000 participants a confirmé la capacité des statines à diminuer les complications cardiovasculaires (infarctus du myocarde : -13 %, revascularisation coronarienne : +19 %, accidents cardiovasculaires : -16 % en réduisant les taux de LDL-C) [202]. D'autres exemples montrent que chaque diminution du LDL-C de 0,386 g/l (1 mmol/L) avec une statine est associée à une réduction significative de 21% des événements cardiovasculaires chez les patients, diabétiques ou non [203]. Cependant, il semblerait que les statines présentent un risque diabétogène sur le long terme. Ce risque a été évoqué grâce à la publication de l'étude *Justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin* (JUPITER), testant l'effet d'une statine (rosuvastatine) chez des patients ayant une concentration de protéine C-réactive ultra-sensible élevée, mais un LDL-C « normal ». Cette étude a révélé une augmentation significative de 25% des nouveaux cas de DT2 [204]. Ce risque diabétogène a été confirmé chez des patients non-diabétiques dans une large méta-analyse (13 essais ; 91 140 sujets), publiée en 2010, avec une augmentation du risque de DT2 de 9% après 4 ans [205]. L'étude *Stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels* (SPARCL) a également mis en évidence une augmentation de 37% du risque de DT2 sous statines [206]. De nombreux arguments sont en faveur d'un effet dose. De plus, il semblerait que l'effet diabétogène des statines soit lié à la molécule utilisée [207]. Hormis leurs effets bénéfiques sur le cholestérol et le risque de complications cardiovasculaires et leurs actions néfastes sur le risque diabétogène, les statines diminuent le stress oxydatif, améliorent la fonction endothéliale [208] et possèdent des propriétés anti-inflammatoires [209]. De plus, elles diminueraient faiblement, mais de manière significative, la PA [210].

Les fibrates diminuent les TG en activant les protéines nucléaires PPAR $\alpha$  (peroxysome proliferator activated receptor alpha) qui stimulent la lipolyse par activation du gène de la lipoprotéine lipase. Ceci induit une diminution de la concentration des VLDL et une augmentation du transport du cholestérol vers le foie. Les fibrates stimulent également l'expression des gènes ApoA1 et ApoA2, constituants essentiels des lipoprotéines HDL dont la

synthèse est alors favorisée. L'expression des gènes des récepteurs aux Apo A1 et A2 est également augmentée. De nombreuses études rapportent également les effets pléiotropes des fibrates : ils présenteraient des effets anti-inflammatoires et anti-thrombogènes [211]. Dans l'étude Helsinki heart study (HHS) portant sur 4081 hommes dyslipidémiques (40-55 ans, non HDL-C  $\geq$  5.2 mmol), le gemfibrozil (fibrate) a permis de réduire le risque cardiovasculaire de 34%, il a abaissé le LDL-C de 11% et les TG de 35% et a augmenté le HDL-C de 11% versus placebo [212,213]. Une seconde étude, the Veterans Affairs High-Density Cholesterol Intervention Trial (VA-HIT), portant sur les effets du même médicament, a mis en évidence une stabilisation du LDL-C, une augmentation du HDL-C de 6% et une diminution des TG de 31% versus placebo [214].

Des études comparatives entre les fibrates et les statines rapportent une diminution du LDL-C de 17 à 36 % pour la statine, et pour le fénofibrate un abaissement des TG de 30 à 50 %, avec une élévation du HDL-C de 1 à 25 %. Cette complémentarité illustre le potentiel thérapeutique d'une co-prescription fibrate/statine chez des patients présentant un SMet et/ou un DT2. Des travaux cliniques rapportent une baisse de LDL-C de 30 à 41 %, des TG de 39 à 57 %, et une hausse de HDL-C de 3 à 19 % lors d'une co-prescription fibrate/statine. Cette association s'avère particulièrement complémentaire chez les patients diabétiques, aboutissant à une réduction de LDL-C de 29 à 46%, des TG de 32 à 50%, et à une élévation du HDL-C de 11 à 34%. Chez les patients avec un SMet, elle abaisse les TG de 52% et élève le HDL-C de 23% [215]. Cependant, en raison de l'apparition d'effets secondaires majeurs, la co-prescription des 2 molécules statine/fibrate a été abandonnée. En effet, des équipes américaines rapportent une augmentation des cas de myopathie et de rhabdomyolyse [216]. Cependant, il semblerait que les effets secondaires observés aient été induit par la prescription de doses trop importantes et dans le cadre de mauvaises indications. L'association des 2 médicaments est actuellement interdite en France.

De nouvelles molécules ont plus récemment vu le jour, c'est par exemple le cas de l'ézétimibe ou de l'anticorps anti proprotéine-convertase subtilisine/kexin type 9 (PCSK9). La cible moléculaire de l'ézétimibe est le transporteur de stérols, Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), qui est responsable de l'absorption intestinale du cholestérol. Dans une étude datant de 2003, chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie essentielle, l'ézétimibe réduit le LDL-C d'environ 18.2% comparativement à une augmentation de 0.9% dans le groupe placebo. D'autres changements du profil lipidique, telles qu'une augmentation du HDL-C et une diminution des

TG, sont à noter [217]. De plus, lorsqu'il est prescrit en combinaison avec une statine, il permet de limiter les apports du cholestérol intestinal au foie et de diminuer la synthèse hépatique du cholestérol. Ainsi, ces deux molécules administrées simultanément entraînent une diminution complémentaire du cholestérol. Cette association réduit le LDL-C et les TG, et augmente le HDL-C chez des sujets atteints de SMet ou de DT2, de manière plus efficace que ne l'aurait fait une statine seule [218]. En complément d'une amélioration du profil lipidique, l'association ézétimibe/statine semble également améliorer la résistance à l'insuline : l'indice d'insulino-résistance HOMA-IR passe de 6 au début du traitement, à 2.14 après 24 semaines de traitement chez les hommes ; de 3.01 au début du traitement, à 2.11 après 24 semaines de traitement chez les femmes. L'ézétimibe, par son action pharmacologique sur divers composants du SMet, constitue un candidat de deuxième choix pour le traitement des dyslipidémies chez des sujets présentant des troubles lipidiques associés à des dérèglements de l'homéostasie glucidique [219].

PCSK9 est une protéine sécrétée par le foie. Elle régule le niveau d'expression des récepteurs aux LDL à la surface des cellules. La liaison de la PCSK9 au récepteur du LDL-C modifie la configuration du récepteur et diminue sa dégradation par les lysosomes. Il en résulte une augmentation de l'expression des récepteurs du LDL-C au niveau hépatique et une diminution du taux sérique de LDL-C. Des anticorps anti-PCSK9 inhibent la liaison de PCSK9 avec le récepteur au LDL-C afin d'augmenter la densité des récepteurs au niveau hépatocytaire et de diminuer la quantité de LDL-C circulant. Deux études s'intéressent actuellement à deux formes différentes de l'anticorps : l'alirocumab (Regeneron Pharmaceuticals et Sanofi) et l'évolocumab (Amgen). L'évolocumab, a été évalué dans le cadre des essais OSLER-1 et OSLER-2, regroupant 4 465 patients [220]. À l'inclusion, un grand nombre de patients présentaient au moins un facteur de risque cardiovasculaire (80 %) et était sous statine au début de l'essai (70 %). Un premier groupe de patients recevait l'évolocumab en plus d'un traitement standard par les statines. Le second groupe était traité par des statines plus un placebo. Après un suivi de 11 mois, les taux de LDL-C ont été réduits de 61 % en moyenne dans le groupe évolocumab (48 mg/dL versus 120 mg/dL dans le groupe placebo) Au bout d'un an, le risque d'événement cardiovasculaire a été significativement réduit dans le groupe sous évolocumab : 0,95 % contre 2,18 % dans le groupe placebo. Pour l'alirocumab (étude ODYSSEY), 2 341 patients à haut risque cardiovasculaire ont été répartis entre un groupe recevant l'alirocumab, en addition du traitement standard par les statines, et un groupe recevant des statines et un placebo [221,222]. Aux termes des 78 semaines,

la diminution de 62 % du taux de LDL-C observée dans le groupe alirocumab au bout de 24 semaines est maintenue. Cependant, de nombreux effets secondaires ont été observés : réaction sur le site d'injection, myalgie, événement neurocognitif, et troubles ophtalmologiques. Ces médicaments ont une autorisation de mise sur le marché européenne datant de 2015 mais ne sont pas encore commercialisés en France.

#### **V.2.4. Limites thérapeutiques et conclusion**

La prise en charge du SMet est complexe parce que sa physiopathologie est incertaine. Les composants du SMet sont associés différemment chez chaque patient. Cette hétérogénéité dans la manifestation des facteurs de risque peut s'expliquer par les susceptibilités génétiques de chacun à développer une composante plutôt qu'une autre, et par les nombreux facteurs environnementaux influant le développement de la pathologie. Chaque patient présentera un tableau clinique qui lui est propre, obligeant le praticien à pratiquer une médecine personnalisée en tenant compte du mode de vie et de l'état psychologique de son patient. D'autre part, actuellement, aucun médicament disponible ne permet d'agir sur l'intégralité des troubles associés au SMet. L'approche thérapeutique actuelle appréhende de manière indépendante chacun des facteurs de risque qui compose le SMet, ce qui augmente considérablement le risque d'interactions médicamenteuses.

## VI. Le récepteur des imidazolines de type 1 : nouvelle cible thérapeutique ?

### VI.1. Les différents sous-types de récepteurs des imidazolines

Il existe différents sous-types de récepteurs aux imidazolines :

- Les récepteurs des imidazolines de sous-type  $I_1$  ( $RI_1$ ) : ils constituent une famille de récepteurs non-adrénergiques avec des sites de liaison à haute affinité pour des ligands tels que la clonidine ou l'idazoxan. Ce sous-type sera plus précisément décrit dans la suite de ce paragraphe parce que c'est celui qui est impliqué dans les effets sympatho-inhibiteurs et hypotenseurs des médicaments de type clonidine [223,224].
- Les récepteurs des imidazolines de sous-type  $I_2$  ( $RI_2$ ) : ces récepteurs fixent des imidazolines et des guanidines mais ont une faible affinité pour les 2-aminoimidazolines telles que la clonidine [225]. Ils sont localisés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et ne sont pas couplés à une protéine G. Ils modulent la fonction des monoamines oxydases A et B (impliquées dans l'inhibition de neurotransmetteurs au niveau de certains neurones et de l'astroglie, dans la régulation de la motilité intestinale et de la température corporelle et dans la gestion de la douleur) [226]. Ils ont été décrits dans de nombreux tissus comme le foie, le placenta, le colon, les cellules pancréatiques ... Certaines molécule appartenant à la classe des biguanides comme la metformine ont la capacité de se lier à ces récepteurs. Chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, la metformine améliore la tolérance au glucose en augmentant le relargage de  $\beta$ -endorphines, impliquées dans le transport du glucose vers les muscles [227].
- Les récepteurs des imidazolines de sous-type  $I_3$  ( $RI_3$ ) : ils sont principalement localisés au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques et leur activation induit la sécrétion d'insuline [228]. Dans une lignée cellulaire pancréatique (cellules  $\beta$  MIN6), les  $\beta$ -carboline (harmane et

pinoline), participent à la sécrétion d'insuline en augmentant la quantité de calcium intracellulaire. Il semble cependant que d'autres mécanismes, indépendants des RI<sub>3</sub>, soient impliqués dans les effets observés [229].

- Les récepteurs non I<sub>1</sub> non I<sub>2</sub> : ils sont exprimés au niveau pré-synaptique et ont été identifiés au niveau des tissus cardiovasculaires. Chez le rat, leur stimulation inhibe la libération de noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques dans les vaisseaux sanguins [230].

Actuellement, les différents sous types de récepteurs n'ont pas encore été clonés. Leur mise en évidence a été permise par des études pharmacologiques basées sur l'affinité que certains radioligands possèdent pour chacun des récepteurs. Par exemple, les sites I<sub>1</sub> ont été caractérisés grâce à leur grande affinité pour les 2-aminoimidazoles comme la [H<sup>3</sup>]-clonidine [231].

## **VI.2. Le récepteur des imidazoles de type 1**

L'hypothèse de l'existence des RI<sub>1</sub> a émergé en 1984 lorsque Bousquet et coll ont observé que la clonidine, alors considérée comme un agoniste exclusif des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, exerçait également son effet pharmacologique via un site insensible aux catécholamines mais sensible aux structures imidazoliniques, situé au niveau du bulbe rachidien [232]. Ce site a par la suite été nommé récepteur des imidazoles de type 1 [233]. Ces expériences ont été confirmées avec d'autres molécules agonistes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, plus sélectives des RI<sub>1</sub>, telles que la rilménidine et la moxonidine. En effet, chez le rat, elles induisent une hypotension et une inhibition de l'activité du SNS malgré la présence d'antagonistes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques [234] même si ces derniers semblent être impliqués dans les effets observés [235]. Les RI<sub>1</sub> sont donc sensibles à la clonidine, insensibles à la noradrénaline, et sont impliqués dans l'effet hypotenseur des composés à structures imidazoliniques par une inhibition du SNS. Cependant, des données indiquent que l'effet hypotenseur induit par l'activation des RI<sub>1</sub> semble être facilité par l'activation simultanée des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques [236].

Comme dit précédemment, les RI<sub>1</sub> sont localisés au niveau du bulbe rachidien, et plus particulièrement au niveau de sa partie rostro-ventro latérale [223,237]. Cependant, des RI<sub>1</sub> ont



été identifiés au niveau du coeur, de la prostate, de la carotide, des reins, des îlots pancréatiques et des plaquettes [238].

Les RI<sub>1</sub> sont des récepteurs membranaires [239]. A ce jour, 2 cascades de transduction ont été découvertes dans la lignée cellulaire PC12 dérivant de phéochromocytomes de rat, un modèle largement utilisé pour l'étude des RI<sub>1</sub>. Dans ces cellules, l'activation du RI<sub>1</sub> induit l'activation de la phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine (PC-PLC) responsable de la génération de DAG et de la libération d'inositol triphosphate (IP3) [240]. En effet l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PC-PLC, la molécule D609, bloque la production de DAG dans des cellules stimulées par la moxonidine [241]. De plus, l'activation du RI<sub>1</sub> activerait une autre cascade de signalisation impliquant une adénylate cyclase et la diminution de la quantité d'AMPc [242]. A l'heure actuelle, le RI<sub>1</sub> n'a pas encore été cloné mais le gène de *l'imidazoline receptor antisera-selected* (IRAS-1) est un excellent candidat [243]. Il semblerait d'autant plus que ce récepteur soit capable d'activer les mêmes effets que ceux induits par les RI<sub>1</sub> (effet hypotenseur de la rilménidine, inhibition de la migration cellulaire ...) [244,245]. L'effet hypotenseur des ligands imidazoliniques est associé à une augmentation de la phosphorylation de ERK au niveau du RVLM. Chez le rat, l'abolition de l'expression de la protéine nischarine dans cette structure empêche l'activation de ERK et l'hypotension induite par l'activation des RI<sub>1</sub> [246]. La nischarine semble donc jouer un rôle important dans la signalisation des RI<sub>1</sub>.

Les mécanismes d'action de médicaments sympatho-inhibiteurs anti-hypertenseurs ont largement été étudiés. Des molécules comme la clonidine ou la guanfacine, ont une affinité mixte pour les RI<sub>1</sub> et les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et présentent de ce fait de nombreux effets secondaires. En effet, ces agonistes stimulent les récepteurs au niveau du locus coeruleus et du noyau du tractus solitaire et sont responsables de sédation, de sécheresse buccale, de bradycardie, d'hypotension, de troubles de l'érection et étaient prescrits en traitement de première intention de l'HTA. Certaines études ont lié ces effets secondaires à l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques [247]. Afin de s'affranchir de ces effets néfastes, des molécules de plus en plus sélectives des RI<sub>1</sub> ont été développées. C'est le cas de la moxonidine et de la rilménidine. Cependant, ces anti-hypertenseurs de deuxième génération présentent encore une affinité réduite mais néanmoins réelle pour les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et sont également à l'origine d'effets secondaires.

### VI.3. Le récepteur des imidazolines de type 1 et le syndrome métabolique

De nombreuses études valident la présence d'une hyperactivité sympathique chez les patients atteints de SMet. De plus, chaque composante peut être reliée de manière indépendante à une augmentation de l'activité du SNS. L'activation des  $RI_1$  par des médicaments sympatho-inhibiteurs de seconde génération tels que la moxonidine induit une diminution des catécholamines circulantes, de la PA, une amélioration des paramètres métaboliques (résistance à l'insuline, intolérance au glucose et dyslipidémies) et diminue la sévérité des effets secondaires observés en comparaison à la clonidine [248]. L'hyperactivité sympathique peut donc constituer une cible pour le développement de nouveaux médicaments. Dans notre laboratoire, des études de pharmaco-chimie ont permis de synthétiser de nouvelles molécules de plus en plus sélectives des  $RI_1$  et finalement dénuées de haute affinité pour les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (Bousquet, 2011, brevet). Des études préliminaires ont permis la détermination des potentiels effets bénéfiques d'une de ces molécules, le LNP599 (figure 16), dans un modèle de SMet : le rat SHHF (Spontaneously Hypertensive Heart Failure). Le LNP599 a une affinité nanomolaire pour les  $RI_1$ , et une affinité indétectable pour les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, ce qui lui confère une sélectivité très importante pour les  $RI_1$  (tableau 2).

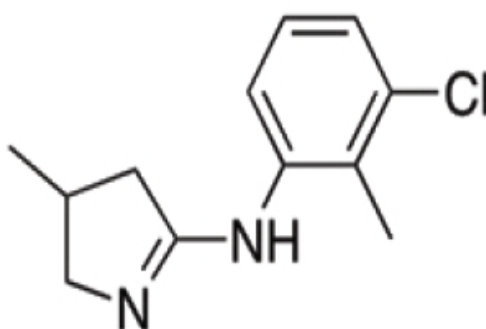


Figure 16 : Formule chimique du LNP599

Ki $RI_1$ (M)	Ki R $\alpha_2$ -adrénergique (M)
$7.10^{-9}$	$> 10^{-5}$

Tableau 2 : Affinité du LNP599 déterminée par des études de liaison spécifique sur des préparations membranaires de cellules PC12.

Il améliore les paramètres hémodynamiques et métaboliques : stabilisation du poids, amélioration de l'HTA, des dyslipidémies, de l'insulinémie et augmentation de la concentration plasmatique d'adiponectine pouvant contribuer à la réduction de l'intolérance au glucose [249]. Des résultats préliminaires suggèrent des effets périphériques additionnels et semblent faire intervenir l'adiponectine. Cette molécule sympatho-inhibitrice a été brevetée par notre université (brevet initial déposé le 19/04/11). A l'heure actuelle, le traitement des patients présentant un SMet repose sur l'association de 4 à 6 médicaments différents. Le développement de molécules efficaces sur plusieurs troubles du SMet permettrait de les substituer aux stratégies thérapeutiques actuelles et de limiter les effets secondaires liés aux interactions médicamenteuses et aux cibles de ces ligands telles que les récepteurs  $\alpha 2$ -adrénergiques.

## **2<sup>ème</sup> partie :**

### **Objectifs**

Les données de la littérature présentées précédemment ont clairement identifié un dysfonctionnement du SNS associé au développement des troubles métaboliques et cardiovasculaires constituant le SMet. Au sein du laboratoire, de nombreuses études expérimentales réalisées dans des modèles murins de SMet nous ont permis de confirmer l'intérêt thérapeutique potentiel du LNP599. En effet, dans un modèle de SMet, le rat SHHF (*spontaneously hypertensive, heart failure*), il est responsable par son action conjointe au niveau central et périphérique d'une stabilisation du poids, d'une action anti-hypertensive majeure, d'une amélioration des dyslipidémies et de la sensibilité tissulaire à l'insuline qui semblerait être liée à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine observée chez les animaux. De plus, des études menées sur une lignée cellulaire dérivant d'adipocytes, les cellules 3T3-L1, ont démontré les effets stimulateurs du LNP599 sur la sécrétion d'adiponectine. L'ensemble de ces résultats suggérerait un impact majeur de ces ligands sélectifs des récepteurs des imidazolines de type 1 (RI<sub>1</sub>) sur l'homéostasie globale. Cependant, de nombreuses questions subsistent. Ce travail de thèse a eu pour objectifs de poursuivre l'étude de l'intérêt thérapeutique potentiel du LNP599 et de cerner les effets périphériques observés dans 3 parties expérimentales réalisées *in vivo* et *in vitro*.

### **Etude des effets d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP599) dans un modèle de troubles métaboliques chez le primate non humain (marmouset, *Callithrix jacchus*)**

Cette première étude expérimentale a eu pour objectifs de (1) développer un modèle accéléré de troubles métaboliques retrouvés dans le SMet chez le primate non humain (PNH), le marmouset (*Callithrix jacchus*) pour y (2) confirmer les effets bénéfiques du LNP599. Un modèle de SMet chez le marmouset représente une alternative plus pertinente que les modèles murins habituellement utilisés, moins représentatifs de la physiologie humaine, notamment concernant le métabolisme lipidique. En effet, les dyslipidémies observées chez les rongeurs sont différentes de celles de l'Homme alors que celles du primate en sont proches puisqu'en cas de dyslipidémie associée au SMet, la proportion de HDL cholestérol par rapport au cholestérol total (HDLchol/TOTchol) est diminuée chez le primate et chez l'Homme. Des différences au niveau de la balance sympatho-vagale sont également observées entre les rongeurs et l'Homme alors que celle du PNH est semblable à celle de l'Homme. De plus, les

effets bénéfiques du LNP599 chez les rongeurs étant déjà validés, le passage à l'étude des effets du LNP599 chez le primate représente une preuve de concept et une étape importante avant le développement clinique de la molécule.

*La publication des résultats de cette étude est en cours.*

### **Etude des effets périphériques d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP509) - Amélioration de la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin d'intolérance au glucose grâce à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et à l'activation de la cascade de signalisation de l'AMPK**

La seconde étude expérimentale a eu pour objectifs de confirmer (1) l'existence d'effets périphériques des ligands RI<sub>1</sub> et (2) leur capacité à moduler directement les cascades de signalisation dans le foie, un des tissus cibles de l'insuline et de l'adiponectine. Afin de discriminer et d'étudier uniquement les effets périphériques de nos ligands, une autre molécule sélective des RI<sub>1</sub> n'ayant pas la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, le LNP509, a été utilisée. Cette étude a été réalisée chez le rat Wistar âgé, préalablement validé comme modèle d'insulino-résistance modérée. Parallèlement, à l'aide d'études réalisées *in vitro* sur une lignée cellulaire dérivant d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2, sur une lignée cellulaire dérivant de cellules  $\beta$  pancréatiques et sur des adipocytes primaires issus de rats, nous avons cherché à comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les effets bénéfiques observés.

*Cette étude a fait l'objet d'une publication dans American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism en 2015 (Facteur d'impact 3.785)*

### **Un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1, le LNP509, améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipidique grâce à son action sur l'AMPK, un acteur clé de l'homéostasie énergétique.**

La troisième étude expérimentale a eu pour objectif d'analyser la capacité des ligands RI<sub>1</sub>, et plus particulièrement du LNP509, à moduler directement les cascades de signalisation dans un des tissus cibles de l'insuline et de l'adiponectine : le foie. Les données recueillies à partir des études

réalisées chez le rat âgé nous ont permis d'observer au niveau hépatique une augmentation de l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), un acteur majeur de la régulation de la balance énergétique. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur le métabolisme glucidique et lipidique au niveau hépatique. L'ensemble des études a été réalisé sur la lignée cellulaire HepG2.

**3<sup>ème</sup> partie :**  
**Travaux personnels**



**1<sup>ère</sup> étude :**

**Etude des effets d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP599) dans un modèle de troubles métaboliques chez le primate non humain (marmouset, *Callithrix jacchus*)**

\*\*\*\*\*

Article à soumettre

Maud Weiss<sup>1</sup>, Lyne Fellmann<sup>2</sup>, Fanélie Wanert<sup>2</sup>, Laurent Monassier<sup>1</sup>, Pascal Bousquet<sup>1</sup>, Nathalie Niederhoffer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France

<sup>2</sup>Centre de primatologie, Plateforme SILABE ADUEIS, Niederhausbergen, France

**EFFECTS OF A TYPE 1 IMIDAZOLINE RECEPTOR LIGAND IN A MODEL OF METABOLIC DISORDERS IN THE COMMON MARMOSET (*CALLITHRIX JACCHUS*).**

\*\*\*\*\*

## I. Contexte et objectifs

Dans une perspective d'application chez l'Homme, de nombreux travaux ont mis en évidence les limites des études de certains troubles métaboliques chez le rongeur. En effet, ce dernier présente de nombreuses différences avec l'Homme. C'est la raison pour laquelle la première partie de ce travail de thèse a été consacrée au développement d'un modèle accéléré et original de SMet chez le primate non humain (PNH / marmouset / callithrix jacchus). Ce modèle représente une alternative plus pertinente que les modèles murins utilisés habituellement. Tout d'abord, les dyslipidémies observées chez les rongeurs sont différentes de celles de l'Homme. Traditionnellement, les études précliniques utilisent les rongeurs afin de valider les effets d'une drogue sur le métabolisme lipidique. Cependant, il existe une différence majeure entre le métabolisme lipidique humain et celui observé chez les rongeurs. En effet, la cholesteryl ester transport protein (CETP) est absente chez les rongeurs. C'est une enzyme clé impliquée dans le transport des esters de cholestérol à partir du HDL (high-density lipoprotein) vers les lipoprotéines contenant les apolipoprotéines de type-B (Apo-B) telles que les LDL (low density lipoprotéin) et les VLDL (very low density lipoprotéin). Ces animaux présentent donc de manière naturelle et systématique un taux élevé de HDL-cholestérol les protégeant face au risque de développement de maladies cardiovasculaires [250]. A l'inverse, les dyslipidémies du primate sont proches de celles observées chez l'Homme, puisque la proportion de HDL cholestérol par rapport au cholestérol total (HDLchol/TOTchol) diminue avec l'âge et dans le cadre d'un régime alimentaire enrichi en graisse. Des différences au niveau de la balance sympatho-vagale sont également observées entre le rongeurs et l'Homme alors que celle du primate non humain est semblable à celle de l'Homme [251,252].

Le ouistiti (*Callithrix jacchus*) présente de nombreux avantages pour modéliser les dysfonctionnements métaboliques associés à l'obésité. Ces primates non humains du Nouveau Monde sont adultes à l'âge de deux ans, ont un taux de fécondité élevé et ont une durée de vie courte (environ 15 ans). En vieillissant et à partir de l'âge de 6 ans, le marmouset possède la capacité de développer de manière spontanée des troubles métaboliques [253] ainsi qu'un diabète associé à l'obésité [254]. Des études plus récentes indiquent qu'une résistance à l'insuline peut survenir chez des animaux jeunes lorsque ces derniers développent une obésité précoce. Enfin,

des modifications de leur régime alimentaire, essentiellement constitué de fruits, peuvent rapidement conduire au développement d'une obésité associée à des dyslipidémies et à des troubles du métabolisme glucidique [255]. Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons décidé de mener notre étude sur ces PNH. Des ouistitis ont donc reçu un régime enrichi en glucose et en graisse (lard et cholestérol) afin d'induire une obésité, des troubles lipidiques et glucidiques.

Nous nous sommes également intéressés aux potentiels effets bénéfiques préventifs d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 ( $I_1R$ ) : le LNP599. Des études préliminaires ont permis d'observer les effets bénéfiques de cette molécule dans un modèle de SMet: le rat SHHF (Spontaneously Hypertensive Heart Failure) [249]. Le LNP599 améliore les paramètres hémodynamiques et métaboliques : stabilisation du poids malgré une prise alimentaire semblable aux animaux contrôle, amélioration de l'hypertension artérielle, des dyslipidémies, de l'insulinémie et augmentation de la concentration plasmatique d'adiponectine pouvant contribuer à la réduction de l'intolérance au glucose [249]. Notons enfin que le passage à l'étude des effets du LNP599 chez le primate représente une étape importante avant le développement clinique de la molécule.

Cette étude avait donc pour objectif le développement d'un modèle plus approprié de SMet et l'étude des effets du LNP599 dans ce même modèle afin de confirmer et d'étendre les résultats obtenus chez le rongeur. Cette étude, associée à d'autres expériences à venir, devrait également permettre de vérifier que l'inhibition sympathique associée à une augmentation de l'adiponectine pourrait constituer un axe de recherche pour le développement de nouveaux médicaments. L'ensemble des travaux devrait permettre à terme, de valider l'intérêt thérapeutique potentiel du LNP599 chez L'Homme.

## II. Méthodologie

### II.1. Le modèle de syndrome métabolique chez le primate non humain (marmouset, *Callithrix jacchus*):

Dix-neuf animaux âgés de 5 à 7 ans ont été soumis à plusieurs traitements durant 16 semaines : groupe témoins régime normal (n=5), groupe placebo régime enrichi (n=8), groupe régime enrichi + LNP 599 (10 mg/kg/jour per os) (n=6).

	Régime standard	Régime enrichi
<b>Apport calorique (kcal/gramme de croquettes)</b>	3.725	4.265
<b>Graisse (%)</b>	7.12	Lard : 12.5 Cholestérol : 0.4
<b>Glucose (%)</b>	4.27	33

Tableau 3 : caractéristiques des différents régimes

Des études préliminaires nous ont permis de valider l'absence de toxicité du LNP599 à la dose de 10 mg/kg/jour administrée par voie orale (résultats non présentés). Un suivi cardio-métabolique a été assuré et des mesures de différents paramètres ont été réalisées au début et à la fin du traitement :

- Prélèvement d'échantillons sanguins pour mesures des lipides (cholestérol total, HDL et LDL cholestérol, triglycérides)
- Test de tolérance au glucose (2g/kg ip) avec mesures des glycémies à jeun et 15,30,60 et 120 minutes après injection

### II.2. Mesures/Dosages/Analyses statistiques

- Le poids corporel est mesuré une fois par semaine, la consommation en eau et en nourriture est mesurée de manière quotidienne.
- La glycémie est évaluée sur une gouttelette de sang prélevée au niveau de la patte à l'aide d'un glycomètre (AccuCheck, Roche Diagnostics, Meylan, France). Ces valeurs permettent le calcul des aires sous la courbe (AUC) des tests de tolérance au glucose.
- Les échantillons sanguins sont prélevés sur des animaux anesthésiés à l'isoflurane (isoflurane 2.5%; Abbott, Rungis, France) grâce à une prise de sang réalisée au niveau de la veine fémorale. Afin de permettre la récupération du plasma, le sang est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 2000g.
- Les triglycérides et le cholestérol total sont dosés grâce à un kit colorimétrique (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Les niveaux de HDL/LDL cholestérol sont dosés grâce à l'utilisation d'un kit fluorométrique. (Euromedex, Souffelweyersheim, France).
- Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques consistent en une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Bonferroni. Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative.



### III. Principaux résultats

Cette étude nous a permis de valider un modèle accéléré et original de troubles métaboliques chez le marmouset et d'y confirmer les effets bénéfiques du LNP599.

#### III.1. Validation du modèle de troubles métaboliques chez le marmouset :

- ✓ Les croquettes enrichies sont appétentes et induisent une prise de poids significative (+9% vs régime normal,  $p=0.02$ )
- ✓ Le régime enrichi modifie les paramètres lipidiques en induisant une augmentation des triglycérides (+70% vs régime normal,  $p=0.14$ ) et du cholestérol total (+51% vs régime normal,  $p=0.08$ )
- ✓ Le régime ne modifie pas la glycémie à jeun mais induit une intolérance au glucose chez la moitié des animaux

#### III.2. Evaluation des effets bénéfiques du LNP599 chez les animaux présentant certains symptômes d'un SMet :

- ✓ Les animaux traités par le LNP599 présentent une stabilisation de leur poids comparativement aux animaux recevant le régime enrichi seul (témoins :  $359 \pm 14.3\text{g}$ , régime enrichi :  $389.37 \pm 9.88\text{g}$ , régime enrichi + LNP599 :  $363.33 \pm 13.76\text{g}$ ) malgré un apport calorique journalier supérieur aux animaux témoins (apport calorique : régime normal =  $3.725\text{ kcal/g}$  de croquette, régime enrichi =  $4.265\text{ kcal/g}$  de croquette)

- ✓ Le LNP599 prévient l'augmentation des triglycérides (pourcentage de variations T0/T16 : Témoins =  $+19.87 \pm 12.99\%$ , régime enrichi =  $+74.84 \pm 25.19\%$ , régime enrichi + LNP599 :  $-9.10 \pm 17.79\%$ . Régime enrichi vs régime enrichi + LNP599 :  $p=0.04$ )
- ✓ Les animaux traités avec le LNP599 présentent une élévation significative de la proportion de HDL-cholestérol (HDL/cholestérol total à T16 : Témoins =  $0.28 \pm 0.06$ , régime enrichi =  $0.31 \pm 0.02$ , régime enrichi + LNP599 :  $0.42 \pm 0.02$ . Régime enrichi vs régime enrichi + LNP599 :  $p=0.03$ )
- ✓ Le LNP599 prévient la mise en place d'une intolérance au glucose (pourcentage de variations des AUC T0/T16 : témoins =  $-6.66 \pm 10.91 \%$ , régime enrichi =  $+5.87 \pm 7.71 \%$ , régime enrichi + LNP599 :  $-19.75 \pm 6.53 \%$ . régime enrichi vs régime enrichi + LNP599 :  $p=0.03$ )

**Le régime enrichi induit des troubles métaboliques chez le marmouset. Même si l'ensemble des symptômes du SMet ne sont pas retrouvés dans notre modèle, il offre de nouvelles perspectives pour étudier les désordres glucidiques et lipidiques chez le PNH, plus pertinent par sa proximité avec l'Homme. Le LNP599 prévient la prise de poids, l'intolérance au glucose et les dyslipidémies. Cependant, en raison de limitations liées aux techniques de dosage, nous n'avons pas pu confirmer sa capacité à agir sur la résistance à l'insuline et la sécrétion d'adiponectine.**



**EFFECTS OF A TYPE 1 IMIDAZOLINE RECEPTOR LIGAND IN A MODEL OF  
METABOLIC DISORDERS IN THE COMMON MARMOSSET (*CALLITHRIX  
JACCHUS*).**

Maud Weiss<sup>1</sup>, Lyne Fellmann<sup>2</sup>, Fanélie Wanert<sup>2</sup>, Laurent Monassier<sup>1</sup>, Pascal Bousquet<sup>1</sup>, Nathalie  
Niederhoffer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, Fédération de Médecine  
Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France

<sup>2</sup>Centre de Primatologie de Strasbourg, Plateforme SILABE Aducis, Chemin du Fort Foch,  
Niederhausbergen, France

Corresponding author:

Dr. N. Niederhoffer (nathalie.niederhoffer@unistra.fr)

Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, EA 7296, Faculté de  
Médecine, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France

Tel.: + 33 3 68 85 33 85 - Fax: + 33 3 68 85 33 88

## ABSTRACT

The metabolic syndrome (MetS) can be defined as a combination of interrelated risk factors including obesity, hypertension, dyslipidemia, and impaired glucose tolerance. We recently reported that activation of I<sub>1</sub> imidazoline receptors (I<sub>1</sub>R) by LNP599 prevents weight gain, improves hypertension, dyslipidemia and glucose intolerance through sympatho-inhibition and peripheral effects such as increased adiponectin secretion in a rat model of MetS. Additionally, a study designed to explore specifically the peripheral effect of another I<sub>1</sub>R ligand, LNP509, in a rat model of insulin resistance, demonstrated beneficial effects of these molecule independently of central actions: LNP509 increased adiponectin secretion acting directly on adipocytes to improve insulin sensitivity and to enhance AMPK signaling pathway in hepatocytes. These results may open new strategy to treat all the symptoms of MetS by using a single one molecule.

A major limitation to the study of MetS pathophysiology and therapy is the lack of relevant animal models which can mimic rigorously the pathogenesis of the human MetS and the associated metabolic abnormalities. Studies are essentially conducted in rodents which present important metabolic differences from human, particularly concerning lipid metabolism, lipogenesis and thermogenesis. The first objective of the present study was therefore to develop an original accelerated model of MetS in the non-human primate (marmoset, *Callithrix jacchus*). Our second objective was to validate the preventive therapeutic potential of LNP599.

Animals received glucose, lard and cholesterol enriched diet during 16 weeks and developed obesity, dyslipidemia and glucose intolerance. Orally treatment with LNP599 prevented obesity, dyslipidemia by reducing triglycerides level and increasing the HDL/total cholesterol ratio and

reduced the area under the curve of the intraperitoneal glucose tolerance test. To conclude, we established that the enriched diet increased rapidly body weight and induced glucose intolerance and dyslipidemia and that LNP599 prevented the establishment of the disease by limiting weight gain and metabolic troubles. This may open a promising new way to study MetS and for the development of treatments of the metabolic syndrome.

**Keywords :** I<sub>1</sub> imidazoline receptors, non human primate, metabolic syndrome.

## INTRODUCTION

The metabolic syndrome (MetS) was first described in 1988 by Reaven et al and can be now defined as a combination of interrelated risk factors including central obesity (defined as waist circumference  $\geq 94$ cm for European men and  $\geq 80$ cm for European women, with ethnicity specific values for other groups) plus any two of the following four factors: raised triglycerides level ( $\geq 1.7$  mmol/L, or specific treatment for this lipid abnormality), reduced high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) ( $< 1.03$  mmol/L in males and  $< 1.29$  mmol/L in females, or specific treatment for this lipid abnormality), raised blood pressure (systolic blood pressure (BP)  $\geq 130$  or diastolic BP  $\geq 85$  mmHg, or treatment of previously diagnosed hypertension), and raised fasting plasma glucose (FPG) ( $\geq 5.6$  mmol/L or previously diagnosed type 2 diabetes) (definition from International Diabetes Federation). MetS predisposes affected subjects to develop cardiovascular and metabolic diseases [2]. The prevalence of insulin resistance and MetS is increasing worldwide and represents a real public health concern [11]. There is an urgent need to find new target pathways as potential therapies for the treatment of MetS.

Despite extensive work, the pathophysiology of MetS is still poorly understood and a major limitation to the study of MetS is the lack of relevant animal models which represent rigorously the pathogenesis of MetS and the associated metabolic abnormalities [252]. Animal studies are mainly carried out in rodents. Some studies have demonstrated that enriched fructose diet induce metabolic disorders associated with MetS [256]. However, important metabolic differences exist between rodents and human, whereas human and primate present many similarities. Firstly, dyslipidemia observed in murine models of MetS are never representative of the human situation: all forms of cholesterol, including HDL, are increased in rodent, in contrast to what is observed in humans and in primate. Plasma HDL-cholesterol originates from the liver, small intestine, and

lipoprotein lipase mediated lipolysis of chylomicrons and VLDL [257,258]. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) plays a major role in the regulation of HDL-cholesterol concentration since it transports cholesterol esters from HDL to lipoproteins containing apolipoprotein B (Apo-B) such as LDL (Low Density Lipoprotein) and VLDL (very low density lipoprotein). This key enzyme is absent in rodents. Consequently, these animals have naturally and consistently high levels of HDL cholesterol, protecting them against the risk of developing cardiovascular diseases [250]. For example, a study in the obese male Zucker rat demonstrated that HDL-cholesterol increases uniformly with increasing dietary fat-content ; in contrast, LDL-cholesterol remained stable [259]. Secondly, the major site of lipogenesis is the liver in rodent whereas it takes place in adipose tissue in human and primate [260]. Moreover, the physiology of thermogenesis differs between rodents and Humans/primates [260]. Further, many rodent models present genetic changes to induce symptoms even though the human disease is usually diet induced [261]. Therefore, the results of metabolic studies realized in primates are more applicable to human medicine than those obtained from rodent studies.

In this setting, we developed a non human primate model of MetS. Several reports demonstrated that the common marmoset, *Callithrix jacchus*, has many advantages for modeling metabolic dysfunction [254,262]. These New World monkeys are relatively small animals, are quite easy to manipulate and can be kept and bred in captivity. They have a lifespan of 15 years; they are adult by two years of age and have a high fertility rate since they are capable to offer twins every 6 months [261]. Several species of primates, including marmosets, have the ability with age to spontaneously develop individual or associated metabolic disorders found in MetS: obesity, insulin resistance, hyperglycemia, increased triglycerides, and dyslipidemia associated with a decrease in the ratio HDL cholesterol/total cholesterol [254,263]. Moreover, recent studies indicate that dietary changes such as increased fructose in diet can lead to the development of

metabolic dysfunction [255]. The first objective of this study was to obtain an original model of MetS developing rapidly, by feeding animals with a more enriched diet (glucose, bacon and cholesterol) compared to others published studies to accelerate metabolic disorders. Only some teams have demonstrated the effect of different enriched diet and we developed for the first time a marmoset model which rapidly develops metabolic troubles.

Over the last years, we synthesized and characterized a series of new pharmacological compounds (LNPs) which display nanomolar affinity for I<sub>1</sub>-imidazoline-receptors (I<sub>1</sub>Rs) [264,265,266,267]. I<sub>1</sub>Rs were first described in 1984 by Bousquet and coworkers [232] as the pharmacological target triggered by clonidine to induce hypotension. Two of these compounds were tested so far for their cardio-metabolic actions; LNP599 ([3-chloro-2-methyl-phenyl)-(4-methyl-4,5-dihydro-3*H*-pyrrol-2-yl)-amine hydrochloride]), a pyrroline analog of clonidine [265] and LNP509 ([*cis*-/*trans*-1-cyclopropylmethyl-(4,5-dimethyl-4,5-dihydro-3*H*-pyrrol-2-yl)-amine] [266]. We demonstrated that chronic treatments with LNPs induce beneficial effects on all the symptoms of MetS (body weight, lipid profile, glucose tolerance...) in various rat models of MetS [249] or insulin resistance [268]. These effects were attributed to sympatho-inhibition and peripheral additional actions related -at least in part- to adiponectin [249,268].

Based on these favorable effects of LNP ligands in rodents, the second objective of our work was to validate the preventive action of the lead compound, LNP599, on body weight, glucose tolerance and on lipid profile in marmosets with MetS. Marmoset received LNP599 orally (10 mg/kg per day) during 16 weeks in complement with enriched diet. We established that 1) the enriched diet increased body weight and induced glucose intolerance and dyslipidemia, and 2) LNP599 prevented the establishment of the disease by limiting the weight gain and metabolic troubles severity.

## MATERIAL AND METHODS

**Animals** 19 adult male Marmoset (5-7 years old, body weight  $365 \pm 4$  g) (*Callithrix jacchus* – Silabe-ADUEIS, Niederhausbergen, France) were used for this study. Animals were housed under standard conditions (room temperature 24-28°C, hygrometry: 30-70%; 12h/12h light/dark cycle; lights on at 7 :00 AM) with ad libitum access to food (standard or enriched pellets – SDS Dietex, Argenteuil, France) and water. Before the onset of the experiment, all animals were submitted to at least one week habituation to the experimental room (single-caged housing). In order to reduce the impact of the stress caused by the housing type, a specific enrichment and socialization program has been established. All experiments were conducted in Silabe which is accredited for the care and use of non-human primates (A67-326-36) and were approved by the regional ethical committee (ref. AL/04/16/07/12).

**Study design for dietary intervention and treatment** Animals were assigned to three groups. Group one (control ; n=5) was fed a standard commercially available diet (3.725 kcal/g of diet) (Mini Marex, SDS Dietex, Argenteuil, France). Group two (enriched diet, HFD; n=8) received high fat high glucose diet containing 12.5% added bacon, 0.4% added cholesterol and 33% added glucose (4.265 kcal/g of diet) (SDS Dietex, Argenteuil, France). Group three (enriched diet + LNP599; n=6,) received the same high fat high glucose diet than group two and the I<sub>1</sub>R ligand LNP599 administered on candy. LNP599 was administered daily orally at a dose of 10 mg/kg per day for 16 weeks; untreated marmosets (groups 1 and 2) received in parallel candy alone. Body weight was measured once a week. Water and food intake were monitored every day. Metabolic parameters (see below) were assessed at the beginning (T0) and at the end (T16) of the treatment period.



**Biochemical measurements** Blood samples (1.5 ml) were obtained from the femoral vein of anesthetized marmoset (isoflurane 2.5%; Abbott, Rungis, France) after a 5-hour fast. Blood samples were centrifuged for 15 minutes at 2000g, and the plasma was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay for total cholesterol, HDL/LDL cholesterol and triglycerides. Total cholesterol and triglycerides were quantified by using colorimetric kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's recommendations. HDL/LDL cholesterol and hepatic enzymes were measured by using fluorometric kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's recommendations.

**Glucose tolerance test (IPGTT)** After a 5-hour fast, a 2 g/kg glucose solution was injected intraperitoneally in non-anesthetized animals. Glucose level in plasma was evaluated in a blood drop at baseline and 15, 30, 60 and 120 minutes after the glucose load ( $t_0$ ) using a glucometer (AccuCheck, Roche Diagnostics, Meylan, France). The area under the curve (AUC) and the percentage of variations compared to  $t_0$  were calculated from these values.

**Statistics** Data are presented as percent differences from baseline  $\pm$  SEM. Comparisons between treatments or groups were performed using one-way ANOVA followed by a Bonferonni post hoc test.  $P$  values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### *Validation of marmoset as an experimental model of metabolic troubles*

The average body weight of control and HFD groups did not differ at T0 ( $361 \pm 7$  g for control vs  $365 \pm 4$  g for HFD). The body weight remained stable in control primates whereas it started to increase already after 2 weeks of enriched diet in the HFD group (Fig. 1A left). After 6 weeks, HFD monkeys displayed significant body weight gain ( $382 \pm 6$  g vs  $356 \pm 12$  g for control animals). At the end of the 16-weeks period, all HFD-fed animals displayed increased body weight, with calculated weight gains from T0 to T16 ranging from + 1.43 % to + 15.79 % (Fig. 1A right). Food and water intakes were measured every day and related to body weight. Food but not water intake was increased in HFD group (Fig. 1B).

Responses to glucose challenge were assessed with IPGTT. Fasting glucose remained unchanged in both control and HFD groups (Fig. 2A); however, exposure to enriched diet increased the value of the peak glycaemia in the HFD group, so that the mean percentage of variation at T16 from T0 of the AUC (%) IP glucose tolerance test was 6% increased (Fig. 2B). Of note, in the HFD group, the AUC was increased in 6/9 animals (+ 0.44 % to 31.15 % from T0 to T16); thus, the only relatively moderate mean increase in AUC can be explained by the decreased AUC values in a minority (2/9) of animals (Fig. 2B lower right).

Disorders in glucose homeostasis were associated with dyslipidemia. HFD group developed plasma hypertriglyceridemia ( $+75 \% \pm 25$  vs  $+20 \% \pm 13$  between T0 and T16 for HFD and control animals, respectively) (Fig. 3A). Total cholesterol also increased ( $+47.15\% \pm 14.03$  vs  $+5.03\% \pm 15.07$  between T0 and T16 for HFD and controls animals, respectively) (Table 1 and Fig. 3B); total cholesterol is increased whereas HDL form is the same in the HFD group (HDL

cholesterol/total cholesterol :  $0.29 \pm 0.06$  vs  $0.31 \pm 0.02$  for control and HFD, respectively) (Fig. 3B).

### ***Preventive effects of LNP599 on metabolic parameters***

**Body weight** As stated above, the weight of HFD animals continued to increase from week 2 to 16 of the protocol, whereas that of the LNP599-treated animals stabilized (after 16 weeks, control:  $359 \text{ g} \pm 15.35$ , HFD:  $389.37 \text{ g} \pm 9.88$ , HFD + LNP599:  $363.33 \pm 13.76$ ) (Fig. 1A), despite an increased food intake compared to controls (average consumption over the 16 weeks-period = control:  $28 \pm 1$ , HFD:  $39 \pm 2$ , HFD + LNP599:  $34 \text{ g/kg/day} \pm 2$ ) (Fig. 1B).

**Glucose regulation** Values for fasting glucose were not different in controls (T0:  $7.6 \text{ mM} \pm 1.0$ , T16:  $7.8 \text{ mM} \pm 1.2$ ), HFD (T0:  $6.7 \text{ mM} \pm 0.8$ , T16:  $6.3 \text{ mM} \pm 0.5$ ) and LNP599 treated animals (T0:  $7.0 \text{ mM} \pm 0.9$ , T16:  $7.5 \text{ mM} \pm 0.7$ ) (Fig. 2A). Except for one animal, LNP599 at  $10 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  improved glucose regulation, as shown by the significant 20% of variations decrease in the AUC IPGTT after  $10 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  LNP599 (Fig. 2B).

**Lipids** In HFD group, triglycerides and total cholesterol increased (Fig. 3A and Table 1). After 16 weeks, LNP599 treatment prevents the increase of plasma triglycerides ( $-9.10\% \pm 17.79$  vs  $+74.84\% \pm 25.18$  in HFD group,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3A). LNP599 did not prevent the mean increase in total cholesterol; however, the treatment prevented the fall in the HDL form of cholesterol and induced an elevation of the HDL/total cholesterol ratio (Fig. 3B).



## DISCUSSION

The present study was designed to develop a new model of metabolic troubles which are associated to MetS and to evaluate the LNP599 capacity to prevent the development of this syndrome.

Because of the differences of lipid metabolism between rodents and Humans, there is an strong need for alternative animal models to study MetS. Metabolic studies are usually conducted in rodent but mice and rats display important differences with human. An alternative to rodent models is the use of Rhesus monkey, a NHP. Phylogenetically, they are more similar to humans in terms of lipoprotein profiles, pathogenesis of atherosclerotic disease, and genetic makeup. The phylogenetic distance between humans and rodents limits the translational value of findings whereas the close relationship between NHPs and humans makes them more appropriate to study LNP599 effects [269]. In their pioneering work, Hansen and colleagues demonstrated that, along with aging, some rhesus monkeys spontaneously develop obesity, followed by insulin resistance and type 2 diabetes [270,271,272]. Nevertheless, the use of Rhesus monkey imposes difficulties to manipulate, and these animals live older and present potential zoonotic risk [273]. Recently, to investigate the development of MetS, a particular interest has been focused on the use of marmosets because of their many advantages [274]. They are similar to humans in fat cell function [275] and in pancreas structure [251]. In addition, lipogenesis occurs in the adipose tissues, as in humans, whereas in rodent it takes place in the liver [252]. Even if studies in marmosets are emergent, only some teams have demonstrated the effects of different enriched diets. Wachtmann and coworkers demonstrated that marmosets fed a diet enriched in glucose developed a prolonged hyperglycemic state as early as week 16. They also develop an obese phenotype with an increase in fat mass. In contrast, animals fed a high-fat diet demonstrated a delayed response such as they develop glucose metabolism troubles since week 40. They

demonstrated only a transient increase in fat mass with a rapid return to basal levels [275]. In the present study, we developed for the first time an enriched diet by combining glucose and fat. This diet rapidly induces metabolic troubles in marmoset monkeys. Of note, all the metabolic troubles were observed as soon as after 16 weeks of enriched diet, which is much shorter period than in other marmoset models [275]. Thus, animals increased their body weight, displayed moderate glucose intolerance without changes in fasting glucose, mimicking a pre-T2D phase, and developed specific dyslipidemia, illustrated by increased triglycerides and total cholesterol, associated with a reduction in the protective HDL form of cholesterol. Dyslipidaemia can be defined as elevated LDL-cholesterol and decreased HDL-cholesterol and is a known risk factor for the development of atherosclerosis in coronary artery disease [276], which is one of the major causes of death world wide [277]. In the past, therapeutic strategies focused on lowering LDL-cholesterol, primarily by the use of statins [278]. Actually, as cardiovascular events seem not to be satisfyingly prevented by decreasing LDL-cholesterol, the therapeutic option consists to increase HDL-cholesterol. The supposed mechanisms by which HDL-cholesterol decreases the risk of cardiovascular event are supported by a lot of clinical studies. Prospective studies have shown that a 1% lower HDL-cholesterol value is associated with a 3–4% increase in cardiovascular event [279]. A recent meta-analysis of 23 studies performed in the Asia-Pacific region reported that low levels of HDL-cholesterol, without any other lipid abnormalities, are associated with an 20 % increased risk of cardiovascular event in Asian population [280]. Moreover, raising HDL-cholesterol (by nicotinic acid for example) has been shown to protect against atherosclerosis and cardiovascular similarly to what is observed when LDL-cholesterol is decreased [281]. Based on all these observations, our model of metabolic troubles in marmosets may represent a clinically relevant model to study the pathophysiology and progression of MetS, but also to evaluate the beneficial actions of emerging therapies targeting HDL-cholesterol.

In previous studies, we demonstrated that molecules highly selective for I<sub>1</sub>R have beneficial effects on several components of MetS in rodent models. In SHHF rats, LNP599 reduced blood pressure and body weight and improved insulin resistance, glucose tolerance and lipid profile [249]. In a model of insulin resistance, LNP509 improved glucose tolerance and insulin sensitivity through a direct action on adiponectin signaling pathway [268]. Non-rodent studies represent an essential step before starting clinical studies, but, as said before, dyslipidemia observed in MetS are characterized by decreased HDL-cholesterol and increased LDL-cholesterol, and can hardly be studied in rats. Because of the lipid metabolism differences between rodents and humans, and since LNP599 toxicity testing and their beneficial effects were validated in rodent model, a study in our innovative marmoset model of MetS could be undertaken. Firstly, in vivo toxicology investigations and cellular viability tests (data not shown) indicate that long-term treatment with LNP599 is well tolerated in marmoset. Because of its pharmacokinetic properties (data not shown) and a good intestinal absorption, LNP599 could be administered orally [264]. Moreover, this form is the more convenient, non invasive, and the closest to the definitive drug form. On the basis of previous results and preliminary test studies on marmoset, LNP599 was administered at a dose of 10 mg/kg/day, in order to characterize the preventive effect of the treatment in animals receiving HFD diet compared to animals receiving HFD or normal diet.

Treatment with LNP599 prevented the HFD-related weight gain. This stabilization of body weight was not related to any reduction in food intake compared to untreated HFD animals; even, it occurred while food intake was increased compared to control animals, most probably due to higher appetite of the enriched pellets. These results suggest that LNP599 is at least able to prevent weight gain without anorexigenic effect, which is in agreement with our previous reports in rodent [249]. There is at least one hypothesis to explain the prevention of weight gain by

LNP599 : LNP599 could increase energy expenditure. As observed previously, LNPs directly phosphorylates and activates hepatocyte AMPK. AMPK is a major regulator of energy homeostasis [268] and it has been involved for instance in the beneficial metabolic effects of exercise. Physical activity leads to activation of AMPK in human skeletal muscle and in rodent intra-abdominal adipose tissue and in liver to increase energy expenditure. Early study by Berger and co-workers demonstrated that exercise diminishes obesity and insulin resistance in Zucker rats by increasing AMPK activation in the skeletal muscle [282]. We can hypothesized that LNP599 activates AMPK in the muscle, leading to increased energy expenditure, and consequently to prevention of the body weight gain and increased food consumption.

LNP599 ameliorated dyslipidemia as show by the decreased triglycerides levels. Moreover, although all HFD animals displayed increased total cholesterol, the elevation in LNP599-treated animals could be mainly attributed to an increase in the HDL form of cholesterol. Hence, HDL/total cholesterol ratio increased by 43 % compared to controls and by 37 % compared to animals receiving enriched diet alone. Of note, this range of effect is higher than that of statins and fibrates, the reference treatments of dyslipidemia in case of MetS, which are usually reported to increase the ratio HDL/total cholesterol by 5-30 % [211]. Considering the gross value of HDL-cholesterol in HFD and in HFD+LNP599 groups ( $3.06 \pm 0.69$  and  $4.94 \pm 1.31$  mmol/L respectively), LNP599 increased HDL-cholesterol by 61%, which is 4 times higher than statins and fibrates (statins: 3-15%, fibrates: 5-20%) [283]. As elevated levels of HDL are associated with reduced cardiovascular risk, this result must be considered with much attention.

Regarding glucose metabolism, HFD marmoset had normal fasting glucose values compared with control animals; thus, it is not surprising that LNP599 treatment did not change this parameter. However, IPGTT tests and AUC values show that primates receiving enriched diet exhibit lower,



although moderate glucose intolerance. LNP599 treatment decreased AUC values, which indicates improved glucose metabolism.

Our previous data unraveled direct actions of LNPs on insulin-sensitive cells, ie adipocytes and hepatocytes, which could account for the beneficial effects seen in the present study [268]. To confirm the ability of LNP599 to act directly on these cellular systems, further experiments should be carried out in tissue samples from treated marmosets,

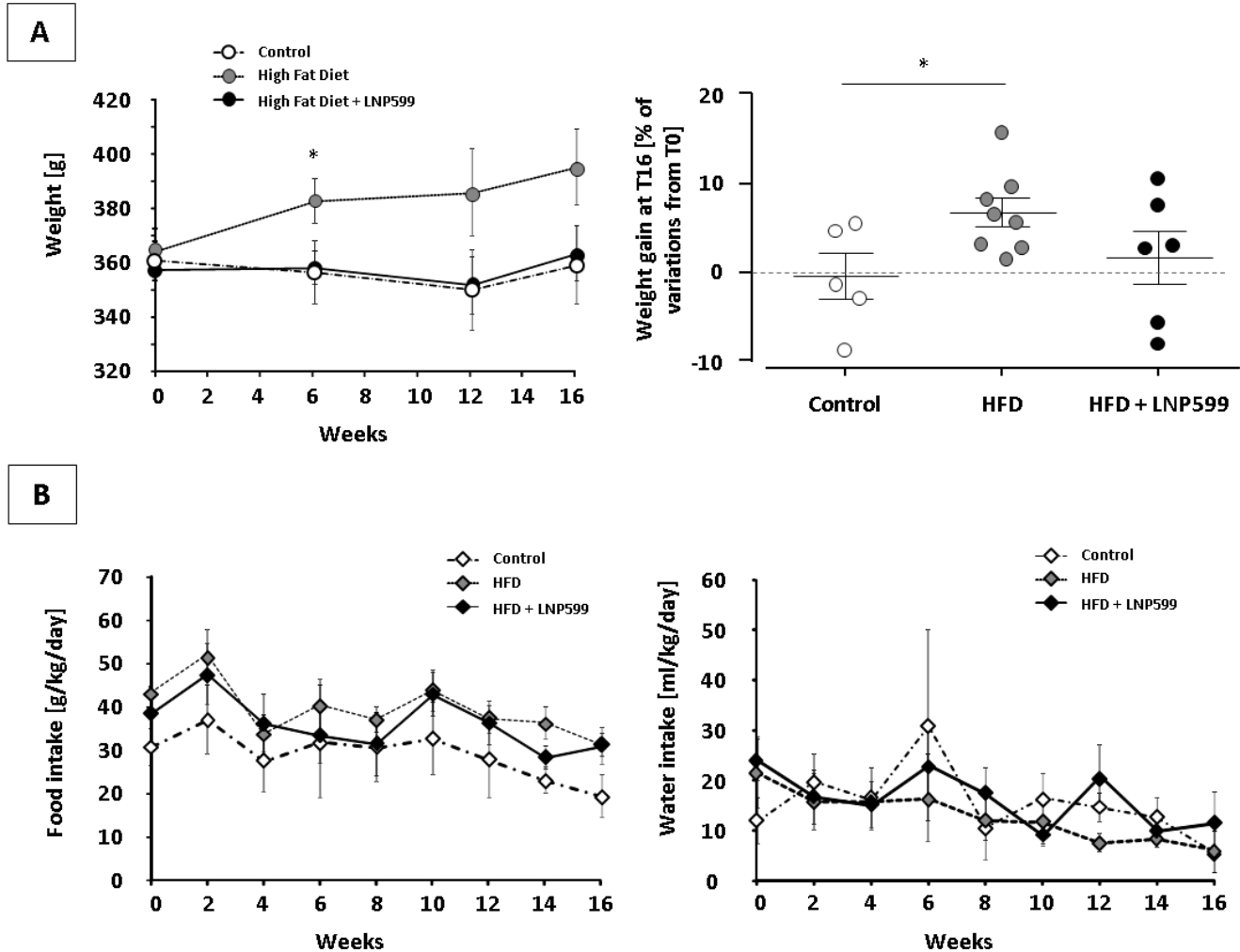
To conclude, the aim of this study was firstly to develop an original model of MetS in the non human primate (*callithrix jacchus*, common marmoset). Indeed, the majority of the models described in the literature settle on longer treatments. Our model offers new opportunities to rapidly study the carbohydrate and lipid disorders in the human primates, more relevant to the human pathophysiology. Regarding the therapeutic benefit of LNP599, we were able to confirm its ability to act on all induced disorders in the developed model. This ligand prevented the development of obesity, glucose intolerance and dyslipidemia. At present, the treatment of MetS frequently associates 4 to 6 different drugs (antihypertensive, cholesterol-lowering, hypoglycemic...). The development of new effective molecules acting simultaneously on several cardio-metabolic disorders could represent an innovative therapeutic strategy, with less side effects and decreased risks of drug interactions.

**Table 1. Effects of 16 weeks enriched diet  $\pm$  LNP559 on lipids**

Parameters were assessed before and at the end of the treatment period. Data are means  $\pm$  SEM.

	<b>Control</b>	<b>HFD</b>	<b>HFD + LNP559</b>
<b>Triglycerides (mmol/L)</b>	0.814 $\pm$ 0.114	1.374 $\pm$ 0.207	0.621 $\pm$ 0.052
<b>Cholesterol</b>			
Total cholesterol (mmol/L)	6.224 $\pm$ 0.430	9.714 $\pm$ 1.743	11.290 $\pm$ 2.499
HDL/total cholesterol	0.283 $\pm$ 0.063	0.309 $\pm$ 0.021	0.416 $\pm$ 0.021
LDL/total cholesterol	0.247 $\pm$ 0.089	0.261 $\pm$ 0.035	0.334 $\pm$ 0.131

Figure 1.



**Figure 1. Effect of 16 weeks of high fat diet  $\pm$  LNP599 on weight gain, food and water intake** Controls (n=5) received normal diet whereas other animals received enriched diet with vehicle (n=8) or LNP599 (10 mg/kg:day, n=6) during 16 weeks. **A:** Body weight was measured once a week. Data are expressed in grammes and in percentage of variations between the start (T0) and the end (T16) of the experiment for each group. **B:** Water and food intake were monitored every day. Data are means  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$  control marmosets *versus* high fat diet marmosets.

Figure 2.

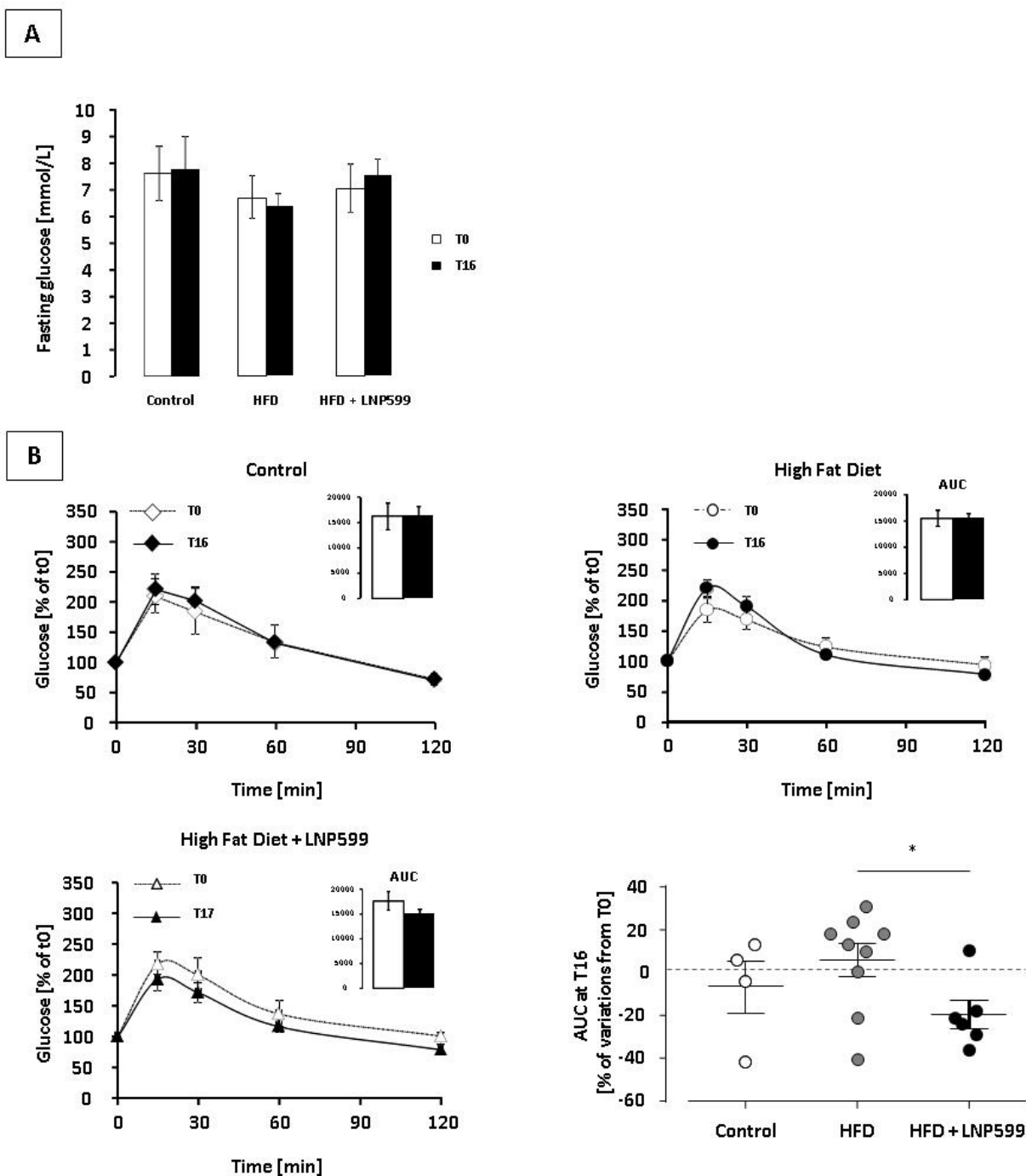
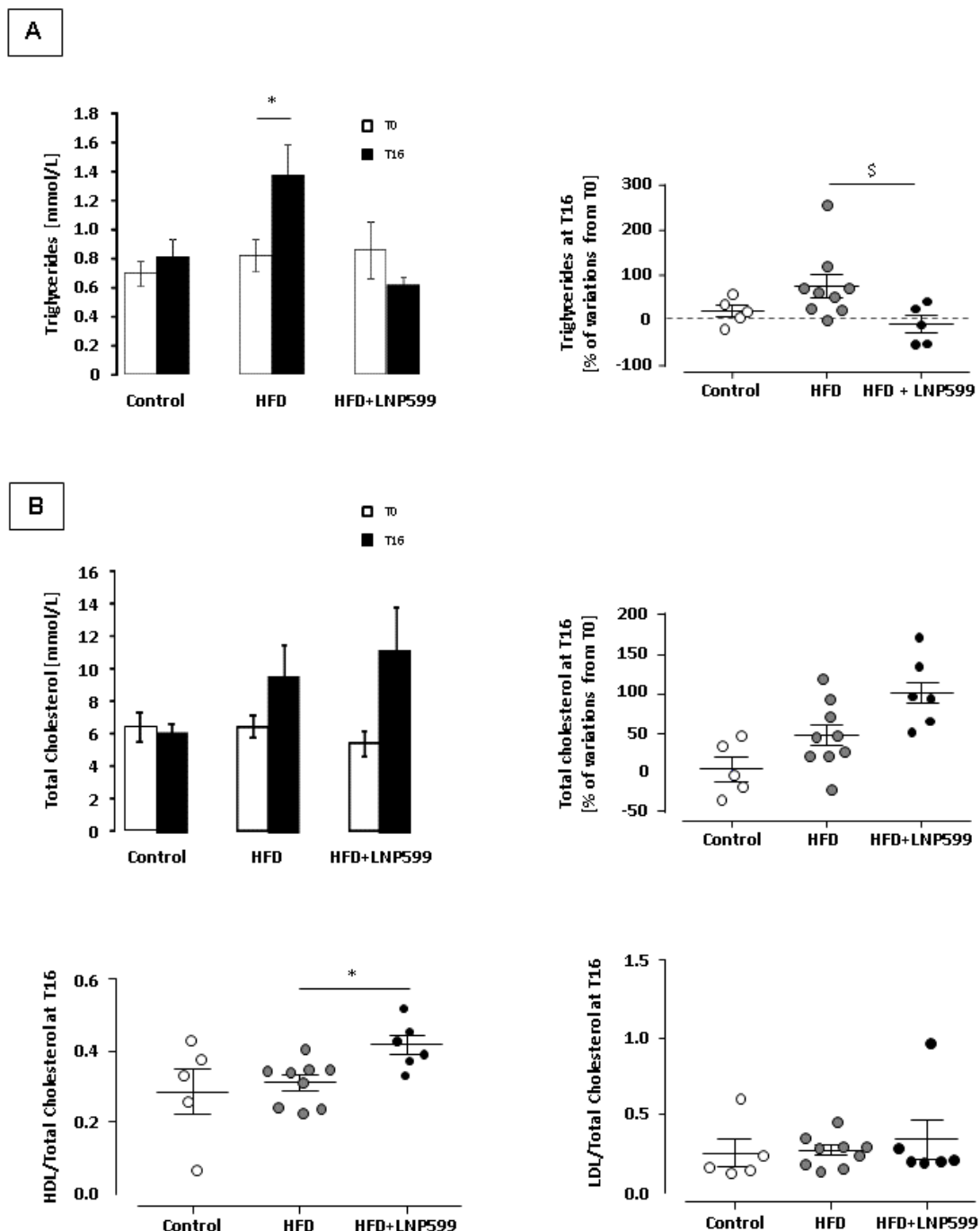


Figure 2. Effect of 16 weeks of high fat diet  $\pm$  LNP599 on glucose parameters

Controls (n=5) received normal diet whereas other animals received enriched diet (HFD) with vehicle (n=8) or LNP599 (10 mg/kg:day, n=6) during 16 weeks. **A:** Fasting glucose in plasma

was evaluated before (T0) and at the end (T16) of the treatment period. **B:** Glucose tolerance was tested before (T0) and at the end (T16) of the treatment period. A glucose solution (2 g/kg) was administered i.p. at  $t_0$  ; the plasma glucose was then determined after 15, 30, 60 and 120 minutes ; the area under the curve (AUC) was calculated from these values. Data are means  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$  HFD-marmoset versus LNP599-treated animals.

Figure 3.



**Figure 3. Effect of 16 weeks of high fat diet  $\pm$  LNP599 on lipid metabolism**

Controls (n=5) received normal diet whereas others received enriched diet (HFD) with vehicle (n=8) or LNP599 (10 mg/kg:day, n=6) during 16 weeks. Blood samples were obtained from isoflurane anesthetized marmosets. **A.** Plasma triglycerides \*:  $P < 0.05$  T0 versus T16 in HFD animals. \$:  $P < 0.05$  placebo versus LNP599-treated animals. **B.** HDL/total cholesterol. \*:  $P < 0.05$  high fat diet marmoset versus LNP599 treated animals.

2<sup>ème</sup> étude :

**Etude des effets périphériques d'un ligand sélectif des récepteurs aux  
imidazoles de type 1(LNP509)  
Amélioration de la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin d'intolérance  
au glucose grâce à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et à  
l'activation de la cascade de signalisation de l'AMPK**

\*\*\*\*\*

Article publié dans *Am Journal Physiol Endocrinol Metabolism*, 2015;309 : E95-104.

Weiss M.\*, Bouchoucha S.\*, Aiad F., Ayme-Dietrich E., Dali-Youcef N., Bousquet P., Greney H.,  
and Niederhoffer N.

**Imidazoline-like drugs improve insulin sensitivity through peripheral stimulation of  
adiponectin and AMPK pathways in a rat model of glucose intolerance**

\*contributed equally to this work

\*\*\*\*\*

## I. Contexte et objectifs

Un nombre grandissant d'études atteste de l'importance majeure du tissu adipeux dans la régulation de la sensibilité à l'insuline via la sécrétion de nombreuses adipokines/cytokines [284,285]. Une d'entre elles, l'adiponectine, est connue pour ses fonctions insulino-sensibilisantes [286] et est inversement corrélée au niveau d'obésité. Les données de la littérature suggèrent qu'une diminution de l'adiponectine circulante associée à une baisse d'expression de ses récepteurs engendrent une perte de la sensibilité à l'insuline, évoluant en syndrome métabolique et laissant place au développement de complications cardiovasculaires (Tarquini et al, 2007). Le développement de stratégies thérapeutiques capables d'activer la cascade de signalisation de l'adiponectine représente donc un défi majeur [287,288].

Cette étude avait pour objectif la compréhension de certains des mécanismes périphériques (indépendants des effets centraux) impliqués dans les effets bénéfiques de molécules sélectives des récepteurs aux imidazolines de type 1(RI<sub>1</sub>)[249]. Nous nous sommes donc intéressés aux effets d'un ligand incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique, le LNP509 [266]. Ses effets sur la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline et la modulation de la cascade de signalisation de l'adiponectine ont été évalués *in vivo* (modèle murin d'intolérance au glucose) et *in vitro* (cellules pancréatiques rin m5F, adipocytes primaires, lignée cellulaire hépatocytaire HepG2).



## II. Méthodologie

### II.1. Le modèle d'intolérance au glucose :

Le rat Wistar âgé (12-14 mois) est un modèle d'intolérance au glucose « spontanée » liée à l'âge. Comparés à des animaux jeunes (1-2 mois), ces derniers présentent une hyperinsulinémie, un index HOMA-IR multiplié par 2 et une intolérance au glucose. Les animaux âgés reçoivent le LNP509 par injection intra-péritonéale chaque jour pendant 7 jours. Le LNP509 est dissout dans une solution de NaCl 0.9% (5-10 ou 20 mg/kg/jour). Des rats âgés recevant une injection de sérum physiologique servent d'animaux contrôles. Durant le protocole, différents paramètres sont mesurés :

- Poids corporel, consommation en eau et en nourriture
- Mesure invasive de la pression artérielle
- Prélèvement d'échantillons sanguins pour la mesure des catécholamines circulantes, de l'insuline et de l'adiponectine totale
- Test de tolérance au glucose (0.5 g/kg iv) et test de tolérance à l'insuline (1.5 U/kg ip) avec mesure des glycémies à jeun et 3, 6, 10, 15, 30, 45 et 60 après injection.
- Prélèvement de tissus :
  - fixés au paraformaldéhyde 4% pour analyses histologiques
  - congelés à -20°C pour western blot, dosages ELISA et études de liaisons spécifiques (binding)

## **II.2. Etudes in vitro**

### **II.2.1. Cellules rin m5F**

Une amélioration de la tolérance au glucose résulte d'une augmentation de la sécrétion d'insuline ou d'un accroissement de la sensibilité des cellules cibles. Afin de valider une des hypothèses, des concentrations croissantes de LNP509 ( $10^{-7}$ M à  $10^{-3}$ M) ont été testées sur des cellules pancréatiques  $\beta$  rin m5F. Le milieu de culture est collecté afin de mesurer la sécrétion d'insuline.

### **II.2.2. Adipocytes primaires**

La présence des  $RI_1$  au niveau du tissu adipeux a été vérifiée par des études de liaisons spécifiques. L'hypothèse d'un effet direct sur la sécrétion d'adiponectine a été vérifiée sur des cultures primaires d'adipocytes issues du tissu adipeux péritesticulaire de rats âgés non traités par le LNP509. Les cellules primaires ont été incubées en présence de LNP509 à des concentrations croissantes ( $10^{-9}$ M à  $10^{-4}$ M) et l'adiponectine sécrétée par les adipocytes a été dosée dans le surnageant de culture. .

### **II.2.3. Cellules HepG2**

La capacité du LNP509 à moduler directement l'activation d'un acteur majeur de l'homéostasie glucidique et cible de l'adiponectine, l'AMPK, a été analysée sur une lignée cellulaire dérivant d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2. La présence des  $RI_1$  a tout d'abord été vérifiée par des études de liaisons spécifiques. Les cellules ont ensuite été traitées par du LNP509 à des concentrations croissantes ( $10^{-9}$ M à  $10^{-5}$ M). Le niveau d'activation (phosphorylation) de l'AMPK a été analysé par Western Blot.

## **II.3. Mesures/Dosages/Analyses statistiques**

- La mesure de la pression artérielle (PA) a été réalisée grâce à l'implantation d'un cathéter au niveau de l'artère fémorale. La PA est suivie pendant 15 minutes grâce à un système d'acquisition et d'analyse (EMKA Technologies, Paris, France)
- La glycémie est évaluée sur une gouttelette de sang prélevée à la queue à l'aide d'un glycomètre (AccuCheck, Roche Diagnostics, Meylan, France). Ces valeurs permettent le calcul de l'index HOMA-IR.
- Le dosage des catécholamines circulantes est réalisé par HPLC (Plateau technique de Biochimie, NHC Strasbourg, France).
- L'insuline et l'adiponectine plasmatique ont été mesurées à l'aide de kits ELISA (insulin : Mercodia, Uppsala, Sweden ; adiponectine : B-Bridge, Paris, France)
- Le niveau d'activation des cascades de signalisation de l'insuline et de l'adiponectine est mesuré par Western Blot, en évaluant le rapport AKTp/AKTtot et AMPKp/AMPKtot, respectivement.
- Les études de liaisons spécifiques ont été réalisées sur les tissus/cellules cibles de l'insuline et de l'adiponectine : foie, tissu adipeux et cellules hepG2. Les analyses sont faites sur des préparations membranaires ou des cellules en suspension en présence de 0.5 nM de [<sup>125</sup>I]para-iodoclonidine, 10 µM de rauwolscine et de 6 concentrations de ligand non radioactif (clonidine et LNP509, 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-3</sup>M).
- Les résultats sont présentés sous formes de moyenne ± SEM. Les analyses statistiques consistent en une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Bonferonni. Une valeur de p<0.05 est considérée comme statistiquement significative.

### III. Principaux résultats

Cette étude a permis de montrer que :

- ✓ Le rat Wistar mâle âgé est un modèle de résistance à l'insuline spontanée
- ✓ Les animaux (rats âgés) traités par le LNP509 présentent une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline associée à une augmentation de l'adiponectine plasmatique.
- ✓ Des analyses réalisées sur des biopsies hépatiques d'animaux traités nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de la phosphorylation d'AKT et d'AMPK.
- ✓ L'hypothèse d'un effet direct sur la sécrétion d'adiponectine a été validée sur des cultures primaires d'adipocytes issues du TA péritesticulaire de rats: le LNP509 augmente de façon dépendante de la concentration la sécrétion de l'adiponectine
- ✓ Le LNP509 seul active l'AMPK de manière dépendante de la concentration et des  $RI_1$

**L'activation des  $RI_1$  périphériques stimule la voie de signalisation de l'adiponectine et permet ainsi l'amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline.**

## CALL FOR PAPERS | *Novel Aspects of Adipocyte Biology*

### Imidazoline-like drugs improve insulin sensitivity through peripheral stimulation of adiponectin and AMPK pathways in a rat model of glucose intolerance

Maud Weiss,<sup>1\*</sup> Soumaya Bouchoucha,<sup>1\*</sup> Farouk Aiad,<sup>1</sup> Estelle Ayme-Dietrich,<sup>1</sup> Nassim Dali-Youcef,<sup>2,3</sup> Pascal Bousquet,<sup>1</sup> Hugues Greney,<sup>1,\*\*</sup> and Nathalie Niederhoffer<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie Générale et Spécialisée, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France; and <sup>3</sup>Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104/INSERM U964, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Submitted 13 January 2015; accepted in final form 20 May 2015

Weiss M, Bouchoucha S, Aiad F, Ayme-Dietrich E, Dali-Youcef N, Bousquet P, Greney H, Niederhoffer N. Imidazoline-like drugs improve insulin sensitivity through peripheral stimulation of adiponectin and AMPK pathways in a rat model of glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E95–E104, 2015. First published May 26, 2015; doi:10.1152/ajpendo.00021.2015.—Altered adiponectin signaling and chronic sympathetic hyperactivity have both been proposed as key factors in the pathogenesis of metabolic syndrome. We recently reported that activation of I<sub>1</sub> imidazoline receptors (I<sub>1</sub>R) improves several symptoms of the metabolic syndrome through sympathoinhibition and increases adiponectin plasma levels in a rat model of metabolic syndrome (Fellmann L, Regnault V, Greney H, et al. *J Pharmacol Exp Ther* 346: 370–380, 2013). The present study was designed to explore the peripheral component of the beneficial actions of I<sub>1</sub>R ligands (i.e., sympathoinhibitory independent effects). Aged rats displaying insulin resistance and glucose intolerance were treated with LNP509, a peripherally acting I<sub>1</sub>R agonist. Glucose tolerance, insulin sensitivity, and adiponectin signaling were assessed at the end of the treatment. Direct actions of the ligand on hepatocyte and adipocyte signaling were also studied. LNP509 reduced the area under the curve of the intravenous glucose tolerance test and enhanced insulin hypoglycemic action and intracellular signaling (Akt phosphorylation), indicating improved glucose tolerance and insulin sensitivity. LNP509 stimulated adiponectin secretion acting at I<sub>1</sub>R on adipocytes, resulting in increased plasma levels of adiponectin; it also enhanced AMPK phosphorylation in hepatic tissues. Additionally, I<sub>1</sub>R activation on hepatocytes directly enhanced AMPK phosphorylation. To conclude, I<sub>1</sub>R ligands can improve insulin sensitivity acting peripherally, independently of sympathoinhibition; stimulation of adiponectin and AMPK pathways at insulin target tissues may account for this effect. This may open a promising new way for the treatment of the metabolic syndrome.

adiponectin and AMPK signaling; glucose tolerance; I<sub>1</sub> imidazoline receptors; insulin resistance; metabolic syndrome; sympathetic tone

METABOLIC SYNDROME (MetS) is defined as a cluster of interrelated risk factors that promotes the development of cardiovas-

cular and metabolic diseases. The most prominent risk factors, also used as diagnosis criteria, are abdominal obesity, elevated blood pressure, atherogenic dyslipidemia, and insulin resistance associated or not with elevated fasting plasma glucose (16, 17, 31).

Adiponectin, a major adipocyte-derived hormone, can assemble into several oligomeric isoforms, including low, middle, and the most physiologically active, high-molecular-weight isoforms, and acts via two receptors, AdipoR1 and AdipoR2 (23, 36). Adiponectin resistance, consecutive to decreases in both adiponectin level (hypoadiponectinemia) and adiponectin receptor expression, may account for the initial loss of insulin sensitivity of target cells, evolving into premetabolic, then MetS, and, finally, overt cardiovascular disease (40, 42). Based on these observations, promoting adiponectin pathway has emerged as a potential therapy for the treatment of MetS (18, 22, 45).

Several components of MetS, i.e., hypertension (8, 12), obesity (6, 14), insulin resistance (44), and diabetes (37), have been associated with increased sympathetic nerve activity. Hence, sympathetic hyperactivity has been proposed as another key factor in the pathogenesis of MetS (13, 27). Pharmacological inhibition of sympathetic activity could therefore also represent an interesting strategy for the treatment of the MetS.

We (2, 7) recently described an original compound (LNP599) selective for I<sub>1</sub> imidazoline receptors (I<sub>1</sub>R), with both sympathoinhibitory and adiponectin secretion-stimulating effects. I<sub>1</sub>R were first described in 1984 by Bousquet and coworkers (3) as part of the medullary receptors targeted by the centrally acting anti-hypertensive drug, clonidine, and its derivatives. LNP599 is a pyrrolidine analog of clonidine, with nanomolar affinity and high selectivity for I<sub>1</sub>R and no detectable affinity for the other pharmacological target of clonidine and related compounds, the  $\alpha_2$ -adrenergic receptors (2). Chronic treatment with LNP599 had favorable effects on all the symptoms of MetS, i.e., blood pressure, body weight, glucose tolerance, and lipid profile, and increased plasma adiponectin levels, in a rat model of MetS (spontaneously hypertensive, heart failure rats, SHHF). Additionally, the drug was shown to promote adiponectin synthesis and secretion

\* M. Weiss and S. Bouchoucha contributed equally to this work.

\*\* H. Greney and N. Niederhoffer contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: N. Niederhoffer, Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, EA 7296, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France (e-mail: nathalie.niederhoffer@unistra.fr).



from cultured 3T3-L1 adipocytes through an  $I_1$ R-dependent mechanism of action (7). These data demonstrated for the first time that imidazoline-like drugs may prove beneficial for the treatment of MetS.

The objective of the present study was to further explore the peripheral, direct (i.e., sympathoinhibitory independent) actions of  $I_1$ R ligands on insulin resistance and glucose homeostasis. To this end, experiments were carried out in aged rats, a model of spontaneously developing glucose intolerance and insulin resistance [(11) and present data]. In order to target only peripheral  $I_1$ R and to rule out centrally mediated changes in cardiovascular parameters and glucose regulation, animals were treated intraperitoneally with LNP509, an analog of LNP599 that has been previously shown not to cross the blood-brain barrier (33). Moreover, the LNP509 ligand displays a good affinity for  $I_1$ R and no detectable affinity for the  $\alpha_2$ -adrenergic sympathoinhibitory receptors (33). We established that 1) imidazoline-like drugs can reduce insulin resistance acting peripherally, independently of any sympathoinhibition, and 2) the drug-induced improvement of insulin sensitivity is associated with an increase in circulating adiponectin levels and a stimulation of AMPK signaling in hepatocytes.

## MATERIAL AND METHODS

**Animals and treatments.** Young (1–2 mo old, body weight  $360 \pm 6$  g) and aged (12–14 mo old, body weight  $633 \pm 6$  g) male Wistar rats (Elevage Janvier, St Berthevin, France) were housed in a temperature- and light-controlled room and allowed ad libitum access to standard diet and water. All procedures conformed to the French and European guidelines and were approved by the Animal Ethics Committee of the Strasbourg University.

The  $I_1$ R ligand LNP509 [*cis*-*trans*-dicyclopropylmethyl-(4,5-dimethyl-4,5-dihydro-3H-pyrrol-2-yl)-amine] (33) was administered daily by intraperitoneal (ip) injection for 7 days; control rats were injected in parallel with vehicle (NaCl 0.9%). At the end of the treatment period, cardiometabolic parameters were assessed in overnight-fasted, pentobarbital sodium-anesthetized animals. Rats were then administered an intravenous lethal dose of pentobarbital sodium. Tissues were removed and immediately fixed in 4% paraformaldehyde for histological examinations or flash-frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for quantitative RT-PCR, Western blot or binding analysis, or ELISA assay.

**Arterial blood pressure and heart rate recording.** The femoral artery was catheterized, and arterial pressure signal was monitored continuously for 15 min with a pressure transducer coupled to a computerized data acquisition and analysis system (EMKA Technologies, Paris, France). At the end of the measurements, plasma was sampled and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until biochemical assay.

**Biochemical measurements.** Concentrations of plasma catecholamines were measured by HPLC (Plateau technique de Biochimie, NHC Strasbourg, France). Glucose levels were evaluated in a blood drop using a glucometer (AccuCheck, Roche Diagnostics, Meylan, France). Plasma insulin and adiponectin were quantitated by ELISA kits (insulin: Mercodia, Uppsala, Sweden; adiponectin: B-Bridge, Paris, France) according to the manufacturers' instructions. The HOMA index of insulin resistance (IR) was calculated as: [fasting insulin (mU/l)  $\times$  fasting glucose (mmol/l)]/22.5.

**Glucose and insulin tolerance tests.** Glucose (0.5 g/kg iv) was administered at  $t = 0$  min. Plasma glucose and insulin concentrations were then determined at the indicated times; the area under the curve (AUC), peak glycemia, and rate of glucose clearance were calculated from these values. Insulin (1.5 U/kg ip) was administered at  $t = 0$

min; plasma glucose was then determined after 15, 30, 45, and 60 min. The AUC was calculated from these values.

**Pancreas histology and function.** Fixed pancreatic tissues were embedded in paraffin, and 5- $\mu\text{m}$  slices were cut and stained with hematoxylin-eosin. Microscopic images were captured using a video camera coupled to a computer (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) and analyzed with Image J software. Total RNA was extracted from pancreas samples using the MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) and then reverse-transcribed into cDNA using the LightCycler Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Insulin gene expression was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using a LightCycler amplifier and a fluorescent Sybr Green I dye for detection (Roche) and using specific primers for the rat insulin gene (forward 5'-CAGCTACAATCATAGACCAT-3'; reverse 5'-TAAGCCTTTGAATGAGCACCA AAA-3'). The cycling conditions were:  $95^\circ\text{C}$  for 10 min, then 40 cycles at  $94^\circ\text{C}$  for 15 s,  $63^\circ\text{C}$  for 15 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 20 s. Relative insulin gene expression in treated animals was standardized to the 18S housekeeping gene (26) and

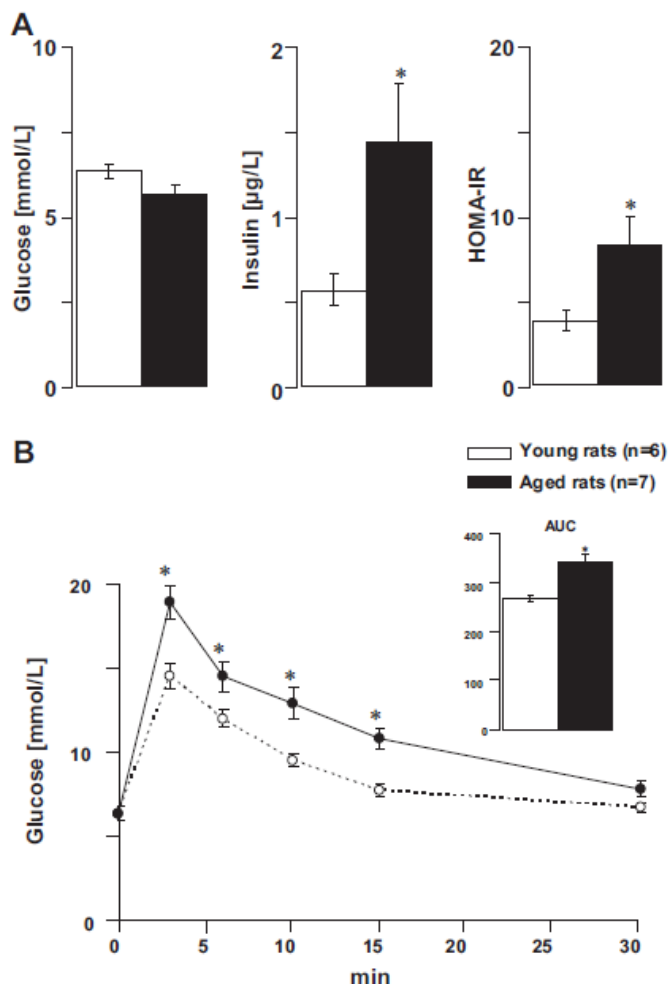


Fig. 1. Glucose intolerance and insulin resistance in aged rats. Blood samples were obtained from pentobarbital-anesthetized rats. A: Homeostasis model assessment (HOMA) index for insulin resistance (IR) was calculated from fasting glucose and insulin values as detailed in MATERIAL AND METHODS. B: For the glucose tolerance test, a glucose solution (0.5 g/kg) was administered iv; plasma glucose concentration was then determined after 3, 6, 10, 15, and 30 min, and the area under the curve (AUC) was calculated from these values. Data are means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  aged rats ( $n = 7$ ) vs. young rats ( $n = 6$ ).

Table 1. Effects of 1-wk treatment with LNP509 on body weight, food and water intake, cardiovascular parameters, and plasma catecholamines in aged rats

	Rats Receiving Vehicle (1 ml·kg <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> ip; n = 9)		Rats Receiving LNP509 (10 mg·kg <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup> ip; n = 8)	
	day 1	day 8	day 1	day 8
Body weight, g	642 ± 15	635 ± 15	651 ± 18	636 ± 18
Food intake, g·kg <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup>	38 ± 4	43 ± 2	40 ± 4	33 ± 3
Water intake, ml·kg <sup>-1</sup> ·day <sup>-1</sup>	55 ± 4	61 ± 5	59 ± 7	53 ± 4
Arterial blood pressure, mmHg				
Systolic	111 ± 5	104 ± 6	109 ± 7	115 ± 4
Diastolic	98 ± 5	91 ± 8	95 ± 7	102 ± 6
Mean	102 ± 5	95 ± 7	99 ± 7	107 ± 5
Heart rate, beats/min	334 ± 9	355 ± 17	299 ± 14	319 ± 18
Plasma catecholamines, pmol/l				
Norepinephrine	500 ± 49	750 ± 102	441 ± 97	415 ± 70
Epinephrine	134 ± 50	199 ± 26	76 ± 19	91 ± 15
Dopamine	187 ± 86	195 ± 93	134 ± 20	145 ± 26

Data are means ± SE. Parameters were assessed before (day 1) and at the end (day 8) of the treatment period. There was no statistically significant difference between day 1 and day 8 within control and LNP509-treated groups.

normalized by the expression obtained in the control group. Expression level of the membrane glucose transporter Glut2 was determined by Western blot analysis (see below).

**Immunoblotting.** Pancreatic and hepatic tissues were homogenized in HEPES buffer containing protease and phosphatase inhibitors, then centrifuged 10 min at 10,000 g at 4°C. The membrane glucose transporter Glut2 was detected using a rabbit polyclonal anti-Glut2

antibody (Millipore); total AMPK $\alpha$ , AMPK phosphorylated on Thr<sup>172</sup> (pAMPK $\alpha$ ), total Akt, and Akt phosphorylated on Ser<sup>473</sup> (pAkt) were probed using appropriate rabbit antibodies purchased from Cell Signaling. All antibodies were incubated overnight at 4°C with gentle shaking. Reactive proteins were detected and quantified using the Bio-Rad Chemidoc System. GAPDH expression level was used to normalize the Glut2 detection. AMPK and Akt activations were evaluated by the ratio pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  and pAkt/Akt, respectively.

**Insulin secretion by *rin m5F* pancreatic  $\beta$ -cells.** Rin m5F pancreatic  $\beta$ -cells obtained from A. Langlois (Centre Européen d'Etude du Diabète, Strasbourg, France) were cultured in 24-well plates at  $5 \times 10^5$  cells/well in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 2% penicillin-streptomycin. Insulin secretion was stimulated by 24-h exposure of the cells to high glucose (25 mM). The culture medium was then collected, and insulin levels were measured by ELISA. In some experiments, incubations were carried out in the presence of the calcium chelator EGTA-Na<sub>2</sub> (0.5 mM). LNP509 was added at increasing concentrations (from  $10^{-7}$  to  $10^{-3}$  M) during the 24-h exposure to glucose.

**Adiponectin secretion by isolated adipocytes.** Adipocytes were isolated from the epididymal white adipose tissue of aged male Wistar rats according to a modified version of Rodbell's adipocyte isolation method (32). Briefly, the adipose tissue was collected, minced, and incubated in collagenase solution (1 mg/ml collagenase type I-A in a Krebs-Ringer solution supplemented with 500 nM adenosine and 1% BSA) at 37°C for 45 min. The resulting suspension was filtered through a nylon mesh, centrifuged (500 g, 4 min), and washed three times to separate mature adipocytes from stromal cells. Adipocytes were plated in a 96-well plate (5,000 cells/well) in Krebs-Ringer buffer supplemented with 1% BSA and 1 U/ml adenosine desaminase in the absence or presence of LNP509 or insulin. After 3 h, the culture medium was collected and adiponectin content measured by ELISA (see above). In some experiments, efaroxan was added 30 min prior

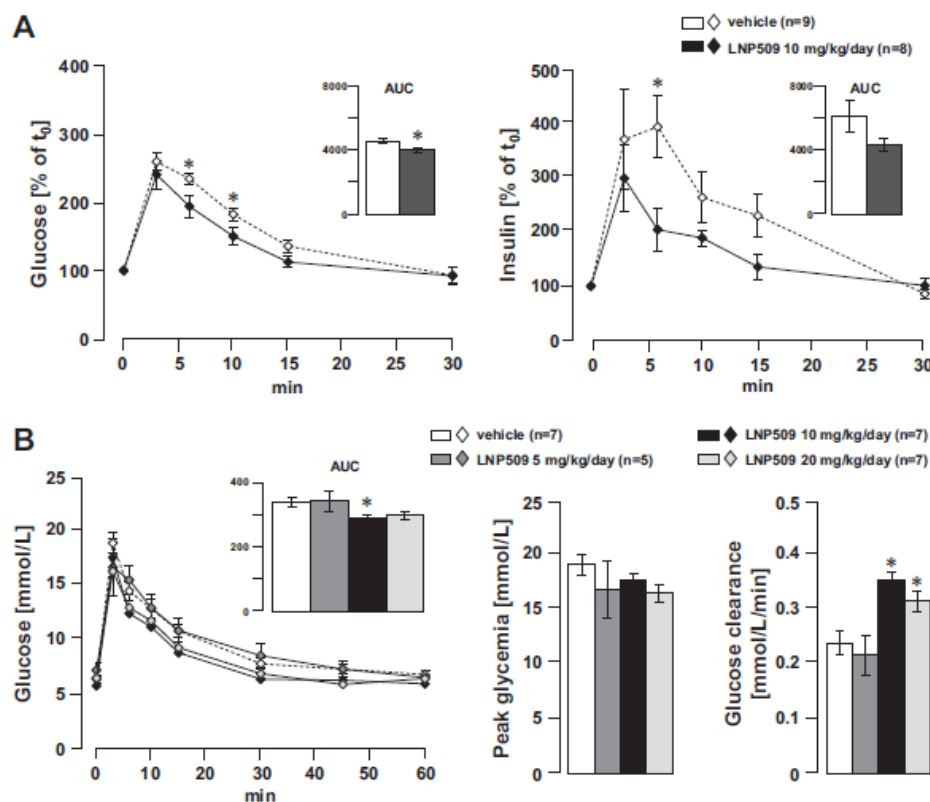
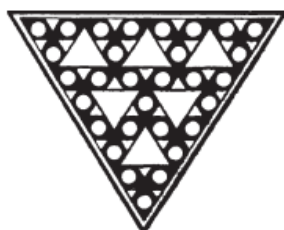


Fig. 2. I<sub>1</sub>-imidazoline receptor (I<sub>1</sub>R) ligand LNP509 improves glucose tolerance in aged rats. Aged rats were treated for 7 days with vehicle or LNP509 [A: 10 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> ip (n = 8 vs. 9 rats receiving vehicle); B: 5-10-20 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> ip (n = 5-7-7, respectively, vs. 7 rats receiving vehicle)]. Glucose tolerance was tested at the end of the treatment period. Glucose solution (0.5 g/kg) was administered iv at t<sub>0</sub>; plasma glucose and insulin concentrations were then determined after 3, 6, 10, 15, and 30 min (and after 45 and 60 min in some experiments); AUC, peak glycemia, and rate of glucose clearance were calculated from these values. Data are means ± SE. \*P < 0.05 vs. rats treated with vehicle.



- metabolic syndrome model mice by inhibiting Akt signaling and chronic inflammation. *J Endocrinol* 213: 67–76, 2012.
29. Phillips SA, Kung J, Ciaraldi TP, Choe C, Christiansen L, Mudaliar S, Henry RR. Selective regulation of cellular and secreted multimeric adiponectin by antidiabetic therapies in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E767–E773, 2009.
  30. Pita J, Panadero A, Soriano-Guillén L, Rodríguez E, Rovira A. The insulin sensitizing effects of PPAR- $\gamma$  agonist are associated to changes in adiponectin index and adiponectin receptors in Zucker fatty rats. *Regul Pept* 174: 18–25, 2012.
  31. Reaven Banting lecture 1988 GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595–1607, 1988.
  32. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells: I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375–380, 1964.
  33. Schann S, Bruban V, Pompermayer K, Feldman J, Pfeiffer B, Renard P, Scalbert E, Bousquet P, Ehrhardt JD. Synthesis and biological evaluation of pyrrolinic isosteres of rilmenidine. Discovery of cis-/trans-dicyclopropylmethyl-(4,5-dimethyl-4,5-dihydro-3H-pyrrol-2-yl)-amine (LNP 509), an II imidazoline receptor selective ligand with hypotensive activity. *J Med Chem* 44: 1588–1593, 2001.
  34. Schimack G, DeFronzo RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab* 8: 591–602, 2006.
  35. Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)* 11: 8–20, 2012.
  36. Simpson F, Whitehead JP. Adiponectin—it's all about the modifications. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 785–788, 2010.
  37. Straznicki NE, Grima MT, Sari CI, Eikelis N, Lambert EA, Nestel PJ, Esler MD, Dixon JB, Chopra R, Tilbrook AJ, Schlaich MP, Lambert GW. Neuroadrenergic dysfunction along the diabetes continuum: a comparative study in obese metabolic syndrome subjects. *Diabetes* 61: 2506–2516, 2012.
  38. Su CH, Liu IM, Chung HH, Cheng JT. Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neurosci Lett* 457: 125–128, 2009.
  39. Sun Z, Ernsberger P. Marked insulin resistance in obese spontaneously hypertensive rat adipocytes is ameliorated by in vivo but not in vitro treatment with moxonidine. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 845–852, 2007.
  40. Tarquini R, Lazzeri C, Laffi G, Gensini GF. Adiponectin and the cardiovascular system: from risk to disease. *Intern Emerg Med* 2: 165–176, 2007.
  41. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 30817–30822, 2004.
  42. Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T. Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. *J Pharmacol Sci* 97: 164–170, 2005.
  43. Velliquette RA, Ernsberger P. Contrasting metabolic effects of antihypertensive agents. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 1104–1111, 2003.
  44. Vollenweider P, Tappy L, Randin D, Schneiter P, Jéquier E, Nicod P, Scherrer U. Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J Clin Invest* 92: 147–154, 1993.
  45. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 8: 264–280, 2006.





## RESULTS

**Validation of aged rats as an experimental model of insulin resistance.** Compared with young animals, aged rats displayed mild but significant hyperinsulinemia ( $1.44 \pm 0.35$  vs.  $0.56 \pm 0.09$   $\mu\text{g/l}$  in young animals) and doubled HOMA-IR (Fig. 1A). Fasting glucose remained unchanged; however, the peak glycemia following iv glucose ( $0.5$  g/kg) was significantly increased ( $14.5 \pm 0.7$  and  $18.9 \pm 1.0$  mmol/l in young and aged rats, respectively), and the glucose clearance was slower, so that the AUC iv glucose tolerance test (IVGTT) was 28% greater (Fig. 1B). These disorders in glucose regulation were not associated with hypertension (Table 1) or dyslipidemia (plasma total cholesterol =  $1.76 \pm 0.11$  mmol/l and triglycerides =  $0.67 \pm 0.18$  mmol/l).

**Effects of LNP509 on cardiovascular parameters and plasma catecholamines.** Aged rats were treated daily with LNP509 10 mg/kg ip. One week's treatment did not significantly influence body weight and food and water consumption (Table 1). Cardiovascular parameters and catecholamine concentrations in plasma were also unchanged (Table 1), confirming the lack of sympathoinhibitory action of the drug under these conditions of administration.

**Effects of LNP509 on glucose regulation and insulin resistance.** Values for fasting glucose ( $7.0 \pm 0.2$  mmol/l), fasting insulin ( $3.1 \pm 0.5$   $\mu\text{g/l}$ ), and HOMA-IR ( $22.9 \pm 3.7$ ) were not significantly different in rats treated with LNP509 compared with rats receiving the vehicle. Glucose tolerance was improved by LNP509, as shown by the 15% decrease in the AUC IVGTT after 10 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> LNP509 (Fig. 2A, left). Glucose-induced insulin secretion was similar in peak amplitude in both groups, but the secretory response was maintained for a significantly longer time in untreated animals

than in LNP509-treated rats (Fig. 2A, right). Thus, in the treated animals, lower levels of plasma insulin were associated with more rapid decreases in glycemia, suggesting a more efficient action of the hormone after LNP509 treatment.

In a series of experiments, we confirmed the beneficial effect of the drug on glucose tolerance. The AUC IVGTT was reduced by 15 and 12% after 10 and 20 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> LNP509, respectively, compared with control (Fig. 2B). This beneficial action was related to an accelerated glucose clearance ( $0.238 \pm 0.021$  mmol·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> in control rats compared with  $0.352 \pm 0.015$  and  $0.314 \pm 0.020$  mmol·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> in rats treated with LNP 10 and 20 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, respectively), rather than changes in the peak glycemia. A lower dose of LNP509 (5 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) was devoid of effect on glucose tolerance (Fig. 2B).

Improvement of glucose tolerance could result from enhanced insulin secretion, better insulin action on target cells (i.e., higher sensitivity of insulin target cells to the hormone), or both. We observed no increase in baseline (fasting) insulin and glucose-induced peak insulin secretion in treated rats compared with control animals (see above). In agreement with these data, insulin mRNA expression was unchanged by LNP509 treatment (Fig. 3B). There was also no difference in the morphology and function of pancreas: the number and size of Langerhans islets, as well as expression levels of the membrane glucose transporter Glut2, were similar in the two groups (Fig. 3, A and C). Finally, the effect of LNP509 on secretory responses of RIN m5F pancreatic  $\beta$ -cells was explored (Fig. 3D). Insulin secretion was induced by exposure of the cells to high glucose; insulin release was reduced by the calcium chelator EGTA, indicating an exocytotic process. In agreement with the results obtained in vivo, there was no effect

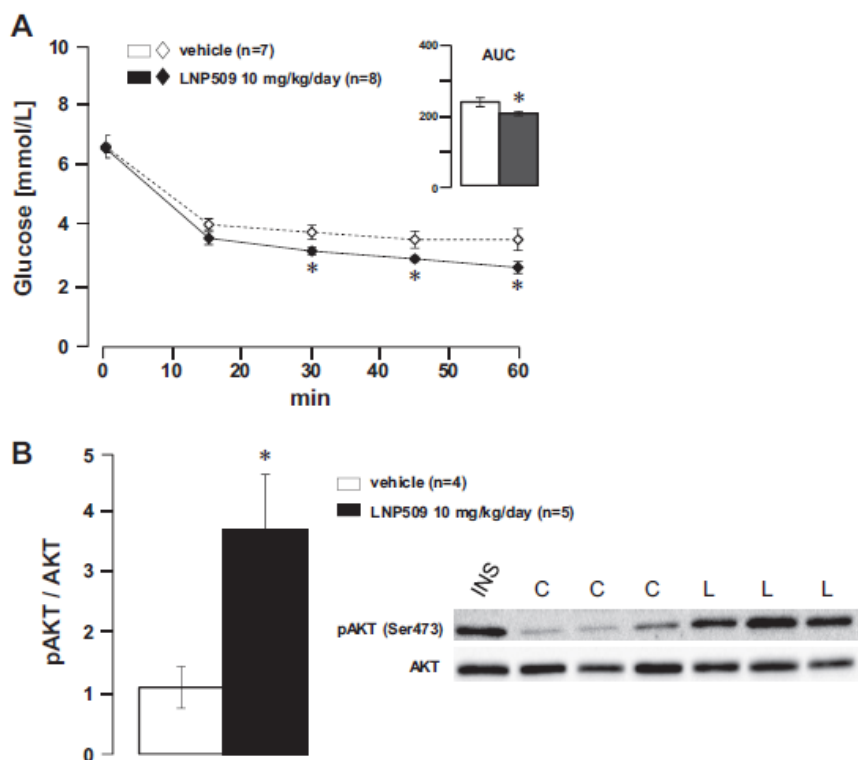
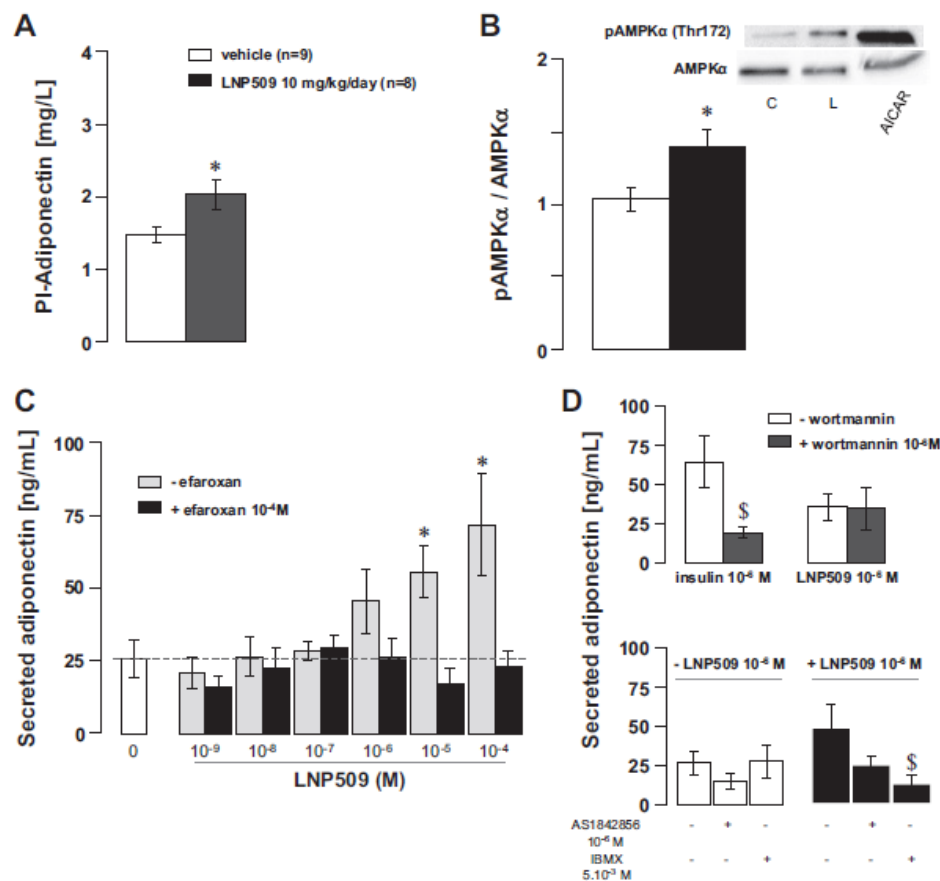


Fig. 4. LNP509 enhances insulin action in aged rats. Aged rats were treated for 7 days with vehicle or LNP509 (10 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> ip). A: insulin (1.5 U/kg) was administered ip at  $t_0$ ; plasma glucose concentration was then determined after 15, 30, 45, and 60 min, and AUC was calculated from these values. Data are means  $\pm$  SE. \* $P$  < 0.05 vehicle ( $n$  = 7) vs. LNP-treated rats ( $n$  = 8). B: Akt activation was evaluated by the ratio Akt phosphorylated on Ser<sup>473</sup> (pAkt)/total Akt determined by Western blot analysis in hepatic tissues from rats after glucose challenge (C, vehicle-treated; L, LNP509-treated; INS, positive control with cultured PC12 cells stimulated with 100 nM insulin for 30 min). Data are means  $\pm$  SE. \* $P$  < 0.05 vehicle ( $n$  = 4) vs. LNP-treated rats ( $n$  = 5).

Fig. 5. LNP509 increases adiponectin secretion and AMPK activation in aged rats and primary cultured adipocytes. **A** and **B**: aged rats were treated for 7 days with vehicle ( $n = 9$ ) or LNP509 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  ip,  $n = 8$ ). **A**: at the end of the treatment period, plasma (PI) adiponectin levels were assessed by ELISA. Hepatic tissue was removed and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis. **B**: AMPK activation in hepatic tissue was evaluated by the ratio AMPK phosphorylated on Thr<sup>172</sup> (pAMPK $\alpha$ )/total AMPK $\alpha$  determined by Western blot (C, vehicle-treated rat; L, LNP509-treated rat; AICAR, positive control with cultured HepG2 cells stimulated with  $1 \text{ mM}$  AICAR for 60 min). Data are means  $\pm$  SE.  $*P < 0.05$  vs. rats treated with vehicle. **C** and **D**: primary cultured adipocytes isolated from aged rats were stimulated for 3 h with increasing concentrations of LNP509 or with insulin in the absence or presence of I<sub>1</sub>R antagonist efaroxan, PI3K inhibitor wortmannin, phosphodiesterase inhibitor IBMX, and FOXO1 inhibitor AS1842856 at indicated concentrations. Secreted adiponectin was measured in culture medium using ELISA. Data are means  $\pm$  SE of 4–7 independent experiments.  $*P < 0.05$  vs. nonstimulated cells.  $\$P < 0.05$  vs. nonpretreated cells.



of the ligand on glucose-induced insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells [ $82.2 \pm 21.9$  and  $81.2 \pm 11.2 \mu\text{g}$  insulin/l of the culture medium, in the absence and in the presence of LNP509 at the highest concentration tested ( $10^{-3}$  M), respectively]. All together, the collected data argued against the hypothesis of an LNP509-mediated augmentation of insulin secretion in aged rats.

To explore the hypothesis of an improvement of insulin action at target cells following LNP509 administration, an insulin tolerance test was carried out in another group of animals. Insulin injection produced marked and long-lasting hypoglycemia in all animals, but the effect was more pronounced in LNP509-treated rats (Fig. 4A). Thus, plasma glucose was reduced by 40–45% after 30 min and remained stable thereafter in vehicle-treated rats. In contrast, glycemia continued to decrease in rats receiving LNP509, to reach a 60% reduction after 60 min; consequently, the AUC was significantly decreased by LNP509 treatment ( $214 \pm 7$  vs.  $247 \pm 14$ ; Fig. 4A). Activation of Akt, a key factor of the intracellular signaling pathways of insulin, was also significantly enhanced in hepatic lysates from treated animals after glucose challenge compared with control animals (Fig. 4B).

**Effects of LNP509 on adiponectin secretion and AMPK signaling pathway.** Since adiponectin acts as a major insulin-sensitizing hormone, increased adiponectin plasma levels promote insulin action and AMPK is a major target of adiponectin intracellular signaling pathways, adiponectin and AMPK signaling were assessed in rats receiving LNP509 and in cultured

cells, i.e., adipocytes and hepatocytes. Animals treated with LNP509  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  for 1 wk displayed significantly enhanced plasma adiponectin levels ( $2.04 \pm 0.21$  vs.  $1.48 \pm 0.11 \text{ mg/l}$ ; Fig. 5A); AMPK activation was also enhanced in hepatic tissues of animals receiving LNP509 (+35% for the

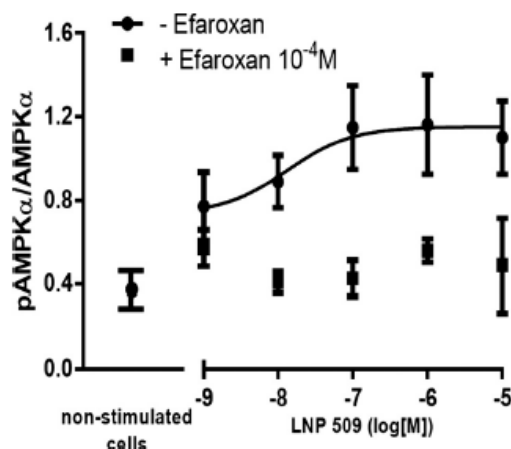


Fig. 6. LNP509 increases AMPK $\alpha$  phosphorylation in cultured human HepG2 hepatocytes. HepG2 cells were stimulated with increasing concentrations of LNP509 in the presence or absence of efaroxan; AMPK activation was evaluated by the ratio AMPK phosphorylated on Thr<sup>172</sup> (pAMPK $\alpha$ )/total AMPK $\alpha$  determined by Western blot. Data are means  $\pm$  SE of 3–7 independent experiments.  $*P < 0.05$  vs. nonstimulated cells.



ratio pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$ ; Fig. 5B). In mature adipocytes isolated from aged rats, application of LNP509 elicited a concentration-dependent adiponectin secretion that was totally prevented by pretreatment of the cells with the I<sub>1</sub>R antagonist efaroxan (Fig. 5C). The LNP509-induced adipokine secretion was not altered by inhibition of PI3K by wortmannin but was reduced after phosphodiesterase and FOXO1 blockade (−74% and −49%, respectively; Fig. 5D). Of note, the phosphodiesterase and FOXO1 inhibitors did not significantly influence basal (i.e., LNP509-independent) adiponectin secretion (Fig. 5D). Finally, the possibility of additional direct effects of LNP509 on AMPK was investigated in the human hepatocarcinoma cell line (HepG2 cells). Addition of LNP509 induced a concentration-dependent increase of the ratio pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$ , which was totally abolished by efaroxan (Fig. 6).

**Membrane expression of I<sub>1</sub>R on tissues and cells targeted by LNP509.** Competition binding assays were carried out on membrane preparations from adipose and hepatic tissue and on cell suspensions of HepG2 cells (Fig. 7). In control experiments (Fig. 7, left), the reference competitors clonidine and

*p*-iodoclonidine (PIC) displayed typical I<sub>1</sub>R binding properties, displacing the I<sub>1</sub>R specific binding of [<sup>125</sup>I]PIC with two affinity (high- and low-affinity) sites. Depending on the tissue or cell extract, LNP509 exhibited one or two affinity sites for displacement of the [<sup>125</sup>I]PIC-specific binding.

## DISCUSSION

The present study was designed to explore the peripheral mechanisms involved in the beneficial actions of I<sub>1</sub>R ligands on glucose regulation and insulin resistance. Experiments were carried out in aged rats that displayed impaired glucose regulation and mild insulin resistance but no other cardiometabolic disorders. Thus, blood pressure and fasting glucose and lipid levels measured in aged animals were similar to those reported in young or healthy animals (7, 11, 19) and were much lower than those reported in rat models of diabetes or MetS (7, 19, 43). In order to target only peripheral I<sub>1</sub>R, the LNP509 ligand was administered intraperitoneally. LNP509 lowers blood pressure only after central administration,

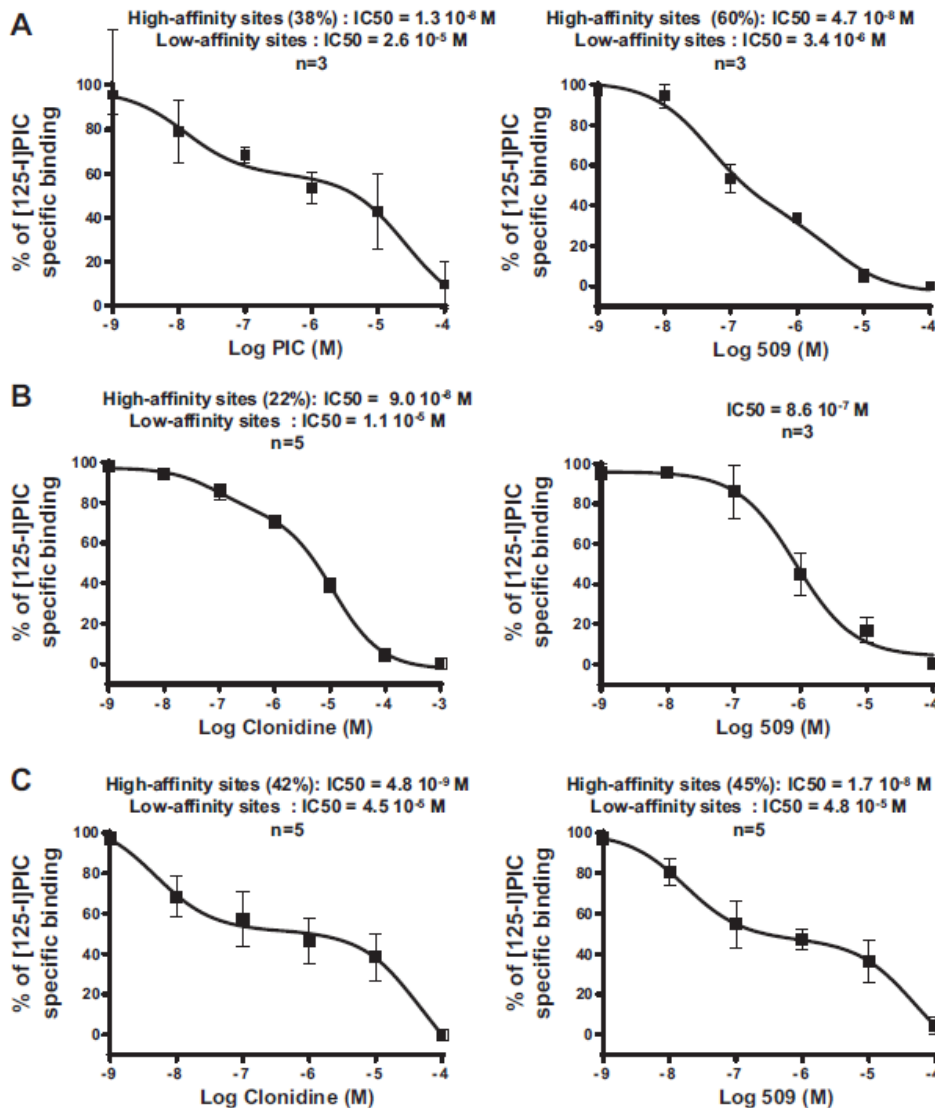


Fig. 7. Competition curves of LNP509 in adipose and hepatic tissues and in HepG2 cell suspension. Competition curves of LNP509 on I<sub>1</sub>R were performed on membrane preparations from adipose (A) and hepatic tissue (B) and cell suspension of human hepatocarcinoma HepG2 cells (C). Mean total specific binding (100%) was 2,380 cpm in adipose tissue, 16,103 cpm in hepatic tissue, and 7,865 cpm in HepG2 cells. Nonspecific binding (as defined by 10  $\mu$ M BDF6143) represented 45, 49, and 71% of total binding in adipose tissue, hepatic tissue, and HepG2 cells, respectively.

indicating that it does not cross the blood-brain barrier, at least in its active form (33).

One-week treatment of aged rats with LNP509 improved glucose tolerance. This beneficial effect can result from increased glucose-induced insulin secretion and/or increased peripheral glucose utilization and clearance following an improvement of insulin action. In the present study, several observations argue for an LNP509-evoked enhancement of insulin sensitivity of target cells, at least hepatocytes, and rule out any enhancement in insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. First, there was no change in pancreas histology, insulin mRNA expression, and the Glut2 membrane expression, excluding a trophic or stimulatory action of the ligand on insulin-secretory cells; second, basal insulin release assessed both in vivo and in vitro was not modified by LNP509. Last, we found no detectable  $I_1R$ -specific binding of LNP509 on RIN m5F membranes (data not shown). Inversely, lower levels in glucose-evoked insulin release provoked more rapid glucose clearance in the treated animals. Finally, direct measurements of 1) the hypoglycemic action of insulin administration and 2) the glucose-evoked activation of hepatic intracellular insulin signaling (pAkt/Akt ratio) confirmed the improved insulin sensitivity. Based on binding and/or functional experiments, three different subtypes of IR have been described to date (5). However, the metabolic effects of LNP509 were most likely mediated by  $I_1R$  only. Thus, although  $I_2R$  have been reported to increase insulin sensitivity (38), LNP509 displayed no detectable affinity for  $I_2R$  in binding experiments (33). Similarly, the  $I_3R$  has long been recognized as one of the targets regulating insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells (5), but LNP509 was ineffective on insulin release.

On the basis of our previous data (7) and the present results, we propose an adiponectin-mediated improvement of insulin sensitivity as a possible mechanism involved in the peripheral favorable metabolic effects of  $I_1R$  ligands (Fig. 8). In adipose tissue, binding of these ligands to membrane  $I_1R$  increases adiponectin secretion and, consequently, adiponectin plasma levels; this could contribute to the stimulation of AMPK phosphorylation in insulin target tissues (at least in hepatic tissue). Additionally,  $I_1R$  ligands also exert direct activating effects on AMPK-dependent transduction in target cells. Stimulation of adiponectin and AMPK pathways, in turn, would improve insulin signaling in hepatocytes, leading to higher insulin sensitivity and better glucose tolerance. In agreement with this hypothesis, HOMA-IR values significantly correlated with adiponectin plasma levels in LNP-treated animals (Fig. 8). Our observations are in good agreement with those of Pita et al. (30) and Phillips et al. (29), showing that the same ranges of adiponectin pathway stimulation (i.e., 35–50% stimulation) lead to significantly improved insulin sensibility in Zucker rats and in humans. Of note also, LNP509, at the concentrations used, was at least as potent as insulin and AICAR in stimulating adiponectin secretion and AMPK phosphorylation, respectively.

How can  $I_1R$  ligands modulate adiponectin levels acting peripherally? Our present data show that  $I_1R$  ligands can stimulate adiponectin secretion by adipocytes independently of any sympathoinhibition, since LNP509 given intraperitoneally had no impact on cardiovascular parameters and circulating catecholamines. This direct stimulatory action at adipose tissue in vivo was confirmed in primary cultured adipocytes isolated

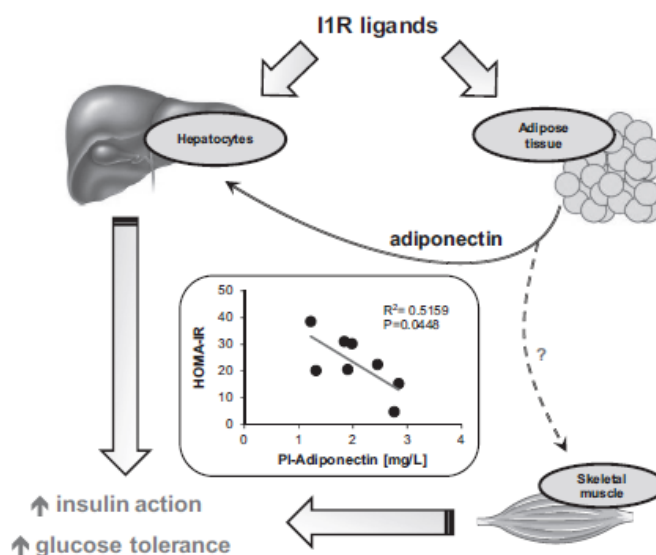


Fig. 8. Proposed peripheral mechanism of action of  $I_1R$  ligands to improve insulin sensitivity. Activation of  $I_1R$  on adipocytes increases adiponectin secretion, and consequently adiponectin plasma levels, independently of any sympathoinhibition. Stimulation of adiponectin pathways improves insulin signaling in hepatocytes, leading to higher insulin sensitivity and better glucose tolerance [significant correlation between HOMA-IR values and adiponectin plasma levels in LNP-treated animals ( $n = 8$ , same animals as in Fig. 2A)].  $I_1R$  ligands also stimulate adiponectin pathways (AMPK) acting directly at  $I_1R$  on hepatocytes membrane. Additional effects of such compounds at other insulin target tissues (e.g., skeletal muscle) remain to be established.

from aged rats and is in agreement with our previous report on cultured 3T3-L1 differentiated adipocytes (7). Transcription of adiponectin is regulated by numerous and complex transduction pathways (35, 41, 42). For instance, a reduction in intracellular cAMP can oppose the endogenous SIRT1-FOXO1-dependent downregulation of adiponectin synthesis, resulting in increased adiponectin synthesis and secretion (10, 35). The LNP509-induced adiponectin secretion by adipocytes was almost abolished by enhancing cAMP levels and was largely reduced after FOXO1 inhibition. The following transduction cascade can therefore be proposed:  $I_1R \rightarrow$  inactivation of adenylate cyclase  $\rightarrow$   $\downarrow$  cAMP  $\rightarrow$  inactivation of SIRT1/FOXO1  $\rightarrow$  activation of PPAR $\gamma$   $\rightarrow$   $\uparrow$  adiponectin synthesis. The direct peripheral modulation of adiponectin and AMPK signaling highlighted in the present study probably contributes to the overall beneficial effect on insulin resistance of sympathoinhibitory antihypertensive agents (39, 43) and  $I_1R$  ligands (7). Nevertheless, additional non-adiponectin mechanisms of action cannot be ruled out.

Adiponectin, through AMPK-dependent transduction pathways, is a well-established insulin sensitizer (20, 21, 45). In hepatocytes, AMPK phosphorylation could attenuate insulin resistance acting at lipid and/or glucose homeostasis by 1) decreasing triglycerides synthesis, 2) inhibiting hepatic gluconeogenesis following modifications of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase, and 3) increasing fatty acid oxidation, mitochondrial biogenesis, and glucose transport (4, 25, 34). A recent study also unraveled a new adiponectin-independent but AMPK-dependent hepatic insulin-sensitizing action of adiponectin related to upregulation of hepatic IRS-2 through an IL-6-dependent pathway (1). Future





**3<sup>ème</sup> étude :**

**Un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipidique en stimulant l'AMPK.**

\*\*\*\*\*

Article à soumettre

Maud Weiss, Djamil Benameur, Laurent Monassier, Hugues Greney, Pascal Bousquet, Nathalie Niederhoffer

**I<sub>1</sub> IMIDAZOLINE RECEPTOR LIGAND IMPROVES INSULIN SENSITIVITY  
AND LIPID METABOLISM IN HEPG2 CELLS THROUGH AMPK  
ACTIVATION.**

\*\*\*\*\*

## I. Contexte et objectifs

Des études réalisées dans notre laboratoire ont permis de confirmer la capacité de ligands sélectifs des récepteurs des imidazolines de type 1 (RI<sub>1</sub>), les LNPs, à améliorer l'intégralité des troubles associés au syndrome métabolique (SMet). En effet, dans un modèle murin de SMet le LNP599 diminue la pression artérielle et présente en parallèle des effets bénéfiques sur plusieurs paramètres métaboliques [249], dont une sensibilisation des tissus à l'action de l'insuline. Des effets périphériques additionnels ont également été remarqués et semblent faire intervenir l'AMPK par le biais d'une augmentation de la sécrétion d'adiponectine.

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques observés, nous nous sommes intéressés à la capacité des ligands RI<sub>1</sub> à moduler directement les cascades de signalisation dans un des tissus cibles de l'insuline et de l'adiponectine : le foie. De plus, les données recueillies à partir des études réalisées chez le rat âgé (chapitre 2) nous ont permis d'observer au niveau hépatique une augmentation de l'activation de l'AMPK, un acteur majeur de la régulation de la balance énergétique [289].

Nous avons donc décidé de nous focaliser sur les métabolismes glucidique et lipidique au niveau hépatique. Les études ont été réalisées dans un modèle cellulaire dérivant d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2, à l'aide d'un autre ligand sélectif des RI<sub>1</sub>, le LNP509. En effet, ce dernier n'ayant pas la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, nous a permis de discriminer les effets centraux des effets périphériques.



Nous avons tout d'abord étudié la capacité du LNP509 à agir directement sur l'activation de l'AMPK. Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée in vivo, nous avons également étudié la capacité du LNP509 à moduler de manière directe l'état d'activation d'un acteur clé de la cascade de signalisation de cette hormone, l'AKT.

Concernant le métabolisme lipidique, nous avons analysé la capacité du LNP509 à induire la phosphorylation inhibitrice de l'acétyl-coA carboxylase (ACC), à l'origine d'une diminution de la synthèse des acides gras et de la stéatose hépatique.

## II. Méthodologie

L'intégralité des expériences a été menée sur une lignée cellulaire dérivant d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2. L'expression membranaire des  $R_{11}$  sur ces cellules a été vérifiée par des études de liaisons spécifiques (cf chapitre 2).

### II.1. AMPK

La capacité du LNP509 à moduler directement l'activation d'un acteur majeur de l'homéostasie glucidique et lipidique, l'AMPK, a été analysée. Les cellules ont été traitées par du LNP509 à des concentrations croissantes ( $10^{-9}$ M à  $10^{-5}$ M, 30 min). Le niveau d'activation (phosphorylation) de l'AMPK a été analysé par Western Blot en calculant le ratio pAMPK/AMPK.

### II.2. AKT

La capacité du LNP509 à moduler directement l'activation d'un acteur clé de la cascade de signalisation de l'insuline, AKT, a été mesurée. Les cellules ont été traitées par du LNP509 ( $10^{-6}$ M, 60 min) suivi ou non d'un traitement à l'insuline (10 nM, 10 min). Dans certaines expériences, un antagoniste des  $RI_1$ , l'efaroxan a été ajouté en prétraitement du LNP509 à une concentration de 100  $\mu$ M pendant 30 minutes. Le niveau d'activation (phosphorylation) d'AKT a été analysé par Western Blot en calculant le ratio pAKT/AKT.

### **II.3. Association entre AMPK et AKT**

Afin d'établir une association entre l'activation de l'AMPK et la potentialisation des effets de l'insuline observée, des études utilisant un inhibiteur de l'AMPK, le composant C, ont été réalisées. Les cellules ont été traitées par du LNP509 ( $10^{-6}$ M, 60 min) suivi ou non d'un traitement par l'insuline (10 nM, 10 min). Le composant C est ajouté avant le LNP509 à une concentration de 20  $\mu$ M pendant 90 minutes. Les niveaux d'activation simultanée d'AKT et d'AMPK ont été analysés comme précédemment.

### **II.4. ACC**

Afin de vérifier la capacité du LNP509 à réduire la production d'acide gras, nous avons étudié le niveau d'activation d'un facteur situé en amont de l'AMPK et régulé par cette enzyme : l'acétyl-coA carboxylase (ACC). En effet, l'AMPK phosphoryle l'ACC et inhibe son activité, réduisant la production d'acide gras. Les cellules ont été traitées par du LNP509 ( $10^{-6}$ M, 30 min) précédé ou non d'un traitement à l'efaroxan (100  $\mu$ M, 30 min). Le niveau d'activation (phosphorylation inhibitrice) de l'ACC a été analysé par Western Blot en calculant le ratio pACC/ACC.

### **II.5. Stéatose hépatique**

Pour vérifier l'action du LNP509 sur la stéatose hépatique, nous avons induit une accumulation intracellulaire de lipides en incubant les cellules HepG2 dans une concentration élevée d'acide oléique (2 mM, 24h). Un traitement par le LNP509 a été réalisé de manière simultanée ( $10^{-6}$ M, 24h). L'incorporation lipidique dans les cellules HepG2 a pu être observée grâce à un marquage à

l'Oil Red O induisant une coloration rouge vif des lipides intracellulaires. Les modifications morphologiques ont été observées par microscopie et quantifiées par dosage spectrophotométrique (492 nm) de la densité du colorant extrait des cellules grâce à de l'isopropanol à 60 %.

## **II.6. Statistiques**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques consistent en une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Bonferonni. Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative.

### III. Principaux résultats

Cette étude a permis de montrer que :

Le LNP509 potentialise la phosphorylation activatrice de l'AMPK de manière dépendante de la dose et des  $RI_1$  puisque la réaction est inhibée par l'ajout de l'antagoniste de référence de ces récepteurs, l'efaroxan.

- Le LNP509 multiplie par 2 la phosphorylation d'AKT induite par l'insuline alors que le LNP509 seul ne modifie pas son activation. Cette potentialisation se fait de manière dépendante des  $RI_1$  (réaction antagonisée par l'ajout d'efaroxan).
- La potentialisation de la phosphorylation insuline-dépendante d'AKT par le LNP509 n'est pas modifiée lorsque la phosphorylation simultanée d'AMPK est inhibée par le composant C, traduisant un mécanisme indépendant de l'activation de l'AMPK en réponse au LNP509.
- Le LNP509 induit la phosphorylation inhibitrice de l'acétyl-coA carboxylase (ACC), à l'origine d'une diminution de la synthèse des acides gras et de la stéatose hépatique. De plus, un marquage à l'Oil red O a confirmé la capacité du LNP509 à induire la diminution de la stéatose hépatique provoquée par un traitement à l'acide oléique dans les cellules HepG2.

**Le LNP509 module l'état d'activation hépatique d'un acteur clé du métabolisme énergétique, l'AMPK. Il en résulte une amélioration du profil lipidique liée à l'inhibition de**

**l'activité de l'ACC au niveau hépatique. De plus, une augmentation de la sensibilité à l'insuline, se traduisant par l'activation d'AKT, est observée de manière indépendante de l'AMPK. Ces données suggèrent que le LNP509 aurait la capacité d'activer de manière directe un ou plusieurs des constituants de la cascade de signalisation d'AKT.**

**I<sub>1</sub> IMIDAZOLINE RECEPTOR LIGAND IMPROVES INSULIN SENSITIVITY  
AND LIPID METABOLISM IN HEPG2 CELLS THROUGH AMPK  
ACTIVATION.**

Maud Weiss<sup>1</sup>, Djamil Benameur, Laurent Monassier<sup>1</sup>, Hugues Greney<sup>1</sup>, Pascal Bousquet<sup>1</sup>,  
Nathalie Niederhoffer<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, Fédération de Médecine  
Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France

Corresponding author:

Dr. N. Niederhoffer (nathalie.niederhoffer@unistra.fr)

Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, EA 7296, Faculté de  
Médecine, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France

Tel.: + 33 3 68 85 33 85 - Fax: + 33 3 68 85 33 88

## ABSTRACT

Prevalence of metabolic syndrome (MetS) has reached epidemic proportions worldwide. MetS is characterized as a cluster of interrelated cardiovascular and metabolic risk factors which promote the risk for cardio-metabolic diseases and an approximately 1.6-fold increase in mortality. We recently described original compounds (LNP599 and LNP509) selective for I<sub>1</sub> imidazoline receptors (I<sub>1</sub>R). Studies in our laboratory have confirmed the ability of LNPs to improve all the disorders associated with MetS. Indeed, in a rat model of the MetS, LNP599 lowers blood pressure and has parallel beneficial effects on several metabolic parameters, including improved tissues insulin sensitivity. Moreover, additional peripheral effects were also noted and seem to implicate AMPK through an increase in adiponectin secretion. In addition, in the liver of aged rats treated with LNP509, we observed an increased activation of AMPK, a major player in the regulation of energy balance.

To identify the mechanisms involved in the observed beneficial effects, particularly on carbohydrate and lipid metabolism, we studied the ability of LNP509 to directly modulate signaling pathways in a target tissue of insulin and adiponectin: the liver. The studies were performed in a cellular model derived from human hepatocarcinoma, the HepG2 cells. We first studied the ability of LNP509 to act directly on the activation of AMPK. In order to understand the mechanisms involved in improving insulin sensitivity observed *in vivo*, we also studied the ability of LNP509 to directly modulate the activation of a key player of the insulin signalling pathway: AKT. Regarding lipid metabolism, we analyzed the ability of LNP509 to induce the inhibitory phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC), causing a decrease in fatty acid synthesis and steatosis.

LNP509 activates AMPK and improves lipid profile by inhibiting of the activity of ACC in the liver. In addition, LNP509 potentiates insulin action on AKT activation, independently of AMPK phosphorylation. These data suggest that the LNP509 have the ability to improve lipid metabolism and to directly activate one or more of the components of the AKT signaling cascade.

**Keywords:** metabolic syndrome, imidazoline type 1 receptor ligand, insulin-resistance, dyslipidemia, AMPK.



## INTRODUCTION

Prevalence of metabolic syndrome (MetS) has reached epidemic proportions worldwide with recent figures estimated at 1.4 billion and rising year-on-year [11,290]. MetS is characterized as a cluster of interrelated risk factors such as abdominal obesity, elevated blood pressure, dyslipidemia, and insulin resistance associated or not with elevated fasting plasma glucose. When occurring together, these symptoms promote the risk for cardio-metabolic diseases (cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus (T2DM...)) and an approximately 1.6-fold increase in mortality [291].

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a phylogenetically conserved intracellular enzyme and energy sensor that has been implicated in the regulation of glucose and lipid homeostasis. It consists of a heterotrimeric complex which is composed of one catalytic subunit ( $\alpha$ ) and two regulatory subunits ( $\beta$  and  $\gamma$ ) that together make a functional enzyme [292]. AMPK is activated by any signal that increases ATP consumption or inhibits ATP production, such as glucose deprivation, hypoxia, oxidative stress, osmotic shock [293], and interestingly by exercise and hormones including adiponectin and leptin [294]. These adipocytokines are involved in control of appetite, body weight and insulin sensitivity. Once activated, AMPK phosphorylates and modulates the activity of some substrates. One of the enzymes under AMPK control is acetyl-CoA carboxylase (ACC). AMPK induces ACC inhibition by phosphorylating it to inhibit anabolic pathways such as lipids synthesis, and to activate catabolic pathways, including fatty acid oxidation and lipolysis [289]. Moreover, AMPK is also involved in the amelioration of insulin resistance. For example, in the Zucker diabetic fatty rats, various therapies that activate AMPK including AICAR, exercise, metformin, thiazolidinediones, and calorie restriction, have been shown to improve insulin sensitivity and to prevent the development of diabetes and pancreatic  $\beta$ -

cell damage [295,296]. In human, some compounds already in use or in therapeutic trial for improving glycemic control and insulin resistance, such as GLP-1 receptor activators, DPP IV inhibitors [297] and salicylates [298], have been shown to increase AMPK activity in a number of tissues in addition to their other actions .

Several observations suggest that promoting AMPK activation could be relevant to treat MetS. When the AMPK activator 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside (AICAR) is administered to insulin-resistant Zucker rats, it improves glucose tolerance and dyslipidemia, [299]. Moreover, the biguanide derivate metformin (1,1-dimethylbiguanide), the current reference treatment for T2D, exerts pleiotropic actions through the activation of AMPK [182,300].

We recently described original compounds (LNP599 and LNP509) selective for I<sub>1</sub> imidazoline receptors (I<sub>1</sub>R) [264]. I<sub>1</sub>R were first described by Bousquet and coworkers in 1984 as receptors targeted by centrally anti-hypertensive drugs such as clonidine [232]. Chronic treatment with LNP599 improves all the symptoms of MetS in spontaneously hypertensive SHHF (spontaneously hypertensive, heart failure) rats. Studies suggested that beneficial actions might be due to central (i.e. sypatho-inhibition) and peripheral effects of LNP599 [249]. To elucidate peripheral components of LNPs actions, we used another RI<sub>1</sub> ligand, LNP509, which does not cross the blood brain barrier (BBB) and thus, allows us to study only peripheral effects [266]. In this study, in a rat model of insulin-resistance, we demonstrated that imidazoline-like drugs can reduce insulin resistance independently of sympatho-inhibition but through direct effects on target tissue by promoting AMPK signaling pathway [268].

As LNP509 improves insulin resistance through activating AMPK pathways and because this enzyme plays a major role in glucose and lipid homeostasis, the objective of the present study was to understand the direct effects of LNP509 in hepatocytes and to explore 1) the extent to which the effects of LNP509 on insulin resistance observed in vivo are due to direct effect on

hepatocytes and 2) the functional consequences of LNP509-induced AMPK activation on insulin sensitivity and lipid accumulation. We used the cultured human hepatoma HepG2 cell line as a model system and presented biochemical evidences that LNP509 have the capacity to directly modulate lipid and glucose metabolism.

## MATERIAL AND METHODS

*Cells.* Human derived hepatocarcinoma HepG2 cells were cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks in DMEM F12 without phenol red containing 10% heat-inactivated fetal calf serum and 2% penicillin/streptomycin. The cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C and passaged every 3 days by trypsinization (trypsin-EDTA). For experiments, HepG2 cells were incubated in 6-well plate at 250000 cells / well in complete medium, grown to 70% confluence, and maintained in serum-free DMEM during 5 hours. Cells were treated with LNP509, insulin, efaroxan (RI<sub>1</sub> antagonist), compound C ((6-[4-(2-Piperidin-1-ylethoxy) phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo [1,5-a]pyrimidine) : AMPK inhibitor), AICAR (cell-permeable adenosine analogue that can be phosphorylated to ZMP, an AMP analogue and known AMPK activator) as indicated in the legends. Under the conditions of our studies, treatment of HepG2 cells with LNP509 (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-3</sup> M) had no detectable cell toxicity (data not shown).

*Induction of steatosis by high oleic acid concentrations.* Once approximately 80% confluence and cultured in FBS-free medium for 5 hours in 24-well culture plate, HepG2 cells were treated with oleic acid (2.0 mM) ± LNP509 (10<sup>-6</sup> M) for 24 hours. After the medium was removed and cells were washed two times with phosphate buffer saline solution (PBS), 500 µl of 10% formalin solution were added, and incubated at room temperature for 1 hour. Control cells were treated with oleic acid free medium.

*Oil Red Oil cell staining.* Oil Red Oil (ORO) stock solution (100%) was made by mixing 60 mg of ORO powder with 20 ml of isopropanol 100% then undergoing filtering. ORO stock solution was then diluted to prepare a 60% ORO solution. After removing the fixative solution from each well of the 24-well culture plate, the cells were washed three times with ddH<sub>2</sub>O. The cells were

the incubated with a 60% isopropanol solution during 5 minutes. After removing the 60% isopropanol solution, 500  $\mu$ l of the 60% ORO solution was then added to each well and incubated at room temperature for 20 minutes. After removing the ORO solution from each well, the cells were washed multiple times with ddH<sub>2</sub>O until the solution became clear. The cells were examined under a light microscope, and the red oil droplet in staining in the cells indicate oleic acid induced steatosis. To quantify Oil Red O content levels, isopropanol 60% was added to each sample and removed 2 times. 500  $\mu$ l of isopropanol 60% is added. After shaking at room temperature for 5 min, the optic density of samples were read at 492 nm on a spectrophotometer.

*Immunoblotting.* HepG2 cells were homogenized in HEPES buffer containing protease and phosphatase inhibitors, then centrifuged 10 minutes at 10000g at 4°C. Total AMPK $\alpha$ , AMPK phosphorylated on Thr172 (pAMPK $\alpha$ ), total AKT and AKT phosphorylated on Ser473 (pAKT), total ACC and ACC phosphorylated on Ser79 (pACC) were probed using appropriate rabbit antibodies purchased from Cell Signaling; all antibodies were incubated overnight at 4°C with gentle shaking. Reactive proteins were detected and quantified using the BioRad Chemidoc System. AMPK and AKT activations and ACC inhibition were evaluated by the ratio pAMPK $\alpha$  / AMPK $\alpha$ , pAKT / AKT and pACC / ACC, respectively.

*Statistics.* Results are presented as means  $\pm$  SEM. Comparisons between treatments or groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferonni post-hoc test. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

*LNP509 promotes AMPK activation in HepG2 cells.* These data have ever been published (Fig. 6 [268]) but are presented here to be more comprehensive. LNP509 (concentrations from  $10^{-9}$ M to  $10^{-5}$ M) increased the ratio pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). The activation of AMPK by LNP509 was completely abolished by efaroxan (100  $\mu$ M), the reference antagonist of I<sub>1</sub>R, which was added 30 min before LNP509 exposure. AICAR was used as positive control.

*LNP509 potentiates insulin signaling pathway in HepG2 cells.* Activation of AKT, a key factor of the intracellular signaling pathways of insulin, was analyzed in LNP509 treated cells (Fig. 1B). Insulin (10 nM, 10 min) was used as positive control of AKT activation (pAKT / AKT :  $1.97 \pm 0.29$ ). LNP509 ( $10^{-6}$ M) alone did not change the ratio pAKT/AKT (pAKT / AKT :  $0.94 \pm 0.14$ ) compared to medium alone (pAKT / AKT : 1) whereas, when it was added with insulin, LNP509 potentiated the effect of this hormone (pAKT / AKT :  $4.37 \pm 0.63$ ). The LNP509-induced potentiation was inhibited by pre-treatment with efaroxan (reference antagonist of I<sub>1</sub>R) since pAKT / AKT value obtained in these conditions ( $2.02 \pm 0.90$ ) was comparable to the value obtained with insulin alone. Efaroxan alone was devoided of effect on AKT signaling.

*LNP509 potentiates insulin signaling pathway independently of AMPK activation in HepG2 cells.* AICAR (1 mM, 90 min) induces the phosphorylation of AMPK but have no effect on the ratio pAKT / AKT (pAKT / AKT :  $1.35 \pm 0.38$ ) which is comparable with that obtain in medium alone (pAKT / AKT : 1). LNP509 alone ( $10^{-6}$ M, 60 min) activates AMPK compared to control (pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  :  $0.88 \pm 0.15$  vs  $0.47 \pm 0.10$ , respectively) whereas it has no effect on AKT (LNP509 = pAKT / AKT :  $0.93 \pm 0.42$ , control = pAKT / AKT : 1). These results confirmed the results shown in Fig. 1A and 1B. Compound C is an agent that is used as a cell-permeable AMPK inhibitor. The AMPK phosphorylation induced by LNP509 + insulin is inhibited when compound C is added, as shown by the 35% decrease of the ratio pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$ . Moreover, AMPK phosphorylation is inhibited by the compound C whereas the ratio pAKT / AKT is maintained at the same level than what is observed without compound C (pAKT / AKT :  $5.51 \pm 1.60$ ) (Fig. 1C), compared to insulin + LNP509 alones (pAKT / AKT :  $4.37 \pm 0.63$ ) (Fig. 1B). These data suggest that insulin effect is potentiated by LNP509 independently of AMPK activation.

*LNP509 induces ACC inactivation in HepG2 cells.* As a result of AMPK activation, hepatocyte ACC activity was markedly suppressed by LNP509 treatment, as shown by the 3 fold increased phosphorylation of ACC (pACC / ACC in control :  $0.21 \pm 0.05$  ; pACC / ACC in LNP509 treated cells :  $0.63 \pm 0.18$ ) (Fig. 2A).

*Oleic acid induced lipid accumulation in HepG2 cells.* In order to observe the lipid content, cultured HepG2 cells were exposed to oleic acid (2mM, 24h) and the lipid accumulation levels were detected by Oil Red O staining and quantified by Oil Red O extraction and density evaluation. Photomicrographs indicate that the intracellular lipid content is increased in oleic acid HepG2 treated cells as shown by red droplets in hepatocytes (Fig. 2B). The total intracellular

extracted lipids were then quantitated using a spectrophotometer at 492 nm. The results show a 38 % elevation of lipid content compared to isopropanol control (Fig. 2B).

*LNP509 prevented lipid accumulation in HepG2 cells.* As shown in Figure 2B, LNP509 ( $10^{-6}$ M, 24h) co-treatment prevent lipid accumulation in hepatocytes. Red droplets had disappeared and density decreased by 26% compared to oleic acid alone.



## DISCUSSION

The present study was designed to explore peripheral direct mechanisms involved in beneficial effects of I<sub>1</sub>R ligands on lipid metabolism and insulin sensitivity observed in vivo [249,268]. Experiments were carried out in Human hepatoma HepG2 cells where the presence of I<sub>1</sub>R was firstly confirmed by competition binding assays [268]. In a recent study, insulin resistant rats treated with LNP509 during one week displayed improved glucose tolerance [268]. In this study, we proposed an adiponectin-mediated improvement of insulin sensitivity as a possible mechanism involved in the peripheral favorable metabolic effects of I<sub>1</sub>R ligands. LNP509 increased adiponectin plasma levels and contributed to the stimulation of AMPK phosphorylation in insulin target tissues like liver. Additionally, LNP509 also exerts direct activating effects on AMPK-dependent transduction in target cells. Stimulation of adiponectin and AMPK pathways in turn would improve insulin signaling in hepatocytes, leading to higher insulin sensitivity and better glucose tolerance [268].

In this study, we firstly hypothesized that LNP509 can act through direct action on hepatocytes to increase insulin sensitivity. We confirmed that LNP509 have the capacity to directly activate AMPK, in a concentration-dependent manner and through the I<sub>1</sub>R because efaroxan, an antagonist of these receptors, inhibits AMPK phosphorylation [268]. Moreover, we demonstrated that LNP509 alone did not affect insulin signaling pathway. Interestingly, insulin-induced AKT activation is potentiated in presence of LNP509 superior to that induced by insulin alone, as shown by the 121 % increase of the ratio pAKT / AKT. Few studies have been able to show a potentiating effect of a drug. Nevertheless, Bhaskar and coworker recently reported the characterization of an antibody called XMetA that binds to allosteric site of the insulin receptor [301]. XMetA play the role of a direct agonist and does not interfere with insulin bonding on its

receptor. However, this antibody stimulates insulin signaling pathway in cultured cells and reduced hyperglycemia in mouse models of diabetes. XMetA also act as a positive allosteric modulator of the insulin receptor by enhancing insulin binding affinity and increasing metabolic signaling, without directly activating the insulin receptor [302]. We can imagine that LNP509 modulates the activity of insulin receptor to enhance insulin sensitivity and to reduce associated metabolic disorders. As LNP509 exerts its effects differentially from the commonly used drugs, it represents a novel and potential therapeutic agent to improve insulin sensitivity and glucose metabolism. Moreover, as shown in our recent studies, LNPs induced an increase in plasma adiponectin [249], an insulin sensitizer adipokine, which could contribute to the activation of AMPK in the liver [268]. Regarding these results, we suggested that LNP509, adiponectin and AMPK play a synergistic role in the improvement of insulin sensitivity. We hypothesized that the activation of AMPK is involved in the beneficial effects observed in the modulation of insulin signaling pathway. Nevertheless, when AMPK is inhibited by compound C, AKT phosphorylation is maintained in presence of LNP509, whereas compound C alone had no effect on AKT activation, suggesting an AMPK independent action. Three mechanisms can be proposed to explain the potentiation of insulin-induced AKT phosphorylation by I<sub>1</sub>R ligands. First, LNP509 could increase directly tyrosine phosphorylation of IRS-1, and consequently, the PI3K activation to induce AKT phosphorylation and increase insulin sensitivity. IRS-1 (insulin receptor substrate family 1) is tyrosine-phosphorylated in response to insulin, insulin growth factor-1 and cytokines and is a crucial signaling molecule that mediates the metabolic effects of insulin [303]. Once phosphorylated, IRS-1 recruits signal transducers including phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [304]. Insulin resistance is a common pathological state in which target tissues fail to respond properly to normal levels of circulating insulin. Studies in rodents have demonstrated that insulin resistance is associated with a reduced tyrosine phosphorylation of IRS-1 and PI3K activation

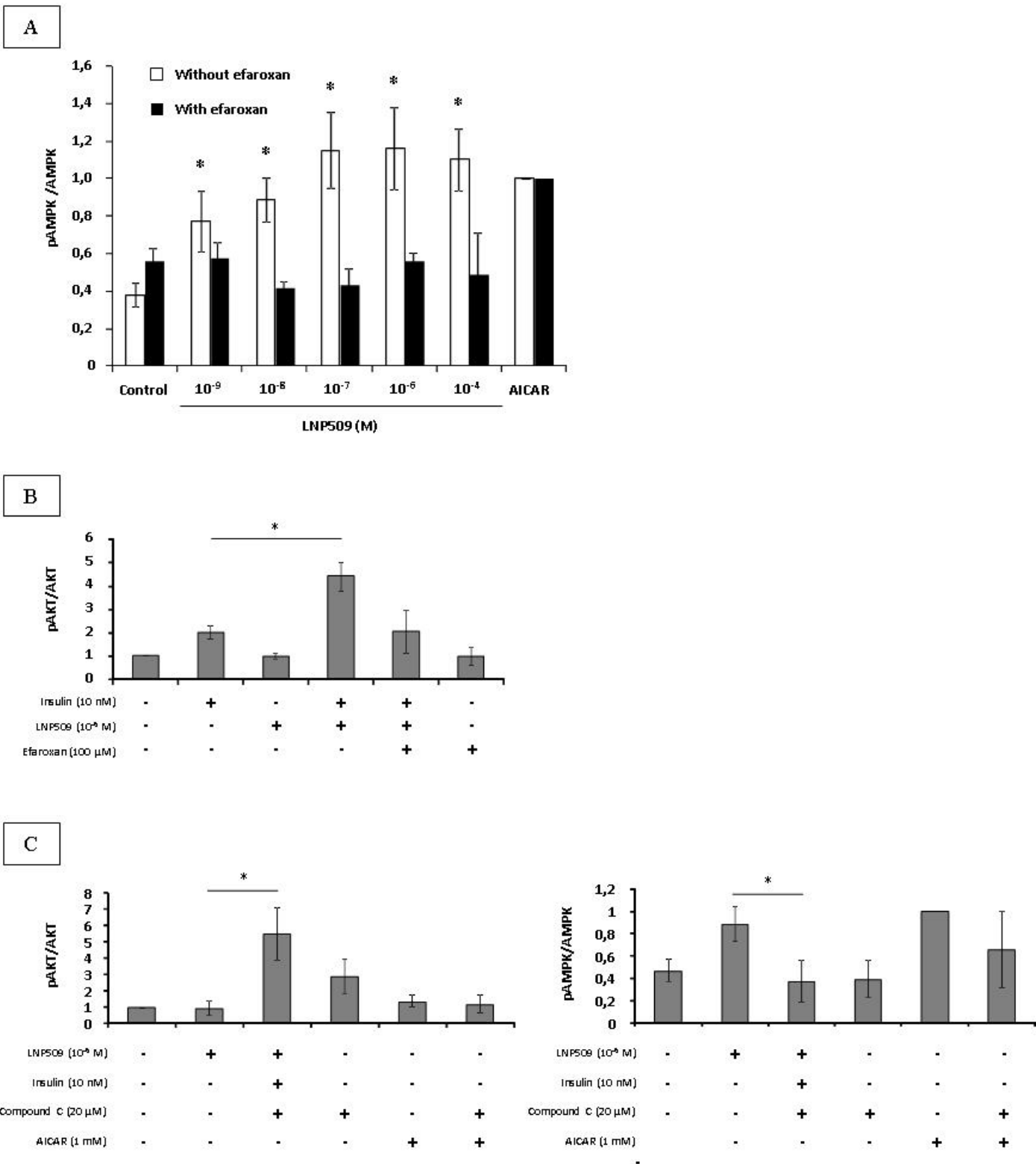
[304]. Moreover, in human, a decrease in IRS-1 tyrosine phosphorylation have been reported in 30% of subjects at high risk for type 2 diabetes [305]. Even if the mechanism of action of metformin are poorly understood, Kumar and coworkers demonstrated that this drug induces a tyrosine phosphorylation of IRS-1 in muscle cells [306]. We can hypothetized that the same process occurs in the liver and that the LNP509-induced phosphorylation of IRS-1 could therefore account for the enhanced AKT activation.

Second, LNP could act indirectly, by preventing the inhibitory S6K1-mediated feedback loop. S6K1 is phosphorylated and activated by the upstream kinase mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1). S6K1 is activated in response to growth factors, insulin or nutrients (such as glucose and amino acids) which are elevated in obesity and can lead to insulin resistance [307,308]. Some studies have demonstrated that the activity of S6K1 is increased in liver of genetic and diet-induced obese animals. Moreover, S6K1 has been shown to modulate insulin sensitivity and to participate to the installation of obesity [309]. The increased S6K1 activity leads to serine phosphorylation and IRS-1 degradation, creating a negative feedback loop in which insulin signaling is altered [310]. In obese animals where S6K1 was pharmacologically blockade by PF-4708671 molecule, Shum and coworkers observed an inhibition of this feedback loop leading to an improved glucose tolerance and to a normal function of AKT [311]. All these data demonstrate that S6K1 can exert inhibitory effects on insulin signaling pathway. As rapamycin [309], a mTORC1 inhibitor, we can imagine that LNP509 directly reverses the inhibitory S6K1 feedback loop to promote insulin signaling pathway and to increase insulin sensitivity.

Finally, LNP could improve insulin effects by lowering free fatty acids (FFA) production. Indeed, a lot of studies demonstrated the negative effect of them on insulin sensitivity. Obesity, especially excessive presence of visceral adipose tissue, promotes the FFA transport in the portal

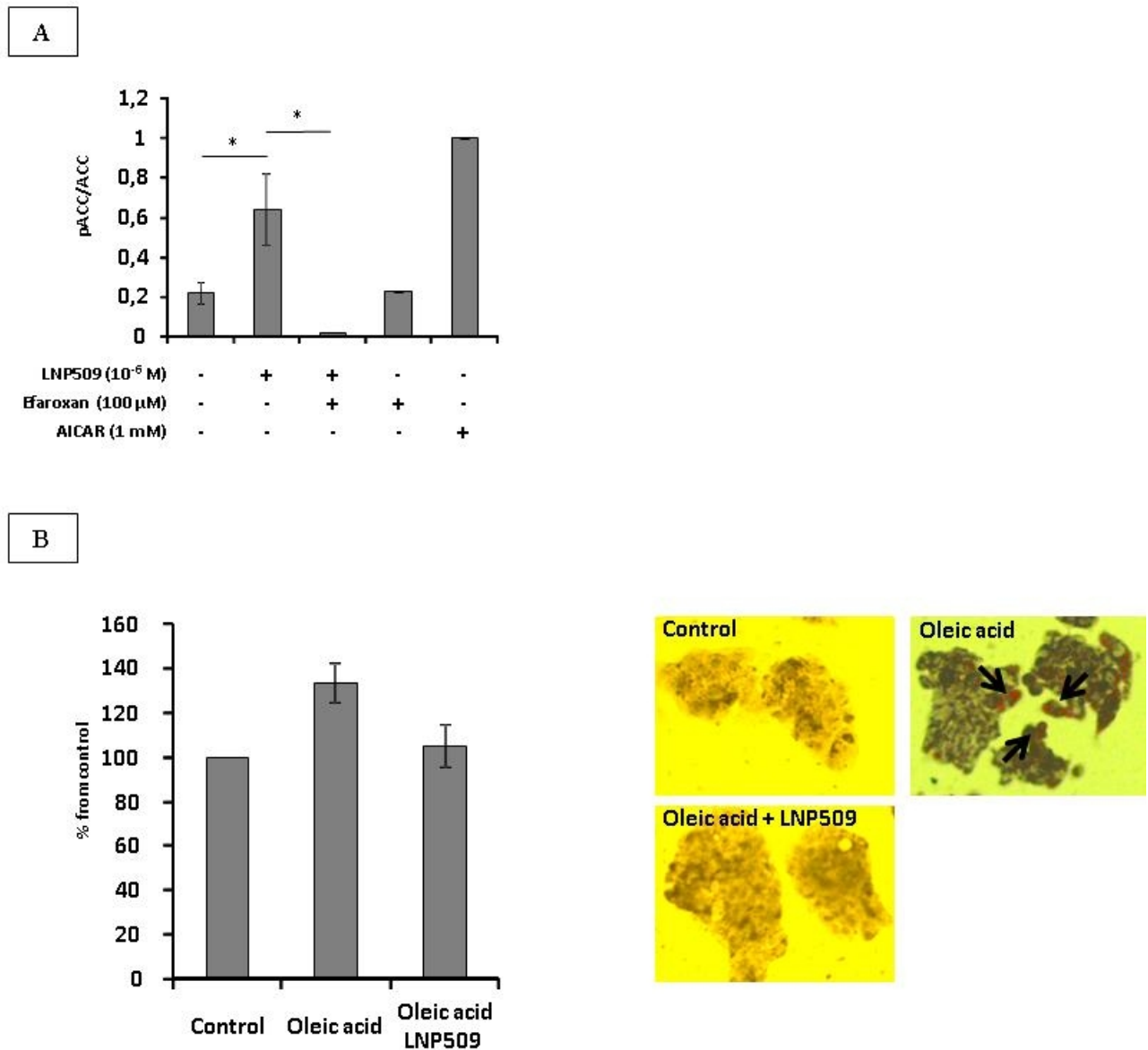
vein [47,48]. For example, the suppression of visceral fat in the rat liver restores sensitivity to insulin [49]. Moreover, previous studies demonstrated that LNPs have the capacity to improve dyslipidemia by decreasing total cholesterol and triglycerides. Regarding these results, we hypothesized that LNP509 regulates directly the lipid metabolism by modulating the activation of AMPK. We have observed that LNP509 increase the inhibitor phosphorylation of ACC involved in fatty acid synthesis. ACC catalyzes the biosynthesis of malonyl-CoA from acetyl-CoA. Malonyl-CoA is an initial substrate for de novo fatty acid biosynthesis, and it serves as a potent inhibitor of carnitine palmitoyl transferase I (CPT-I), a rate-limiting step for fatty acid oxidation. Thus, as a result of ACC inactivation, decreased malonyl-CoA concentrations could lead to decreased lipid synthesis and increased fatty acid oxidation. Moreover, lipid accumulation is reduced in oleic acid treated cells when they are exposed to LNP509. High plasma fatty acid and triglyceride levels lead to increased import of fatty acid in liver, contributing to the development of steatosis [312]. Nevertheless, this phenomenon leads rapidly to lipotoxicity. Studies have revealed elevated free fatty acid and dyslipidemia in type 1 and type 2 diabetes and in obese patients [313]. The lowering effect of LNP509 on free fatty acid production can be responsible for the increased AKT phosphorylation, resulting in ameliorated insulin sensitivity.

Figure 1.



**Figure 1: The I<sub>1</sub>R ligand LNP509 increases AMPK $\alpha$  phosphorylation and potentiates insulin effects in cultured human HepG2 hepatocytes. A: LNP509 increases AMPK $\alpha$  phosphorylation in a concentration-dependent manner (Fig. 6 [268]).** HepG2 cells were stimulated with increasing concentrations of LNP509 ( $10^{-9}$ M to  $10^{-5}$ M, 10 min) in the presence or absence of the I<sub>1</sub>R antagonist efaroxan (100  $\mu$ M, 30 min pretreatment); AMPK activation was evaluated by the ratio AMPK phosphorylated on Thr172 (pAMPK $\alpha$ ) / total AMPK $\alpha$  determined by Western blots. Data are normalized with AICAR and are means  $\pm$  SEM of 3-7 independent experiments. \*:  $P < 0.05$  *versus* non-stimulated cells. **B: LNP509 potentiates insulin signaling pathway.** HepG2 cells were stimulated with LNP509 ( $10^{-6}$ M, 60 min) in the presence or absence of insulin (10 nM, 10 min, added after LNP509) and the I<sub>1</sub>R antagonist efaroxan (100  $\mu$ M, 30 min, LNP509 pretreatment). AKT activation was evaluated by the ratio AKT phosphorylated on Ser473 (pAKT) / total AKT determined by western blot. Data are normalized with non stimulated cells and are means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*:  $P < 0.05$  *versus* insulin-stimulated cells. **C: LNP509 potentiates insulin signaling pathway independently of AMPK activation.** HepG2 cells were stimulated with LNP509 ( $10^{-6}$ M, 60 min) in the presence or absence of insulin (10 nM, 10 min, added after LNP509) and AMPK inhibitor compound C (20  $\mu$ M, 90 min, LNP509 pretreatment). AKT activation was evaluated by the ratio AKT phosphorylated on Ser473 (pAKT) / total AKT determined by western blot. Data are normalized with non stimulated cells and are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. AMPK activation was evaluated by the ratio AMPK phosphorylated on Thr172 (pAMPK $\alpha$ ) / total AMPK $\alpha$  determined by western blot. Data are normalized with AICAR and are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

**Figure 2.**



**Figure 2: LNP509 stimulates ACC phosphorylation and decreases intracellular lipid in cultured human hepatoma HepG2 cells. A: LNP509 inhibits ACC by increasing its phosphorylation.** HepG2 cells were stimulated with LNP509 (10<sup>-6</sup>M, 10 min) in the presence or absence of the I<sub>1</sub>R antagonist efaroxan (100 μM, 30 min pretreatment); ACC activation was evaluated by the ratio ACC phosphorylated on Ser79 (pACC) / total ACC determined by western blot. Data are means ± SEM of 3 independent experiments. \*: P<0.05 *versus* non-stimulated cells. **B: LNP509 prevented oleic acid induced steatosis in HepG2 cells.** Non-treated HepG2 cells did not show Oil Red O staining. Positive Oil Red O staining is observed in red in cytoplasm of HepG2 cells treated with 2 mM oleic acid for 24 hours. LNP509 co-treatment (10-

6M, 24 hours) prevents lipid accumulation in HepG2 cells (x 200). Resultes are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

**4<sup>ème</sup> partie :**

**Discussion générale**

**Perspectives**

**Conclusion**





Ce travail de thèse avait deux principaux objectifs : dans un premier temps, nous voulions poursuivre l'étude et valider l'intérêt thérapeutique du LNP599 dans un modèle plus pertinent de troubles métaboliques retrouvés dans le syndrome métabolique (SMet) chez le primate non humain (PNH), puis comprendre les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques périphériques observés. Ces objectifs ont été atteints grâce à 3 parties expérimentales réalisées *in vivo* (chez le primate et le rat âgé) et *in vitro* (lignées cellulaires et culture primaire).

## **I. Résumé des résultats**

### **I.1. Etude des effets d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP599) dans un modèle de troubles métaboliques chez le primate non humain (marmouset, *Callithrix jacchus*)**

Cette première étude expérimentale a eu pour objectifs de (1) développer un modèle accéléré de troubles métaboliques retrouvés dans le SMet chez le PNH, le marmouset (*Callithrix jacchus*) dans lequel (2) confirmer les effets bénéfiques du LNP599, déjà observés chez le rongeur.

#### **I.1.1. Validation du modèle accéléré de troubles métaboliques associés au SMet chez le marmouset**

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets d'un régime enrichi sur le développement d'anomalies métaboliques chez le marmouset. Des marmousets ont donc reçus pendant 16 semaines un régime enrichi en glucose (33%) et en graisse (12.5 % de lard et 0.4% de cholestérol) afin d'induire une obésité, des troubles lipidiques et glucidiques. Nous avons constaté que le régime enrichi est appétent et induit une prise de poids significative (+9% vs régime normal,  $p=0.02$ ) comparativement aux animaux recevant un régime standard. Le régime enrichi induit également des modifications des paramètres lipidiques en induisant une augmentation des triglycérides (TG) (+70% vs régime normal,  $p=0.14$ ) et du cholestérol total (+51% vs régime normal,  $p=0.08$ ). Enfin, le régime enrichi ne modifie pas la glycémie à jeun mais induit une intolérance au glucose chez la moitié des animaux.

**Cette première partie a permis le développement d'un modèle accéléré de désordres métaboliques chez le PNH, et plus particulièrement chez le marmouset. En effet, le régime enrichi induit des troubles métaboliques retrouvés chez les patients atteints de SMet.**

### **I.1.2. Evaluation des effets bénéfiques du LNP599 chez les animaux présentant certains symptômes d'un SMet**

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons analysé les effets du LNP599 chez le marmouset afin de confirmer les résultats obtenus chez le rongeur. En effet, des études préliminaires menées dans un modèle de SMet, le rat SHHF (Spontaneously Hypertensive Heart Failure) ont permis d'observer les effets bénéfiques de cette molécule : stabilisation du poids malgré une prise alimentaire semblable aux animaux contrôle, amélioration de l'hypertension artérielle, des dyslipidémies, de l'insulinémie et augmentation de la concentration plasmatique d'adiponectine pouvant contribuer à la réduction de l'intolérance au glucose. Des marmousets ont donc reçu pendant 16 semaines un régime enrichi en glucose (33%) et en graisse (12.5 % de lard et 0.4% de cholestérol) et le LNP599 par voie orale à une dose de 10 mg/kg/jour. Les primates traités par le LNP599 présentent une stabilisation de leur poids comparativement aux animaux recevant le régime enrichi seul (Témoins :  $359 \pm 14.3\text{g}$ , régime enrichi :  $389.37 \pm 9.88\text{g}$ , régime enrichi + LNP599 :  $363.33 \pm 13.76\text{g}$ ) malgré un apport calorique journalier supérieur aux animaux témoins (apport calorique : régime normal = 3.725 kcal/g de croquette, régime enrichi = 4.265 kcal/g de croquette). Le LNP599 prévient l'augmentation des TG (pourcentage de variations T0/T16 : Témoins =  $+19.87 \pm 12.99\%$ , régime enrichi =  $+74.84 \pm 25.19\%$ , régime enrichi + LNP599 :  $-9.10 \pm 17.79\%$ . Régime enrichi vs régime enrichi + LNP599 :  $p=0.04$ ). Les animaux traités avec le LNP599 présentent une élévation significative de la proportion de HDL-cholestérol (HDL/cholestérol total à T16 : Témoins =  $0.29 \pm 0.06$ , régime enrichi =  $0.31 \pm 0.02$ , régime enrichi + LNP599 :  $0.42 \pm 0.02$ . Régime enrichi vs régime enrichi + LNP599 :  $p=0.03$ ). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 4.

	Régime standard	Régime HFD	Régime HFD + LNP599
<b>Poids corporel</b>	=	↗	=
<b>Triglycérides</b>	=	↗	↘
<b>Cholestérol total</b>	=	↗	↗
<b>HDL-cholestérol/cholestérol total</b>	=	=	↗
<b>LDL-cholestérol/cholestérol total</b>	=	=	=
<b>Tolérance au glucose</b>	=	↘	↗

Tableau 4 : Effets d'un régime enrichi en graisse et en glucose et d'un traitement par le LNP599 chez le primate non humain

La seconde partie de cette étude a confirmé les effets bénéfiques du LNP599 dans un modèle induit de troubles métaboliques chez le marmouset : Le LNP599 prévient la prise de poids sans effet anorexigène, l'intolérance au glucose et les dyslipidémies en diminuant la production de TG et en favorisant la production de HDL-cholestérol.

### **I.2. Etude des effets périphériques d'un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 (LNP509) - Amélioration de la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin d'intolérance au glucose grâce à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et à l'activation de la cascade de signalisation de l'AMPK**

Cette seconde étude expérimentale a eu pour objectif de confirmer l'existence d'effets périphériques des ligands RI<sub>1</sub> et leur capacité à moduler directement les cascades de signalisation dans le foie. Afin d'étudier uniquement les effets périphériques de nos ligands, une autre molécule sélective des R<sub>1</sub> n'ayant pas la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, le LNP509, a été utilisée. Les travaux ont été réalisés dans un modèle murin d'insulino-résistance modérée : le rat Wistar âgé. A l'aide d'études réalisées *in vitro*, nous avons cherché à comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les effets bénéfiques observés. Cette étude a tout d'abord permis de montrer que le rat Wistar mâle âgé est un modèle spontanée d'insulino-résistance modérée. Les animaux traités par le LNP509 présentent une amélioration de la

tolérance au glucose (diminution de 15% de l'aire sous la courbe obtenue lors d'un test de tolérance au glucose) et de la sensibilité à l'insuline associée à une augmentation de l'adiponectine plasmatique  $2.04 \pm 0.21$  vs  $1.48 \pm 0.11$  mg/L chez les animaux traités et contrôle, respectivement). Des analyses réalisées sur des biopsies hépatiques d'animaux traités nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de la phosphorylation d'AMPK (AMP-activated protein kinase), impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique, et d'AKT, acteur clé de la cascade de signalisation de l'insuline. Dans des cultures primaires d'adipocytes, le LNP509 augmente de manière directe et dépendante de la dose la sécrétion de l'adiponectine. Enfin, dans la lignée cellulaire HepG2, le LNP509 seul active l'AMPK de manière dépendante de la dose et des récepteurs des imidazolines de type 1 (RI<sub>1</sub>).

**L'activation périphérique des RI<sub>1</sub> stimule la voie de signalisation de l'adiponectine par l'intermédiaire de l'AMPK et permet ainsi l'amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline.**

### **1.3. Un ligand sélectif des récepteurs des imidazolines de type 1 améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipidique grâce à son action sur l'AMPK, un acteur clé de l'homéostasie énergétique.**

Les données recueillies à partir des études réalisées chez le rat âgé (chapitre 2) nous ont permis d'observer au niveau hépatique une augmentation de l'activation de l'AMPK. Suite à ces résultats, nous avons donc décidé d'élucider les mécanismes cellulaires à l'origine des améliorations observées concernant les métabolismes glucidique et lipidique. Dans les cellules HepG2, le LNP509 multiplie par 2 la phosphorylation d'AKT induite par l'insuline alors que le LNP509 seul ne modifie pas son activation. Cette potentialisation se fait de manière dépendante des RI<sub>1</sub> (réaction antagonisée par l'ajout d'efaroxan). L'utilisation d'un inhibiteur de l'AMPK nous a permis de démontrer que la potentialisation de la phosphorylation insuline-dépendante d'AKT par le LNP509 est indépendante de l'activation de l'AMPK. Enfin, le LNP509 active l'acétyl-coA carboxylase (ACC), à l'origine d'une diminution de la synthèse des acides gras et de la stéatose hépatique. Ces résultats ont été complétés par un marquage à l'Oil red O confirmant la

capacité du LNP509 à induire la diminution de la stéatose hépatique provoquée par un traitement à l'acide oléique dans les cellules HepG2.

## II. Conclusion / perspectives

Dans la première partie de ma thèse, il s'agissait de mettre au point un modèle accéléré tout à fait original de SMet chez le PNH (marmouset). En effet, les animaux recevant le régime enrichi en graisse en glucose développent des troubles lipidiques dès 6 semaines alors que la majorité des modèles décrits dans la littérature s'établissent sur de plus longs traitements [255]. A cause de limitations techniques, notamment concernant la mesure de la pression artérielle, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'ensemble des troubles associés au SMet dans notre modèle. Cependant, il offre de nouvelles perspectives pour étudier les désordres glucidiques et lipidiques chez le PNH, plus pertinent par sa proximité avec l'Homme. Tout d'abord, en regroupant les résultats obtenus, nous avons pu observer qu'à la différence de modèles murins de même souche et de fond génétique similaire, ce modèle original de SMet chez le PNH permet de modéliser les variations interindividuelles observées chez l'Homme. De plus, par les différences majeures de métabolisme lipidique, le SMet présent chez les modèles murins habituellement utilisés est donc par nature différent de la pathologie humaine. Concernant l'intérêt thérapeutique du LNP599, nous avons pu confirmer sa capacité à agir sur l'ensemble des troubles induits dans le modèle développé. Le LNP599 prévient le développement de l'obésité, de l'intolérance au glucose et des dyslipidémies. En plus de l'action centrale du LNP599, des études antérieures ont suggéré l'existence d'effets périphériques bénéfiques, et plus particulièrement l'implication de l'adiponectine dans l'amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. En raison du faible nombre de techniques de dosages validées chez le marmouset, les dosages des niveaux de ces deux hormones n'ont pas pu être réalisés. Afin de confirmer la capacité du LNP599 à agir directement sur les systèmes cellulaires impliqués dans l'homéostasie glucidique et lipidique, d'autres expériences *in vitro* devront être réalisées.

Comme décrit précédemment, l'adiponectine semble être un élément clé de la physiopathologie des troubles métaboliques présents dans le SMet. En effet, des travaux antérieurs ont permis l'observation d'une diminution de l'adiponectine plasmatique chez des animaux modèles de SMet. La deuxième partie de ce travail nous a permis de confirmer l'existence d'effets périphériques d'un ligand sélectif des RI<sub>1</sub> et sa capacité à moduler directement les cascades de signalisation dans le foie, un des tissus cibles de l'insuline et de l'adiponectine. En effet, chez le

rat âgé, le LNP509 augmente le taux d'adiponectine circulante. Nous avons également supposé que les LNPs agissaient directement au niveau adipocytaires et modulaient ainsi la concentration plasmatique d'adiponectine. Cette hypothèse a été vérifiée dans des cultures primaires d'adipocytes dans lesquelles le LNP509 induit une augmentation dépendante de la dose de la sécrétion d'adiponectine [268]. De ce fait, nos ligands modulent l'état d'activation hépatique d'un acteur clé du métabolisme énergétique, l'AMPK, qui pourrait être en parti responsable des effets bénéfiques de nos ligands sur les métabolismes lipidique et glucidique. Il en résulte une augmentation de la sensibilité à l'insuline se traduisant par l'activation d'AKT. Velliquette et coll ont déjà montré que certains effets bénéfiques de la moxonidine, notamment la diminution du taux plasmatique de TG, étaient liés à une action directe sur des  $R_{11}$  situés au niveau des hépatocytes [314]. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés au cours de ma thèse puisque le LNP509 induit une amélioration du profil lipidique chez l'animal, liée à l'inhibition de l'activité de l'ACC au niveau hépatique.

Ces résultats ont ainsi permis de déterminer quelques uns des mécanismes mis en jeu dans les effets bénéfiques des LNPs. Les travaux à venir devront confirmer les voies de signalisation proposées dans les chapitres 2 et 3, en particulier le lien entre  $RI_1$  et AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et l'activation des récepteurs  $PPAR\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor), mais également la capacité des LNPs à agir directement au niveau des différents acteurs de la cascade de signalisation de l'insuline.

Actuellement, le traitement des patients présentant un SMet associe fréquemment 4 à 6 médicaments différents (antihypertenseur(s), hypocholestérolémiant(s), hypoglycémiant(s), néphroprotecteur ...). Le développement de molécules efficaces sur plusieurs troubles du SMet, telles que les LNPs, permettrait de les substituer aux stratégies thérapeutiques actuelles avec des effets indésirables et des risques d'interactions médicamenteuses moindres. Il s'agirait là d'une innovation thérapeutique majeure, pouvant déboucher sur une réduction du nombre de médicaments administrés aux patients, avec une efficacité supérieure, et aboutir à une observance meilleure. Mon travail a permis de poser un certain nombre d'hypothèses concernant les cibles moléculaires et les mécanismes d'action centraux et périphériques de ligands LNP. Les études à venir permettront de préciser ces mécanismes et les phénomènes impliqués dans la pathogenèse du SMet. Ceux-ci restent en effet mal connus à ce jour. D'après la littérature, l'hyperactivité



sympathique semble constituer une composante majeure du développement d'un SMet. Il s'agit de confirmer ce point chez le primate et de vérifier que l'inhibition sympathique associée à l'augmentation de l'adiponectine pourrait constituer un axe de recherche pour le développement de nouveaux médicaments. L'ensemble des travaux devrait permettre à terme, de valider l'intérêt thérapeutique des LNPs chez l'Homme.

## **Références bibliographiques**

1. Avogaro P, Crepaldi G, Enzi G, Tiengo A (1965) [Metabolic aspects of essential obesity]. *Epatologia* 11: 226-238.
2. Reaven GM (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.
3. Kaplan NM (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149: 1514-1520.
4. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, et al. (1992) Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 41: 715-722.
5. Vague P (1996) Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947. *Obes Res* 4: 201-203.
6. Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553.
7. Balkau B, Charles MA (1999) Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 16: 442-443.
8. (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486-2497.
9. Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, et al. (2003) American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract* 9: 237-252.
10. Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB (2005) Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 112: 3066-3072.
11. Kaur J (2014) A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014: 943162.
12. Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002) Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287: 356-359.
13. Ford ES (2005) Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 28: 2745-2749.
14. Ervin RB (2009) Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report*: 1-7.
15. Mozumdar A, Liguori G (2011) Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes Care* 34: 216-219.
16. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, et al. (2002) Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 28: 364-376.
17. Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, et al. (2003) The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab* 29: 526-532.
18. Vernay M, Salanave B, de Peretti C, Druet C, Malon A, et al. (2013) Metabolic syndrome and socioeconomic status in France: The French Nutrition and Health Survey (ENNS, 2006-2007). *Int J Public Health* 58: 855-864.

19. Zabetian A, Hadaegh F, Azizi F (2007) Prevalence of metabolic syndrome in Iranian adult population, concordance between the IDF with the ATPIII and the WHO definitions. *Diabetes Res Clin Pract* 77: 251-257.
20. Kozan O, Oguz A, Abaci A, Erol C, Ongen Z, et al. (2007) Prevalence of the metabolic syndrome among Turkish adults. *Eur J Clin Nutr* 61: 548-553.
21. Chen HJ, Pan WH (2007) Probable blind spot in the International Diabetes Federation definition of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 15: 1096-1100.
22. Chuang SY, Chen CH, Chou P (2004) Prevalence of metabolic syndrome in a large health check-up population in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 67: 611-620.
23. Ko GT, Cockram CS, Chow CC, Yeung V, Chan WB, et al. (2005) High prevalence of metabolic syndrome in Hong Kong Chinese--comparison of three diagnostic criteria. *Diabetes Res Clin Pract* 69: 160-168.
24. Lohsoonthorn V, Dhanamun B, Williams MA (2006) Prevalence of metabolic syndrome and its relationship to white blood cell count in a population of Thai men and women receiving routine health examinations. *Am J Hypertens* 19: 339-345.
25. Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, et al. (2005) Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet* 365: 1398-1405.
26. Chowdhury B, Lantz H, Sjostrom L (1996) Computed tomography-determined body composition in relation to cardiovascular risk factors in Indian and matched Swedish males. *Metabolism* 45: 634-644.
27. Marceline YT, Issiaka S, Gilberte KC, Nadege R, Macaire OS, et al. (2014) [Diagnosis and prevalence of metabolic syndrome in diabetics followed in a context of limited resources: the case of Burkina Faso]. *Pan Afr Med J* 19: 364.
28. Hauhouot-Attoungbre ML, Yayo SE, Ake-Edjeme A, Yapi HF, Ahibo H, et al. (2008) Le syndrome métabolique existe-t-il en Côte d'Ivoire ? *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23: 375-378.
29. BjÖRntorp PER (2000) Hypertension and the Metabolic Syndrome: Closely Related Central Origin? *Blood Pressure* 9: 71-82.
30. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, et al. (2003) The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 163: 427-436.
31. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, et al. (2004) Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 53: 2087-2094.
32. Pajvani UB, Scherer PE (2003) Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 3: 207-213.
33. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, et al. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.
34. Cheng Z, White MF (2012) The AKTion in non-canonical insulin signaling. *Nat Med* 18: 351-353.
35. Pouliot M-C, Després J-P, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, et al. (1992) Visceral Obesity in Men: Associations With Glucose Tolerance, Plasma Insulin, and Lipoprotein Levels. *Diabetes* 41: 826-834.
36. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, et al. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274.

37. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
38. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, et al. (1996) Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97: 2859-2865.
39. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176.
40. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, et al. (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103: 253-259.
41. Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A, et al. (1999) Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* 48: 358-364.
42. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, et al. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277: 50230-50236.
43. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183-190.
44. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, et al. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336.
45. Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377: 151-155.
46. Tsao TS, Stenbit AE, Li J, Houseknecht KL, Zierath JR, et al. (1997) Muscle-specific transgenic complementation of GLUT4-deficient mice. Effects on glucose but not lipid metabolism. *J Clin Invest* 100: 671-677.
47. Bjorntorp P (1990) "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10: 493-496.
48. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, et al. (2007) Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 133: 496-506.
49. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, et al. (2002) Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging. An Adipokine-Mediated Process? *J Biol Chem* 277: 2951-2958.
50. Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI (2000) Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 275: 8456-8460.
51. Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, et al. (1999) Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48: 524-530.
52. Manco M, Bertuzzi A, Salinari S, Scarfone A, Calvani M, et al. (2004) The ingestion of saturated fatty acid triacylglycerols acutely affects insulin secretion and insulin sensitivity in human subjects. *Br J Nutr* 92: 895-903.
53. Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802-1812.
54. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587.

55. VERGES, #160, Bruno (2007) Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2. Paris, FRANCE: Arnette. 8 p.
56. Taskinen MR (2003) Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 46: 733-749.
57. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, et al. (1997) Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 40: 454-462.
58. Verges B (2005) New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 31: 429-439.
59. Duvillard L, Pont F, Florentin E, Galland-Jos C, Gamber P, et al. (2000) Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest* 30: 685-694.
60. Chait A, Bierman EL, Albers JJ (1979) Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J Clin Invest* 64: 1309-1319.
61. Verges B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, et al. (2006) Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1364-1369.
62. Kannel WB, Brand N, Skinner JJ, Jr., Dawber TR, McNamara PM (1967) The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann Intern Med* 67: 48-59.
63. Savoia C, Volpe M, Alonzo A, Rossi C, Rubattu S (2010) Natriuretic peptides and cardiovascular damage in the metabolic syndrome: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)* 118: 231-240.
64. Gluba A, Mikhailidis DP, Lip GYH, Hannam S, Rysz J, et al. (2013) Metabolic syndrome and renal disease. *International Journal of Cardiology* 164: 141-150.
65. Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7: 335-346.
66. Vecchione C, Carnevale D, Di Pardo A, Gentile MT, Damato A, et al. (2009) Pressure-induced vascular oxidative stress is mediated through activation of integrin-linked kinase 1/betaPIX/Rac-1 pathway. *Hypertension* 54: 1028-1034.
67. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL (2009) Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* 54: 1384-1392.
68. Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, Chudek J, Kokot F, et al. (2003) Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 16: 72-75.
69. Fesus G, Dubrovskaya G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, et al. (2007) Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res* 75: 719-727.
70. Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, Wu X, Mahadev K, et al. (2007) Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest* 117: 1718-1726.
71. Wang ZV, Scherer PE (2008) Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. *Hypertension* 51: 8-14.
72. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P (1991) Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 34: 457-462.

73. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, et al. (2000) Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49: 1374-1380.
74. Schneider DJ, Sobel BE (1996) Synergistic augmentation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 induced by insulin, very-low-density lipoproteins, and fatty acids. *Coron Artery Dis* 7: 813-817.
75. Bistrian BR, Khaodhilar L (2000) Chronic systemic inflammation in overweight and obese adults. *JAMA* 283: 2235; author reply 2236.
76. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 847-850.
77. Cao H (2014) Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of Endocrinology* 220: T47-T59.
78. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K-i, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of Clinical Investigation* 116: 1494-1505.
79. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH (2009) Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Current Diabetes Reports* 9: 26-32.
80. Ridker PM, Morrow DA (2003) C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiology Clinics* 21: 315-325.
81. Blaser M, Bork P, Fraser C, Knight R, Wang J (2013) The microbiome explored: recent insights and future challenges. *Nat Rev Microbiol* 11: 213-217.
82. Gallo RL, Hooper LV (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12: 503-516.
83. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, et al. (2011) Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478: 250-254.
84. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT (2012) Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489: 231-241.
85. Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH (2012) Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 3: 27-43.
86. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, et al. (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336: 1262-1267.
87. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15718-15723.
88. Collins SM, Surette M, Bercik P (2012) The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 10: 735-742.
89. Franks I (2013) Microbiota: gut microbes might promote intestinal angiogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 3.
90. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, et al. (2013) Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4410-4415.
91. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15718-15723.

92. Shen J, Obin MS, Zhao L (2013) The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 34: 39-58.
93. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 979-984.
94. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, et al. (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50: 2374-2383.
95. Ma X, Hua J, Li Z (2008) Probiotics Improve High Fat Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance by Increasing Hepatic NKT cells. *Journal of hepatology* 49: 821-830.
96. Borody TJ, Khoruts A (2012) Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 88-96.
97. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, et al. (2012) Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 143: 913-916 e917.
98. Fox EA, Powley TL (1985) Longitudinal columnar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. *Brain Res* 341: 269-282.
99. Luckman SM, Lawrence CB (2003) Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends Endocrinol Metab* 14: 60-65.
100. Scheurink AJ, Nolan LJ (1996) Food intake, fuel homeostasis, and the autonomic nervous system. *Appetite* 26: 304.
101. Grill HJ, Kaplan JM (2002) The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 23: 2-40.
102. Luiten PG, ter Horst GJ, Steffens AB (1987) The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog Neurobiol* 28: 1-54.
103. Shapiro RE, Miselis RR (1985) The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J Comp Neurol* 238: 473-488.
104. Shapiro RE, Miselis RR (1985) The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol* 234: 344-364.
105. Youngstrom TG, Bartness TJ (1995) Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 268: R744-751.
106. Bowers RR, Festuccia WT, Song CK, Shi H, Migliorini RH, et al. (2004) Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R1167-1175.
107. Stanley S, Pinto S, Segal J, Perez CA, Viale A, et al. (2010) Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7024-7029.
108. Bartness TJ, Song CK (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J Lipid Res* 48: 1655-1672.
109. Valet P, Grujic D, Wade J, Ito M, Zingaretti MC, et al. (2000) Expression of human alpha 2-adrenergic receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. *J Biol Chem* 275: 34797-34802.
110. Lafontan M, Berlan M (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34: 1057-1091.
111. Grujic D, Susulic VS, Harper ME, Himms-Hagen J, Cunningham BA, et al. (1997) Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-



- induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J Biol Chem* 272: 17686-17693.
112. Fogari R, Zoppi A, Corradi L, Preti P, Mugellini A, et al. (1999) Beta-blocker effects on plasma lipids during prolonged treatment of hypertensive patients with hypercholesterolemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 534-539.
  113. Jungermann K, Gardemann A, Beuers U, Balle C, Sannemann J, et al. (1987) Regulation of liver metabolism by the hepatic nerves. *Adv Enzyme Regul* 26: 63-88.
  114. Shimazu T (1996) Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition* 12: 65-66.
  115. Athari A, Hanecke K, Jungermann K (1994) Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and D<sub>2</sub> release from primary Ito cell cultures after stimulation with noradrenaline and ATP but not adenosine. *Hepatology* 20: 142-148.
  116. Porte D, Jr., Williams RH (1966) Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. *Science* 152: 1248-1250.
  117. Porte D, Jr. (1967) Beta adrenergic stimulation of insulin release in man. *Diabetes* 16: 150-155.
  118. Campfield LA, Smith FJ (1983) Neural control of insulin secretion: interaction of norepinephrine and acetylcholine. *Am J Physiol* 244: R629-634.
  119. Ahren B, Veith RC, Taborsky GJ, Jr. (1987) Sympathetic nerve stimulation versus pancreatic norepinephrine infusion in the dog: 1). Effects on basal release of insulin and glucagon. *Endocrinology* 121: 323-331.
  120. Bloom SR, Edwards AV (1984) Characteristics of the neuroendocrine responses to stimulation of the splanchnic nerves in bursts in the conscious calf. *J Physiol* 346: 533-545.
  121. Skoglund G, Lundquist I, Ahren B (1988) Selective alpha 2-adrenoceptor activation by clonidine: effects on <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> efflux and insulin secretion from isolated rat islets. *Acta Physiol Scand* 132: 289-296.
  122. Ahren B, Lundquist I (1981) Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. *Eur J Pharmacol* 71: 93-104.
  123. Chan SL, Perrett CW, Morgan NG (1997) Differential expression of alpha 2-adrenoceptor subtypes in purified rat pancreatic islet A- and B-cells. *Cell Signal* 9: 71-78.
  124. Lacey RJ, Berrow NS, Scarpello JH, Morgan NG (1991) Selective stimulation of glucagon secretion by beta 2-adrenoceptors in isolated islets of Langerhans of the rat. *Br J Pharmacol* 103: 1824-1828.
  125. Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO (1988) Inhibition of glucose-stimulated insulin release by alpha 2-adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 263: 1855-1860.
  126. Nakaki T, Nakadate T, Ishii K, Kato R (1981) Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3':5'-adenosine monophosphate accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 607-612.
  127. Sharp GW (1996) Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* 271: C1781-1799.
  128. Kuo WN, Hodgins DS, Kuo JF (1973) Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents. *J Biol Chem* 248: 2705-2711.
  129. Ahren B, Lindskog S (1992) Galanin and the regulation of islet hormone secretion. *Int J Pancreatol* 11: 147-160.

130. Wang ZL, Bennet WM, Wang RM, Ghatei MA, Bloom SR (1994) Evidence of a paracrine role of neuropeptide-Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. *Endocrinology* 135: 200-206.
131. Mendis S, Davis S, Norrving B (2015) Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke* 46: e121-122.
132. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S (2000) Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz J Med Biol Res* 33: 605-618.
133. Tuck ML (1992) Obesity, the sympathetic nervous system, and essential hypertension. *Hypertension* 19: I67-77.
134. Lopes HF, Egan BM (2006) Autonomic dysregulation and the metabolic syndrome: pathologic partners in an emerging global pandemic. *Arq Bras Cardiol* 87: 538-547.
135. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, et al. (2004) Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens* 22: 2363-2369.
136. Branth S, Ronquist G, Stridsberg M, Hambraeus L, Kindgren E, et al. (2007) Development of abdominal fat and incipient metabolic syndrome in young healthy men exposed to long-term stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 427-435.
137. Grassi G (2006) Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertens Res* 29: 839-847.
138. Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP (2010) Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome—Causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics* 126: 159-172.
139. Galletti F, Barbato A, Versiero M, Iacone R, Russo O, et al. (2007) Circulating leptin levels predict the development of metabolic syndrome in middle-aged men: an 8-year follow-up study. *J Hypertens* 25: 1671-1677.
140. Haynes WG (2000) Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2: 311-318.
141. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.
142. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D, Jr. (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13: 387-414.
143. Duvnjak L, Duvnjak M (2009) The metabolic syndrome - an ongoing story. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 7: 19-24.
144. Wang CC, Goalstone ML, Draznin B (2004) Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 53: 2735-2740.
145. Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML (1997) Sympathetic nerve hyperactivity precedes hyperinsulinemia and blood pressure elevation in a young, nonobese Japanese population. *Am J Hypertens* 10: 77-83.
146. Carreno FR, Seelaender MC (2004) Liver denervation affects hepatocyte mitochondrial fatty acid transport capacity. *Cell Biochem Funct* 22: 9-17.
147. Lastya A, Saraswati MR, Suastika K (2014) The low level of glucagon-like peptide-1 (glp-1) is a risk factor of type 2 diabetes mellitus. *BMC Res Notes* 7: 849.
148. Ben-Shlomo S, Zvibel I, Shnell M, Shlomai A, Chepurko E, et al. (2011) Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase. *J Hepatol* 54: 1214-1223.

149. Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, et al. (2013) GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE(-/-) mice. *Endocrinology* 154: 127-139.
150. Warne JP, Alemi F, Reed AS, Varonin JM, Chan H, et al. (2011) Impairment of central leptin-mediated PI3K signaling manifested as hepatic steatosis independent of hyperphagia and obesity. *Cell Metab* 14: 791-803.
151. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Nogueiras R, Seoane LM, et al. (2007) Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *Int J Obes (Lond)* 31: 371-377.
152. Shen J, Tanida M, Nijima A, Nagai K (2007) In vivo effects of leptin on autonomic nerve activity and lipolysis in rats. *Neurosci Lett* 416: 193-197.
153. Scherer T, O'Hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, et al. (2011) Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metab* 13: 183-194.
154. Scherer T, Buettner C (2011) Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 12: 235-243.
155. Coomans CP, Geerling JJ, Guigas B, van den Hoek AM, Parlevliet ET, et al. (2011) Circulating insulin stimulates fatty acid retention in white adipose tissue via KATP channel activation in the central nervous system only in insulin-sensitive mice. *J Lipid Res* 52: 1712-1722.
156. Tentolouris N, Liatis S, Katsilambros N (2006) Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1083: 129-152.
157. O'Connell TD, Jensen BC, Baker AJ, Simpson PC (2014) Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacol Rev* 66: 308-333.
158. Mancía G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, et al. (2007) The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens* 25: 909-920.
159. Moss NG, Colindres RE, Gottschalk CW (2010) Neural Control of Renal Function. *Comprehensive Physiology*: John Wiley & Sons, Inc.
160. Gosmanov AR, Smiley DD, Robalino G, Siquiera J, Khan B, et al. (2010) Effects of oral and intravenous fat load on blood pressure, endothelial function, sympathetic activity, and oxidative stress in obese healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E953-958.
161. Kalil GZ, Haynes WG (2012) Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. *Hypertens Res* 35: 4-16.
162. Landsberg L (1992) Obesity and hypertension: experimental data. *J Hypertens Suppl* 10: S195-201.
163. Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Liu X, Sigmund CD, et al. (2004) Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *J Clin Invest* 114: 652-658.
164. Pathak R, Pathak A (2012) Study of life style habits on risk of type 2 diabetes. *Int J Appl Basic Med Res* 2: 92-96.
165. Fabricatore AN (2007) Behavior therapy and cognitive-behavioral therapy of obesity: is there a difference? *J Am Diet Assoc* 107: 92-99.
166. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, et al. (2007) Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13: 803-811.

167. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, et al. (2014) 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation* 129: S102-138.
168. Phelan S, Wadden TA, Berkowitz RI, Sarwer DB, Womble LG, et al. (2007) Impact of weight loss on the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 31: 1442-1448.
169. Wing RR, Koeske R, Epstein LH, Nowalk MP, Gooding W, et al. (1987) Long-term effects of modest weight loss in type II diabetic patients. *Arch Intern Med* 147: 1749-1753.
170. Magkos F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, et al. (2016) Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab* 23: 591-601.
171. Panagiotakos DB, Georgousopoulou EN, Pitsavos C, Chrysohooou C, Skoumas I, et al. (2015) Exploring the path of Mediterranean diet on 10-year incidence of cardiovascular disease: the ATTICA study (2002-2012). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 25: 327-335.
172. Trichopoulou A, Martinez-Gonzalez MA, Tong TY, Forouhi NG, Khandelwal S, et al. (2014) Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Med* 12: 112.
173. Mancini JG, Filion KB, Atallah R, Eisenberg MJ (2016) Systematic Review of the Mediterranean Diet for Long-Term Weight Loss. *Am J Med* 129: 407-415 e404.
174. Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith H, Paddags A, et al. (2000) Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 133: 92-103.
175. Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, et al. (2003) Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 35: 1703-1709.
176. Dickinson HO, Mason JM, Nicolson DJ, Campbell F, Beyer FR, et al. (2006) Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *J Hypertens* 24: 215-233.
177. Lakka TA, Laaksonen DE (2007) Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 76-88.
178. Laaksonen DE, Lakka HM, Salonen JT, Niskanen LK, Rauramaa R, et al. (2002) Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25: 1612-1618.
179. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, et al. (2005) The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 142: 611-619.
180. Varady KA, Bhutani S, Church EC, Phillips SA (2010) Adipokine responses to acute resistance exercise in trained and untrained men. *Med Sci Sports Exerc* 42: 456-462.
181. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, et al. (2005) Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 809-814.
182. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, et al. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174.
183. De Mello WC, Danser AH (2000) Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1183-1188.

184. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, et al. (1996) Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12490-12495.
185. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G (2004) Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 94: 1211-1218.
186. Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft FC (2002) Angiotensin Blockade Prevents Type 2 Diabetes by Formation of Fat Cells. *Hypertension* 40: 609-611.
187. Reisin E, Weir MR, Falkner B, Hutchinson HG, Anzalone DA, et al. (1997) Lisinopril versus hydrochlorothiazide in obese hypertensive patients: a multicenter placebo-controlled trial. *Treatment in Obese Patients With Hypertension (TROPY) Study Group. Hypertension* 30: 140-145.
188. Donnelly R (1992) Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 11: S38-44.
189. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, et al. (2004) Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension* 43: 993-1002.
190. Lobo MD, Sobotka PA, Pathak A (2016) Interventional procedures and future drug therapy for hypertension. *Eur Heart J*.
191. Jamerson K, Weber MA, Bakris GL, Dahlof B, Pitt B, et al. (2008) Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients. *N Engl J Med* 359: 2417-2428.
192. Ripley TL, Saseen JJ (2014) beta-blockers: a review of their pharmacological and physiological diversity in hypertension. *Ann Pharmacother* 48: 723-733.
193. Messerli FH, Grossman E (2004) beta-Blockers in hypertension: is carvedilol different? *Am J Cardiol* 93: 7B-12B.
194. Pepine CJ, Handberg EM, Cooper-DeHoff RM, Marks RG, Kowey P, et al. (2003) A calcium antagonist vs a non-calcium antagonist hypertension treatment strategy for patients with coronary artery disease. The International Verapamil-Trandolapril Study (INVEST): a randomized controlled trial. *JAMA* 290: 2805-2816.
195. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, et al. (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359: 995-1003.
196. Gress TW, Nieto FJ, Shahar E, Wofford MR, Brancati FL (2000) Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis Risk in Communities Study. N Engl J Med* 342: 905-912.
197. Reisin E, Owen J (2015) Treatment: special conditions. *Metabolic syndrome: obesity and the hypertension connection. J Am Soc Hypertens* 9: 156-159; quiz 160.
198. ALLHAT (2002) Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 288: 2981-2997.
199. Rapoport MI, Hurd HF (1964) THIAZIDE-INDUCED GLUCOSE INTOLERANCE TREATED WITH POTASSIUM. *Arch Intern Med* 113: 405-408.

200. Barzilay JI, Davis BR, Cutler JA, Pressel SL, Whelton PK, et al. (2006) Fasting glucose levels and incident diabetes mellitus in older nondiabetic adults randomized to receive 3 different classes of antihypertensive treatment: a report from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Arch Intern Med* 166: 2191-2201.
201. Goldstein JL, Brown MS (1992) Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 13 Suppl B: 34-36.
202. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, et al. (2010) Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 376: 1670-1681.
203. Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J, et al. (2008) Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 371: 117-125.
204. Ridker PM, MacFadyen JG, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, et al. (2009) Number needed to treat with rosuvastatin to prevent first cardiovascular events and death among men and women with low low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein: justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin (JUPITER). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2: 616-623.
205. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, et al. (2010) Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet* 375: 735-742.
206. Waters DD, Ho JE, DeMicco DA, Breazna A, Arsenault BJ, et al. (2011) Predictors of new-onset diabetes in patients treated with atorvastatin: results from 3 large randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 57: 1535-1545.
207. Carter AA, Gomes T, Camacho X, Juurlink DN, Shah BR, et al. (2013) Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study. *BMJ* 346: f2610.
208. Liao JK (2002) Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol* 86: 5-18.
209. Meyer-Sabellek W, Brasch H (2006) Atherosclerosis, inflammation, leukocyte function and the effect of statins. *J Hypertens* 24: 2349-2351.
210. Strazzullo P, Kerry SM, Barbato A, Versiero M, D'Elia L, et al. (2007) Do statins reduce blood pressure?: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* 49: 792-798.
211. Staels B, Maes M, Zambon A (2008) Fibrates and future PPARalpha agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5: 542-553.
212. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, et al. (1987) Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317: 1237-1245.
213. Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Manttari M, et al. (1992) Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. *Circulation* 85: 37-45.
214. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, et al. (1999) Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 341: 410-418.

215. Keating GM, Croom KF (2007) Fenofibrate: a review of its use in primary dyslipidaemia, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 67: 121-153.
216. Davidson MH, Armani A, McKenney JM, Jacobson TA (2007) Safety considerations with fibrate therapy. *Am J Cardiol* 99: 3C-18C.
217. Knopp RH, Dujovne CA, Le Beaut A, Lipka LJ, Suresh R, et al. (2003) Evaluation of the efficacy, safety, and tolerability of ezetimibe in primary hypercholesterolaemia: a pooled analysis from two controlled phase III clinical studies. *Int J Clin Pract* 57: 363-368.
218. Averna M, Missault L, Vaverkova H, Farnier M, Viigimaa M, et al. (2011) Lipid-altering efficacy of switching to ezetimibe/simvastatin 10/20 mg versus rosuvastatin 10 mg in high-risk patients with and without metabolic syndrome. *Diab Vasc Dis Res* 8: 262-270.
219. Ohbu-Murayama K, Adachi H, Hirai Y, Enomoto M, Fukami A, et al. (2015) Ezetimibe combined with standard diet and exercise therapy improves insulin resistance and atherosclerotic markers in patients with metabolic syndrome. *J Diabetes Investig* 6: 325-333.
220. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, Raal FJ, Blom DJ, et al. (2015) Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* 372: 1500-1509.
221. Colhoun HM, Robinson JG, Farnier M, Cariou B, Blom D, et al. (2014) Efficacy and safety of alirocumab, a fully human PCSK9 monoclonal antibody, in high cardiovascular risk patients with poorly controlled hypercholesterolemia on maximally tolerated doses of statins: rationale and design of the ODYSSEY COMBO I and II trials. *BMC Cardiovasc Disord* 14: 121.
222. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, et al. (2015) Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* 372: 1489-1499.
223. Bricca G, Dontenwill M, Molines A, Feldman J, Belcourt A, et al. (1988) Evidence for the existence of a homogeneous population of imidazoline receptors in the human brainstem. *Eur J Pharmacol* 150: 401-402.
224. Bricca G, Grenay H, Zhang J, Dontenwill M, Stutzmann J, et al. (1994) Human brain imidazoline receptors: further characterization with [3H]clonidine. *Eur J Pharmacol* 266: 25-33.
225. Smith KL, Roche M, Jessop DS, Finn DP (2009) The effects of synthetic and endogenous imidazoline binding site ligands on neuronal activity in discrete brain regions of naive and restraint-stressed rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 19: 371-380.
226. Bektas N, Nemutlu D, Arslan R (2015) The imidazoline receptors and ligands in pain modulation. *Indian J Pharmacol* 47: 472-478.
227. Lee JP, Chen W, Wu HT, Lin KC, Cheng JT (2011) Metformin can activate imidazoline I-2 receptors to lower plasma glucose in type 1-like diabetic rats. *Horm Metab Res* 43: 26-30.
228. Chan SL, Brown CA, Scarpello KE, Morgan NG (1994) The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I1- and I2-sites. *British Journal of Pharmacology* 112: 1065-1070.
229. Squires PE, Hills CE, Rogers GJ, Garland P, Farley SR, et al. (2004) The putative imidazoline receptor agonist, harmaline, promotes intracellular calcium mobilisation in pancreatic beta-cells. *Eur J Pharmacol* 501: 31-39.
230. Molderings GJ, Gothert M (1998) Presynaptic imidazoline receptors mediate inhibition of noradrenaline release from sympathetic nerves in rat blood vessels. *Fundam Clin Pharmacol* 12: 388-397.

231. Wang LY, Ku PM, Chen SH, Chen LJ, Yu YM, et al. (2013) Characterization of the Specificity of Imidazoline I-1 Receptor Antibody for Subtype of Imidazoline Receptors In Vitro. *Horm Metab Res* 45: 485-489.
232. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J (1984) Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 232-236.
233. Regunathan S, Reis DJ (1996) Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 511-544.
234. Ernsberger P, Giuliano R, Willette RN, Reis DJ (1990) Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 408-418.
235. Chan HL, de Silva HJ, Leung NW, Lim SG, Farrell GC (2007) How should we manage patients with non-alcoholic fatty liver disease in 2007? *J Gastroenterol Hepatol* 22: 801-808.
236. Bousquet P, Bruban V, Schann S, Greney H, Ehrhardt JD, et al. (1999) Participation of imidazoline receptors and alpha(2)-adrenoceptors in the central hypotensive effects of imidazoline-like drugs. *Ann N Y Acad Sci* 881: 272-278.
237. Reis DJ (1996) Neurons and Receptors in the Rostroventrolateral Medulla Mediating the Antihypertensive Actions of Drugs Acting at Imidazoline Receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 27: S11-S18.
238. Ernsberger P, Graves ME, Graff LM, Zakieh N, Nguyen P, et al. (1995) I1-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci* 763: 22-42.
239. Heemskerk FM, Dontenwill M, Greney H, Vonthron C, Bousquet P (1998) Evidence for the existence of imidazoline-specific binding sites in synaptosomal plasma membranes of the bovine brainstem. *J Neurochem* 71: 2193-2202.
240. Separovic D, Kester M, Ernsberger P (1996) Coupling of I1-imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Mol Pharmacol* 49: 668-675.
241. Ernsberger P, Friedman JE, Koletsky RJ (1997) The I1-imidazoline receptor: from binding site to therapeutic target in cardiovascular disease. *J Hypertens Suppl* 15: S9-23.
242. Greney H, Ronde P, Magnier C, Maranca F, Rascente C, et al. (2000) Coupling of I(1) imidazoline receptors to the cAMP pathway: studies with a highly selective ligand, benazoline. *Mol Pharmacol* 57: 1142-1151.
243. Piletz JE, Wang G, Zhu H (2003) Cell signaling by imidazoline-1 receptor candidate, IRAS, and the nischarin homologue. *Ann N Y Acad Sci* 1009: 392-399.
244. Zhang L, Zhao T-Y, Hou N, Teng Y, Cheng X, et al. (2013) Generation and Primary Phenotypes of Imidazoline Receptor Antisera-Selected (IRAS) Knockout Mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19: 978-981.
245. Head GA, Mayorov DN (2006) Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4: 17-32.
246. Zhang J, Abdel-Rahman AA (2008) Inhibition of nischarin expression attenuates rilmenidine-evoked hypotension and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 production in the rostral ventrolateral medulla of rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 72-78.
247. Edwards LP, Brown-Bryan TA, McLean L, Ernsberger P (2012) Pharmacological properties of the central antihypertensive agent, moxonidine. *Cardiovasc Ther* 30: 199-208.



248. Jacob S, Klimm HJ, Rett K, Helsberg K, Haring HU, et al. (2004) Effects of moxonidine vs. metoprolol on blood pressure and metabolic control in hypertensive subjects with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112: 315-322.
249. Fellmann L, Regnault V, Grenay H, Gasparik V, Muscat A, et al. (2013) A new pyrroline compound selective for I1-imidazoline receptors improves metabolic syndrome in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 346: 370-380.
250. Tsutsumi K, Hagi A, Inoue Y (2001) The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol Pharm Bull* 24: 579-581.
251. Plentz, Palagani, Wiedemann, Diekmann, Glage, et al. (2012) Islet microarchitecture and glucose transporter expression of the pancreas of the marmoset monkey display similarities to the human. *Islets* 4: 123-129.
252. Bremer, Stanhope, Graham, Cummings, Wang, et al. (2011) Fructose-fed rhesus monkeys: A nonhuman primate model of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. *Clin Transl Sci* 4: 243-252.
253. Tardif SD, Power ML, Ross CN, Rutherford JN, Layne-Colon DG, et al. (2009) Characterization of obese phenotypes in a small nonhuman primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)* 17: 1499-1505.
254. Tardif SD, Mansfield KG, Ratnam R, Ross CN, Ziegler TE (2011) The marmoset as a model of aging and age-related diseases. *ILAR J* 52: 54-65.
255. Wachtman LM, Kramer JA, Miller AD, Hachey AM, Curran EH, et al. (2011) Differential contribution of dietary fat and monosaccharide to metabolic syndrome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)* 19: 1145-1156.
256. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002) Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 911-922.
257. Eisenberg S (1984) High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 25: 1017-1058.
258. Inazu A, Jiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, et al. (1994) Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *Journal of Clinical Investigation* 94: 1872-1882.
259. Corsetti JP, Sparks JD, Peterson RG, Smith RL, Sparks CE (2000) Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis* 148: 231-241.
260. Bergen WG, Mersmann HJ (2005) Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J Nutr* 135: 2499-2502.
261. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E (2007) Animal models of obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1: 55-61.
262. Ziegler TE, Sosa ME, Peterson LJ, Colman RJ (2013) Using Snacks High in Fat and Protein to Improve Glucoregulatory Function in Adolescent Male Marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52: 756-762.
263. Crook D, Weisgraber KH, Boyles JK, Mahley RW (1990) Isolation and characterization of plasma lipoproteins of common marmoset monkey. Comparison of effects of control and atherogenic diets. *Arteriosclerosis* 10: 633-647.
264. Bousquet P, EHRHARDT JD, FELLMANN L, GASPARIK V, GRENEY H, et al. (2012) Novel amino-pyrroline derivatives, and use thereof in the prevention and/or treatment of metabolic syndrome. Google Patents.

265. Gasparik V, Grenay H, Schann S, Feldman J, Fellmann L, et al. (2015) Synthesis and biological evaluation of 2-aryliminopyrrolidines as selective ligands for I1 imidazoline receptors: discovery of new sympatho-inhibitory hypotensive agents with potential beneficial effects in metabolic syndrome. *J Med Chem* 58: 878-887.
266. Schann S, Bruban V, Pompermayer K, Feldman J, Pfeiffer B, et al. (2001) Synthesis and biological evaluation of pyrrolic isosteres of rilmenidine. Discovery of cis-/trans-dicyclopropylmethyl-(4,5-dimethyl-4,5-dihydro-3H-pyrrol-2-yl)-amine (LNP 509), an I1 imidazoline receptor selective ligand with hypotensive activity. *J Med Chem* 44: 1588-1593.
267. Schann S, Grenay H, Gasparik V, Dontenwill M, Rascente C, et al. (2012) Methylation of imidazoline related compounds leads to loss of alpha(2)-adrenoceptor affinity. Synthesis and biological evaluation of selective I(1) imidazoline receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 20: 4710-4715.
268. Weiss M, Bouchoucha S, Aiad F, Ayme-Dietrich E, Dali-Youcef N, et al. (2015) Imidazoline-like drugs improve insulin sensitivity through peripheral stimulation of adiponectin and AMPK pathways in a rat model of glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E95-104.
269. Phillips KA, Bales KL, Capitanio JP, Conley A, Czoty PW, et al. (2014) Why Primate Models Matter. *Am J Primatol* 76: 801-827.
270. de Koning EJP, Bodkin NL, Hansen BC, Clark A (1993) Diabetes mellitus in *Macaca mulatta* monkeys is characterised by islet amyloidosis and reduction in beta-cell population. *Diabetologia* 36: 378-384.
271. Tigno XT, Gerzanich G, Hansen BC (2004) Age-Related Changes in Metabolic Parameters of Nonhuman Primates. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59: 1081-1088.
272. Hansen BC, Jen KL, Schwartz J (1988) Changes in insulin responses and binding in adipocytes from monkeys with obesity progressing to diabetes. *Int J Obes* 12: 433-443.
273. Huff JL, Barry PA (2003) B-Virus (Cercopithecine herpesvirus 1) Infection in Humans and Macaques: Potential for Zoonotic Disease. *Emerging Infectious Diseases* 9: 246-250.
274. Tardif, Power, Ross, Rutherford, Layne-Colon, et al. (2009) Characterization of Obese Phenotypes in a small Nonhuman Primate, the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)* 17.
275. Wachtman, Kramer, Miller, Hachey, Curran, et al. Differential contribution of dietary fat and monosaccharide to metabolic syndrome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).
276. Arca M, Montali A, Valiante S, Campagna F, Pigna G, et al. (2007) Usefulness of atherogenic dyslipidemia for predicting cardiovascular risk in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Am J Cardiol* 100: 1511-1516.
277. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S (2001) Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104: 2746-2753.
278. LaRosa JC, He J, Vupputuri S (1999) Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 282: 2340-2346.
279. Wilson PW (1990) High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 66: 7A-10A.
280. Huxley RR, Barzi F, Lam TH, Czernichow S, Fang X, et al. (2011) Isolated low levels of high-density lipoprotein cholesterol are associated with an increased risk of coronary

- heart disease: an individual participant data meta-analysis of 23 studies in the Asia-Pacific region. *Circulation* 124: 2056-2064.
281. Brown BG, Zhao XQ (2008) Nicotinic acid, alone and in combinations, for reduction of cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 101: 58B-62B.
  282. Becker-Zimmermann K, Berger M, Berchtold P, Gries FA, Herberg L, et al. (1982) Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats. *Diabetologia* 22: 468-474.
  283. Ostocka-Kmiecik A, Mikhailidis DP, Nicholls SJ, Davidson M, Rysz J, et al. (2012) Dysfunctional HDL: A novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? *Progress in Lipid Research* 51: 314-324.
  284. Rega-Kaun G, Kaun C, Wojta J (2013) More than a simple storage organ: adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 110: 641-650.
  285. Kwon H, Pessin JE (2013) Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 71.
  286. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G (2003) Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Diabetes* 52: 1779-1785.
  287. Gu W, Li Y (2012) The therapeutic potential of the adiponectin pathway. *BioDrugs* 26: 1-8.
  288. Fisman EZ, Tenenbaum A (2014) Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol* 13: 103.
  289. Hardie DG, Carling D (1997) The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246: 259-273.
  290. Sookoian S, Pirola CJ (2011) Metabolic syndrome: from the genetics to the pathophysiology. *Curr Hypertens Rep* 13: 149-157.
  291. Harris MF (2013) The metabolic syndrome. *Aust Fam Physician* 42: 524-527.
  292. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546: 113-120.
  293. Hardie DG, Hawley SA (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23: 1112-1119.
  294. Lim CT, Kola B, Korbonits M (2010) AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of Molecular Endocrinology* 44: 87-97.
  295. Pold R, Jensen LS, Jessen N, Buhl ES, Schmitz O, et al. (2005) Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. *Diabetes* 54: 928-934.
  296. Yu X, McCorkle S, Wang M, Lee Y, Li J, et al. (2004) Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 47: 2012-2021.
  297. Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, Rychlicki C, Agostinelli L, De Minicis S, et al. (2011) Glucagon-like peptide-1 receptor activation stimulates hepatic lipid oxidation and restores hepatic signalling alteration induced by a high-fat diet in nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 31: 1285-1297.
  298. Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, Schertzer JD, Chevtzoff C, et al. (2012) The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* 336: 918-922.
  299. Buhl ES, Jessen N, Pold R, Ledet T, Flyvbjerg A, et al. (2002) Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51: 2199-2206.

300. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG (2002) The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 51: 2420-2425.
301. Bhaskar V, Lau A, Goldfine ID, Narasimha AJ, Gross LM, et al. (2013) XMetA, an allosteric monoclonal antibody to the insulin receptor, improves glycaemic control in mice with diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab* 15: 272-275.
302. Bhaskar V, Goldfine ID, Bedinger DH, Lau A, Kuan HF, et al. (2012) A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control. *Diabetes* 61: 1263-1271.
303. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
304. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, et al. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15: 2099-2111.
305. Smith U (2002) Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 897-904.
306. Kumar N, Dey CS (2002) Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol* 137: 329-336.
307. Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 307-318.
308. Krebs M, Brehm A, Krssak M, Anderwald C, Bernroider E, et al. (2003) Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* 46: 917-925.
309. Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A (2005) Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 146: 1328-1337.
310. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J (2008) S6K Directly Phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to Promote Insulin Resistance in Response to TNF- $\alpha$  Signaling through IKK2. *Journal of Biological Chemistry* 283: 35375-35382.
311. Shum M, Bellmann K, St-Pierre P, Marette A (2016) Pharmacological inhibition of S6K1 increases glucose metabolism and Akt signalling in vitro and in diet-induced obese mice. *Diabetologia* 59: 592-603.
312. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI (2014) The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 510: 84-91.
313. Boden G (1997) Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes* 46: 3-10.
314. Velliquette RA, Kossover R, Previs SF, Ernsberger P (2006) Lipid-lowering actions of imidazoline antihypertensive agents in metabolic syndrome X. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372: 300-312.

## Maud WEISS

### **Etudes des effets cardio-métaboliques d'une aminopyrrolone sympatho-inhibitrice dans un modèle de syndrome métabolique chez le primate non humain. Mise en évidence des mécanismes d'action impliqués.**

#### Résumé

Le syndrome métabolique (SMet) est caractérisé par la conjonction de troubles cardiovasculaires et métaboliques. Une hyperactivité du système nerveux sympathique pourrait être impliquée dans le développement du SMet. Les récepteurs I<sub>1</sub> des imidazolines (RI1) identifiés par notre équipe ont une action sympatho-inhibitrice et représentent donc une cible de choix pour le développement de nouveaux médicaments. Dans notre laboratoire, des études de pharmaco-chimie ont permis de synthétiser une série d'aminopyrrolines sélectives des RI1. Des études préliminaires nous ont permis de sélectionner un chef de file, le LNP599, qui diminue la pression artérielle et induit des effets métaboliques bénéfiques. Des effets périphériques additionnels liés à l'adiponectine ont également été remarqués. Le premier objectif de ma thèse a consisté au développement d'un modèle original de SMet chez le marmoset pour y tester l'intérêt thérapeutique du LNP599. Le second objectif fut d'étudier les effets périphériques potentiels des ligands RI1. Ces études ont été menées chez le rat âgé, un modèle d'insulino-résistance modérée, et sur les cellules hépatocytaires HepG2.

Mots clés : syndrome métabolique, système nerveux sympathique, aminopyrrolines, adiponectine

#### Résumé en anglais

Metabolic syndrome (MetS) can be defined as a combination of cardiovascular and metabolic disorders. Sympathetic nervous system overactivity may be involved in the development of MetS. I<sub>1</sub> imidazoline receptors (I<sub>1</sub>R), identified by our team, have a sympatho-inhibitory action and therefore, represent a target for developing new drugs. In our laboratory, pharmaco-chemical studies led to the synthesis of I<sub>1</sub>R selectives aminopyrrolines. Preliminary studies allowed us to select a leader, the LNP599, which lowers blood pressure and induces beneficial metabolic effects. Additional peripheral effects related to adiponectin were also noted. The first aim of my thesis consisted in the development of an original model of MetS in marmoset in order to test the therapeutic benefit of LNP599. The second objective was to study the potential effects of peripheral I<sub>1</sub>R ligands. These studies were conducted in elderly rats, a model of moderate insulin resistance, and in the HepG2 cells.

Key words: metabolic syndrome, sympathetic nervous system, aminopyrrolines, adiponectin