

Université Bordeaux Segalen

Année 2012

Numéro 1919

THESE

Pour le

THESE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 31 Mai 2012

Par

Blandine GATTA

Système Endocannabinoïde et Pathologies Métaboliques Chez l'Homme

Sous la direction du Docteur Daniela COTA

Membres du Jury

Mme Sophie LAYE, Directeur de Recherche,

M. Bruno ESTOUR, Professeur,

M. Pierre GOURDY, Professeur,

M. Gilles MITHIEUX, Directeur de Recherche,

M. Pier Vincenzo PIAZZA, Directeur de Recherche,

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier

Monsieur le Professeur Bruno Estour

C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Vous avez aussi accepté de donner de votre temps pour être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Pierre Gourdy

Vous me faites l'honneur de siéger dans mon jury de thèse et vous avez accepté de donner de votre temps pour être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Gilles Mithieux

Vous avez accepté avec enthousiasme d'être membre de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Madame le Docteur Sophie Laye

Vous avez été ma tutrice et aujourd'hui vous avez accepté d'être membre et présidente du jury de ma thèse. Soyez en grandement remerciée.

Monsieur le Docteur Pier Vincenzo Piazza

Vous m'avez accueillie au sein de l'unité U862 pour ma thèse. Etre étudiant en thèse au sein de cette unité est, je le sais, un privilège. Veuillez trouver ici l'expression de mes très sincères remerciements.

Madame le Docteur Daniela Cota

Tu m'as accueillie dans l'équipe que tu créais il y a quatre ans. Je veux te dire aujourd'hui un très grand MERCI pour ton encadrement tout au long de ces quatre années, pour tes connaissances, ta rigueur, ta patience. Etre membre de ton équipe a été pour moi une immense chance.

Monsieur le Professeur Antoine Tabarin

Cette thèse est l'occasion officielle de vous remercier très sincèrement et très profondément pour votre enseignement, vos conseils, votre bienveillance tout au long de mon parcours depuis... le DCEM1. Je suis fier d'être votre élève.

Madame le Docteur Isabelle Matias

En dehors des « *equal contribution* » de nos publications, ce travail est aussi le tien puisque c'est toi qui, en plus de notre collaboration sur les études, a établi le dosage des endocannabinoïdes à l'unité U862. Trouve ici, Isabelle, l'expression de mes sincères remerciements.

Madame Ilaria Belluomo

Merci de nous avoir rejoint dans cette collaboration.

Monsieur le Professeur Roger Marthan

Vous m'avez accordé avec bienveillance une 4ème année de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes très sincères remerciements.

Monsieur Thierry Leste-Lasserre et Madame Samantha James

Pour m'avoir fait découvrir la PCR « en vrai », un grand merci.

Messieurs les Professeurs Henri Gin et Vincent Rigalleau

Soyez très sincèrement remerciés pour votre collaboration dans le cadre de ce travail mais aussi pour vos conseils, enseignements, encouragements tout au long de mon parcours.

Madame le Docteur Agnès Georges et Monsieur le Docteur Benoit Corcuff

Vous avez toujours été là pour les dosages ELISA, les devis mille et une fois redemandés, les questions techniques, les encouragements...un grand merci.

Monsieur le Professeur Denis Colet

Vous assurez la prise en charge chirurgicale des patients. Surtout, vous avez toujours montré beaucoup d'intérêt et d'enthousiasme pour nos travaux. Pour tout cela, je tiens à vous remercier.

Mesdames Françoise Lillet, Maryvonne Diallo, Isabelle Barcos, Fabienne Gheysen

J'ai toujours trouvé une écoute attentive auprès de vous et toujours reçu des réponses positives et enthousiastes lors de la mise en place des études. Ce manuscrit est l'occasion de remerciements très sincères.

Mesdames les Infirmières et Aides Soignantes des services d'Endocrinologie et de Diabétologie

C'est un immense merci très officiel que je souhaite vous adresser ici.

Mesdames Valérie Gey, Geneviève Ferrandi, Brigitte Regnier, Audrey Ville, Florence Garuz, Delphine Sury

Pour les commandes de pâtes, les calculs de calories, les grammes de pommes épluchées et tout le reste, à vous aussi mesdames, un immense merci.

Mesdames les techniciennes du service de Médecine Nucléaire

Merci pour votre disponibilité, votre accueil et votre gentillesse.

Monsieur le Docteur Paul Perez

La collaboration et les échanges que nous avons eus en particulier pour l'étude des effets du court-circuit gastrique ont toujours été très enrichissants. Soyez en très sincèrement remercié.

Madame Julie Boussuge-Roze, Monsieur Yann Ruter, Monsieur Julien Jeanpetit

Vous êtes un soutien important pour la recherche clinique. Soyez ici très sincèrement remerciés.

Madame le Docteur Valérie Latrabe, Monsieur le Professeur Michel Montaudon, Monsieur le Docteur Mathieu Lederlin, Monsieur Le Docteur Olivier Corneloup

Vous avez toujours répondu présents pour les rendez vous de scanner, pris parfois à la dernière minute...Un grand merci à vous.

Madame Elisa Maury

Un très grand merci pour notre collaboration pour Diabendo.

Monsieur Nicolas Andreu et Mademoiselle Sarah Cazenave

Ce manuscrit est l'occasion de vous remercier publiquement pour votre aide si précieuse.

Madame le Docteur Roselyne Baudoin

Grâce à toi, l'étude sur l'effet du court circuit gastrique continue, malgré mon départ à Maastricht. Un grand merci.

Monsieur Loic Valier, Madame le Docteur Caterina Catania, Madame Samantha James , Madame le Docteur Elke Binder, Madame le Docteur Caroline André, Madame Melissa Elie, Madame Magalie Haissaguerre, Monsieur le Docteur Olivier Doumy, Monsieur le Professeur Bruno Aouizerate

Vous retrouver au laboratoire a toujours été un grand plaisir.

Monsieur le Docteur Didier Chapelot

Vous avez encadré mes premiers pas dans le domaine de la recherche clinique et du comportement alimentaire lors de mon DEA. Je vous remercie très sincèrement.

Mes remerciements vont aussi au CHU de Bordeaux, à la Société Française d'Endocrinologie, et à la Société Française de Diabétologie pour leur soutien financier.

Résumé

Le système endocannabinoïde (SEC) est un système clé de la régulation de la balance énergétique. Les rares études réalisées chez l'Homme concluent à une augmentation des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes, anandamide (AEA) et 2-arachidonoylglycerol (2-AG), chez les sujets obèses ou diabétiques de type 2. Cependant plusieurs questions restent posées et cette thèse s'est spécifiquement intéressée : i) à l'existence d'une cinétique prandiale et au rôle des endocannabinoïdes circulants par rapport à la prise alimentaire, ii) aux effets d'une perte de poids obtenue par court-circuit gastrique sur ces concentrations et iii) aux liens physiopathologiques entre insulino-résistance et SEC. Enfin, nous avons tenté de développer un outil non invasif pour faciliter l'étude du SEC chez l'Homme.

Dans la 1^{ère} étude, nous avons mis en évidence pour la première fois une augmentation préprandiale de l'AEA indépendante du poids. Ceci suggère que l'AEA plasmatique pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la prise alimentaire chez l'Homme. De façon intéressante, la réduction post prandiale de l'AEA est éteinte chez les sujets obèses insulino-résistants, ce qui peut créer un cercle vicieux vis à vis de l'obésité. Dans la 2^{ème} étude, des résultats préliminaires montrent qu'une même perte de poids obtenue par court-circuit gastrique ou par règles hygiéno-diététiques modifie différemment les concentrations plasmatiques d'AEA qui tendent à augmenter après court-circuit gastrique alors qu'elles ne sont pas modifiées après règles hygiéno-diététiques. Ainsi, le court-circuit gastrique pourrait directement affecter le fonctionnement du SEC localisé au niveau du tractus gastro-intestinal. Dans la 3^{ème} étude, 72 heures de régime hypoglycémique permettent de diminuer significativement la glycémie à jeun et la résistance à l'insuline de 8 sujets diabétiques de type 2, mais pas les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes, qui ne sont par ailleurs pas modifiées chez ces sujets en fonction du statut nutritionnel. Enfin, nous avons pu déterminer les concentrations des endocannabinoïdes dans la salive humaine, qui sont plus élevées chez les sujets obèses par rapport aux normopondéraux, avec une diminution de l'AEA salivaire associée à la perte de poids, mais sans variation en fonction de la prise alimentaire. La salive pourrait donc constituer un outil non invasif pour l'étude du SEC chez l'Homme.

Ainsi, notre travail confirme les liens entre SEC et pathologies métaboliques chez l'Homme. Nos résultats suggèrent en particulier un rôle physiologique de l'AEA dans la prise alimentaire ainsi que l'importance potentielle du SEC du tractus gastro-intestinal. Nous confirmons la dérégulation statique et dynamique du SEC dans la situation de diabète de type 2. Enfin nous développons un nouvel outil pour l'exploration du SEC chez l'Homme. Nos résultats sont importants car la meilleure connaissance des systèmes impliqués dans la régulation de la balance énergétique est nécessaire pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces contre l'obésité et ses pathologies associées.

Mots clé : Système endocannabinoïde, obésité, insulino-résistance, court-circuit gastrique, salive

Abstract

The endocannabinoid system (ECS) is a key system for the regulation of energy balance. Only few studies have been so far carried out in humans but they all lead to conclude that obese subjects have higher plasma fasting levels of the 2 major endocannabinoids, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). However, many questions concerning the role of the ECS in the physiopathology of obesity in humans remain still unanswered. This thesis has therefore attempted to address some of these questions by investigating i) the changes of plasma endocannabinoids in response to food intake, ii) the effect of weight loss induced by gastric bypass or lifestyle intervention on these plasma levels and iii) the potential link between insulin resistance and circulating endocannabinoids. Lastly, we have also tested the possibility to develop a non-invasive tool to ease the investigation of the ECS in humans.

In the 1st study, we have described for the first time the existence of a pre-prandial peak in plasma AEA, which is independent of body weight. This evidence suggests that circulating AEA levels might work as a meal initiator factor in humans. Importantly, the AEA postprandial decrease is blunted in obese insulin resistant subjects and might therefore favor the persistence of the obese phenotype. In our 2nd study, preliminary results suggest that the same body weight loss obtained through gastric-bypass or lifestyle intervention differently affects plasma AEA levels. In particular, while AEA tend to increase in subjects who have undergone gastric bypass, no changes are observed after a comparable weight loss induced by lifestyle intervention. Thus, a possibility is that the bypass might directly affect the function of the ECS localized within the gastrointestinal tract. In our 3rd study, which was carried out on 8 type 2 diabetic patients, we have shown that 72 hours of a low carbohydrate diet significantly decreases glycaemia and insulin resistance, without affecting the levels and the kinetic of circulating endocannabinoids. Lastly, we demonstrated that endocannabinoids are reliably measured in saliva. Salivary endocannabinoids are higher in obese as compared to normal weight subjects. Body weight loss significantly decreases salivary AEA, while the consumption of a meal does not influence salivary endocannabinoids levels.

Altogether our studies confirm the association between ECS deregulation and metabolic disease in humans. In particular, we have demonstrated that plasma AEA might have a physiological role in the regulation of human feeding behavior, and have hinted the potential relevance of the gastro-intestinal ECS in our studies on gastric-bypass patients. We have also shown that in type 2 diabetes, there is a flattening of the kinetics of circulating endocannabinoids. Finally, we have shown that measurement of salivary endocannabinoids is reliable and might be of clinical value. These findings extend our knowledge on one of the systems majorly implicated in energy balance regulation. Such knowledge is a necessary step towards the development of novel therapeutic strategies needed to halt obesity and metabolic disease.

Key words: Endocannabinoid system, obesity, insulin resistance, gastric bypass, saliva

Listes des publications et communications

Publications

Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity

Gatta-Cherifi B *, Matias I *, Vallée M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV and Cota D.

*Equal contribution

Publié dans *International Journal of obesity*

Endocannabinoids measurement in human saliva as a potential biomarker of obesity

Matias I *, Gatta-Cherifi B*, Tabarin A, Clark S, Leste-Lasserre T, Marsicano G, Piazza PV, Cota D.

*Equal contribution

Soumis à *Diabetologia*

Communications orales

Effet de la prise alimentaire sur les concentrations plasmatiques et salivaires d'endocannabinoides

Gatta-Cherifi B *, Matias I *, Vallée M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV and Cota D.

27^{ème} congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Deauville, Octobre 2010.

Synergistic postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity

Gatta-Cherifi B *, Matias I *, Vallée M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV and Cota D.

Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior, Clearwater, Florida, July 2011

Communications affichées

A new biomarker for human obesity : salivary endocannabinoids.

Matias I *, Gatta-Cherifi B*, Tabarin A, Clark S, Leste-Lasserre T, Marsicano G, Piazza PV, Cota D

Hot topic session, European Congress of Obesity, Lyon, France, May 2012.

Liste des abréviations utilisées

AEA : Anandamide

2-AG : 2 Arachidonoyglycérol

ASAT : Aspartate aminotransférase,

ALAT Alanine aminotransférase

CB₁ : Récepteurs des cannabinoïdes de type 1

CB₂: Récepteurs des cannabinoïdes de type 2

CCG : court-circuit gastrique

CCK: Cholécystokinine

DAG : 1,2-diacylglycérol

DER : Dépense énergétique de repos

DEXA : Dual Energy X-Ray Absortimetry

FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase

γGT : Gammaglutamyl transférase

GLP-1 : Glucagon-like peptide 1

HbA₁C : hémoglobine glycosylée

HOMA : Homeostasis Model Assesment

IMC : Indice de Masse Corporelle

MAGL: *Monoacylglycerol lipase*

OEA : Oléoyléthanolamide

PEA : Palmitoyléthanolamide

PYY : Peptide YY

QR : Quotient respiratoire

SEC : Système endocannabinoïde

TFEQ : Three Factor Eating Questionnaire

THC : Tétrahydrocannabinol

VO₂ : Consommation d'O₂

VCO₂ : Production de CO₂

INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE 1 : EXISTE-T-IL UNE CINETIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES ENDOCANNABINOÏDES EN FONCTION DE LA PRISE ALIMENTAIRE ? SI OUI, CETTE CINETIQUE EST ELLE CONSERVEE CHEZ LE SUJET OBESE ?	29
INTRODUCTION	29
ETAT DE LA QUESTION	29
QUESTION POSEE	30
PATIENTS ET METHODES	31
RESULTATS	34
DISCUSSION ET CONCLUSION	39
CHAPITRE 2 : QUEL EST L'EFFET D'UNE PERTE DE POIDS, OBTENUE PAR COURT-CIRCUIT GASTRIQUE OU PAR MESURES HYGIENO-DIETETIQUES SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES ENDOCANNABINOÏDES ?.....	43
INTRODUCTION	43
ETAT DE LA QUESTION	43
QUESTION POSEE	47
PATIENTS ET METHODES	47
RESULTATS	53
DISCUSSION ET CONCLUSION	69
CHAPITRE 3 : UNE DIMINUTION AIGUË DE LA GLYCEMIE ET DE LA RESISTANCE A L'INSULINE CHEZ DES SUJETS DIABETIQUES DE TYPE 2 MODIFIE-T-ELLE LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES ENDOCANNABINOÏDES ?.....	74
INTRODUCTION	74
ETAT DE LA QUESTION	74
QUESTION POSEE	78
PATIENTS ET METHODES	78
RESULTATS	83
DISCUSSION ET CONCLUSION	88
CHAPITRE 4 : LA DETERMINATION DES CONCENTRATIONS DES ENDOCANNABINOÏDES DANS LA SALIVE EST-ELLE REALISABLE ? SI OUI, PEUT-ELLE CONSTITUER UN OUTIL NON INVASIF INTERESSANT POUR L'ETUDE DU SEC ?	94
INTRODUCTION	94
ETAT DE LA QUESTION	94
QUESTION POSEE	98
PATIENTS ET METHODES	98

RESULTATS	102
DISCUSSION ET CONCLUSION	111
CONCLUSION GENERALE	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
ANNEXES	131

Introduction générale

La prévalence de l'obésité, définie par un indice de masse corporelle (IMC) > 30kg/m², ne cesse d'augmenter dans les pays occidentaux. Les Etats Unis d'Amérique sont particulièrement concernés puisque les derniers chiffres publiés rapportent d'une prévalence atteignant ou dépassant 30% dans plusieurs états (1, 2). La France n'est cependant pas épargnée. Les enquêtes épidémiologiques nationales OBépi mettent en évidence que la prévalence de l'obésité dans la population adulte française est passée de 8,7% en 1997 à 14,5 % en 2009. Ce dernier état des lieux de 2009 met par ailleurs en évidence que l'on devient obèse de plus en plus jeune, mais aussi que la population des plus de 65 ans est maintenant très concernée, avec une prévalence supérieure à la moyenne nationale. Enfin, cette augmentation de la prévalence de l'obésité est accompagnée d'une augmentation du tour de taille, c'est à dire d'une augmentation de la prévalence de l'obésité abdominale, facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires et métaboliques (3). Ainsi, l'obésité n'est plus considérée comme un signe de richesse, ni même un simple inesthétisme. Elle est aujourd'hui considérée comme une maladie et représente un facteur de risque non seulement pour les maladies métaboliques et cardiovasculaires, comme le diabète de type 2, les dyslipidémies, l'hypertension artérielle ou les coronaropathies mais aussi pour de nombreux types de cancers (4). Enfin, l'obésité représente un cout économique et social croissant pour nos sociétés (*World Health Organization, obesity and overweight fact sheet N3111 : update March 2011, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>*).

L'obésité est donc un réel fléau et ceci est d'autant plus vrai que les traitements pharmacologiques efficaces manquent. En 2011, une seule molécule, l'orlistat, un inhibiteur partiel des lipases pancréatiques, conserve l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de cette maladie (5). La découverte de nouvelles cibles pour le développement de nouveaux traitements pharmacologiques est une urgence. Il nécessite cependant une connaissance de la maladie et surtout des systèmes biologiques impliqués

dans la régulation de la balance énergétique et dans la physiopathologie de l'obésité et de complications métaboliques.

Dans un environnement donné, le poids corporel est maintenu de façon remarquablement stable durant la vie adulte malgré un turnover de calories relativement important. Il existe ainsi des mécanismes complexes et efficaces permettant d'ajuster les dépenses énergétiques aux apports caloriques.

Dans le cerveau, des systèmes complexes et intégrés reçoivent et intègrent des informations sur le type et la quantité de nutriments ingérés par l'intermédiaire de signaux périphériques, coordonnent l'utilisation des substrats énergétiques au niveau des différents organes, «monitorent» les réserves d'énergie au niveau du tissu adipeux et répondent enfin aux messages externes informant de la disponibilité et de la palatabilité des aliments, régulant en conséquence la prise alimentaire.

Deux catégories majeures de signaux provenant de la périphérie ont un rôle important au niveau des circuits du système nerveux central contrôlant la balance énergétique. La première catégorie de ces signaux est constituée par des signaux dits d'adiposité, qui incluent la leptine et l'insuline, et qui sont capables d'informer le cerveau des niveaux de réserve d'énergie du corps (6). Ces signaux d'adiposité sont capables d'accéder directement aux structures clés du cerveau réglant la prise alimentaire et le poids et d'influencer ainsi l'équilibre énergétique. La seconde catégorie de signaux est représentée par les signaux de satiété qui correspondent à des hormones produites au niveau du tractus gastro-intestinal, comme la cholécystokinine (CCK), le *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) et le peptide YY (PYY), dont les concentrations augmentent au cours du repas et participent à l'interruption du repas et à l'établissement de la satiété (7). Parmi les hormones gastro-intestinales, la ghréline est le seul exemple d'hormone avec une action orexigène. L'administration de ghréline stimule la prise alimentaire chez l'animal et chez l'Homme (8). Les concentrations plasmatiques de ghréline augmentent avec le jeûne et diminuent avec la prise alimentaire, suggérant qu'elle peut avoir un rôle d'initiateur de la prise alimentaire (9, 10).

De récents travaux ont aussi illustré le rôle des nutriments et plus particulièrement du glucose, des acides gras à longue chaîne ou encore de certains acides aminés dans la régulation de la prise alimentaire et de l'équilibre énergétique (11, 12).

Les endocannabinoïdes sont des molécules dérivées des lipides maintenant bien identifiés qui sont capables de moduler la balance énergétique.

L'effet stimulant l'appétit de la marijuana (*Cannabis sativa*, principal composé du cannabis), était en effet connu de longue date mais il n'a été réellement pris en considération qu'après la découverte du système endocannabinoïde (SEC), la cible endogène de l'action de la marijuana (13).

Le SEC comprend :

- Des récepteurs spécifiques, dont 2, CB₁ et CB₂, ont été identifiés et clonés en 1990 et 1993 respectivement (14, 15). CB₁ et CB₂ sont des récepteurs transmembranaires à 7 domaines couplés aux protéines G. Le récepteur CB₁, le plus exprimé au niveau cérébral, est particulièrement impliqué dans la régulation de la balance énergétique. En plus de son expression au niveau des structures cérébrales impliquées dans la prise alimentaire et la récompense, il est aussi exprimé au niveau périphérique et plus spécifiquement dans le tissu adipeux, foie, pancréas endocrine, tractus gastro-intestinal, muscle squelettique (16, 17).
- Des ligands endogènes spécifiques appelés endocannabinoïdes. Les endocannabinoïdes sont des acides gras, synthétisés à partir des phospholipides des membranes cellulaires (dérivés de l'acide arachidonique). Au moins 5 endocannabinoïdes ont été identifiés jusque là mais l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) sont les mieux caractérisés (Figure 1a et b) (18, 19).

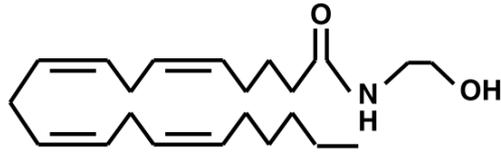


Figure 1a. Structure de l'AEA (18)

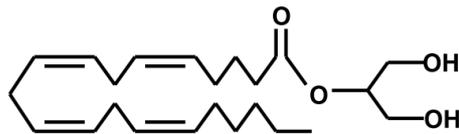


Figure 1b. Structure du 2-AG (18)

- Les enzymes spécifiques impliqués dans la synthèse et la dégradation des endocannabinoïdes. L'AEA est produit à partir de l'hydrolyse, par une phospholipase D, de la N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine (20). Le 2-AG est produit en 2 étapes : hydrolyse du phosphatidylinositol-biphosphate par la phospholipase C en 1,2-diacylglycérol (DAG) qui est à son tour converti en 2-AG par la DAG lipase (20). La dégradation est effectuée par 2 enzymes spécifiques : la FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) et la MAGL (*monoacylglycerol lipase*) responsables respectivement de l'inactivation de l'AEA et du 2-AG (18, 19, 21).

Notons qu'au moins deux autres molécules sont apparentées aux endocannabinoïdes et en particulier à l'AEA, mais ne lient pas les récepteurs des cannabinoïdes : l'oléoyléthanolamide (OEA) et le palmitoyléthanolamide (PEA) (22).

L'activation des récepteurs CB₁ par les endocannabinoïdes agit principalement sur 3 grand types de voies de signalisation intracellulaire : l'adénylate cyclase, la voie des *mitogen-activated protein kinases*-(MAP) kinases et certains canaux ioniques (23).

Dans les modèles animaux d'obésité génétique ou induite par alimentation riche en graisses, les niveaux d'endocannabinoïdes dans le cerveau et les tissus périphériques comme le foie, le muscle et le tissu adipeux sont augmentés (13) tandis que la souris délétée du récepteur CB₁ (CB₁^{-/-}) est mince et résistante à l'obésité induite par l'alimentation (24, 25).

Le SEC est généralement considéré comme un système favorisant la prise alimentaire et le stockage des calories, orientant ainsi l'organisme vers la prise de poids et le gain d'adiposité (26-28). Administrés au niveau central ou périphérique, le 2-AG et l'AEA, augmentent la prise alimentaire (26, 27, 29). Cet effet est médié par l'activation de CB₁ puisque l'administration d'un antagoniste sélectif de CB₁ inhibe l'effet orexigène de l'AEA ou du 2-AG (26), (29). De plus, les souris CB₁^{-/-} mangent moins que les souris de souche sauvage après une période de privation de nourriture et l'antagoniste de CB₁ est incapable de réduire la prise alimentaire chez ces animaux confirmant que la réduction de la prise alimentaire du rimonabant, agoniste inverse du CB₁, est liée au blocage du CB₁ (30). L'administration des endocannabinoïdes dans des régions cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire comme l'hypothalamus (27) ou le noyau accumbens (29) augmentent la prise alimentaire par l'intermédiaire de CB₁. Il est néanmoins important de préciser que l'augmentation de la prise alimentaire induite par l'activation du CB₁ dépend du type de population neuronale recrutée, puisque les récepteurs CB₁ cérébraux modulant la transmission excitatrice glutamatergique déterminent cet effet orexigène. A l'inverse, l'activation de CB₁ au niveau du striatum ventral diminue la prise alimentaire par l'intermédiaire d'une inhibition de la transmission GABAergique (31).

Jusqu'en 2003, on pensait que le CB₁ était exclusivement localisé dans le cerveau. Cette année là, les travaux de Cota et collaborateurs et de Bensaid et collaborateurs ont été les premiers à décrire la présence de CB₁ sur les adipocytes blancs (24, 32). La même année, les travaux réalisés chez la souris CB₁^{-/-} confirment que son phénotype mince ne peut être seulement expliqué par une réduction de la prise alimentaire (24). Depuis, le rôle du CB₁ périphérique dans le métabolisme a été largement étudié. Il a ainsi été montré que l'activation de CB₁ adipocytaire entraînait l'accumulation de tissu adipeux

en favorisant la différenciation et la maturation des cellules adipocytaires du tissu adipeux blanc, en augmentant l'expression des enzymes de la lipogénèse et l'activité de la lipoprotéine lipase (24, 32). De récents travaux ont même mis en évidence que le SEC pouvait participer à la transdifférenciation du tissu adipeux, puisqu'*in vitro*, le blocage de CB₁ entraîne la transformation de tissu adipeux blanc en un tissu riche en mitochondries dont le phénotype est celui du tissu adipeux brun (33). Ces résultats sont tout à fait en accord avec l'augmentation de la dépense énergétique, de l'oxydation lipidique et la thermogénèse observée après administration des antagonistes de CB₁ *in vivo* (34, 35).

En parallèle des effets au niveau de l'adipocyte, l'activation de CB₁ au niveau des hépatocytes augmente l'expression des enzymes de la lipogénèse, ce qui augmente la synthèse *de novo* des acides gras et la stéatose hépatique, en particulier lors d'exposition au régime riche en gras (36, 37). Le rôle du CB₁ hépatocytaire semble particulièrement important dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique puisque les animaux qui possèdent une délétion exclusive du CB₁ hépatocytaire, même s'ils gagnent du poids pendant un régime gras, restent protégés de la stéatose hépatique, de l'hyperglycémie, de la dyslipidémie et de la résistance à l'insuline (37). Ce rôle spécifique du CB₁ hépatique est aussi illustré par le fait qu'un antagoniste périphérique de CB₁ permet de corriger le phénotype d'insulinorésistance d'animaux obèses résistants à l'insuline alors que ces animaux n'expriment CB₁ qu'au niveau hépatique (38).

Les rôles de CB₁ au niveau du muscle squelettique et au niveau du pancréas endocrine sont moins bien connus. Il a néanmoins été mis en évidence sur le muscle soléaire isolé de rat que le blocage pharmacologique de CB₁ améliorerait le transport du glucose alors que l'activation de CB₁ par un agoniste de CB₁ (arachidonyl-2- chloroéthylamide, ACEA) avait l'effet inverse (39).

Enfin, au niveau du pancréas, plusieurs études maintenant ont démontré la présence de CB₁ et de CB₂ au niveau des îlots de Langerhans (de rongeur et humain) avec cependant des variations de l'expression selon les espèces (40-42). La fonction physiologique exacte du SEC du pancréas endocrine n'est encore pas bien définie, mais il semble que CB₁ pourrait moduler *in vitro* la

sécrétion d'insuline en régulant les variations calciques intracellulaires (43, 44).

Ainsi, la connaissance du rôle du SEC périphérique a largement progressé au cours de ces dernières années et il est maintenant bien admis que le SEC, tant au niveau central que périphérique, participe à la modulation de la balance énergétique et du métabolisme.

Chez l'Homme, il a aussi pu être mis en évidence que le SEC était dérégulé dans l'obésité et le diabète de type 2 (28).

Il existe tout d'abord des preuves indirectes de l'hyperactivité du SEC dans l'obésité humaine. L'administration d'un agoniste inverse du récepteur CB₁, le rimonabant, permet de diminuer le poids mais aussi d'améliorer les anomalies métaboliques de patients obèses ou en surpoids ayant des facteurs de risque cardiovasculaires, diabétiques de type 2 ou non (45-48). Cependant, compte tenu des effets psychiatriques (dépression, anxiété) développés, qui pourraient être pour partie liés au passage de la barrière hématoencéphalique, le rimonabant a été retiré du marché Européen – la *Food and Drug Administration* ayant préalablement récusé l'entrée de la molécule sur le marché Américain – à l'automne 2008 (European Medical Agency, 23 Octobre 2008). Néanmoins, très récemment, des études ont rapporté que l'administration d'un antagoniste exclusivement périphérique de CB₁ à des souris obèses permettait d'obtenir des bénéfices métaboliques significatifs sans effets secondaires psychiatriques ou comportementaux (38, 49).

Des études génétiques ont mis en évidence les liens entre SEC et pathologies métaboliques. Ainsi, dans une étude portant sur 2667 américains (caucasiens, africains américains et d'origine asiatique), Sipe et collaborateurs retrouvent que le polymorphisme faux sens FAAH 385 A/A semble être un facteur de risque d'obésité ou de surpoids (50). Notons qu'il a pu être mis en évidence que chez les sujets porteurs de ce polymorphisme, l'activité de l'enzyme FAAH et l'expression de la protéine étaient diminuées de moitié, ce qui pourrait conduire à un défaut de métabolisme des endocannabinoïdes (51). Dans un travail ultérieur, en effet, Sipe et collaborateurs mettent en évidence que les

individus porteurs de ce polymorphisme qui n'altère pas le fonctionnement de l'enzyme ont des concentrations d'AEA et de N-acyléthanolamines plus élevées que les sujets porteurs du phénotype C/C (52). Cependant, ces résultats ne sont pas toujours confirmés. Ainsi, par exemple, dans une étude portant sur 5801 blancs, il n'est pas retrouvé de lien entre ce même variant du gène de la FAAH et l'IMC et des paramètres métaboliques (insulinorésistance, tour de taille...) (53). Enfin, une étude portant sur 364 familles d'obèses (enfants ou adolescents avec un IMC supérieur au 90^{ème} percentile et leurs deux parents) il n'est pas retrouvé d'association entre les polymorphismes du gène de CB₁ et le phénotype métabolique des patients (52).

Ainsi, si les études génétiques sont relativement peu nombreuses, elles mettent en évidence pour la plupart d'entre elles que les polymorphismes des gènes étudiés, qui entraînent des diminutions de l'activité de l'enzyme impliquée dans la dégradation de l'AEA et des augmentations des concentrations plasmatiques de l'AEA peuvent être associés à une obésité. Si toutes les études ne sont pas concordantes, cette approche génétique en évaluant le lien entre SEC et obésité chez l'Homme semble néanmoins confirmer que les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes sont plus élevées chez les sujets obèses (53-57). De plus, il a été mis en évidence des corrélations positives entre les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes et le tour de taille, la graisse viscérale mesurée par scanner, ou encore l'insulinémie et le niveau des triglycérides (53-57). Cependant, peu d'études, chez l'animal ou chez l'Homme ont pu avoir accès aux concentrations tissulaires ou plasmatiques d'endocannabinoïdes et ont pu étudier les relations avec des phénotypes. Outre le caractère invasif de cette approche en effet, les endocannabinoïdes sont des molécules lipidiques et la détermination de leur concentration plasmatique ou tissulaire nécessite un dosage par spectrométrie de masse dont peu de laboratoires dans le monde disposent.

Les résultats des principales études cliniques mesurant les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes chez l'Homme sont résumés dans la Table 1.

Table 1. Endocannabinoïdes circulants chez l'Homme et corrélations avec les paramètres métaboliques. Adapté de (58).

Sujets	Résultats	Corrélation	Ref
20 Femmes (F) obèses et 20 F minces	↗ AEA et 2AG obèses / minces	Positive AEA/ IMC Positive 2-AG / tour de taille	(59)
5 hommes (H) et 3F normopondéraux et 4H et 6F obèses diabétiques de type 2	↗ AEA et 2AG obèses diabétiques/ normo pondéraux	Non réalisé	(60)
10H et 10F minces 10H et 10F avec obésité sous cutanée 10H et 10F avec obésité viscérale	↗ AEA obèses/ minces ↗ 2-AG obésité viscérale / obésité sous cutané	Positive 2-AG et IMC, %masse grasse et tissu adipeux viscéral	(54)
62 H	Non réalisé	Négative AEA et tissu adipeux intra abdominal Positive 2-AG et IMC, tour de taille, triglycérides, insulinémie à jeun Négative 2-AG/HDL Cholestérol, Adiponectine	(55)
6F, 4H minces insulinosensibles et 6F, 4H obèses insulino-résistants	↗ AEA insulino-résistants/ insulinosensibles 2-AG non différents	Si sujets insulinosensibles et insulino-résistants ensemble Positive AEA/IMC, tour de taille, triglycérides Positive 2-AG/triglycérides	(61)
7H non diabétiques et 12 H diabétiques	Pas de différence	Positive 2-AG/triglycérides	(61)
49 H avant et après un an de règles hygiéno-diététiques	↘ AEA (-7.1%) après intervention ↘ 2-AG (-62.3%) après intervention	Positive ↘ 2-AG et réduction tissu adipeux viscéral	(62)
17H, 31F normopondéraux et 43H, 53F obèses	↗ (tendance) AEA Obèses/Normopondéraux	Positive AEA / mutation FAAH 385A	(52)
27H	↗ AEA obèses	Positive AEA/IMC, tour de taille, insulinémie à jeun	(63)

Quelques investigations chez l'Homme ont aussi déterminé les concentrations d'endocannabinoïdes ou l'activité des enzymes de synthèse ou de dégradation des endocannabinoïdes ou encore l'expression de l'ARNm de CB₁ dans des tissus cibles dans le contexte de pathologies métaboliques et en particulier dans le tissu adipeux.

Ainsi dans 2 travaux publiés en 2006, Bluher et collaborateurs et Engeli et collaborateurs retrouvent une diminution de l'expression de l'ARNm de CB₁ et de l'activité de la FAAH, respectivement avec une diminution de 34% et de 59 % chez les sujets obèses par rapport aux sujets normopondéraux (53, 54, 57).

Annuzi et collaborateurs ont mesuré les concentrations d'endocannabinoïdes mais aussi d'OEA et de PEA dans le tissu adipeux sous cutané de 10 sujets obèses et diabétiques, 11 sujets obèses et 8 sujets de poids normal (64). Toutes les concentrations, sauf celle du 2-AG, étaient significativement plus élevées chez les obèses diabétiques par rapport aux 2 autres groupes tandis qu'il n'est pas retrouvé de différence significative entre les concentrations tissulaires des patients obèses non diabétiques et des patients normopondéraux. La concentration de 2-AG est par ailleurs significativement plus basse chez les patients diabétiques obèses. L'absence de différence des concentrations adipocytaires d'endocannabinoïdes entre sujets normopondéraux et sujets obèses non diabétiques avait déjà été retrouvée (60). Enfin, la diminution des concentrations adipocytaires de 2-AG a été très récemment retrouvée chez des sujets obèses. Chez ces patients, après une perte de poids de 10% obtenue par des mesures hygiéno-diététiques, la concentration de 2-AG dans les adipocytes augmente significativement (65).

Enfin, notons que Jumpertz et collaborateurs ont mesuré chez 12 sujets caucasiens, 11 indiens d'Amérique et 4 afro-américains les concentrations dans le plasma mais aussi dans le liquide céphalorachidien d'AEA, de 2-AG, d'OEA et de PEA retrouvant une corrélation négative entre les concentrations d'AEA dans le liquide céphalorachidien et l'adiposité (IMC, tour de taille et pourcentage de masse grasse) (63).

Les relations entre perte de poids et concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes chez l'Homme restent aussi mal connues. En effet, il a été montré qu'une perte de poids de 5 %, obtenue par mesures hygiéno-diététiques ou par administration de sibutramine [un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline capable d'entraîner des pertes de poids moyennes de 4,6 kg associées à des améliorations des complications de l'obésité en dehors de l'hypertension artérielle (66)] ne modifiait pas les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes, alors que l'intervention améliorerait significativement les mesures anthropométriques et les anomalies métaboliques de ces patients (56). A l'inverse, dans un travail publié en 2009, Di Marzo et collaborateurs mettent en évidence qu'une perte de poids de $6,4 \pm 4,9\%$ en moyenne obtenue chez 49 sujets obèses grâce à une prise en charge hygiéno-diététique d'une année, permettant une diminution des IMC moyens de $30,9 \pm 3,3$ à $28,8 \pm 3,6$ kg/m² et une amélioration significative des comorbidités, est associée à une diminution significative des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes avec une diminution de 7,1% des niveaux d'AEA tandis que les concentrations de 2-AG diminuent de 62,3% (62).

Il existe par ailleurs une corrélation positive entre la réduction des concentrations plasmatiques de 2-AG et la réduction du tissu adipeux viscéral (62). Une étude publiée en 2011 a mesuré l'activité adipocytaire du SEC chez 10 patients obèses avant et après une perte de poids de 10% obtenue en 10 semaines par des mesures hygiéno-diététiques. Les activités de la FAAH et de la MGL diminuent après la perte de poids (12).

Ainsi, même si les études sont peu nombreuses et s'il est prématuré de considérer les endocannabinoïdes circulants ou tissulaires comme des marqueurs d'obésité, il n'en reste pas moins que les études réalisées chez l'Homme sont toutes en faveur d'une hyperactivité du SEC ou en tous les cas d'une augmentation des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes dans l'obésité, en particulier abdominale, ou encore dans le diabète de type 2 et que le SEC constitue encore une perspective thérapeutique intéressante. De fait, très récemment, des études ont rapporté que l'administration d'un antagoniste exclusivement périphérique de CB₁ à des souris obèses permettait

d'obtenir des bénéfices métaboliques significatifs sans effets secondaires psychiatriques (38, 49). Ces données très récentes relancent bien sûr l'intérêt thérapeutique du ciblage du CB₁ périphérique dans le traitement de l'obésité et du diabète de type 2.

Néanmoins, comme nous l'avons dit précédemment, les études chez l'Homme sont peu nombreuses et plusieurs questions importantes restent non résolues.

Ainsi, si des variations des concentrations tissulaires d'endocannabinoïdes en fonction du statut nutritionnel cohérentes avec un système facilitant la prise alimentaire, i.e augmentation lors du jeûne et diminution lors de la reprise alimentaire, ont été mises en évidence chez l'animal (29, 67, 68), la possible relation entre niveaux des endocannabinoïdes et prise alimentaire n'a jamais été recherchée chez l'Homme. Nous avons émis l'hypothèse que cette cinétique prandiale pouvait exister chez le sujet normopondéral mais que le sujet obèse, dont les concentrations plasmatiques à jeun d'endocannabinoïdes sont plus élevées, pourrait présenter des anomalies de cette cinétique.

De plus, même si les études sont relativement peu nombreuses, l'augmentation des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes chez les sujets obèses par rapport aux sujets de poids normaux est bien admise. Cependant, les liens de causalité ou de conséquence ne sont pas connus. Comme nous l'avons dit précédemment en effet, seulement 3 études ont déterminé l'effet d'une perte de poids modérée, obtenue par mesures hygiéno-diététiques ou par un inhibiteur sélectif de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine sur les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes et ont donné des résultats différents. De plus, l'effet d'une chirurgie bariatrique, traitement à ce jour le plus efficace contre l'obésité et ses complications (69-72), n'est pas connu.

De la même façon, si les liens entre métabolisme glucidique et SEC sont établis et si la résistance à l'insuline semble favoriser l'élévation des concentrations plasmatiques et tissulaires des endocannabinoïdes dans l'obésité et le diabète de type 2 (13, 61, 73, 74), les liens de causalité et de conséquence entre résistance à l'insuline et activité du SEC sont mal connus et il n'existe pas de données sur l'effet que pourrait avoir une diminution aiguë

de la glycémie et de la résistance à l'insuline sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes.

Enfin, et comme nous l'avons déjà mentionné, les outils d'explorations directes du SEC chez l'Homme sont limités par le caractère invasif des prélèvements sanguins et des biopsies tissulaires. La salive est un liquide biologique particulièrement facile à recueillir et l'idée d'effectuer des dosages d'hormones dans ce fluide date de plusieurs décennies. Dans ce contexte et compte tenu des résultats chez l'animal en faveur de la présence du SEC au niveau des glandes salivaires (75, 76), nous nous sommes posés la question de l'utilité de cet outil chez l'Homme.

Cette thèse s'est attachée à répondre à chacun de ces différents points qui seront détaillés dans chacun des 4 chapitres suivants.

Avant de les aborder, il est important de préciser que ce travail a été possible grâce à une collaboration avec le docteur Isabelle Matias, post doctorante dans l'équipe « Endocannabinoïdes et Neuroadaptation » dirigée par le docteur Giovanni Marsicano au sein de l'unité U862, qui a établi dans l'unité U862 la technique de dosage des endocannabinoïdes, AEA et 2-AG, et des N-acyléthanolamines, OEA et PEA, par spectrométrie de masse. Cette technique, similaire pour tous les dosages réalisés dans le contexte du présent projet est résumée ci-dessous et ne sera plus détaillée lors de chacune des parties du travail.

L'extraction, la purification et la quantification des endocannabinoïdes dans les tissus ou le sang nécessitent un certain nombre d'étapes. Tout d'abord, les échantillons sont homogénéisés dans du chloroforme/méthanol/Tris-HCl 50mM pH 7,5 (2 :1 :1, V/V) contenant les standards internes deutérés (AEA-d8, 2-AG-d5, PEA-d4 ET OEA-d2). L'extrait lipidique ainsi obtenu est ensuite purifié par chromatographie en phase liquide en colonne ouverte de silice éluées avec des concentrations croissantes de méthanol dans le chloroforme. Les fractions contenant AEA, 2-AG, OEA, PEA sont obtenues en éluant la colonne de silice avec du chloroforme/méthanol (9 :1, V/V) et concentrés à l'aide d'un évaporateur de flux d'azote afin d'éviter l'oxydation des

endocannabinoïdes et des N-acyléthanolamines. Les échantillons sont alors analysés et quantifiés par un spectromètre de masse en triple quadrupole couplée à une chromatographie liquide (LC-MSMS). L'appareil utilisé est un TSQ Quantum (Thermo-Finnigan) équipé avec une source APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) et fonctionnant en mode positif (77). Les quantités d'AEA, de 2-AG, de PEA et d'OEA sont exprimées en pmol/mg de poids de tissu ou par ml de sang après dilution isotopique à l'aide d'une courbe de calibration. Notre méthode est suffisamment sensible, linéaire, et reproductible pour permettre le dosage des endocannabinoïdes dans le plasma humain (Table 2).

Table 2. Table de validation de la méthode

Composé	LD (n=6)	LQ (n=6)	Linéarité (n=6)	r ² (n=6 ± SEM)	Récupération		Intraessai			Interessai		
					Niveaux	Recuperation (n=2 ± SEM)	Niveaux	Précision (n=3)	Exactitude (n=3 ± SD)	Niveaux	Précision (n=3)	Exactitude (n=3 ± SD)
2AG	0,1	0,3	1,5-30000	0,9995± 0,0002	15	100,6 ± 19,2	1,5	8,87	106,22 ± 9,42	1,5	15,87	110,17 ± 17,48
					150	94,0 ± 2,5	7,5	4,19	99,66 ± 4,18	7,5	4,1	120,97 ± 4,96
					1500	92,8 ± 3,9	37,5	0,76	96,00 ± 0,73	37,5	2,62	121,39 ± 3,18
AEA	0,03	0,03	0,06-750	0,9989 ± 0,0001	0,3	68,6 ± 18,2	0,06	10,35	106,86 ± 11,06	0,06	23,78	91,80 ± 21,83
					3	79,6 ± 14,3	0,3	17,73	101,44 ± 17,98	0,3	4,56	108,55 ± 4,95
					30	93,2 ± 3,9	1,5	2,48	99,90 ± 2,47	1,5	3,05	107,43 ± 3,28
OEA	0,03	0,03	0,6-300	0,9992 ± 0,0002	0,3	115,9 ± 18,9	0,6	16,59	132,85 ± 22,03	0,6	8,78	126,04 ± 11,06
					3	137,4 ± 3,2	3	9,26	98,70 ± 9,14	3	3,47	121,88 ± 4,22
					30	114,9 ± 4,3	15	4,03	104,46 ± 4,21	15	5,63	110,40 ± 6,21
PEA	0	0	0,6-3000	0,9986± 0,0006	0,3	83,5 ± 20,7	0,6	42,79	90,65 ± 38,79	0,6	35,51	71,20 ± 25,28
					3	109,6 ± 10,4	3	18,29	97,92 ± 17,91	3	4,66	86,74 ± 4,04
					30	102,3 ± 3,8	15	1,88	90,27 ± 1,70	15	1,82	96,56 ± 1,77
							75	0,84	98,25 ± 0,82	75	1,72	101,91 ± 1,75

Limite de détection (LD), limite de quantification (LQ), linéarité (n=6) et concentrations exprimées en pmol. La précision est exprimée par le pourcentage du coefficient de variation des mesures tandis que l'exactitude correspond à la différence entre la valeur mesurée et la valeur réelle en pourcentage (n=3).

Enfin, en dehors de cet aspect technique, il est important de préciser que toutes les études présentées ci-après ont fait l'objet d'une autorisation par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé et par le Comité de Protection des Personnes du Sud Ouest. Dans tous les cas, un consentement éclairé a été signé avant toute participation à l'étude.

Chapitre 1 : Existe-t-il une cinétique des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes en fonction de la prise alimentaire ? Si oui, cette cinétique est elle conservée chez le sujet obèse ?

Introduction

Plusieurs études sur modèle animal ont mis en évidence le rôle critique joué par le SEC dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, injectés dans l'hypothalamus ou dans le noyau accumbens, 2 régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, ou encore en périphérie, les endocannabinoïdes augmentent la prise alimentaire (26, 27, 29, 30). Cet effet est aboli si l'on administre un antagoniste de CB₁ aux animaux, illustrant le fait que cette action orexigène dépend de l'activation de ce récepteur (26, 27, 30). Il est néanmoins important de préciser que cette action spécifique dépend du type de population neuronale recrutée, puisque l'activation de CB₁ au niveau du striatum ventral diminue la prise alimentaire par l'intermédiaire d'une inhibition de la transmission GABAergique. A l'inverse, les récepteurs CB₁ cérébraux présents sur les neurones glutamatergiques médient l'effet orexigène bien connu (31).

Par ailleurs, le blocage pharmacologique de CB₁ entraîne une anorexie chez les rongeurs exposés à une nourriture palatable, ou exposés à nourriture après une période de jeûne ou encore chez des animaux obèses (78, 79).

Etat de la question

Il est bien admis maintenant que le contrôle de la prise alimentaire dépend de nombreux facteurs dont les variations des concentrations circulantes des signaux périphériques, comme les hormones gastro-intestinales qui préparent l'organisme à recevoir les aliments et à stocker les calories nouvellement acquises. Parallèlement, la prise alimentaire entraîne aussi la modification de la sécrétion de ces hormones dans le sens où les hormones qui favorisent la

prise alimentaire sont diminuées tandis que celles qui sont impliquées dans la fin du repas sont augmentées. Ainsi, les concentrations plasmatiques de ghréline, peptide orexigène principalement sécrété par l'estomac, s'élèvent en préprandial et s'effondrent après la consommation du repas (9). A l'inverse, les concentrations plasmatiques du peptide anorexigène peptide YY (PYY) sécrété par les cellules de l'intestin distal (iléon et colon) augmentent en réponse à la prise alimentaire et participent à l'interruption de celle-ci (9, 80, 81). Il a été rapporté dans la littérature que la concentration plasmatique de PYY augmente parallèlement au niveau calorique ingéré et reflète le niveau de satiété (80). Il a été aussi montré que pour un même niveau calorique l'élévation post prandiale du PYY plasmatique est plus faible chez le sujet obèse, témoignant d'une dérégulation de la sécrétion de cette hormone dans l'obésité (80).

Les variations en fonction du statut nutritionnel ont aussi été mises en évidence pour les endocannabinoïdes, mais uniquement chez l'animal (29, 67, 68, 82). Ainsi, au niveau cérébral, le jeûne augmente les concentrations tissulaires de 2-AG au niveau du système limbique et de l'hypothalamus et d'AEA au niveau de l'hypothalamus tandis que ces concentrations diminuent à l'état nourri (29). Au niveau périphérique il a été mis en évidence que le jeûne augmentait les concentrations tissulaires de 2-AG et d'AEA au niveau du duodénum, du foie et du pancréas ainsi que d'AEA au niveau de l'intestin distal (67, 68). Cette variation des niveaux d'endocannabinoïdes en fonction du statut nutritionnel n'a jamais été mise en évidence chez l'Homme.

Question posée

Compte tenu des données précédemment publiées sur le rôle du SEC dans la régulation de la prise alimentaire, nous nous sommes posés la question de l'existence d'une variation des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes en fonction du statut nutritionnel chez l'Homme. De plus, du fait de la dérégulation en condition basale du SEC dans l'obésité, c'est à dire de l'augmentation des concentrations plasmatiques des

endocannabinoïdes à jeun chez les patients obèses (54-57, 61, 74, 83, 84), nous avons aussi émis l'hypothèse que si cette variation prandiale existait, elle pourrait être perturbée dans l'obésité.

Patients et Méthodes

Critères d'inclusion et d'exclusion

Douze sujets normopondéraux et 12 sujets obèses ont été recrutés. Les critères d'inclusion des 2 groupes des sujets étaient :

Groupe de sujets normopondéraux :

- Age compris entre 18 et 65 ans
- IMC compris entre 18 et 25 kg/m²
- Poids stable depuis 3 mois au moins
- Absence de tabagisme actif
- Absence de consommation de cannabis
- Consentement libre, éclairé et signé par le patient après avoir été informé de l'étude par l'investigateur (avant tout examen nécessité par l'essai)
- Sujet affilié ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale

Groupe de patients obèses :

- Age compris entre 18 et 60 ans
- Obésité avec IMC > 40kg/m² ou compris entre 35 et 40 kg/m² avec des complications de l'obésité associées
- Absence de tabagisme actif
- Absence de consommation de cannabis

- Consentement libre, éclairé signé par le patient après avoir été informé de l'étude par l'investigateur (avant tout examen nécessité par l'essai)
- Sujet affilié ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale

Les critères d'exclusion identiques pour les 2 groupes sont listés ci-dessous :

- Traitement pouvant potentiellement interférer avec le SEC : antidépresseurs, neuroleptiques, anxiolytiques, anticonvulsivants
- Consommation de cannabis
- Tabagisme actif
- Grossesse, allaitement

Mesures anthropométriques

Le poids est mesuré sur une balance avec une précision de 0,1 Kg et la taille sur une toise avec une précision de 0,5 cm. Le tour de taille est mesuré avec un mètre ruban placé entre les épines iliaques supérieures et les dernières côtes.

Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins étaient réalisés après une nuit de jeûne, ainsi qu'une heure avant, juste avant et une heure après la fin du déjeuner (Figure 2). Les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes AEA et 2-AG, de glucose, d'insuline, ainsi que de cholestérol total, de HDL cholestérol, de LDL cholestérol, de triglycérides, de transaminases (aspartate aminotransférase, (ASAT) et alanine aminotransférase, (ALAT) et de gammaglutamyl transférase (γ GT) étaient déterminées lors du premier prélèvement. Lors des prélèvements suivants, les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes, d'insuline et de PYY étaient déterminées. Comme nous l'avons dit précédemment, il a été montré que les concentrations plasmatiques de PYY augmentent en réponse à la prise alimentaire. Les déterminations des

concentrations plasmatiques de PYY représentaient une sorte de « contrôle » de notre procédure pour vérifier qu'il y avait bien un changement des niveaux des hormones gastro-intestinales en réponse au déjeuner.

Le dessin expérimental de l'étude est représenté sur la figure 2.

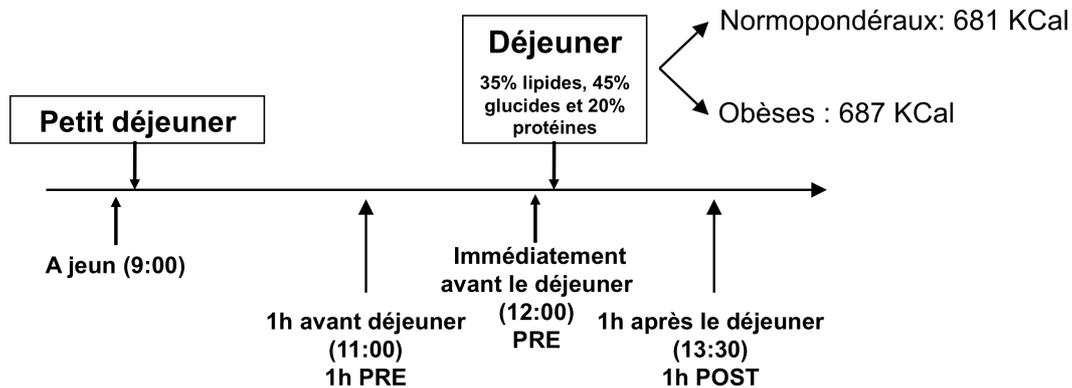


Figure 2. Dessin expérimental de l'étude. Les flèches dirigées vers le haut correspondant aux temps de prélèvement sanguin. Le déjeuner était composé de 35% de lipides, 45% de glucides et 20% de protides. L'apport calorique était de 681 et 687 Kcal pour les sujets normopondéraux et les sujets obèses respectivement ($P=0,8$).

Détermination des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes

La méthode de dosage des endocannabinoïdes est décrite dans le chapitre introduction générale (voir page 25-27).

Déterminations des concentrations plasmatiques des autres paramètres hormonaux et des paramètres biochimiques

Les fractions lipidiques, la glycémie et les enzymes hépatiques ont été déterminées par des méthodes enzymatiques et fluorométriques grâce à un analyseur Olympus AU2700 (Beckman Coulter, Villepinte, France). L'insuline a été mesurée avec un kit IRMA CIS bio (coefficient de variation intra essai 3,8%, coefficient de variation inter essai: 8% ; CIS bio International, Gif-sur-Yvette, France). Le PYY total était mesuré grâce à un kit ELISA (pour une

concentration de 83,2 pg/ml, le coefficient de variation intra-essai était de 1,79% et le coefficient de variation inter-essai de 6,07%, pour une concentration de 115 pg/ml, les coefficients étaient de 1,00 et 16% respectivement ; Millipore, St Charles, MO, USA).

Composition du déjeuner

Le déjeuner était composé par une diététicienne de l'hôpital afin de garantir la composition en macronutriments suivante : 35 % de lipides, 45% d'hydrates de carbones et 20% de protéines. Le repas était constitué d'une entrée (salades, crudités), d'un plat principal (rôti de porc, jambon, poulet, saumon, thon) accompagné de pâtes, légumes ou riz, pain blanc et portion de fromage, fruit. Les items du repas étaient consommés au hasard, afin d'éviter au maximum les interférences sur les concentrations d'endocannabinoïdes (85).

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. Les comparaisons ont été effectuées grâce à des tests ANOVA à mesures répétées ou ANOVA à un facteur. Les ANOVA significatives étaient suivies de tests post-hoc de Tukey. Les corrélations ont été effectuées par des tests de Pearson ou de Spearman en fonction de la distribution des variables. La significativité était retenue pour une valeur de $P < 0,05$.

Résultats

Les caractéristiques anthropométriques, hormonales et biochimiques des sujets de l'étude sont résumées dans la table 3.

Table 3. Caractéristiques cliniques et biologiques des sujets.

	Normopondéraux	Obèses
Sexe (M/F)	2/10	4/8
Age (années)	39,1 ± 3,7	37,4 ± 3,4
IMC (Kg/m ²)	21,0 ± 0,6	42,0 ± 1,4**
Tour de taille (cm)	73,8 ± 2,9	125,0 ± 4,5**
PAS (mmHg)	111,3 ± 2,6	125,0 ± 4,0*
PAD (mmHg)	70,0 ± 3,5	70,8 ± 4,7
Glucose (mmol/l)	5,0 ± 0,1	4,8 ± 0,2
Insuline (µUI/ml)	4,1 ± 0,6	16,1 ± 4,0*
HOMA	0,9 ± 0,1	3,4 ± 0,8*
LDL cholestérol (mmol/l)	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2
HDL cholestérol (mmol/l)	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,09
Triglycérides (mmol/l)	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2
ASAT (UI/l)	24,0 ± 0,2	31,0 ± 2,7
ALAT (UI/l)	19,8 ± 2,6	39,3 ± 5,3**
Gamma GT (UI/l)	20,2 ± 3,4	42,0 ± 7,2*

PAS : pression artérielle systolique, PAD : pression artérielle diastolique, HOMA : Homeostasis Model Assesment, LDL cholestérol : Low density lipoprotein cholesterol, HDL cholestérol : high density lipoprotein cholesterol, ASAT aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransférase, gamma GT : gamma glutamyl transferase. * P<0,05, **P<0,01.

Comme précédemment rapporté dans la littérature, nous observons que les patients obèses ont des concentrations basales d'AEA (0,66 ± 0,07 versus 0,28 ± 0,04 pmol/ml, obèses versus normopondéraux, P<0,05) et de 2-AG (4,49 ± 0,61 versus 3,02 ± 0,33 pmol/ml, obèses versus normopondéraux

$P < 0,05$) dans le plasma plus élevées que les patients normopondéraux. De plus, il existe une corrélation positive entre l'AEA d'une part (Figures 3 a-c) et l'IMC, le tour de taille et l'insulinémie d'autre part, ainsi que entre le 2-AG et les mesures anthropométriques (Figures 3d-f).

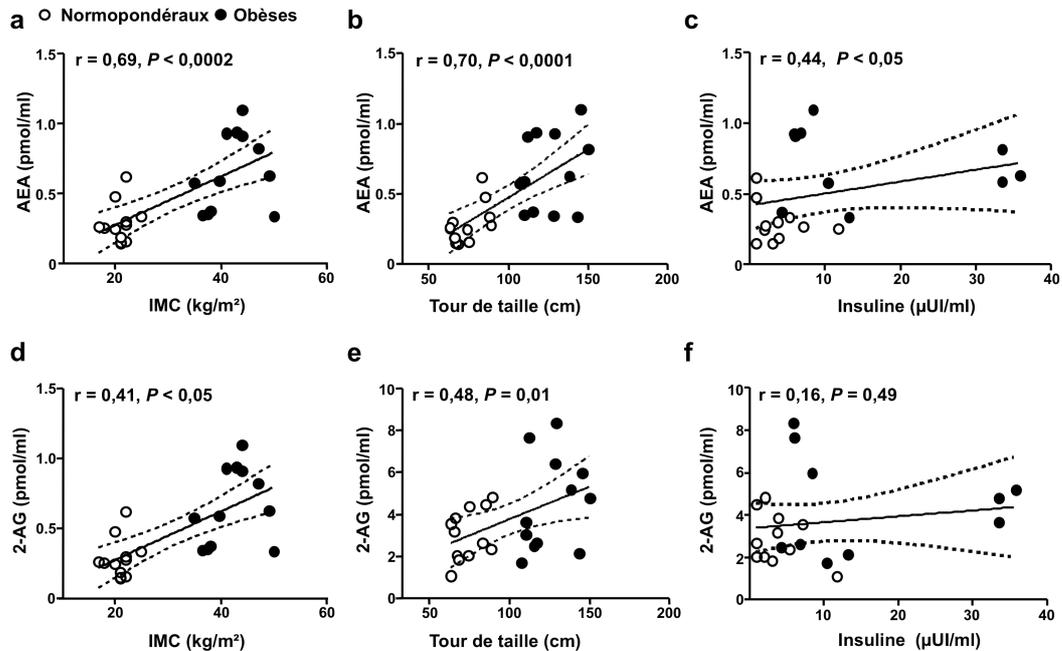


Figure 3. Relations entre l'AEA et l'IMC (a), le tour de taille (b) et l'insuline (c) et entre le 2-AG et l'IMC (d), le tour de taille (e) et l'insuline (f).

De façon intéressante, nous avons mis en évidence que l'AEA plasmatique augmente significativement immédiatement avant la consommation du repas (période pré prandiale) dans les 2 groupes de sujets (obèses et normopondéraux). A l'inverse, après la consommation du repas (période post prandiale), l'AEA ne diminue significativement que dans le groupe de sujets normopondéraux et le pourcentage de réduction post prandial d'AEA est significativement plus élevé chez les sujets normopondéraux par rapport aux sujets obèses (Figure 4 a-b). Il existe de plus une corrélation négative entre le tour de taille et le pourcentage de réduction post prandiale de l'AEA (Figure 4 c).

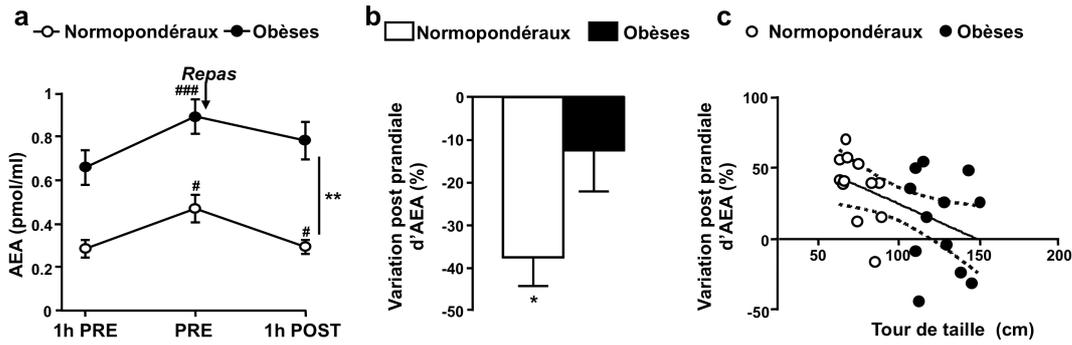


Figure 4. Dérégulation post prandiale de l'AEA dans l'obésité. (a) : Concentrations plasmatiques d'AEA 1 heure avant (1h PRE), immédiatement avant (PRE) et 1 heure après la fin du repas (1h POST). (b) : Variations post prandiales d'AEA. (c) : Corrélation entre les variations post prandiales d'AEA et le tour de taille ($r=-0,479$, $P=0,02$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$ normopondéraux versus obèses, # $P<0,05$; ### $P<0,001$ par rapport au temps précédent.

Contrairement à l'AEA, Il n'existe aucune variation des concentrations plasmatiques de 2-AG, ni en pré ni en post prandial (Figure 5).

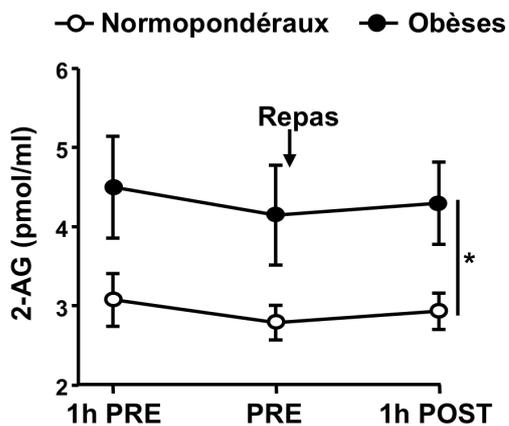


Figure 5. Concentrations plasmatiques de 2-AG 1 heure avant (1h PRE), immédiatement avant (PRE) et 1 heure après la fin du repas (1h POST). * $P<0,05$ normo pondéraux versus obèses (effet groupe).

Les résultats des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes sont présentés dans la table 4.

Table 4. Variations des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes en fonction de la prise alimentaire.

	Normopondéraux	Obèses	P
AEA 1PRE (pmol/ml)	0,28 ± 0,04	0,66 ± 0,07	P<0,01
AEA PRE (pmol/ml)	0,47 ± 0,06	0,89 ± 0,07	P<0,01
AEA 1POST (pmol/ml)	0,29 ± 0,03	0,78 ± 0,08	P<0,01
2-AG 1PRE (pmol/ml)	3,03 ± 0,33	4,49 ± 0,62	NS ; P<0,05#
2-AG PRE (pmol/ml)	2,82 ± 0,25	4,15 ± 0,60	NS ; P<0,05#
2-AG 1POST (pmol/ml)	3,15 ± 0,39	4,29 ± 0,50	NS ; P<0,05#

= Effet groupe

Comme précédemment montré, le PYY augmente significativement chez les sujets normo pondéraux mais pas chez les patients obèses (Figure 6a). Le pourcentage de réduction post prandiale de PYY est significativement plus élevé chez les sujets normo pondéraux par rapport aux sujets obèses (Figure 6b). Il existe une corrélation négative entre le tour de taille et le pourcentage de réduction post prandiale du PYY (Figure 6c).

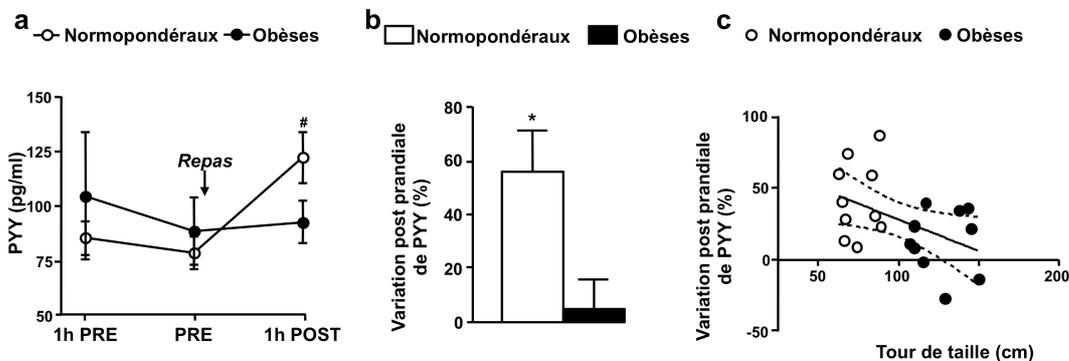


Figure 6. Dérégulation post prandiale du PYY anorexigène dans l'obésité. (a): Concentrations plasmatiques de PYY 1 heure avant (1h PRE), immédiatement

*avant (PRE) et 1 heure après la fin du repas (1h POST). (b) : Variations post prandiales de PYY. (c) : Corrélation entre les variations post prandiales de PYY et le tour de taille ($r=-0,462$, $P=0,04$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$ normaux pondéraux versus obèses, # $P<0,05$; ### $P<0,001$ par rapport au temps précédent.*

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre le PYY et l'AEA, que l'on considère la valeur absolue post prandiale ou le pourcentage de réduction post prandiale. Donc, par une régression linéaire multiple, nous avons pu montrer que les variations post prandiales de l'AEA et du PYY expliquaient ensemble 34% de la variance du tour de taille, 13% étant expliqué par chacune des variations prises séparément.

Discussion et conclusion

Nos résultats confirment que les sujets obèses ont des niveaux d'endocannabinoïdes plus élevés à jeun, et ce d'autant plus que le tour de taille augmente. Ceci témoigne donc d'une dérégulation du SEC dans l'obésité, en particulier dans l'obésité abdominale.

Nos résultats sont les premiers à suggérer un rôle des endocannabinoïdes et plus précisément de l'AEA dans la prise alimentaire.

Chez le sujet normopondéral, nous mettons en évidence une augmentation pré prandiale et une diminution post prandiale des concentrations d'AEA. Ces résultats sont cohérents avec le fait que le SEC est un système facilitant la prise de nourriture. Cette élévation pré prandiale de l'AEA pourrait être considérée comme un signal de faim. Cependant, d'autres études sont nécessaires avant d'affirmer cela. Nos sujets savaient en effet non seulement qu'un déjeuner allait leur être servi, mais ils connaissaient aussi l'heure de ce repas. Il sera ainsi nécessaire d'étudier l'évolution des concentrations plasmatique d'AEA chez des sujets privés de tous stimuli environnementaux qui pourraient perturber une prise alimentaire physiologique. Ceci permet ainsi

de recréer une séquence prandiale spontanée et d'étudier au mieux la physiologie du comportement alimentaire (86).

Chez le sujet obèse, l'élévation pré prandiale significative de l'AEA est aussi présente et elle n'est pas différente de celle observée chez les sujets normopondéraux, témoignant du fait que ce système garde une certaine fonctionnalité dans le contexte d'obésité. En revanche, contrairement à ce qui est observé chez le sujet normopondéral, chez le sujet obèse il n'existe pas de diminution significative d'AEA une heure après la consommation du repas. Nous pouvons envisager qu'une charge calorique plus importante aurait permis d'obtenir une réduction significative de ces concentrations plasmatiques chez l'obèse ou encore que cette diminution significative aurait pu être mise en évidence en réalisant des prélèvements post prandiaux 2 ou 3 heures après la consommation du repas. Il n'en reste pas moins que nos résultats témoignent d'un dysfonctionnement dynamique du SEC dans l'obésité et que la persistance de l'élévation post prandiale de l'AEA peut participer à un véritable cercle vicieux métabolique.

Notons d'ailleurs que dans un modèle de rat génétiquement obèse (le rat Zucker), les concentrations tissulaires d'endocannabinoïdes au niveau du duodénum restent élevées 30 minutes après la prise alimentaire alors que ces mêmes concentrations s'effondrent chez l'animal non obèse (68).

Il faut aussi mentionner que nos sujets étaient par ailleurs résistants à l'insuline. Or l'état d'insulinorésistance est une des conditions associées à une élévation des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes chez l'Homme (62). En effet, l'infusion d'insuline chez l'Homme diminue la concentration plasmatique d'AEA mais cette régulation est perdue chez des sujets résistants à l'insuline (62). Ainsi, la présence d'une résistance à l'insuline chez nos sujets obèses pourrait participer à l'absence de diminution post prandiale des concentrations plasmatiques d'AEA mise en évidence dans ce groupe.

Notre travail est en faveur d'un rôle différent des 2 principaux endocannabinoïdes, AEA et 2-AG, dans la régulation de la prise alimentaire.

Ceci n'est finalement pas si étonnant et il faut rappeler ici que ces 2 composés ont des voies de synthèse et dégradation différentes. Le 2-AG est synthétisé en 2 étapes. L'activation de la phospholipase C-β permet la synthèse de 1,2-diacylglycerol qui est ensuite clivé par la diacylglycérol lipase-α pour donner le 2-AG (87). La production de l'AEA passe probablement par la voie de la phospholipase D qui permet l'hydrolyse de la N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine même si d'autres voies de synthèses ont été proposées (88). De plus, l'AEA peut lier d'autres récepteurs que les récepteurs des cannabinoïdes comme le récepteur *transient receptor potential vanilloid type-1 channels* ou encore le récepteur PPAR γ à plus fortes concentrations alors que le 2-AG lie plus spécifiquement les récepteurs des cannabinoïdes. Une modulation différente des niveaux de ces 2 endocannabinoïdes a déjà été retrouvée (64, 89). Ainsi, dans un travail portant sur 10 obèses diabétiques, 11 obèses non diabétiques et 8 normopondéraux, Annuzzi et collaborateurs retrouvent une augmentation des concentrations adipocytaires d'AEA ainsi que d'OEA et de PEA mais pas de 2-AG, dont la concentration tissulaire est au contraire diminuée dans les 2 groupes d'obèses par rapport aux sujets normopondéraux (64). Dans un travail très récemment publié par Cable et collaborateurs portant sur une population de sujets dont les IMC varient de 19,0 à 33,3 kg/m², il existe une corrélation positive entre le tour de taille et l'activité de la FAAH (enzyme responsable de la dégradation de l'AEA) mesurée au niveau du tissu adipeux sous cutané mais pas avec celle de la MGL (enzyme responsable de la dégradation du 2-AG) mesurée au niveau du même tissu (89).

Nous ne pouvons bien sûr affirmer l'origine de ces endocannabinoïdes plasmatiques. Néanmoins, à l'instar des variations des concentrations des endocannabinoïdes dans le tissu gastro-intestinal en fonction du statut nutritionnel, retrouvées chez l'animal, une des possibilités serait que ces endocannabinoïdes soient produits à ce niveau. Ils pourraient alors intervenir sur la régulation de la prise alimentaire en modifiant les sécrétions des hormones gastro-intestinales ou l'activité du nerf vague. On pourrait aussi envisager que ces endocannabinoïdes libres dans la circulation générale à partir du tractus gastro-intestinal pourraient agir directement sur les circuits du

système nerveux central et sur la libération des neuropeptides et neurotransmetteurs intracérébraux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire mais cela nécessiterait une demi-vie relativement longue des endocannabinoïdes plasmatiques et celle-ci n'a jamais été mesurée jusque là. Quoi qu'il en soit, si nous sommes trop en amont pour affirmer cela, il n'en reste pas moins que nos résultats et la cinétique prandiale que nous mettons en évidence va à l'encontre de la théorie qui considère ces endocannabinoïdes plasmatiques comme un simple relargage tissulaire passif. Enfin, nous avons mis en évidence que les sujets obèses présentaient un dysfonctionnement simultané et indépendant d'un signal orexigène, l'AEA, et d'un signal anorexigène, le PYY. Cette double dérégulation permet d'envisager que pour gagner en efficacité les molécules contre l'obésité devraient cibler conjointement au moins 2 systèmes, inhibant d'une part un système orexigène et activant d'autre part un système anorexigène. Cette approche bidirectionnelle, déjà utilisée d'ailleurs pour les traitements antihypertenseurs serait parfaitement logique et plus efficace, compte tenu de la complexité des mécanismes impliqués dans la régulation de la balance énergétique. Malgré le retrait du marché des premiers antagonistes de CB₁ du fait de leurs effets secondaires psychiatriques, des études récentes ont montré l'efficacité des antagonistes périphériques de CB₁. Nos résultats qui mettent en évidence le rôle de l'AEA dans l'initiation de la prise alimentaire permettraient d'envisager un traitement ayant une double approche. Celle-ci pourrait en effet inclure un antagoniste de CB₁ à faible dose qui jouerait sur le déclenchement de la prise alimentaire en association avec une molécule qui ciblerait une autre voie de la prise alimentaire ou de la dépense énergétique. Il a ainsi été très récemment montré chez l'animal un effet synergique sur la réduction de la prise alimentaire après l'administration d'un antagoniste de CB₁ et d'un analogue du GLP-1 donnés à des doses n'ayant pas donné d'effets séparément (90).

Notre étude a fait l'objet d'une communication orale lors du Congrès de la Société Française d'Endocrinologie à Deauville (2010) et lors du congrès de la *Society for the Study of Ingestive Behavior* à Clearwater, Floride (2011). Elle est publiée dans *The International Journal of Obesity* (Cf Annexe).

Chapitre 2 : Quel est l'effet d'une perte de poids, obtenue par court-circuit gastrique ou par mesures hygiéno-diététiques sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes ?

Introduction

La chirurgie bariatrique est actuellement reconnue comme une procédure de choix pour le traitement de l'obésité sévère et compliquée (69-72, 91, 92). Sa place dans la stratégie thérapeutique de ces obésités est justifiée par son efficacité remarquable sur le poids mais aussi sur les comorbidités associées à l'obésité (69-72, 92). Les effets de la chirurgie bariatrique et plus spécifiquement du court circuit gastrique (CCG) sur le diabète de type 2 et les troubles du métabolisme glucidique sont particulièrement intéressants et même spectaculaires. S'il n'existe pas de réel consensus quant à la définition de la rémission du diabète de type 2 après la chirurgie bariatrique, il n'en reste pas moins que la plupart des études portant sur de grandes séries mettent en évidence un taux de rémission de l'ordre de 80% du diabète de type 2 après un CCG (93). Plusieurs théories, présentées ci-dessous, permettent d'expliquer l'effet métabolique de la chirurgie de type CCG sur le diabète de type 2 (94). Le rôle du SEC dans cette chirurgie métabolique d'une part, et les effets de ce type de chirurgie sur le SEC d'autre part ne sont pas connus.

Etat de la question

Le CCG est une technique chirurgicale malabsorptive et restrictive décrite pour la première fois au début des années 1990 (Figure 7). Elle consiste en une réduction du volume de l'estomac et en un court-circuit du duodénum. C'est la technique de chirurgie bariatrique qui tend à être la plus réalisée en France (95). Elle permet en effet des pertes de poids de l'ordre 35-40 % du poids total à un an avec une tolérance satisfaisante. De plus, le CCG permet une

amélioration spectaculaire des complications de l'obésité et en particulier du diabète de type 2 (70, 93).



Figure 7. Schémas du court-circuit gastrique réalisé par le professeur Denis Collet.

Le remarquable impact du CCG sur le diabète de type 2 a déjà été décrit il y a plusieurs années. Ainsi, en 1995, Pories et collaborateurs rapportaient qu'après 14 ans de suivi, 146 patients obèses diabétiques ayant bénéficié d'un CCG étaient normoglycémiques sans antidiabétiques oraux au terme de ce suivi (96). Plusieurs études ont depuis confirmé ces résultats (97, 98). Citons aussi l'étude SOS (*Swedish Obese Subjects*) qui met en évidence qu'après 10 ans de suivi, la «guérison» du diabète de type 2 est 3 fois plus fréquente dans le groupe «chirurgie» par rapport au groupe «traitement conventionnel» (71).

Plusieurs théories sont actuellement proposées pour expliquer cette amélioration du diabète de type 2 précoce et relativement spécifique du CCG (94, 99). Il est important de préciser d'emblée que compte tenu du caractère spécifique de cette amélioration obtenue après CCG par rapport aux autres méthodes d'amaigrissement et de sa relative précocité, il est maintenant admis que cet effet est indépendant de la perte de poids (100). De même,

l'hypothèse de la restriction calorique ne peut expliquer entièrement l'effet «antidiabétique» du CCG, puisque cette restriction calorique péri-opératoire est aussi présente dans les autres procédures de chirurgie bariatrique ou de chirurgie gastrique alors que les effets antidiabétiques sont spécifiques du CCG.

Une des hypothèses proposées est l'effondrement après CCG des niveaux de ghréline, hormone orexigène sécrétée par l'estomac (101). Une deuxième hypothèse est celle de l'intestin distal. Compte tenu du montage chirurgical, en effet les aliments arrivent de façon plus précoce au niveau de l'intestin distal ce qui augmente la sécrétion de GLP-1 et augmente la tolérance glucidique (100, 102). L'augmentation de la sécrétion du PYY ou encore de l'oxyntomoduline a aussi été rapportée (103, 104). L'hypothèse de l'intestin proximal a aussi été proposée. Cette théorie initialement proposée par F Rubino sur des modèles de rats diabétiques non obèses suggère que l'exclusion d'une courte portion de l'intestin proximal (principalement le duodénum) du contact avec les aliments a des effets antidiabétiques propres, probablement par l'intermédiaire de facteurs duodénaux non identifiés qui modifient la tolérance glucidique (105). Enfin, une autre hypothèse récemment proposée est celle concernant la néoglucogenèse intestinale. Il a en effet été récemment montré sur des modèles murins équivalents du CCG humains que ce type de chirurgie induisait la néoglucogenèse intestinale, qui par l'intermédiaire d'une détection par le senseur hépato portal et par le transporteur de glucose GLUT2, entraînait une diminution de la prise alimentaire et une diminution de la production hépatique de glucose et donc une amélioration de l'équilibre glycémique (106).

Ces hypothèses non exclusives (107) sont aussi non exhaustives et il peut logiquement être envisagé que des modifications de l'activité du SEC pourraient participer à l'effet métabolique du CCG.

Plusieurs travaux réalisés chez l'animal attestent en effet que le SEC est présent tout au long du tractus gastro-intestinal. Chez l'animal, CB₁ est localisé principalement au niveau des neurones du système nerveux entérique, qui sont le principal site d'action des cannabinoïdes dans le tube digestif (108). Les endocannabinoïdes sont aussi présents et quantifiables au niveau du

tractus gastro-intestinal. Leur source n'est pas parfaitement connue mais il semble que chez l'Homme, les cellules épithéliales puissent produire des endocannabinoïdes (108). Enfin, les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des endocannabinoïdes sont retrouvées tout au long du tractus gastro-intestinal au niveau des entérocytes et ces cellules de la lamina propria. Le SEC est impliqué dans la motilité intestinale, dans la sécrétion gastrique ou encore dans la modulation de la réponse inflammatoire intestinale (109). Ainsi, il a été rapporté une augmentation des concentrations tissulaires d'AEA et de 2-AG au niveau du duodénum dans la maladie cœliaque, ou encore une augmentation des concentrations tissulaires des endocannabinoïdes au niveau colique dans les situations de cancers colorectaux, de polypes adénomateux ou de diverticulite (108).

La relation entre le SEC localisé au niveau gastro-intestinal et la prise alimentaire a été encore très récemment illustrée par une étude réalisée par Dipatrizio et collaborateurs (110). En effet, chez des rats soumis à une procédure de *sham feeding*, -c'est à dire chez lesquels les aliments après être passés dans la bouche et dans l'œsophage sont drainés hors de l'estomac par une canule, ce qui permet de juger des propriétés orosensorielles des aliments - l'exposition orale aux lipides mais pas au sucre ou aux protéines, augmente les concentrations tissulaires d'endocannabinoïdes exclusivement au niveau du jéjunum et pas au niveau d'autres organes périphériques (langue, estomac, iléon, foie, pancréas) ni au niveau de l'hypothalamus. Une vagotomie sous diaphragmatique abolit cet effet. De plus, le blocage sélectif de ce signal (par infusion intra duodénale d'antagoniste de CB₁) entraîne une diminution dose-dépendante de la consommation de lipides chez ces animaux (110).

Enfin, dans un modèle de rat ayant bénéficié d'un CCG, il existe une diminution des concentrations musculaires d'AEA et hépatiques d'AEA et de 2-AG 1 mois après l'opération par comparaison avec des animaux ayant bénéficié d'une opération factice (111).

Ainsi, tous ces éléments sont de forts arguments pour pouvoir envisager que le SEC puisse être un des acteurs participant à la régulation de la réponse métabolique associée au CCG.

Question posée

Dans ce contexte, nous nous sommes posés la question d'un effet propre de la chirurgie de type CCG sur les niveaux circulants des endocannabinoïdes chez l'Homme. En effet, compte tenu des travaux déjà publiés et de nos résultats récents (77), suggérant fortement un rôle de l'AEA, provenant probablement du tractus gastro-intestinal, dans la régulation de la prise alimentaire chez l'animal mais aussi chez l'Homme (68, 77, 110), notre hypothèse est que le CCG et l'intervention hygiéno-diététique impacteront différemment l'activité périphérique du SEC.

Notre objectif est donc d'étudier les modifications de l'activité périphérique du SEC après une perte de poids équivalente en pourcentage, obtenue par CCG ou par mesures hygiéno-diététiques chez des patients obèses et de corrélérer ces modifications avec les changements métaboliques et comportementaux obtenus avec ces 2 traitements.

Patients et méthodes

Vingt patients obèses devant bénéficier d'un CCG (groupe «chirurgie»), 20 patients obèses bénéficiant d'une prise en charge hygiéno-diététique (groupe «mesure hygiéno-diététique») et 10 sujets normopondéraux (groupe normopondéraux) seront inclus.

Critères d'inclusion et d'exclusion:

Les critères d'inclusion de l'étude sont les suivants :

Groupe de patients obèses «chirurgie»

- Age compris entre 18 et 60 ans
- Obésité avec IMC > 40kg/m² ou compris entre 35 et 40 kg/m² avec des complications de l'obésité associées

- Prise en charge médicale pluridisciplinaire de l'obésité pendant une période de 6 à 12 mois en pré opératoire
- Patient s'engageant à un suivi post opératoire prolongé
- Prise de contraception efficace pour les femmes en âge de procréer
- Consentement libre, éclairé et signé par le patient après avoir été informé de l'étude par l'investigateur (avant tout examen nécessité par l'essai)
- Sujet affilié ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale

Groupe de patients obèses «mesures hygiéno-diététiques»

Conformément aux recommandations des sociétés savantes, la chirurgie de l'obésité ne peut s'envisager qu'après un suivi de 6 à 12 mois par une équipe pluridisciplinaire individualisée pour la mise en place de mesures hygiéno-diététiques. Le groupe de patients obèses « mesures hygiéno-diététiques » correspond aux patients pour lesquels une chirurgie est envisagée à moyen terme qui vont dans un premier temps bénéficier de ce suivi préopératoire. Les critères d'inclusion seront donc les mêmes que ceux des patients du groupe «chirurgie»

Groupe de patients normopondéraux

- Age compris entre 18 et 60 ans
- IMC compris entre 18 et 25 kg/m²
- Poids stable depuis 3 mois au moins
- Absence de préoccupation alimentaire attestée par un score de restriction <6, un score de déshinhibition <4 et un score de faim <4 lors du *Three factor Eating Questionnaire* (TFEQ)

Les critères d'exclusion correspondent aux contre indications de la chirurgie bariatrique :

- Absence de prise en charge préalable identifiable
- Incapacité du patient à bénéficier d'un suivi médical prolongé

- Psychoses non stabilisées, dépression sévère, troubles de la personnalité en dehors de l'avis contraire du psychiatre référent
- Toxicomanies, alcoolisme
- Pathologies associées mettant en jeu le pronostic vital à court terme
- Patients dans l'incapacité de s'assumer et ne bénéficiant pas d'un soutien social ou familial suffisant

Par ailleurs les critères d'exclusion comprennent aussi pour tous les sujets, quel que soit le groupe :

- Les situations qui selon l'investigateur pourraient interférer avec la participation optimale à l'étude ou constituer un risque particulier pour le sujet
- La grossesse et l'allaitement
- La présence de Tétrahydrocannabinol (THC) dans les urines
- Le tabagisme actif

Les critères d'inclusion et d'exclusion sont les mêmes dans le groupe «mesures hygiéno-diététiques» et dans le groupe «chirurgie» dans la mesure où cette prise en charge multidisciplinaire de 12 semaines est incluse dans le parcours de soins préopératoires obligatoires avant la réalisation d'une chirurgie bariatrique.

Le groupe «chirurgie» bénéficiera : en pré-opératoire et à 1 et 6 mois post opératoire de i) un phénotypage comportemental et métabolique, ii) une biopsie du tissu adipeux sous cutané en per opératoire et à 6 mois post opératoire et iii) une évaluation basale et dynamique du tonus plasmatique endocannabinoïde.

Le groupe «mesures hygiéno-diététiques» bénéficiera avant et 6 mois après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques ainsi qu'après un temps X ayant permis de perdre le même poids en % que le patient apparié du groupe chirurgie à 1 mois post opératoire (si ce temps tX est différent du temps T6

mois), de i) un phénotypage comportemental et métabolique, ii) une évaluation basale et dynamique du tonus plasmatique endocannabinoïde. Ces mesures hygiéno-diététiques consistent en une prise en charge multi disciplinaire (diététicienne, psychologue, kinésithérapeute, médecin) sous la forme d'une hospitalisation d'une semaine suivie de 12 séances hebdomadaires (une séance correspondant à une demi-journée et consistant en une session de kinésithérapie, un atelier de diététique, un entretien avec la diététicienne et un entretien avec un médecin) puis d'une nouvelle évaluation à 3, 6 et 12 mois.

Le groupe «normopondéraux» bénéficiera d'un phénotypage comportemental et d'une évaluation basale et dynamique du tonus plasmatique endocannabinoïde.

L'évaluation des niveaux circulants des endocannabinoïdes sera réalisée en situation basale, avant toute prise alimentaire (5 prélèvements plasmatiques à jeun réalisés à 09h00, 10h00, 11h00, 11h30, 12h00) mais aussi avant et après l'exposition à la nourriture pendant 30 minutes ainsi qu'après la consommation de pâtes (servies par portion de 150 g avec 5 g de beurre et 10 g de gruyère râpé, soit 265 Kcal/portion). Les prélèvements sont réalisés juste après la fin de la première portion, juste après la fin du repas puis 60, 120 et 180 min après la fin du repas. La détermination des concentrations plasmatiques de glucose, insuline et ghréline sera réalisée à chaque temps. Les patients du groupe «chirurgie» bénéficieront aussi d'une évaluation de l'activité adipocytaire du système endocannabinoïde (quantification par PCR *real-time* quantitative de niveaux d'expression du récepteur CB₁, des enzymes de dégradation et par spectrométrie de masse des concentrations intra-tissulaires des endocannabinoïdes) sur des biopsies de tissu adipeux réalisées lors de la chirurgie et à 6 mois post opératoire.

Le phénotypage métabolique comprendra une mesure du poids et de la taille pour calcul de l'IMC, une mesure du périmètre abdominal, une détermination des concentrations à jeun d'insuline, leptine, ghréline, adiponectine, HbA1C, une évaluation du profil lipidique à jeun (taux de HDL cholestérol, triglycérides,

LDL cholestérol), une détermination des enzymes hépatiques à jeun, la mesure de l'adiposité abdominale par tomодensitométrie, la détermination du pourcentage de masse grasse corporelle par absorptiométrie biphotonique.

Le phénotypage comportemental comprendra un questionnaire de dépression (version française du questionnaire abrégé de Beck et des scores de dépression et d'anxiété de l'échelle HAD) un questionnaire de comportement alimentaire (score de faim, désinhibition et restriction obtenus lors de la version française du *Three Factor Eating Questionnaire*), un questionnaire de qualité de vie (Questionnaire Orwell 1997) et un questionnaire de personnalité (*Trait Character Inventory*, TCI).

Le dessin expérimental de l'étude est représenté sur la figure 8.

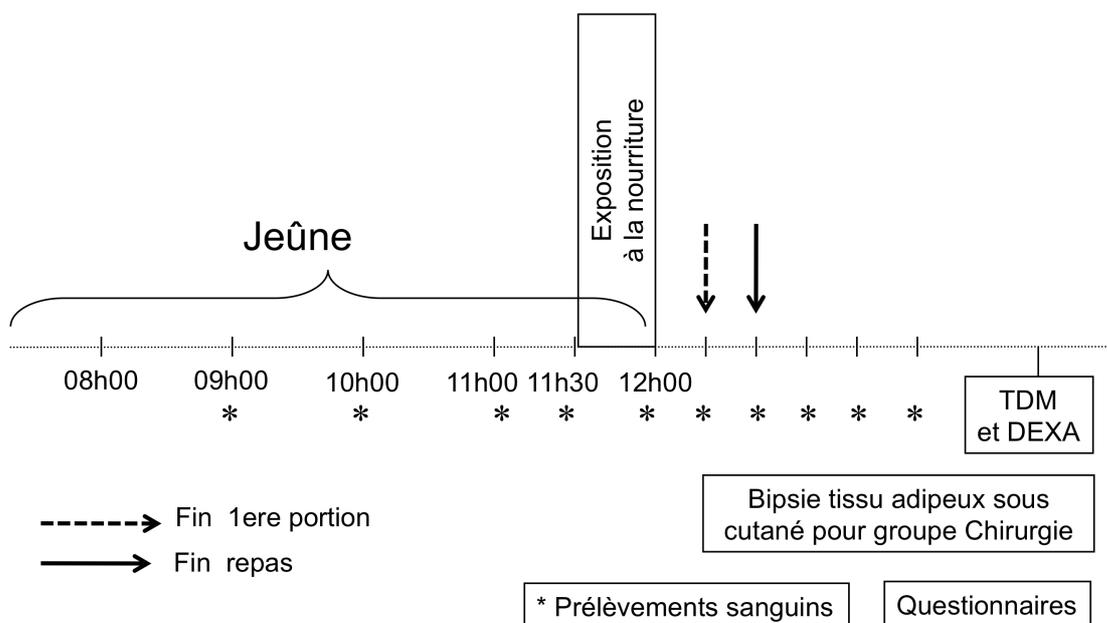


Figure 8. Dessin expérimental de l'étude. Les questionnaires comprennent une évaluation de la qualité de vie, de l'anxiété, de la dépression, et de la personnalité. La tomодensitométrie (TDM) et la DEXA permettent de mesurer la graisse viscérale et la composition corporelle respectivement. La biopsie de tissu adipeux n'est réalisée que dans le groupe «chirurgie». Au cours de l'intervention chirurgicale, une biopsie de tissu adipeux sous-cutané et de tissu adipeux viscéral est réalisée. A 6 mois post opératoire, une biopsie de tissu adipeux sous cutanée est réalisée.

Tous les patients du groupe chirurgie vont bénéficier d'un CCG qui sera toujours réalisé par le même opérateur (Professeur Denis Collet, Hôpital Haut Lévêque, CHU de Bordeaux). La technique de la chirurgie est brièvement rapportée ci dessous.

Cette intervention est à la fois restrictive et malabsorptive, d'où son efficacité. Restrictive car elle comporte la création d'une poche gastrique proximale de petit volume (environ 20 à 30 cc), qui a un effet limitatif sur les quantités ingérées. Malabsorptive, car elle comporte la création d'une anse intestinale alimentaire de 1,20 m à 1,50 m (en fonction de l'importance de l'obésité) par laquelle transitent les aliments au sortir de l'estomac avant d'être mélangés aux sécrétions biliaires et pancréatiques au niveau de l'anastomose jéjuno-jéjunale au pied de l'anse. Ceci entraîne, malgré l'absence de résection intestinale, une réduction de la surface jéjunale physiologiquement efficace. Actuellement, cette intervention est devenue le procédé de référence, malgré sa relative complexité comparée à la gastroplastie par anneau ajustable.

Mesures anthropométriques

Le poids est mesuré sur une balance avec une précision de 0,1 Kg et la taille sur une toise avec une précision de 0,5 cm. Le tour de taille est mesuré avec un mètre ruban entre les épines iliaques supérieures et les dernières côtes. La composition corporelle est mesurée par DEXA et la graisse viscérale par scanner.

Détermination des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes

La méthode de dosage des endocannabinoïdes est décrite dans le chapitre introduction générale (voir page 25-27).

Détermination des concentrations plasmatiques des autres paramètres hormonaux et des paramètres biochimiques

Les fractions lipidiques, la glycémie et les enzymes hépatiques ont été déterminées par des méthodes enzymatiques et fluorométriques grâce à un

analyseur Olympus AU2700 (Beckman Coulter, Villepinte, France). Les concentrations de leptine, PYY, et GLP-1 seront déterminées par des kits ELISA ou RIA.

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. L'aire sous courbe (ASC) a été calculée selon la méthode trapézoïdale. Les variables des 3 groupes avant toute intervention sont comparées par ANOVA. Des tests pour échantillons appariés, paramétriques ou non selon la distribution de la variable sont utilisés pour comparer les données avant et après chirurgie ainsi qu'avant et après mesures hygiéno-diététiques. La significativité est retenue pour $P < 0,05$.

L'étude a reçu le soutien financier du CHU de Bordeaux dans le cadre de l'Appel d'Offre Interne 2008 ainsi qu'une allocation « Société Française de Diabétologie-Roche » en 2010.

Résultats

Douze patients du groupe chirurgie ont été recrutés et évalués avant et à un mois post opératoire et 9 à six mois post opératoire. Six patients ont été inclus dans le groupe mesures hygiéno-diététiques dont 4 évalués lors d'au moins 2 des évaluations prévues. Deux patients du groupe normopondéraux ont été recrutés et évalués. Nous présentons ici des résultats préliminaires portant sur 2 patients du groupe normopondéraux, 7 patients du groupe chirurgie avant et 1 mois après CCG et 4 patients du groupe mesures hygiéno-diététiques avant et après une perte de poids équivalente en pourcentage.

Caractéristiques des sujets avant intervention.

Les caractéristiques des patients avant toute intervention sont résumées dans la table 5. Les patients obèses, quel que soit le groupe, chirurgie ou mesures hygiéno-diététiques, ont un IMC et un tour de taille plus élevés que les patients

normo pondéraux. En revanche, ces paramètres anthropométriques ne sont pas différents entre les 2 groupes de patients obèses.

Table 5. Caractéristiques anthropométriques, hormonales et biochimiques des sujets avant toute intervention.

	Chirurgie	Mesures hygiéno- diététiques	Normopondéraux
Sexe	3F/4H	1F/3H	2F/0H
Age (années)	35,6 ± 3,5	43,0 ± 4,5	34,5 ± 4,5
Poids (Kg)	144,3 ± 10,9	124,7 ± 7,0	59,2 ± 1,5
IMC (kg/m ²)	49,9 ± 2,8	42,7 ± 0,8	21,2 ± 1,5
Tour de taille (cm)	139,5 ± 3,1	144,5 ± 1,5	74,0 ± 6,4
TAS (mmHg)	128,8 ± 7,6	142,3 ± 6,6	122,5 ± 2,5
TAD (mmHg)	73,3 ± 5,7	89,0 ± 5,7	64,5 ± 1,5
Glycémie (mmol/l)	5,54 ± 0,48	7,07 ± 0,88	5,01 ± 0,09
ASAT (UI/l)	27,0 ± 5,54	39,75 ± 11,02	17,0 ± 2,0
ALAT (UI/l)	45,14 ± 8,77	62,75 ± 15,94	15,5 ± 1,5
GammaGT (UI/l)	43,00 ± 8,46	47,0 ± 11,46	17,5 ± 0,5
HDL Cholestérol (mmol/l)	1,14 ± 0,11	0,89 ± 0,05	1,42 ± 0,01
Triglycérides (g/l)	1,34 ± 0,36	1,58 ± 0,38	1,08 ± 0,8

TAS: tension artérielle systolique, TAD: tension artérielle diastolique, ASAT aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransférase, gamma GT : gamma glutamyl transferase LDL cholestérol : Low density lipoprotein cholesterol, HDL cholestérol : high density lipoprotein cholesterol.

Concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes avant toute intervention.

Nous confirmons à nouveau dans cette étude que les sujets obèses ont des concentrations plasmatiques d'AEA et de 2-AG plus élevées que les sujets normopondéraux (Figure 8) tandis qu'il n'existe pas de différence entre les 2 groupes de sujets obèses avant toute intervention. De façon intéressante, nous confirmons aussi i) l'existence d'une cinétique prandiale de l'AEA avec une augmentation préprandiale et une diminution dans la première heure post prandiale et ii) que cette diminution post prandiale est retardée chez le sujet obèse. Les concentrations plasmatiques de sujets obèses avant intervention et des sujets normopondéraux sont représentées sur la figure 9.

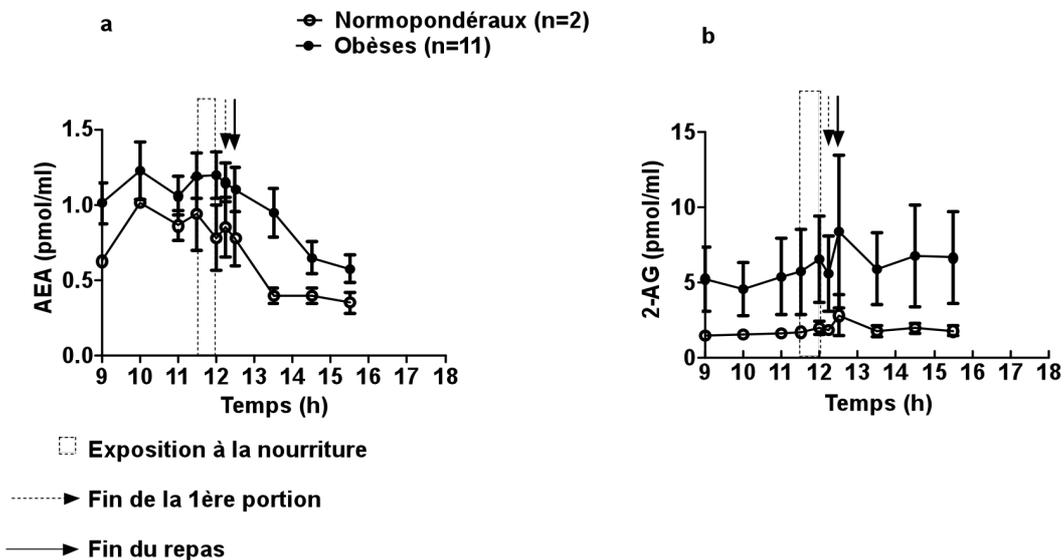


Figure 9. Concentrations plasmatiques d'AEA (a) et de 2-AG (b) chez les sujets contrôles normopondéraux et chez les sujets obèses avant toute intervention.

Conformément au protocole, les patients du groupe chirurgie ont donc été évalués à un mois post opératoire. La perte de poids moyenne de ces 7 patients à un mois post opératoire était de $8,6 \pm 0,4$ %.

Effets du CCG sur les caractéristiques anthropométriques et biochimiques

Les effets du CCG sur les caractéristiques anthropométriques et biochimiques sont représentés dans la table 6.

Table 6. Caractéristiques anthropométriques et biologiques des patients avant et un mois après la réalisation du CCG.

	Pré Opératoire	Post Opératoire
Poids (kg)	144,3 ± 10,9	131,8 ± 10,3 *
IMC (kg/m ²)	49,9 ± 2,8	45,78 ± 1,90*
Tour de taille (cm)	139,5 ± 3,1	136,0 ± 7,6
TAS (mmHg)	128,8 ± 7,6	132,3 ± 9,3
TAD (mmHg)	73,3 ± 5,7	70,2 ± 5,8
Glycémie (mmol/l)	5,54 ± 0,48	4,99 ± 0,3
ASAT (UI/l)	27,0 ± 5,54	30,0 ± 3,8
ALAT (UI/l)	45,14 ± 8,77	40,1 ± 12,5
GammaGT (UI/l)	43,00 ± 8,46*	26,1 ± 3,8*
HDL Cholestérol (mmol/l)	1,14 ± 0,11	1,01 ± 0,05
Triglycérides (g/l)	1,34 ± 0,36	1,19 ± 0,13

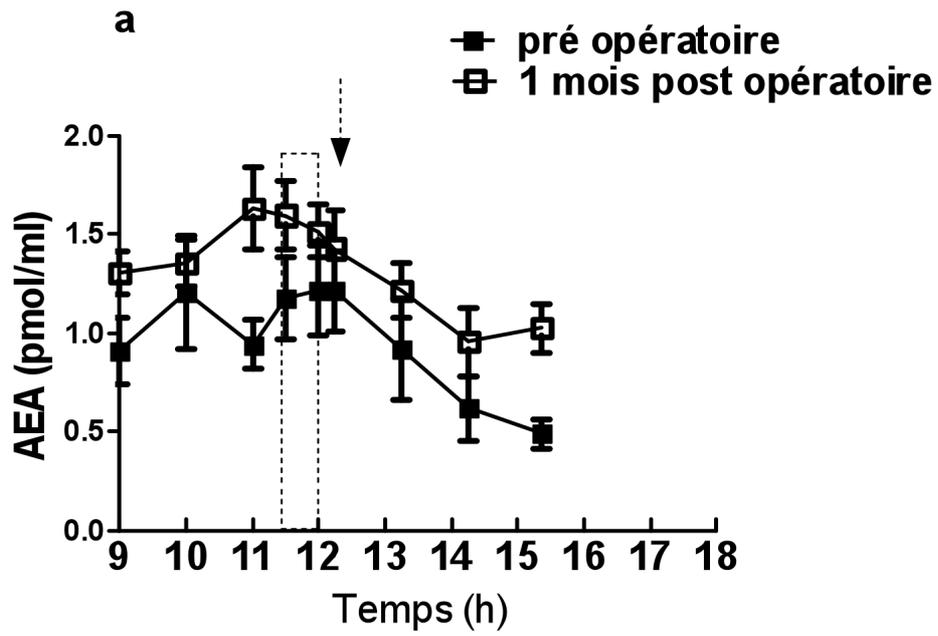
*TAS: tension artérielle systolique, TAD: tension artérielle diastolique, ASAT aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransférase, gamma GT : gamma glutamyl transferase LDL cholestérol : Low density lipoprotein cholesterol, HDL cholestérol : high density lipoprotein cholesterol. * P<0,05.*

Effet du CCG sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes.

A un mois post opératoire, les concentrations plasmatiques d'AEA à jeun tendent à augmenter par rapport à la valeur pré opératoire ($0,91 \pm 0,17$ versus $1,31 \pm 0,17$, $P=0,08$) (Figure 10 a et b et table 7). De la même manière, l'ASC totale d'AEA tend à augmenter en post opératoire ($362,68 \pm 1,5$ versus 478 ± 43 $P= 0,06$) (Figure 10 a et c et table 7).

Table 7 ; Variations des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes avant et un mois après un court circuit gastrique

	Pré opératoire	Post opératoire	P
AEA à jeun (pmol/ml)	$0,91 \pm 0,17$	$1,31 \pm 0,11$	$P=0,08$
ASC AEA (pmol/ml,min)	362 ± 68	478 ± 43	$P=0,06$
2-AG à jeun (pmol/ml)	$2,95 \pm 0,73$	$2,69 \pm 0,54$	$P=0,5$
ASC 2-AG (pmol/ml,min)	1161 ± 306	975 ± 154	$P=0,5$



□ Exposition à la nourriture

---> Fin de la 1ère portion

Figure 10. a) Concentrations plasmatiques d'AEA avant et un mois après le CCG.

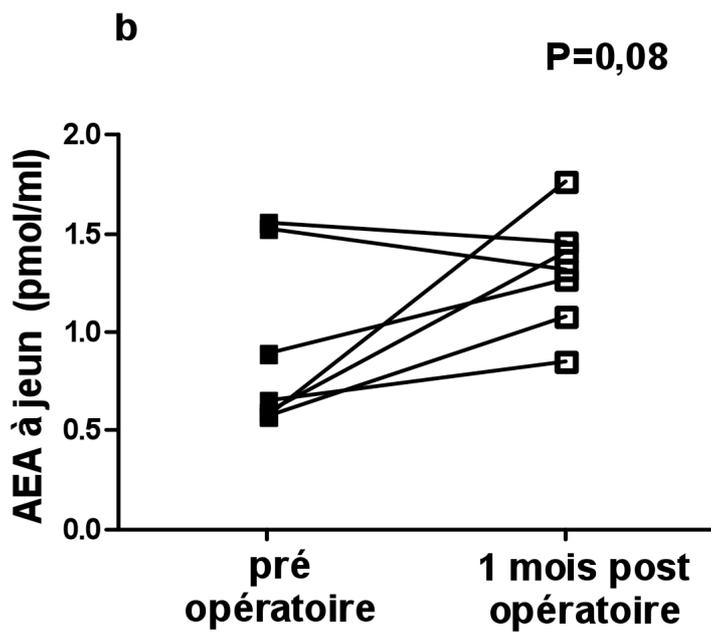


Figure 10. b) Concentrations plasmatiques à jeun d'AEA avant et un mois après le CCG.

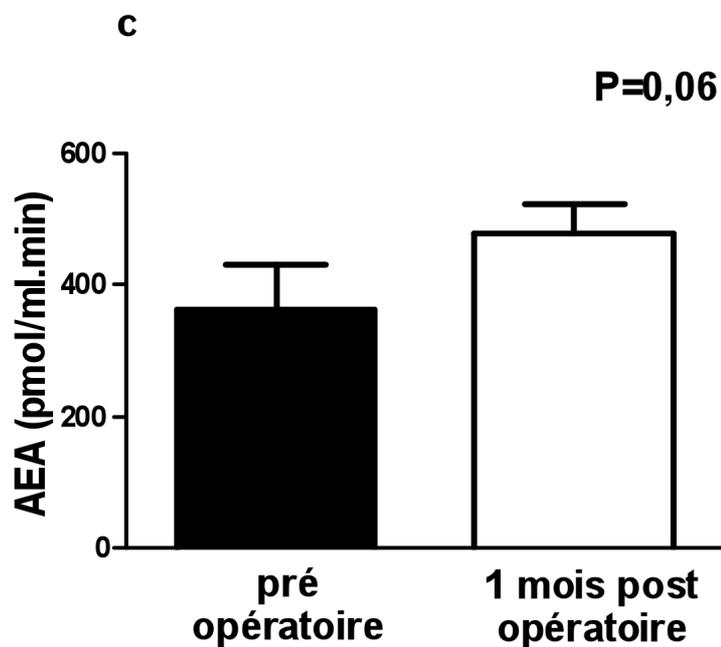
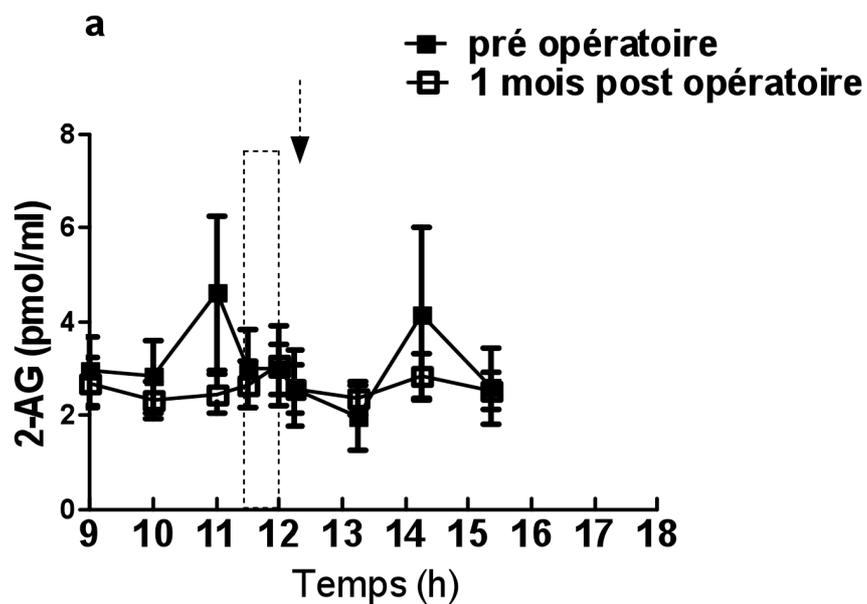


Figure 10. c) ASC d'AEA avant et un mois après le CCG.

En revanche, les concentrations de 2-AG ne sont pas modifiées avant et un mois après la réalisation du court-circuit gastrique (Figure 11 et table 7).



▣ Exposition à la nourriture

----> Fin de la 1ère portion

Figure 11. a) Concentrations plasmatiques de 2-AG avant et un mois après le CCG.

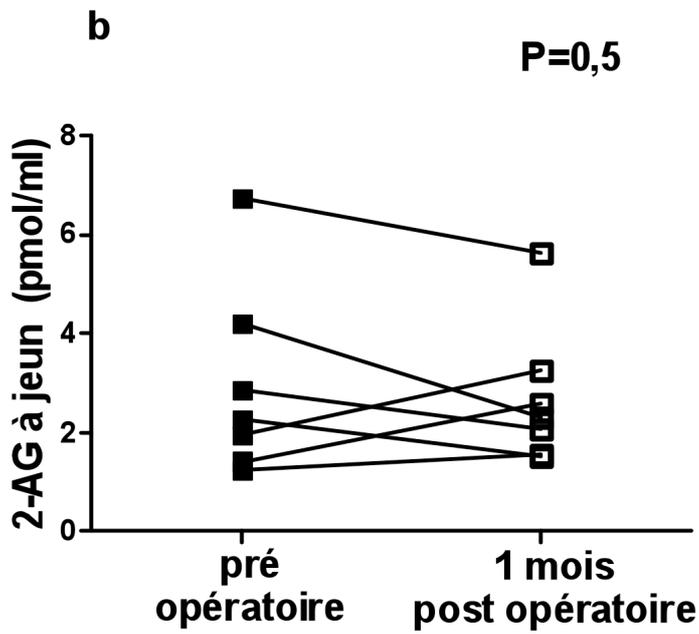


Figure 11.b) Concentrations plasmatiques à jeun de 2-AG avant et un mois après le CCG.

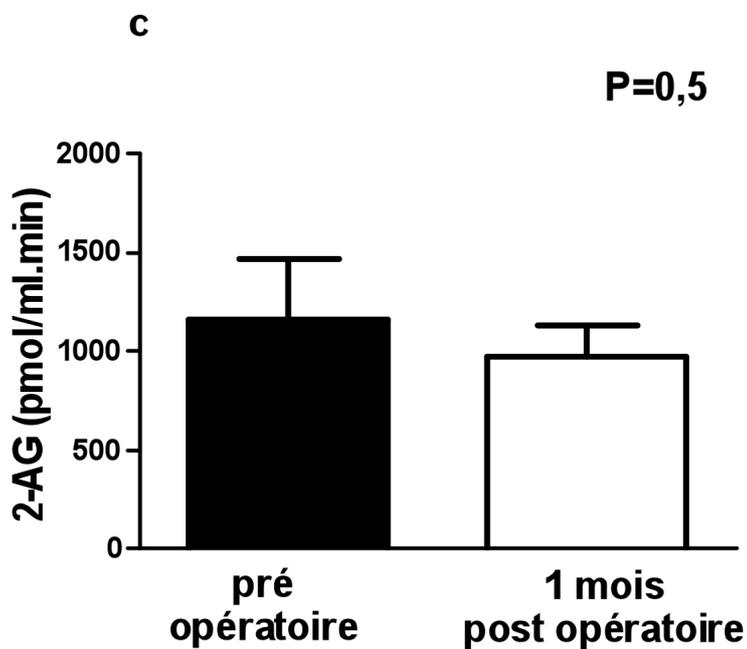


Figure 11. c) ASC de 2-AG avant et un mois après le CCG.

Effet des mesures hygiéno-diététiques sur les concentrations caractéristiques anthropométriques et biochimiques (Table 6).

Conformément au protocole, les patients du groupe mesures hygiéno-diététiques ont été étudiés avant et après une perte de poids équivalente en pourcentage à celle des patients opérés, un mois après la chirurgie. Cette perte de poids est en moyenne de $8,2 \pm 4,3$ %. Elle a été obtenue avec un délai moyen de $4,5 \pm 0,75$ mois. A noter cependant, que l'évolution du poids a été différente pour les 4 sujets inclus puisque 3 des 4 sujets ont perdu du poids, avec des poids qui sont passés de 129,9 à 120,3 kg, de 106,4 à 99,9 et 123,8 à 99,0 kg, tandis que le poids du 4^{ème} sujet est resté stable malgré la prise en charge (poids de début : 139,7 kg, poids de fin : 140 kg). En plus du faible nombre de sujets dans ce groupe, cette différence d'évolution du poids et des paramètres associés peut expliquer l'absence de changement significatif lors de la comparaison des différents paramètres avant et après l'intervention (Table 8).

Table 8. Caractéristiques anthropométriques et biologiques des patients avant et après une perte de poids moyenne de 8,2% obtenue par mesures hygiéno-diététiques.

	Pré mesures hygiéno-diététiques	Post mesures hygiéno-diététiques
Poids (kg)	124,7 ± 7,0	114,7 ± 9,7
IMC (kg/m ²)	42,7 ± 0,8	39,02 ± 1,7
Tour de taille (cm)	144,5 ± 1,5	135,0 ± 0,7
TAS (mmHg)	142,3 ± 6,6	121,3 ± 8,2
TAD (mmHg)	89,0 ± 5,7	68,0 ± 5,3
Glycémie (mmol/l)	7,07 ± 0,88	5,94 ± 0,42
ASAT (UI/l)	39,75 ± 11,02	27,25 ± 3,94
ALAT (UI/l)	62,75 ± 15,94	41,75 ± 11,25
GammaGT (UI/l)	47,0 ± 11,46	37,25 ± 11,19
HDL Cholestérol (mmol/l)	0,89 ± 0,05	0,94 ± 0,07
Triglycérides (g/l)	1,58 ± 0,38	1,20 ± 0,12

TAS: tension artérielle systolique, TAD: tension artérielle diastolique, ASAT aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransférase, gamma GT : gamma glutamyl transferase LDL cholestérol : Low density lipoprotein cholesterol, HDL cholestérol : high density lipoprotein cholesterol.

Effet des mesures hygiéno-diététiques sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes

Nous ne retrouvons pas de tendance en faveur de variations significatives d'AEA ou de 2-AG chez les sujets obèses avant et après une perte de poids moyenne de $8,2 \pm 4,3$ % obtenue par mesures hygiéno-diététiques (Figure 12 et 13 et table 9).

Table 9. Variations des concentrations plasmatiques endocannabinoïdes avant et après mesures hygiéno-diététiques.

	Pré « hygiène de vie »	Post « hygiène de vie »	P
AEA à jeun (pmol/ml)	$1,08 \pm 0,25$	$0,88 \pm 0,14$	P=0,6
ASC AEA (pmol/ml.min)	$407,50 \pm 58,70$	$314,80 \pm 46,90$	P=0,3
2-AG à jeun (pmol/ml)	$5,23 \pm 2,14$	$5,12 \pm 2,18$	P=0,7
ASC 2-AG (pmol/ml.min)	2352 ± 1090	1422 ± 358	P=0,7

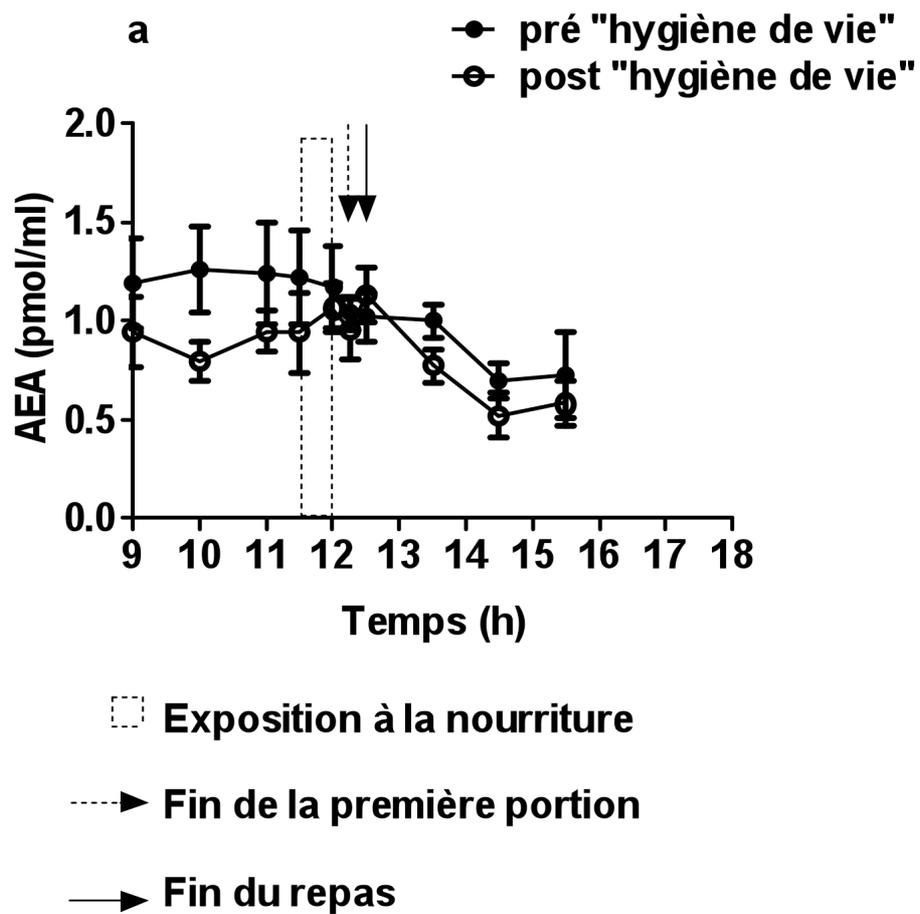


Figure 12. a) Concentrations plasmatiques d'AEA avant et après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques.

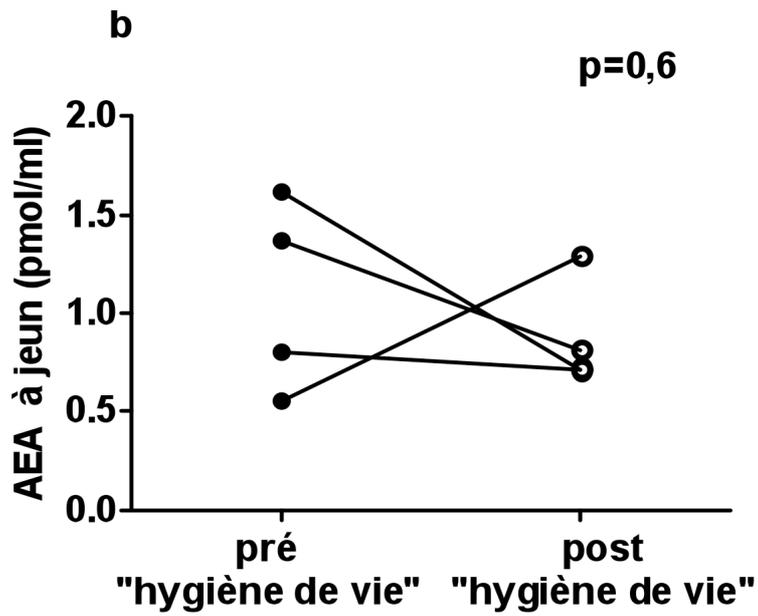


Figure 12. b) Concentrations plasmatiques à jeun d'AEA avant et après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques.

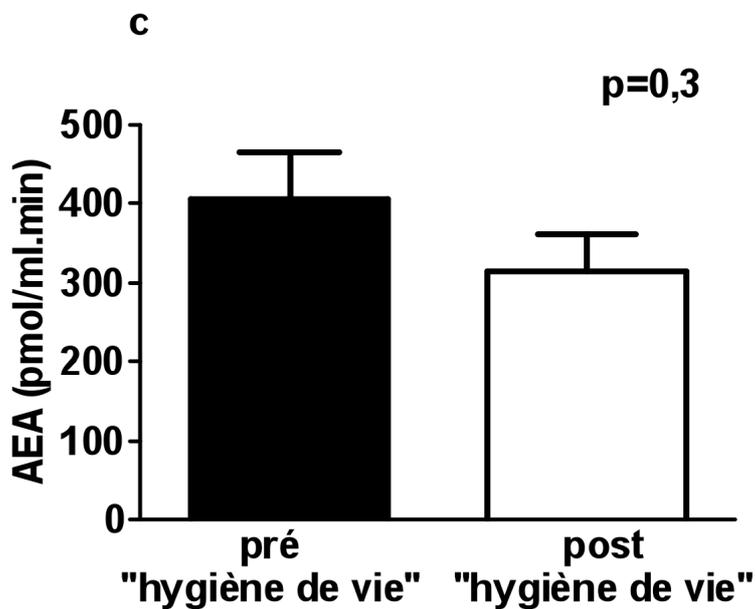


Figure 12. c) ASC d'AEA avant et après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques.

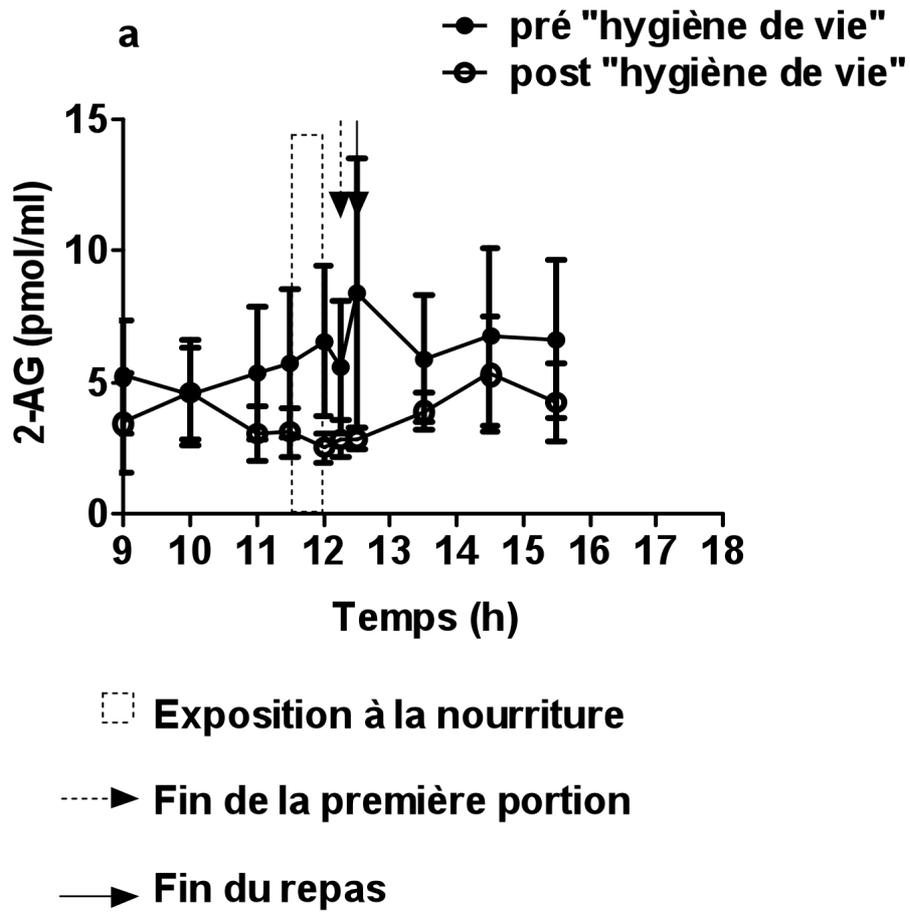


Figure 13. a) Concentrations plasmatiques de 2-AG avant et après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques.

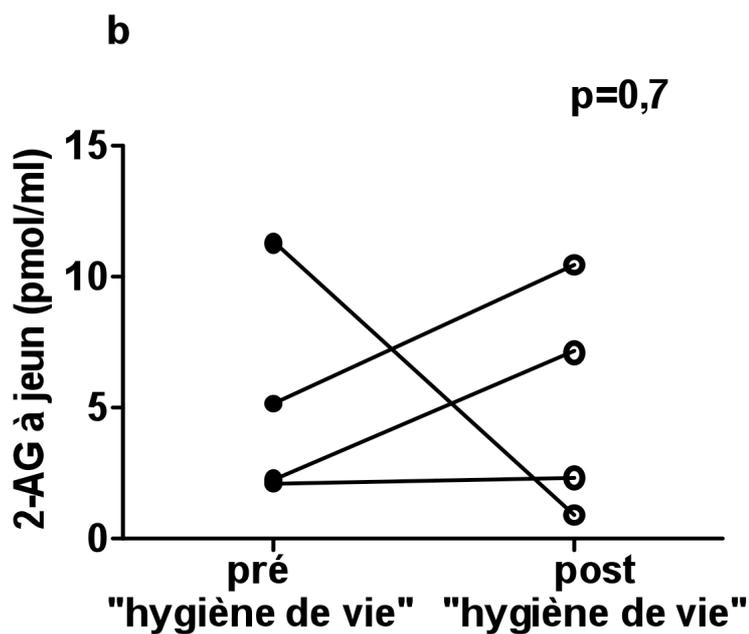


Figure 13 b) concentrations plasmatiques à jeun de 2-AG avant et après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques.

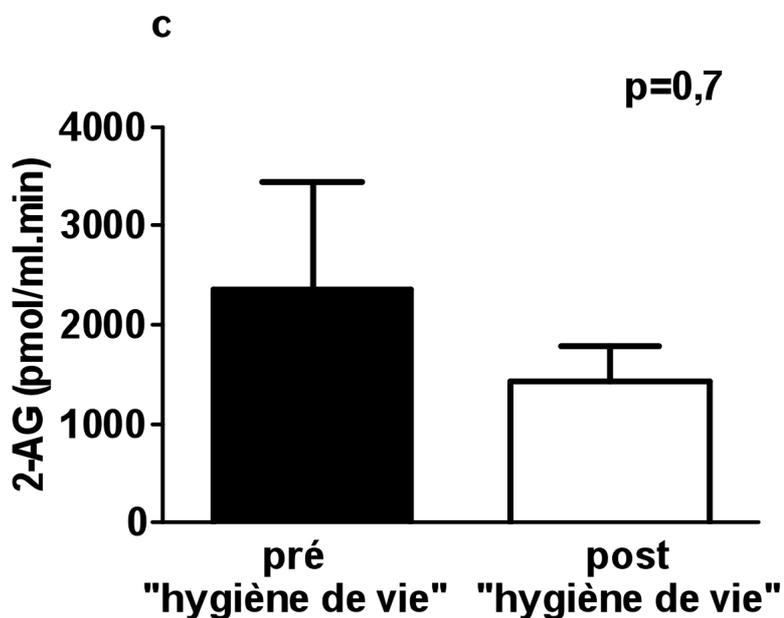


Figure 13 c) ASC de 2-AG avant et après la mise en place des mesures hygiéno-diététiques.

Néanmoins, nous pouvons remarquer, qu'en ce qui concerne les variations des concentrations plasmatiques à jeun d'AEA, elles diminuent chez les 3 patients qui perdent du poids et augmentent chez le seul patient dont la prise en charge n'a pas permis de perdre du poids (Figure 12 a, b, c, d).

Discussion et conclusion

Bien sûr, nos résultats sont préliminaires puisqu'ils sont obtenus sur un petit nombre de sujets. Néanmoins, sur 7 patients ayant bénéficié d'un CCG, nos résultats sont proches de la significativité.

Ils mettent en évidence qu'une même amplitude de perte de poids, obtenue par une méthode chirurgicale versus une prise en charge hygiéno-diététique entraîne des modifications différentes des concentrations plasmatiques d'AEA avec une augmentation des concentrations en post chirurgie alors que ces mêmes concentrations ne sont pas modifiées en post intervention hygiéno-diététique. Les variations d'AEA ne semblent donc pas dépendre du degré de perte de poids.

Ces effets différents de ces 2 traitements de l'obésité ont déjà été mis en évidence sur d'autres systèmes impliqués dans la prise alimentaire et dans la régulation de la balance énergétique et expliquent pour une part le remarquable impact de la chirurgie bariatrique sur le diabète de type 2 par rapport aux traitements comportementaux ou médicamenteux (94). Jusque là cependant, toutes les modifications retrouvées suggèrent un effet favorable de la chirurgie qui entraîne ainsi un effondrement des concentrations de ghréline (hormone orexigène) et à l'inverse une restauration de la sécrétion du GLP1 ou du PYY (hormones anorexigènes) (94, 101).

Pour la première fois, nous mettons en évidence des modifications d'un système connu pour favoriser la prise de nourriture et le stockage de calories dans le sens d'une augmentation de l'activité de ce système, qui donc semble s'opposer à la perte de poids et à l'amélioration des complications métaboliques.

Une différence majeure entre nos 2 groupes de patients obèses est bien sûr le montage chirurgical dont ont bénéficié les patients du groupe chirurgie. Rappelons ainsi qu'en plus de la réduction, par agrafage, du volume de l'estomac, le CCG comprend aussi une modification du circuit alimentaire. Le duodénum est en effet exclu du trajet des aliments et une anastomose gastro-jéjunale est réalisée au cours du montage chirurgical. Il a été montré par plusieurs travaux réalisés chez l'animal une augmentation des concentrations d'AEA au niveau du duodénum lors du jeûne alors que la consommation de nourriture diminue significativement ces concentrations tissulaires (68, 82). Ces variations tissulaires d'AEA au niveau du duodénum pourraient d'ailleurs participer à la régulation du comportement alimentaire en inhibant ou en stimulant la satiété par l'intermédiaire des afférences vagales qui vont du duodénum au tronc cérébral (67, 108, 110, 112, 113).

Ainsi, dans le montage chirurgical du CCG dont bénéficient nos patients, le duodénum est exclu et nous pouvons émettre l'hypothèse que le « shunt » duodénal mime au niveau de ce tissu une privation alimentaire et entraîne une élévation des endocannabinoïdes à l'instar des variations retrouvées chez l'animal (68).

Notons d'ailleurs pour conforter cette hypothèse du rôle possiblement délétère de l'exclusion du duodénum que dans un modèle de rat ayant un court-circuit du duodénum sans restriction du volume gastrique, Kindel et collaborateurs ne retrouvent pas d'amélioration de la sensibilité à l'insuline avec ce montage chirurgical, laissant supposer que l'exclusion du duodénum seule ne suffit pas expliquer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline indépendante de la perte de poids, au moins dans ce modèle de rats non diabétiques (114). Par analogie avec nos résultats, il pourrait être envisagé que l'augmentation des concentrations duodénales d'endocannabinoïdes participe à la non amélioration de l'insulinosensibilité dans ce modèle animal. De fait, des travaux très récents réalisés chez l'Homme par Hansen et collaborateurs laissent aussi penser que l'exclusion du duodénum ne suffit pas à améliorer la sensibilité à l'insuline. En effet, dans ce travail, les aires sous courbes de glucose et insuline ne sont pas différentes chez des sujets opérés d'un CCG selon qu'un repas liquide de 250 Kcal (40 g d'hydrates de carbone, 6 g de

lipides et 9 g de protéines) est administré en respectant le nouveau trajet des aliments secondaire à la chirurgie ou par sonde de gastrotomie en passant par l'estomac le duodénum et le jéjunum proximal normalement exclu (115).

Cependant les résultats que nous avons obtenus jusque là ne permettent pas de confirmer une telle hypothèse.

Néanmoins, ces résultats comme ceux que nous avons présentés dans le premier chapitre (étude de la cinétique prandiale des endocannabinoïdes) soulignent l'importance potentielle du SEC du tractus digestif dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique chez l'Homme.

Bien sûr la perte de poids dans chacun des 2 groupes n'a pas été obtenue au bout du même délai puisque la perte de poids est obtenue en 1 mois chez les patients opérés contre 4,5 mois en moyenne chez les patients ayant bénéficié de la prise en charge hygiéno-diététique. Notre protocole permettra dans tous les cas de comparer l'effet temps, puisque les 2 groupes de patients doivent être évalués 6 mois après le début de l'intervention.

Une autre hypothèse pouvant être proposée pour expliquer cette augmentation des endocannabinoïdes est l'état d'inflammation dans lequel pourraient se trouver les patients à un mois d'une intervention chirurgicale (116). Cependant, aucun des patients du groupe chirurgie ne présentait lors de son évaluation à un mois post opératoire de signes cliniques d'inflammation locaux ou généraux. De plus, les marqueurs d'inflammation systémique dont nous disposons, comme la vitesse de sédimentation, le fibrinogène et le nombre de leucocytes ne sont pas différents entre la condition pré et post opératoire et entre les 2 groupes de patients obèses. Bien sûr, ceux sont là des marqueurs «grossiers» d'inflammation et il serait intéressant de disposer de marqueurs d'inflammation plus spécifiques comme l'Interleukine 6 ou encore le *Tumor Necrosis Factor α* avant et après la perte de poids, quelle que soit la méthode utilisée.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la différence de variations de concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes, qui sont dérivés des lipides, est la différence de mobilisation des acides gras en fonction de la méthode d'amaigrissement. Il a été ainsi récemment montré qu'une perte

de poids par court circuit gastrique entraînait une mobilisation des lipides plus importante qu'une perte de poids de même amplitude obtenue dans le même temps par régime très basse calorie (117).

En ce qui concerne les mesures hygiéno-diététiques, nous ne retrouvons pas de différence significative ou approchant la significativité entre les concentrations d'AEA ou de 2-AG avant et après l'intervention ayant permis une perte de poids de 8,3%. Néanmoins, nos résultats sont très préliminaires puisqu'ils ne portent que sur 4 patients et il est donc impossible de tirer des conclusions même provisoires. Jusque là, les effets d'une intervention comportementale ou médicamenteuse sur la perte de poids ont porté sur les concentrations plasmatiques à jeun d'endocannabinoïdes ou sur les concentrations adipocytaires et l'activité des enzymes de synthèse et de dégradation des endocannabinoïdes au niveau des adipocytes. En ce qui concerne les concentrations plasmatiques, les résultats des 3 études publiées jusque là dans la littérature sont discordants (56, 59, 62). Ainsi, Engeli et collaborateurs ne retrouvent pas de variations des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes après une perte de poids de 5% obtenue en 12 semaines par mesures hygiéno-diététiques ou par la sibutramine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, et ce malgré l'efficacité de la perte de poids sur les anomalies métaboliques associées à l'obésité (56, 59). A l'inverse, les concentrations plasmatiques d'AEA et de 2-AG de 49 sujets obèses diminuent significativement après qu'une prise en charge hygiéno-diététique d'un an ait permis une perte de poids moyenne de 6,4 % du poids corporel. Il existe même dans cette étude une corrélation positive entre la diminution des concentrations plasmatiques de 2-AG et la diminution de la graisse viscérale mesurée par scanner (62). Notons que parmi nos 4 patients, les concentrations d'AEA n'augmentent que chez le patient qui ne maigrit pas alors que chez les 3 autres patients qui perdent du poids, les concentrations d'AEA diminuent (n=2) ou sont stables (n=1).

En conclusion, nos résultats même préliminaires et en tenant compte des limites de l'étude décrites ci-dessus, montrent que les variations des concentrations d'AEA après perte de poids sont indépendantes de la quantité

de poids perdu mais fonction du type de traitement. Il semble que les concentrations de l'AEA, orexigène, augmentent en post opératoire d'un CCG chez les sujets obèses. Nos résultats suggèrent donc que le SEC agirait comme un système s'opposant à la perte de poids obtenue par CCG, contrebalançant les effets métaboliques bénéfiques de la chirurgie liés entre autres aux modifications de la sécrétion des peptides digestifs décrites après ce type de chirurgie.

Par ailleurs, ces résultats, ainsi que ceux rapportés dans la première partie du travail, illustrent l'importance du SEC localisé au niveau du tractus digestif chez l'Homme, soulignant encore l'intérêt thérapeutique des antagonistes périphériques du CB₁ (38).

Chapitre 3 : Une diminution aiguë de la glycémie et de la résistance à l'insuline chez des sujets diabétiques de type 2 modifie-t-elle les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes ?

Introduction

L'obésité est associée à une augmentation de la mortalité mais aussi de la morbidité, avec une augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires, des maladies métaboliques et en particulier du diabète de type 2. L'obésité en particulier abdominale constitue le principal facteur de risque de diabète de type 2 et on estime ainsi que plus de 90% des diabétiques de type 2 sont attribuables au mode de vie, avec un rôle essentiel de l'obésité et de la sédentarité dans la physiopathologie de la maladie (118-120). Selon un article du Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire paru en novembre 2010, le nombre de diabétiques en France a atteint en 2009 le niveau initialement prévu par les experts pour 2016. Ainsi, 2,9 millions de Français (soit plus de 4% de la population totale) sont désormais traités pour cette maladie. A ce constat alarmant, il convient d'ajouter que chaque jour, près de 400 nouveaux cas sont diagnostiqués et que d'ici 2020 le nombre de personnes traitées aura doublé dans l'Hexagone (121). La physiopathologie du diabète de type 2 est de mieux en mieux connue et comporte au moins 2 anomalies majeures que sont le dysfonctionnement des cellules (tant α que β) des îlots pancréatiques et l'insulinorésistance. La présence d'une insulinorésistance est constante chez les diabétiques de type 2.

Etat de la question

Les facteurs participants au développement de la résistance à l'insuline sont nombreux. Parmi eux il faut mentionner les anomalies des voies de signalisations de l'insuline, les anomalies du métabolisme des acides gras ainsi que l'altération de la fonction adipocytaire (122).

Il existe des relations importantes entre hyperglycémie, résistance à l'insuline et activation du SEC (28, 61, 74, 123).

Il est tout d'abord important de rappeler d'une part que CB₁ est exprimé au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique et que son activation dans ces organes favorise le développement de la résistance à l'insuline (28).

Au niveau de muscle squelettique, il a été montré qu'après un traitement par antagoniste de CB₁ administré pendant 7 jours par voie intra péritonéale à des souris *ob/ob* (délétées du gène codant pour la leptine) obèses, la captation ex-vivo de glucose au niveau du muscle soléaire augmente de 68% (124). De même, des travaux réalisés *in vitro* mettent en évidence que le traitement par antagoniste de CB₁ sur des préparations de muscle soléaire provenant de rats minces ou obèses entraîne une augmentation dose-dépendante la captation du glucose alors que l'agoniste de CB₁ la diminue (39).

Au niveau du tissu adipeux, l'activation de CB₁ favorise l'accumulation de graisse en augmentant la différenciation et la maturation des cellules adipocytaires du tissu adipeux blanc, mais aussi l'expression des enzymes de la lipogénèse et l'activité de la lipoprotéine lipase (24, 32). De plus, dans des cultures d'adipocytes, un traitement par insuline pendant 24 h diminue les niveaux intracellulaires de 2-AG et d'AEA du fait d'une augmentation de l'expression des enzymes de dégradation de l'AEA et du 2-AG. Cet effet de l'insuline est aboli dans des adipocytes rendus insulino-résistants par supplémentation du milieu de culture en insuline (100 nmol/l de j3 à j8) (123). Ainsi, l'insuline serait un régulateur potentiel du métabolisme SEC. De plus, l'insulino-résistance tissulaire, au niveau adipocytaire comme au niveau de la cellule β -pancréatique pourrait participer à l'augmentation des concentrations plasmatiques et tissulaires des endocannabinoïdes retrouvées dans les situations de désordres métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2.

Enfin le rôle essentiel du CB₁ hépatique dans le développement de la résistance à l'insuline est illustré par les travaux du groupe de Georges Kunos (37, 38, 125). Ainsi les modèles de souris spécifiquement délétées de CB₁ au niveau hépatocytaire ou au contraire n'exprimant ce récepteur que dans ce

type de cellules mettent en évidence que le CB₁ hépatique est non seulement nécessaire mais aussi suffisant pour le développement de l'insulinorésistance hépatique (37, 125). Ainsi, les souris présentant une délétion du gène codant pour CB₁ exclusivement au niveau hépatique deviennent certes obèses lorsqu'elles sont soumises à un régime gras mais à l'inverse de leurs congénères de souche sauvage, elles ne développent pas de résistance à l'insuline (37). A l'inverse, des souris n'exprimant le CB₁ qu'au niveau hépatique sont résistantes à l'insuline et présentent une augmentation de la production hépatique de glucose (125). De plus, un traitement par un antagoniste périphérique de CB₁ administré à des souris n'exprimant le CB₁ qu'au niveau hépatique corrige les anomalies du métabolisme glucidique (38).

Les liens entre SEC et métabolisme du glucose sont aussi attestés par la présence de récepteurs des cannabinoïdes au niveau des cellules β pancréatiques. Chez la souris, les cellules β du pancréas expriment les récepteurs CB₁ et CB₂ (126). Dans un modèle murin de cellules β pancréatiques, cultivées en normoglycémie (13mM) pendant 24 heures, une stimulation aiguë (2 heures) par le glucose (pulse de 33mM) augmente les niveaux de 2-AG et AEA dans le milieu de culture cellulaire. Cette élévation des endocannabinoïdes est abolie par une stimulation conjointe glucose/insuline, l'insuline *per se* ne modifiant pas les taux d'endocannabinoïdes sécrétés (74). A l'inverse, sur les mêmes cellules cultivées en milieu hyperglycémique chronique (25mM pendant 24 heures avant la même stimulation d'un pulse de 33mM de glucose), la stimulation conjointe glucose/insuline n'abolit pas l'augmentation des endocannabinoïdes induite par le pulse de glucose. Dans ce contexte de milieu hyperglycémique, l'effet de l'insuline est aussi modifié puisque l'insuline augmente le niveau des endocannabinoïdes *per se* (74). De plus, la stimulation par un agoniste CB₁ de ces cellules β « soumises » à une hyperglycémie chronique augmente la sécrétion d'insuline (74). Ces données suggèrent d'une part, qu'en milieu hyperglycémique chronique, il existe une dérégulation du SEC au niveau β pancréatique et d'autre part, que cette dérégulation pourrait créer à ce niveau

un véritable cercle vicieux, les endocannabinoïdes pourraient avoir un effet autocrine sur les cellules β pancréatiques.

Les différents travaux concernant le SEC au niveau du pancréas sont en faveur d'une spécificité d'espèce (41). Les travaux réalisés à partir de cultures cellulaires d'îlots de Langerhans humains ont montré que les îlots de Langerhans expriment à la fois l'ARNm et la protéine CB₁ et CB₂ ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation du 2-AG (127). Le récepteur CB₁ est exprimé au niveau des cellules α et des cellules β tandis que le CB₂ est exprimés au niveau des cellules δ (43). Il a été aussi montré que chez l'Homme la stimulation de CB₁ augmente la sécrétion d'insuline et de glucagon tandis que la stimulation de CB₂ diminue l'insulinosécrétion induite par le glucose (43).

Il a été montré à plusieurs reprises que les sujets obèses avaient à jeun des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes plus élevées que les sujets de poids normal, en particulier dans le contexte d'obésité abdominale et dans le diabète de type 2 (28). De plus, il a été mis en évidence une corrélation positive entre les concentrations plasmatiques de 2-AG et l'insulinémie à jeun et une corrélation négative entre ces mêmes concentrations de 2-AG et la quantité de glucose infusé pendant un clamp euglycémique hyperinsulinémique (54, 55). Enfin, Di Marzo et collaborateurs administrent à 19 hommes, d'IMC moyen 25,8 kg/m², diabétique de type 2 (n=7) ou non une infusion d'insuline lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (61). L'infusion d'insuline diminue significativement les concentrations plasmatiques d'AEA à jeun, mais pas celle de 2-AG. Il est par ailleurs retrouvé une corrélation négative entre la diminution de l'AEA après infusion d'insuline et les triglycérides plasmatiques ou encore les ALAT (62).

Cette relation entre SEC et troubles du métabolisme glucidique est aussi illustrée par les résultats de l'étude RIO diabète. L'administration d'un antagoniste spécifique du CB₁ permet de diminuer le poids et aussi d'améliorer l'équilibre glycémique de patients obèses diabétiques de type 2, cette amélioration des troubles du métabolisme glucidique étant pour partie indépendante de la perte de poids (48). Cependant, à la différence de ces premiers résultats, les travaux récents de Triay et collaborateurs n'ont pas

permis de montrer que les améliorations du métabolisme glucidique et lipidique obtenus après traitement par rimonabant sont supérieures à celles prédites par la perte de poids (128).

En résumé, ces travaux illustrent la présence d'anomalies du SEC dans le diabète de type 2 et la présence d'une relation entre l'insulinorésistance et le SEC, cette dernière restant cependant peu étudiée. L'hyperglycémie et l'insulinorésistance pourraient entraîner une hyperactivation du SEC, elle-même aggravant l'insulinorésistance et le dérèglement du métabolisme et créant un véritable cercle vicieux. Cependant, il n'existe aucun argument à ce jour permettant de savoir si l'hyperactivité du SEC est une cause ou une conséquence de ces anomalies métaboliques.

Question posée

Dans ce contexte, nous nous sommes posés la question de l'effet de la normalisation de la glycémie et de la diminution de la résistance à l'insuline chez des patients diabétiques de type 2 sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la normalisation de la glycémie et la diminution de l'insulinorésistance chez des patients diabétiques de type 2 pourraient diminuer les niveaux circulants des endocannabinoïdes et rompre ainsi un cercle vicieux délétère sur le plan métabolique et cardiovasculaire.

Patients et méthodes

Le but de cette étude est d'investiguer les modifications des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes (à jeun, en pré et en post prandial) chez des sujets diabétiques de type 2 après correction aiguë d'une hyperglycémie et d'une résistance à l'insuline chronique par 72 heures de régime hypoglycémique et de corrélérer ces éventuelles modifications aux variations anthropométriques (poids, IMC, tour de taille, plis cutanés) et métaboliques

(insulinémie, triglycéridémie, acides gras libres, cétonémie, dépense énergétique de repos, quotient respiratoire) induites par l'intervention.

Douze patients diabétiques de type 2, en surpoids ou obèses participeront à l'étude.

Critères d'inclusion et d'exclusion

Les critères d'inclusion sont résumés ci-dessous.

- Age compris entre 18 et 65 ans
- Diabète de type 2
- IMC > 25kg/m²
- Hyperglycémie chronique attestée par une hémoglobine glycosylée (HbA₁C) supérieure à 8,5%
- Absence de signes cliniques de carence en insuline
- Absence de traitement par insuline
- Consentement libre, éclairé et signé par le patient après avoir été informé de l'étude par l'investigateur (au plus tard le jour de la pré inclusion et avant tout examen nécessité par l'essai)
- Sujet affilié ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale

Les critères d'exclusion sont résumés ci-dessous.

- Diabète de type 1
- Diabète insulino-traité
- Consommation habituelle de cannabis attestée par la présence de tétrahydrocannabinol dans les urines
- Tabagisme actif
- Médicaments susceptibles d'interférer avec le SEC : antidépresseurs, neuroleptiques, anxiolytiques
- HbA₁C < 8,5%

- Indice de masse corporelle < 25kg/m²
- Situations qui selon l'investigateur pourraient interférer avec la participation optimale à l'étude ou constituer un risque particulier pour le sujet

Le dessin expérimental de l'étude est représenté sur la figure 14.

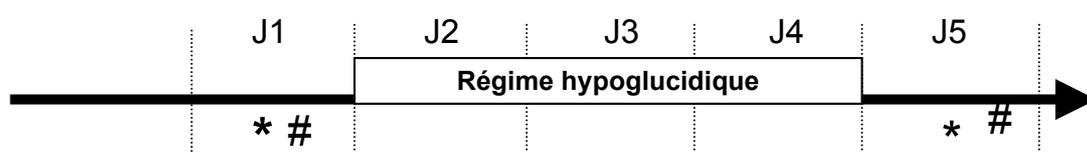


Figure 14. Dessin expérimental de l'étude.

* Prélèvements sanguins

Calorimétrie indirecte

Lors de chaque évaluation, réalisée lors de la consommation d'un repas standardisé, avant (J1), et après (J5) 72h de régime hypoglucidique, les patients bénéficieront :

- D'une évaluation anthropométrique : poids, taille, IMC, tour de taille.
- D'une détermination de l'activité périphérique du SEC grâce à la mesure des concentrations plasmatiques d'AEA et de 2-AG à partir de prélèvements sanguins réalisés à jeun, une heure avant et immédiatement avant ainsi que juste après, une heure, deux heures et trois heures après la consommation d'un repas standardisé.
- D'une évaluation métabolique : mesure de la dépense énergétique de repos et du quotient respiratoire par calorimétrie indirecte (30 minutes le matin à jeun puis une heure avant le repas test et trois heures après celui-ci), détermination des concentrations plasmatiques de glycémie, insuline, C peptide, acides gras libres, cétonémie aux temps cités ci-dessus.

Composition du repas standardisé et du régime hypoglucidique

La composition du repas standardisé est la suivante : pain (40 g), 100 g de tomates nature + 1 vinaigrette, 1 escalope de dinde (80 g), 100 g de pâtes nature, 100 g de haricots verts, 1 yaourt sans sucre, 120 g de pommes épluchées ou 150 g d'oranges épluchées, apportant 644 Kcal (24% énergie provenant des protéines, 31,4% énergie provenant des lipides et 44,3% énergie provenant des glucides).

La composition du régime hypoglucidique (20g d'hydrate de carbonés) est la suivante :

- Petit déjeuner : café ou thé à volonté, sans sucre + édulcorant, 100 g de fromage blanc.
- Déjeuner et dîner : 1 bol de bouillon ou potage de légumes sans féculent, 1 entrée de légumes verts assaisonnés (sauf carottes, betteraves, surimi, melon), 1 portion de viande, poisson ou œuf, légumes verts cuits (sauf carottes et betteraves), fromage ou 100 g de fromage blanc sans sucre ou 2 petits suisses non sucrés.
- Collation : café ou thé à volonté, sans sucre + édulcorant.

Ceci correspond à un apport calorique de 849 Kcal/24heures (dont 33% énergie provenant des protéines, 56% énergie provenant des lipides et 9% énergie provenant des glucides).

Mesures anthropométriques

Le poids est mesuré sur une balance avec une précision de 0,01 Kg et la taille sur une toise avec une précision de 0,5 cm. Le tour de taille est mesuré avec un mètre ruban placé entre les épines iliaques supérieures et les dernières côtes.

Dépense énergétique de repos et calcul du quotient respiratoire

La calorimétrie indirecte permet d'estimer la production d'énergie à partir des échanges gazeux respiratoires : consommation d'O₂ (VO₂) et production de

CO₂ (VCO₂). Un flux d'air constant est généré dans un casque recouvrant la tête du sujet. Les concentrations en O₂ et CO₂ de l'air entrant et sortant du casque sont mesurées ce qui permet le calcul des débits de consommation VO₂ et de production VCO₂. Elle permet par conséquent de mesurer le quotient respiratoire (QR), avec $QR = VCO_2/VO_2$. L'appareil (Appareil Vmax encore/ Viasys healthcare) est étalonné avant chaque test par mesure de pressions en O₂ et CO₂ calibrées avec un gaz de référence de composition connue.

Déterminations des paramètres sanguins biochimiques et hormonaux

Les paramètres biochimiques et hormonaux sont déterminés dans les laboratoires de biochimie et de médecine nucléaire du CHU de Bordeaux, hôpital Haut-Lévêque. Les fractions lipidiques, la glycémie, les acides gras libres, la cétonémie et les enzymes hépatiques ont été déterminés par des méthodes enzymatiques et fluorométriques grâce à un analyseur Olympus AU2700 (Beckman Coulter, Villepinte, France). L'insulinémie a été déterminée par automate Unicel DXi 800 (Beckman Coulter)(valeur de référence = 1,9-23µUi/mL à jeun , CV inter série : à 18,1µUi/ml, CV 4,3%, à 47,8µUi/ml CV 4.4%, à 137,4 µUi/ml CV = 3,8%). Le C peptide a été déterminé par automate LIAISON (Dia Sorin) (valeur de référence = 0,27-1,39 nmol/L à jeun, CV inter série : à 0,7nmol/L, CV 7,4%, à 2,0 nmol/L CV 7,0%, à 3,2nmol/L CV 8,0%).

Détermination des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes et de N-acyléthanolamines

La méthode de dosage des endocannabinoïdes et des N-acyléthanolamines est décrite dans le chapitre introduction générale (voir page 25-27).

Ce travail a bénéficié d'une allocation Société Française d'Endocrinologie-Sanofi Aventis.

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Une aire sous courbe (ASC) a été calculée par la méthode trapézoïdale entre le début du déjeuner et le temps 180 minutes après le déjeuner. Les variables sont comparées par des tests pour échantillons appariés paramétriques ou non selon la distribution des variables. La significativité est retenue pour $P < 0,05$.

Résultats

Neuf patients ont été évalués. Nous présentons ici les résultats obtenus sur 8 patients, 7 femmes et 1 homme, âgés de $54,37 \pm 2,82$ ans. A l'inclusion, l'IMC moyen des patients est $36,9 \pm 1,59$ kg/m². L'HbA₁C moyenne est de $10,7 \pm 1,8\%$.

Effets de l'intervention sur les caractéristiques métaboliques cliniques et biologiques

Les caractéristiques des sujets avant et après l'intervention sont résumées dans la table 10.

Table 10. Caractéristiques anthropométriques et biologiques des patients avant et après 72 heures de régime hypoglycémique.

	Avant (J1)	Après (J5)
Poids (kg)	98,56 ± 4,74	96,54 ± 4,66 *
Tour de taille (cm)	116,4 ± 2,64	113,4 ± 3,36
DER (kcal/24h)	1880,5 ± 114,3	1796,9 ± 103,1
QR	0,78 ± 0,03	0,73 ± 0,01*
Glycémie (g/l)	2,39 ± 0,16	1,53 ± 0,16 *
Insulinémie (µui/ml)	8,98 ± 1,56	6,38 ± 1,47
C peptide (nmol/l)	1,22 ± 0,09	1,30 ± 0,11
HOMA	5,35 ± 1,04	2,57 ± 0,65 *
Triglycérides (g/l)	3,29 ± 1,00	2,52 ± 0,60
Acides Gras Libres (mmol/l)	0,84 ± 0,08	0,77 ± 0,10
Cétonémie (mmol/l)	0,16 ± 0,04	1,00 ± 0,35 *

DER : dépense énergétique de repos, QR : quotient respiratoire, HOMA : Homeostasis Model Assesment, * $P < 0,05$.

Après 72 heures de régime hypoglycémique, la cétonémie augmente significativement témoignant de l'efficacité de la procédure. Le poids diminue significativement tandis qu'il existe une tendance à la diminution du tour de taille qui n'est pas significative (Table 7). La dépense énergétique de repos diminue mais la différence n'atteint pas la significativité ($P = 0,09$). Le QR baisse significativement tandis que le delta QR, différence entre le QR à jeun et le QR post prandial calculée pour chacune des 3 heures post prandiales n'est pas significativement modifiée. Sur le plan biologique, la procédure permet

une diminution significative de la glycémie à jeun (Table 7). L'ASC post prandiale 0-180 min de la glycémie est aussi significativement diminuée (Figure 15). L'insulinémie et le C peptide à jeun ne sont pas significativement modifiés. L'index HOMA est significativement diminué. L'ASC post prandiale 0-180 min du C peptide est significativement augmentée (Figure 16).

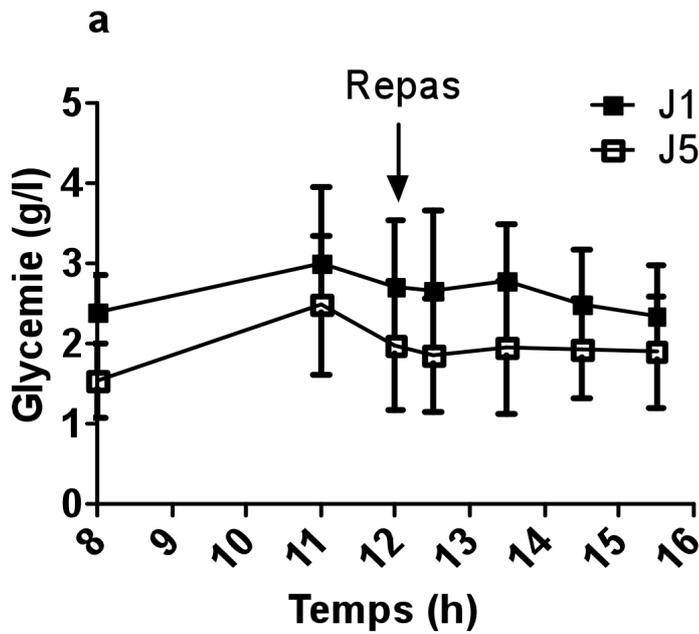


Figure 15. a : Glycémie avant (J1) et après (J5) 72 heures de régime hypoglycémique

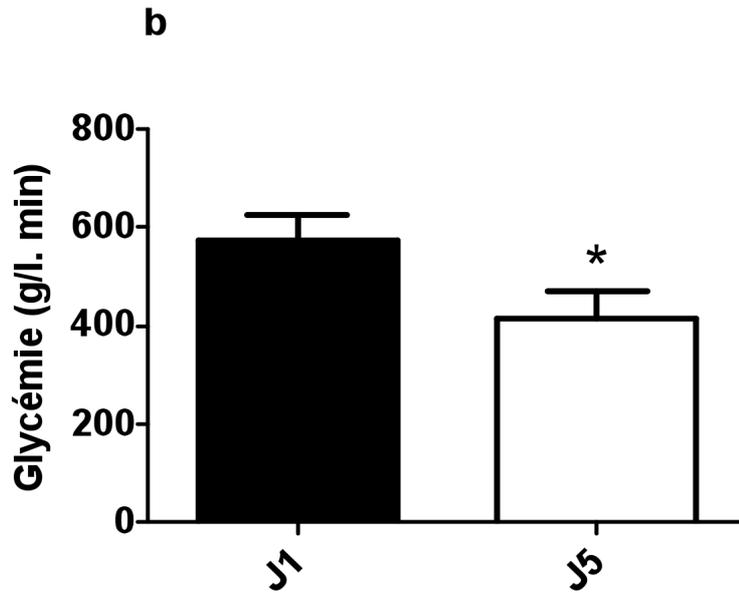


Figure 15. b : Aire sous courbe post prandiale de glycémie avant (J1) et après (J5) 72 heures de régime hypoglycémique. * $P < 0,05$

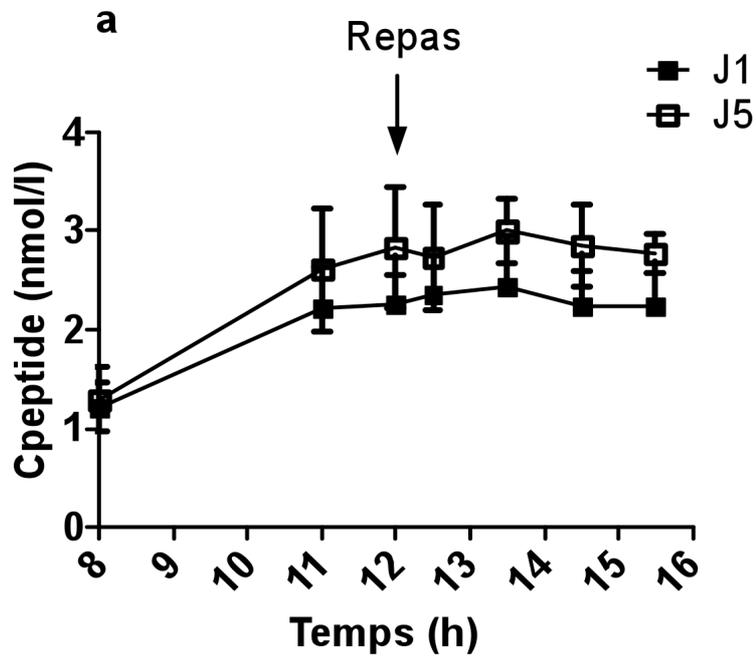


Figure 16. a : C peptide avant (J1) et après (J5) 72 heures de régime hypoglycémique.

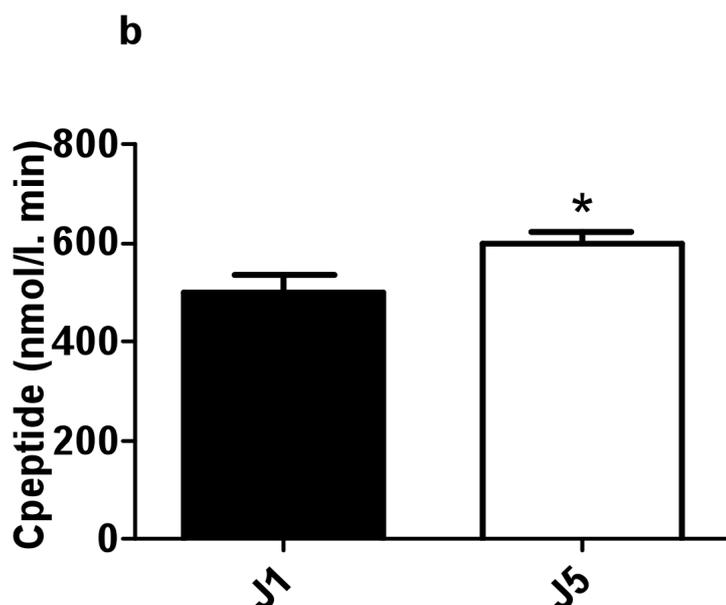


Figure 16. b : Aire sous courbe post prandiale de C peptide avant (J1) et après (J5) 72 heures de régime hypoglucidique. * $P < 0,05$.

Effet de l'intervention sur les concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes

Les concentrations plasmatiques d'AEA, 2-AG, OEA et PEA, ne sont pas modifiées par l'intervention, que l'on considère les valeurs à jeun ou l'aire sous courbe (Figure 17 et table 11).

Table 11. Variations des concentrations plasmatiques à jeun des endocannabinoïdes et des N-Acyléthanolamines avant (J1) et après (J5) 72 heures de régime hypoglucidique.

	J1	J5	P
AEA (pmol/ml)	0,84 ± 0,08	0,81 ± 0,05	0,7
2-AG (pmol/ml)	5,59 ± 1,57	6,53 ± 1,63	0,3
OEA (pmol/ml)	10,21 ± 1,14	11,85 ± 1,05	0,5
PEA (pmol/ml)	21,05 ± 2,64	16,54 ± 2,03	0,2

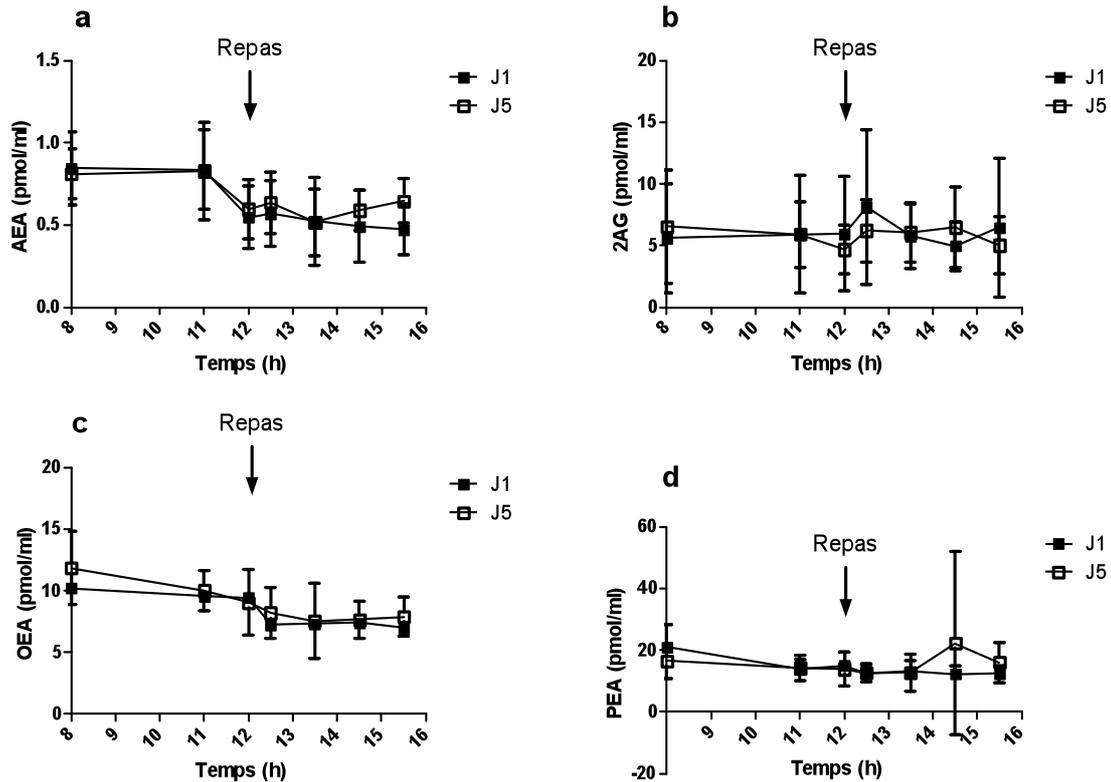


Figure 17. a : Concentrations plasmatiques d'AEA (a), de 2-AG (b), d'OEA (c) et de PEA (d) avant (J1) et après (J5) 72 heures de régime hypoglycémique.

Discussion et conclusion

Nos résultats préliminaires mettent donc en évidence que 72 heures de régime hypoglycémique permettent de diminuer significativement le poids corporel, la glycémie à jeun, le QR et d'améliorer significativement la résistance à l'insuline chez 8 patients diabétiques de type 2 obèses.

Néanmoins, s'il existe une perte de poids significative après 72 heures de diététique hypocalorique, il est probablement difficile de rattacher cette évolution pondérale uniquement au régime hypoglycémique. Il est en effet probable que ces sujets obèses diabétiques de type 2 étaient en balance énergétique négative au cours de ces 72 heures d'hospitalisation, ce qui peut, indépendamment de la répartition en macronutriments, expliquer l'évolution pondérale. Ainsi, si l'apport calorique habituel des sujets n'est pas connu, il peut être estimé selon la formule de Harris et Benedikt (129) à partir de la DER

mesurée par calorimétrie indirecte ou encore par analogie avec d'autres études précédemment publiées (130) à environ 2600 Kcal/jour. Cette diminution significative du poids est concomitante d'une tendance à la diminution de la dépense énergétique de repos, qui n'est néanmoins pas statistiquement significative et reste modérée. La diminution de la dépense énergétique de repos lors d'hospitalisation pour la prise en charge hygiéno-diététique de patients obèses, diabétiques ou non, a déjà été rapportée (131) mais pas toujours confirmée (données personnelles non publiées). La dépense énergétique de repos a par ailleurs été retrouvée plus élevée chez des sujets diabétiques modérément hyperglycémiques par rapport à des sujets non diabétiques appariés sur l'IMC (132), cette augmentation de la dépense énergétique de repos concomitante du mauvais contrôle glycémiques pouvant être attribuée à l'augmentation de la production hépatique de glucose et du turnover protéique, deux situations métaboliques consommatrices d'énergie (133). De plus, une diminution de la dépense énergétique a pu être retrouvée chez des sujets diabétiques après diminution de la glycémie (133).

En plus de cette diminution significative du poids, il existe aussi une diminution significative de la glycémie à jeun de 35,41% soit 0,86g/l en valeur absolue. La glycémie post prandiale (ASC 0-180 min) et la résistance à l'insuline évaluée par l'index HOMA sont aussi significativement diminuées par les 72 heures de régime hypoglycémique. Kirk et collaborateurs rapportent dans une méta analyse publiée en 2008 portant sur 13 études que le régime hypoglycémique permet de diminuer l'HbA_{1c}, la glycémie à jeun et les triglycérides chez ces patients (134). D'autres études ont déjà mis en évidence le bénéfice métabolique d'un régime hypoglycémique chez des sujets insulino-résistants (diabétiques ou non) (135, 136), avec des bénéfices mis en évidence dès la 48^{ème} heure dans l'une des études (135). Ainsi, Kirk et collaborateurs comparent les bénéfices métaboliques d'une diététique pauvre en hydrates de carbone (moins de 50 g / jour) à une diététique pauvre en lipides, riches en hydrates de carbone (>150 g / jour) administrée à 22 sujets obèses (IMC moyen de 36,9 ± 1,2 m² insulino-résistants (HOMA IR >3) (135). Le régime pauvre en glucide permet à la 48^{ème} heure de diminuer de façon plus importante l'index HOMA, la production hépatique de glucose, reflétant

l'insulinosensibilité hépatique et le contenu hépatique en triglycérides mesuré par spectroscopie. En revanche, l'insulinosensibilité musculaire (évaluée par clamp) n'est pas significativement différente entre les 2 groupes à la 48ème heure (135).

Nous retrouvons aussi une diminution significative du QR qui témoigne d'une plus forte oxydation lipidique à jeun après l'intervention concomitamment de la baisse de la glycémie et de la sensibilité à l'insuline. Une relation entre le QR à jeun et l'insulinosensibilité a été retrouvée dans certaines études (137). En revanche, nous ne retrouvons pas de différence significative entre le delta QR (différence entre le QR à jeun et le QR post prandial qu'elle que soit le temps post prandial considéré, 1 heure, 2 heures et 3 heures après le repas) entre J1 et J5 pouvant témoigner du fait que ces sujets ne retrouvent malgré tout pas de flexibilité métabolique (138).

Nous retrouvons aussi une augmentation significative de l'ASC post prandiale du C peptide, qui peut témoigner d'une amélioration de l'insulinosécrétion qui pourrait elle-même être le reflet de la baisse de la glucotoxicité sur la fonction sécrétoire β pancréatique (139).

Ainsi, le régime hypoglycémique permet d'obtenir des bénéfices métaboliques cliniques et biologiques dans une population de sujets obèses diabétiques de type 2. De fait, même si les recommandations ne préconisent pas un régime hypoglycémique chez les patients diabétiques de type 2, il n'en reste pas moins que plusieurs travaux ont déjà fait la preuve des bénéfices métaboliques de ce type de diététique chez ces patients. De fait, dans ces dernières recommandations en 2008 *l'American Diabetes Association*, qui recommandait en 2004 de ne pas descendre en dessous de 130g d'hydrates de carbones/jour, ne statue plus sur ce point (140). Des études manquent néanmoins pour évaluer les bénéfices et les risques de telles diététiques à long terme.

Une autre possibilité thérapeutique pour diminuer de façon aigue l'hyperglycémie chez les patients diabétiques de type 2 est l'administration transitoire d'insuline. Il a en effet pu être montré que l'infusion sous cutanée d'insuline pendant 3 jours à des sujets diabétiques de type 2 en hyperglycémie

chronique permet de diminuer significativement la glycémie dans des proportions comparables à celles obtenues avec la diététique hypoglycémique, en augmentant l'oxydation du glucose (141). Néanmoins, sur le plan physiopathologique, compte tenu des effets métaboliques de l'insuline, la restriction en hydrate de carbone paraît préférable à l'infusion de doses parfois importantes d'insuline.

En revanche, si la diététique hypocalorique permet une amélioration significative des paramètres métaboliques cliniques et biologiques, il n'existe aucune variation significative des concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes.

Un premier élément notable concernant les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes dans cette étude est qu'à l'inverse de nos 2 études précédentes (Cf chapitre 1 et 2 et annexe 1), nous ne retrouvons pas d'élévation préprandiale ni de diminution post prandiale de l'AEA. Nous observons une courbe aplatie. Pour autant les valeurs d'AEA à jeun sont tout à fait dans les mêmes ordres de grandeurs et non différentes de celles retrouvées dans nos 2 populations d'obèses étudiées dans les chapitres 1 et 2. Néanmoins, cette population est différente des précédentes puisqu'il s'agit ici de patients certes obèses mais surtout insulino-résistants et diabétiques de type 2 et dont l'équilibre glycémique est mauvais (HbA_{1c} moyenne de 10,7 ± 1,8%). Les liens entre glycémie, résistance à l'insuline et concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes n'ont été étudiés chez l'Homme que dans une étude (61). Dans ce travail, l'infusion d'insuline diminue les concentrations plasmatiques d'AEA avec une relation négative entre la diminution de l'AEA plasmatique et l'insulinémie à jeun de sujets, c'est à dire que plus les sujets sont résistants à l'insuline, moins l'insuline diminue les concentrations plasmatiques d'AEA (61). Les variations prandiales de l'AEA que nous avons précédemment décrites (77) sont en miroir de celles de l'insuline. En préprandial en effet, l'insuline diminue tandis que nous avons décrit une augmentation de l'AEA plasmatique alors qu'en post prandial, l'insuline augmente tandis que nous avons montré une diminution de l'AEA plasmatique. Les résultats de Di Marzo et collaborateurs montrent que chez l'Homme, la baisse des concentrations plasmatiques d'AEA induite par l'insuline est

d'autant moins importante que le sujet est résistant à l'insuline (61). Il est donc tout à fait logique que la résistance à l'insuline de ces sujets puisse éteindre voire annuler les variations d'AEA plasmatiques. De fait, nous avons pu montrer que dans une population de sujets sains normopondéraux, l'AEA plasmatique augmentait significativement en pré prandial et diminuait significativement en post prandial. En revanche, nous avons aussi montré que dans une population d'obèses insulino-résistants non diabétiques (HOMA = 3,4), la diminution post prandiale de l'AEA plasmatique n'était plus significative. Les sujets décrits dans la présente étude sont très insulino-résistants (HOMA = 5,3) et diabétiques de type 2 et on peut donc s'attendre à des anomalies plus importantes du SEC, c'est à dire à une disparition complète de la cinétique des endocannabinoïdes.

L'absence totale de cinétique prandiale de l'AEA plasmatique dans ce contexte de résistance à l'insuline sévère et de diabète de type 2 retrouvée dans cette étude, mise en perspective avec les résultats obtenus dans le chapitre 1 est intéressante. Ces résultats pourraient en effet refléter l'existence d'une gradation dans la dérégulation du SEC chez l'Homme en fonction de la sensibilité à l'insuline. Il pourrait exister une sorte de continuum entre la physiologie du SEC chez les sujets insulinosensibles, les anomalies retrouvées chez les sujets obèses résistants à l'insuline et la disparition complète de la cinétique prandiale chez les sujets diabétiques.

Ici, la cinétique prandiale de l'AEA plasmatique n'est pas rétablie après les 72 heures de diététique hypoglycémique. A noter que notre intervention permet de diminuer la résistance à l'insuline mais nos sujets restent probablement non flexibles sur le plan métabolique. Le concept de non flexibilité métabolique, non admis par tous, a été décrit chez des patients insulino-résistants comme la non suppression par l'insuline de l'oxydation lipidique (138, 142). Cette non flexibilité métabolique peut être pressentie par l'absence de différence significative des deltas QR (différence entre les QR à jeun et les QR post prandiaux) avant et après l'intervention chez nos sujets et pourrait inclure en particulier la perte de la cinétique prandiale de l'AEA.

La demi vie des endocannabinoïdes plasmatiques n'est pas connue, mais il est peu probable qu'elle puisse expliquer l'absence de changement de leurs

concentrations, puisque nous avons mis en évidence des variations significatives en pré et post prandial, et donc dans un délai de temps plus court (77). Il serait néanmoins intéressant de regarder les effets d'une baisse de la glycémie et de la résistance à l'insulinémie prolongées dans le temps (plusieurs semaines) sur les concentrations d'endocannabinoïdes.

Rappelons que les travaux réalisés in vitro sur des cultures cellulaires de cellules β pancréatiques confirment aussi que l'hyperinsulinisme est associé à une dérégulation du SEC et suggèrent des liens entre endocannabinoïdes et insuline (74).

En ce qui concerne les liens entre perte de poids et concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes, les résultats de la littérature sont discordants. Ainsi, Engeli ne retrouve pas de changements des concentrations des endocannabinoïdes plasmatiques après une perte de poids, obtenue par mesures hygiéno-diététiques ou par sibutramine (56, 59). A l'inverse, Di Marzo et collaborateurs retrouvent une diminution des endocannabinoïdes plasmatiques chez des sujets obèses ayant perdu du poids après une année de prise en charge hygiéno-diététique (62). Enfin, nous avons rapporté (cf chapitre 4 et annexe 2) une diminution significative des concentrations salivaires d'AEA chez des sujets obèses ayant perdu en moyenne 5,3 % de poids au cours d'une prise en charge de 12 semaines. Dans cette étude, la perte de poids est obtenue en 72 heures et elle est moins importante (2%), ce qui peut expliquer l'absence de variation des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes.

En conclusion, une diététique hypoglycémique administrée pendant 72h à des sujets obèses diabétiques de type 2 en hyperglycémie chronique permet de diminuer significativement le poids, la glycémie et la résistance à l'insuline. Ces améliorations métaboliques aiguës ne semblent pas être associées avec des changements des concentrations plasmatiques ni de la cinétique des endocannabinoïdes et des N-acétyléthanolamines.

Chapitre 4 : La détermination des concentrations des endocannabinoïdes dans la salive est-elle réalisable ? Si oui, peut-elle constituer un outil non invasif intéressant pour l'étude du SEC ?

Introduction

L'étude directe du SEC chez l'Homme est limitée par le caractère invasif de la méthode, qui nécessite d'obtenir des prélèvements sanguins ou des biopsies tissulaires. Parmi les outils non invasifs développés pour l'exploration de systèmes biologiques, la salive est particulièrement intéressante et est déjà largement utilisée chez l'Homme pour l'exploration de certains marqueurs biologiques, comme le cortisol (143). La salive représente la première sécrétion digestive rencontrée par les aliments (144). Aussi, en dehors du caractère non invasif du recueil de salive, il est donc légitime que la présence de systèmes impliqués dans la prise alimentaire soit recherchée dans la salive et d'évaluer si la salive pourrait être utile pour l'exploration du SEC chez l'Homme.

Etat de la question

Il est important de rappeler brièvement d'une part la physiologie des glandes salivaires et d'autre part de faire l'état des lieux sur les relations entre les systèmes impliqués dans la prise alimentaire et la salive jusque là identifiées.

Rappels anatomiques et physiologiques sur la salive

Les trois principales paires de glandes salivaires sont les glandes sublinguales qui déversent la salive dans la bouche, par l'intermédiaire de canaux qui s'abouchent sous la langue (145), les deux principaux sont les canaux de Walther et de Rivinus ; les glandes sous-maxillaires qui déversent la salive dans la bouche par l'intermédiaire du canal de Wharton et les glandes parotides, les plus grosses qui sont situées de chaque côté du visage au-

dessous et en avant des oreilles (145). Elles déversent la salive au niveau de la joue par le canal de Sténon.

Par ailleurs, il existe un grand nombre de plus petites glandes salivaires dans la langue, les joues, les lèvres et le palais, comme les glandes de von Ebner, à l'arrière de la langue, au niveau des papilles circumvalées.

L'appareil sécrétoire est constitué par les acini, qui contiennent en proportion variable des cellules séreuses, sécrétant des grains de zymogène et des cellules à mucus. Les acini sont entourés par des cellules myoépithéliales. L'appareil de drainage est constitué de canaux intercanalaires, inter lobulaires (ou striés) et du canal excréteur.

La salive est constituée à 95 % d'eau, les concentrations en électrolytes variant en fonction du débit salivaire et de l'état d'hydratation de l'organisme. La composition ionique de la salive primaire est proche de celle du plasma.

Les composants organiques de la salive sont avant tout des protéines synthétisées dans les cellules acineuses et sécrétées par un mécanisme d'exocytose. On trouve également dans la salive des substances non électrolytiques de bas poids moléculaire dont des substances lipophiles qui passent facilement dans la salive par diffusion à travers les membranes lipidiques.

En l'absence de stimulation, les glandes salivaires n'ont pas d'activité sécrétoire significative. Le débit et la sécrétion salivaire sont sous la dépendance exclusive d'une commande nerveuse.

Le centre salivaire est situé dans le bulbe, au niveau du plancher du IVème ventricule, proche des centres de la déglutition et de la respiration.

Le centre salivaire reçoit des afférences provenant des autres centres bulbaires, du cortex cérébral et surtout des afférences réflexes qui véhiculent des informations en provenance de la bouche (mécano et chémorécepteurs), et de l'œsophage (mécanorécepteurs). Ces afférences sont véhiculées par le nerf trijumeau, le glossopharyngien et l'hypoglosse. Ces afférences sont innées. Il existe aussi des réflexes conditionnés qui apparaissent à la suite d'un apprentissage et stimulent la sécrétion salivaire à partir d'informations visuelles ou olfactives.

En réponse à ces différentes informations, le centre salivaire émet des ordres à destination des glandes salivaires. La majorité des efférences sont parasympathiques et transmises aux glandes par le nerf facial et le glossopharyngien. Le médiateur est l'acétylcholine. La liaison de l'acétylcholine sur les récepteurs membranaires des cellules zymogènes entraîne une mobilisation du calcium intracellulaire aboutissant à une stimulation de la sécrétion d'eau, d'électrolytes et d'enzymes. Il existe aussi des efférences sympathiques dont les médiateurs sont la noradrénaline et la dopamine. La stimulation sympathique entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en Adénosine Monophosphate Cyclique (AMPc), aboutissant à une stimulation de la sécrétion du mucus, cet effet étant surtout marqué au niveau des glandes sous-maxillaires. La stimulation sympathique provoque également une vasoconstriction des artérioles salivaires, diminuant le flux sanguin à destination des glandes salivaires, et entraînant une diminution du débit salivaire (145).

Systèmes biologiques impliqués dans la balance énergétique et salive

Compte tenu de cette place particulière de première sécrétion rencontrée par les aliments détenue par la salive, des travaux récents ont cherché à mettre en relation les systèmes impliqués dans la prise alimentaire et la salive.

Ainsi, il a été très récemment mis en évidence que le PYY, peptide anorexigène sécrété par l'intestin était présent dans la salive humaine et dans la salive de souris (146). Chez ces animaux, le PYY salivaire a une double origine, plasmatique mais provenant aussi des cellules du goût de la langue (146). De plus, le récepteur du PYY est très largement exprimé chez ces souris au niveau de la langue et des glandes de von Ebner's (146). Enfin, une augmentation aiguë ou chronique du PYY salivaire entraîne une réduction à court et long terme respectivement de la prise alimentaire illustrant que le PYY salivaire pouvait au moins chez le rongeur avoir un rôle physiologique (146). Par ailleurs, l'injection intrapéritonéale de PYY entraîne une augmentation des concentrations salivaires de PYY (146). Li et collaborateurs ont aussi mis en évidence dans la salive humaine la ghréline, avec une corrélation entre les concentrations plasmatiques et salivaires de ghréline ainsi qu'entre les

concentrations salivaires de ghréline et l'IMC d'enfants et d'adolescents obèses chinois (147). A noter que l'ARNm de la ghréline était retrouvé dans les glandes parotides et sous mandibulaires, mais pas dans les glandes sublinguales (147). Dans un autre travail, Benedix et collaborateurs objectivent une diminution post prandiale des concentrations de ghréline salivaire chez des sujets obèses ayant bénéficié d'une chirurgie bariatrique témoignant de l'activité de ce système salivaire (148). De même, les concentrations salivaires des trois adipokines, résistine, adiponectine et visfatine ont récemment été mesurées dans la salive de 50 sujets volontaires de poids normal avec une corrélation entre les concentrations plasmatiques et les concentrations salivaires pour les deux premières adipokines (149).

Système endocannabinoïde et salive

Chez l'Homme, il n'a pour l'instant pas été possible de mesurer les endocannabinoïdes dans la salive, possiblement du fait d'un manque de sensibilité de la méthode (150).

Les endocannabinoïdes sont présents dans la salive de la tique et du rat (75, 76). Chez le rat, il a aussi pu être mis en évidence que les récepteurs CB₁ et CB₂ étaient présents au niveau des glandes sous mandibulaires avec des localisations spécifiques selon le sous-type de récepteurs. CB₁ est en effet exprimé au niveau des canaux excréteurs alors qu'il n'est pas détecté au niveau des acini (76). CB₂ est exprimé tant au niveau des acini que des canaux excréteurs, dans des segments différents de ceux exprimant CB₁ (76). Dans ce même travail, les auteurs mettent en évidence que l'activation de CB₁ au niveau de la glande sous mandibulaire inhibe la sécrétion salivaire. Il semble que le SEC puisse inhiber la sécrétion de salive (76, 151) et soit par ailleurs impliqué dans l'inhibition de la sécrétion salivaire induite par le lipopolysaccharide (76). La sécheresse buccale est d'ailleurs un des principaux effets de la consommation de marijuana (152).

En dehors des modèles murins, il a aussi été récemment mis en évidence par immunohistochimie que CB₁ était présent au niveau des canaux excréteurs

des glandes parotides et ou sous-mandibulaires de chiens plus spécifiquement au niveau de la membrane apicale (153).

Question posée

Dans ce contexte, compte tenu de tous les arguments précités, nous nous sommes posés la question de savoir si la détermination des concentrations des endocannabinoïdes et de N-acyléthanolamines dans la salive était réalisable, reproductible et sensible chez l'Homme et si à l'instar des concentrations plasmatiques, les concentrations salivaires étaient plus élevées chez les sujets obèses, si elles variaient en fonction de la prise alimentaire ou du poids corporel.

Patients et Méthodes

Douze sujets normopondéraux et 12 sujets obèses ont été recrutés (Table 3). Des prélèvements sanguins et salivaires ont été recueillis pour la détermination des concentrations plasmatiques et salivaires d'endocannabinoïdes à jeun, une heure avant, immédiatement avant une heure après la fin d'un déjeuner apportant 45% de glucides, 20 % de protides et 35% de lipides. Le dessin expérimental de l'étude est représenté sur la figure 2 et cette partie de l'étude a été réalisée sur les mêmes sujets que ceux décrits dans le chapitre 1.

Pour mesurer les concentrations intra tissulaires des endocannabinoïdes et rechercher l'expression de l'ARNm de CB₁, des enzymes de synthèse et de dégradation des endocannabinoïdes, nous avons récupéré des fragments de glandes sous-maxillaires auprès du service de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Bordeaux au décours d'une intervention chirurgicale et des glandes salivaires accessoires lors des biopsies de glandes salivaires accessoires dans le service de neurologie du CHU de Bordeaux. Les fragments de glandes sous maxillaires étaient prélevés en zone saine tandis que les glandes

salivaires accessoires n'étaient « utilisées » qu'en cas de négativité de l'examen anatomopathologie. Aucun prélèvement supplémentaire n'a été réalisé pour l'étude.

Par ailleurs, douze autres patients obèses, 8 femmes et 4 hommes d'âge moyen $45,0 \pm 2,5$ ans ont été recrutés lors de leur inclusion dans un programme d'éducation thérapeutique de prise en charge de l'obésité. Ce programme consistait en 12 sessions hebdomadaires consécutives d'éducation thérapeutique. Chaque session comprenait une séance de 60 minutes d'activité physique dirigée par un enseignant en activité physique adaptée, deux séances de 45 minutes d'atelier nutritionnel et psychologique animées par une diététicienne et une psychologue respectivement et une session médicale de 45 minutes animée par un médecin. Il était demandé aux patients de recueillir leur salive à jeun, au domicile au début et à la fin des sessions.

Mesures anthropométriques

Le poids est mesuré sur une balance avec une précision de 0,01 Kg et la taille sur une toise avec une précision de 0,5 cm. Le tour de taille est mesuré avec un mètre ruban placé entre les épines iliaques supérieures et les dernières côtes.

Recueil de salive

Les sujets recueillaient leur salive dans des tubes de 15 ml après s'être rincé la bouche à l'eau et après être resté sans boire ni manger depuis 30 minutes. De même, il était demandé aux sujets de ne pas se laver les dents entre les recueils de salive afin d'éviter les contaminations sanguines. Elle était conservée à 4°C au domicile puis stockée à -80°C au laboratoire jusqu'au dosage.

Détermination des concentrations plasmatiques, salivaires et tissulaires d'endocannabinoïdes et de N-acyléthanolamines

La méthode de dosage des endocannabinoïdes et des N-acyléthanolamines est la même que celle décrite dans l'introduction. Comme le plasma, la salive et les fragments de glandes sous maxillaires sont d'abord homogénéisés dans du chloroforme/méthanol/Tris-HCl 50mM pH 7,5 (2 :1 :1, V/V) puis la procédure suit celle décrite pour la détermination des concentrations plasmatiques (voir pages 25-27).

Détermination des concentrations plasmatiques des autres paramètres hormonaux et des paramètres biochimiques

Les fractions lipidiques, la glycémie et les enzymes hépatiques ont été déterminées par des méthodes enzymatiques et fluorométriques. L'insuline a été mesurée avec un kit IRMA CIS bio (coefficient de variation intra essai 3,8%, coefficient de variation inter essai: 8%, CIS bio International, Gif-sur-Yvette, France).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'ARN était extrait avec le réactif Tri Reagent en suivant les instructions du protocole du fournisseur (Fermentas). Après extraction et précipitation dans l'éthanol, L'ARN était traité avec le Turbo DNA-free (Ambion, Austin, TX), selon les instructions du fournisseur. L'intégrité de l'ARN était vérifiée par électrophorèse sur capillaire grâce au kit RNA 6000 Nano Lab-on-a-Chip et au bioanalyseur Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Le cDNA était synthétisé à partir de 2 µg d'ARN total grâce à une transcriptase inverse RevertAid™ (Fermentas), grâce à des amorces hexamères et à des amorces oligomères (Fermentas). Pour la RT PCR, l'amplification des amorces était réalisée selon une première étape de dénaturation à 95° C pendant 15 minutes suivies de 40 cycles de dénaturation à 95°c pendant 30 secondes, suivie de la fixation des amorces à 60°C (ou 55°C selon les conditions fournies, ou bien aux 2 températures si aucune condition n'était fournie) pendant 30s, et de l'élongation à 72°C pendant 1 min. Une fois les cycles

effectués, une extension finale à 72° C pendant 5 minutes était réalisée puis la réaction était conservée à 4°C. La RT-PCR est ensuite réalisée grâce à un thermocycleur PTC-200 Biorad. Les gènes de ménage GAPDH and HPRT ont été utilisés comme contrôle interne. Les résultats de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.8%. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes (Eurogentec, Belgium). : CB₁, Sens (S): 5' GAT GTC TTT GGG AAG ATG AAC AAG C 3', Antisens (A): 5' AGA CGT GTC TGT GGA CAC AGA CAT GG 3' ; fatty acid amide hydrolase (FAAH), S: 5' GTG GTG CT(G/A) ACC CCC ATG CTG G 3', A: 5' TCC ACC TCC CGC ATG AAC CGC AGA CA 3'; monoacylglycerol lipase (MAGL), S: 5' TCT TCC TTC TGG GCC ACT CCA 3', A: 5' GGA TTG GCA AGA ACC AGA GG 3' DIACYLGLYCEROL LIPASE alpha (DAG alpha) S: 5' GCC ATC TTC CTC TTT CTC CTG 3', DAG alpha A: 5' GAG CAC GTA CTG CAT GGA GTC 3', DIACYLGLYCEROL LIPASE beta (DAG beta) S: 5' AAG CTG CCA GAT ACG TTT ACC 3', DAG beta A: 5' GGA GAA GGC GTA GCA CCT GAC 3'; glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), S: 5' CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG GT 3', A: 5' GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC TG 3'; hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), S: 5' CTT GCT CGA GAT GT(C/G) ATG AAG 3', A: 5' TGC ATT GTT TT(A/G) CCA GTG 3'.

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. Les comparaisons ont été effectuées grâce à des ANOVA à mesures répétées ou ANOVA à un facteur suivies de tests post-hoc de Tukey ou avec des tests pour échantillons appariés paramétriques ou non selon la distribution des variables. Les corrélations ont été effectuées par des tests de Pearson ou de Spearman en fonction de la distribution des variables. La significativité était retenue pour une valeur de P<0,05.

Résultats

Les endocannabinoïdes et les N-acyléthanolamines peuvent être mesurés dans la salive humaine

Nous avons pu déterminer les concentrations salivaires d'endocannabinoïdes mais aussi de N-acyléthanolamines chez les sujets normopondéraux et chez les sujets obèses. A l'instar des résultats retrouvés dans le plasma, les concentrations salivaires à jeun d'AEA, de 2-AG, d'OEA et de PEA sont significativement augmentées chez les sujets obèses par rapport aux sujets normopondéraux (Figure 18 et table 12). De façon intéressante, nous mettons en évidence que les rapports entre les concentrations salivaires d'AEA, de 2-AG, d'OEA et de PEA des sujets normaux et des sujets obèses sont plus élevés que ces mêmes rapports établis entre les concentrations plasmatiques (Figure 18).

Table 12. Concentrations plasmatiques et salivaires endocannabinoïdes et des N-Acyléthanolamines à 08h00 chez les sujets normopondéraux et obèses.

	Normopondéraux	Obèses	P
AEA plasma 08h (pmol/ml)	0,4675 ± 0,04957	1,0670 ± 0,1192	P<0,001
AEA salive 08h (pmol/ml)	0,1229 ± 0,02794	0,6050 ± 0,1476	P<0,01
2-AG plasma 08h (pmol/ml)	2,681 ± 0,1967	3,299 ± 0,4219	P=0,5
2-AG salive 08h (pmol/ml)	6,706 ± 1,334	31,35 ± 8,53	P<0,05
OEA plasma 08h (pmol/ml)	5,704 ± 0,6471	9,864 ± 1,169	P<0,01
OEA salive 08h (pmol/ml)	14,40 ± 2,832	39,39 ± 7,977	P<0,01
PEA plasma 08h (pmol/ml)	24,83 ± 3,570	18,25 ± 1,446	P=0,3
PEA salive 08h (pmol/ml)	51,43 ± 8,998	86,68 ± 11,75	P<0,05

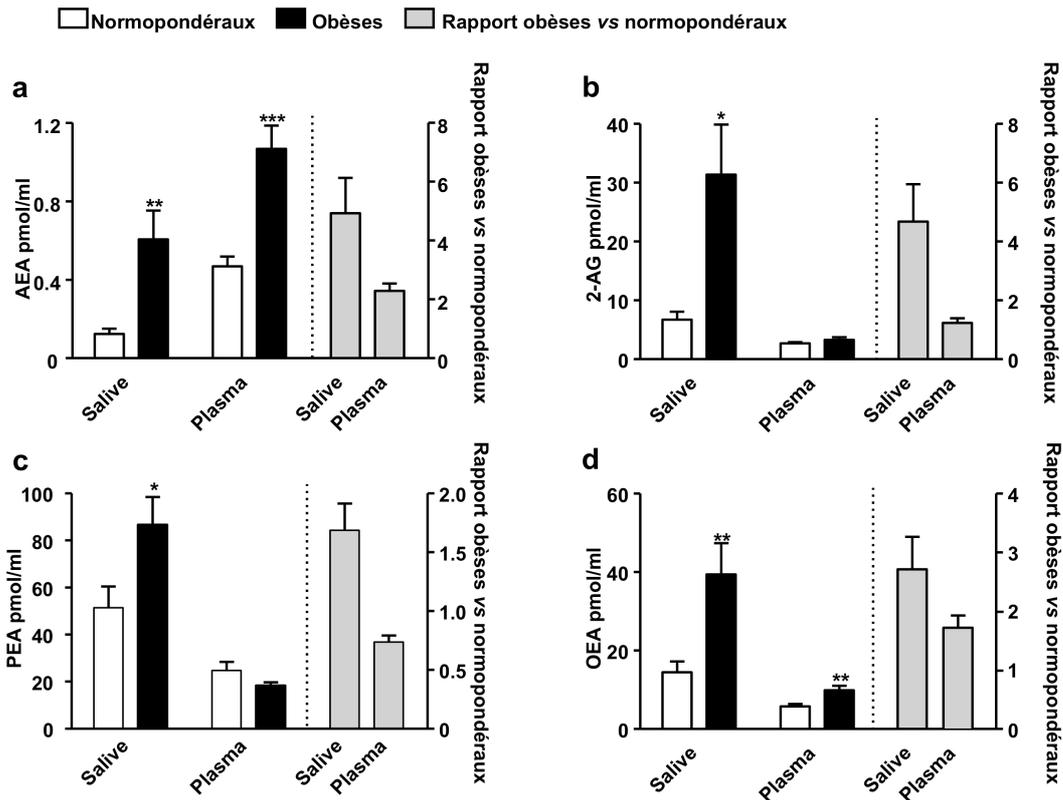


Figure 18. Concentrations plasmatiques et salivaires d'AEA (a), 2-AG (b), PEA (c) et OEA (d) chez les sujets normo pondéraux et obèses. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs par rapport aux sujets normopondéraux.

Nous retrouvons une corrélation positive significative entre les concentrations salivaires à jeun d'AEA et d'OEA et les variables anthropométriques (IMC, tour de taille) ainsi que l'insulinémie à jeun (Figure 19). Il existe une corrélation positive entre les concentrations salivaires à jeun de 2-AG et le tour de taille ($r=0,50$, $P=0,002$) et l'insulinémie à jeun ($r=0,48$, $P=0,027$) tandis que les concentrations salivaires à jeun de PEA ne corrélaient avec aucune de ces variables.

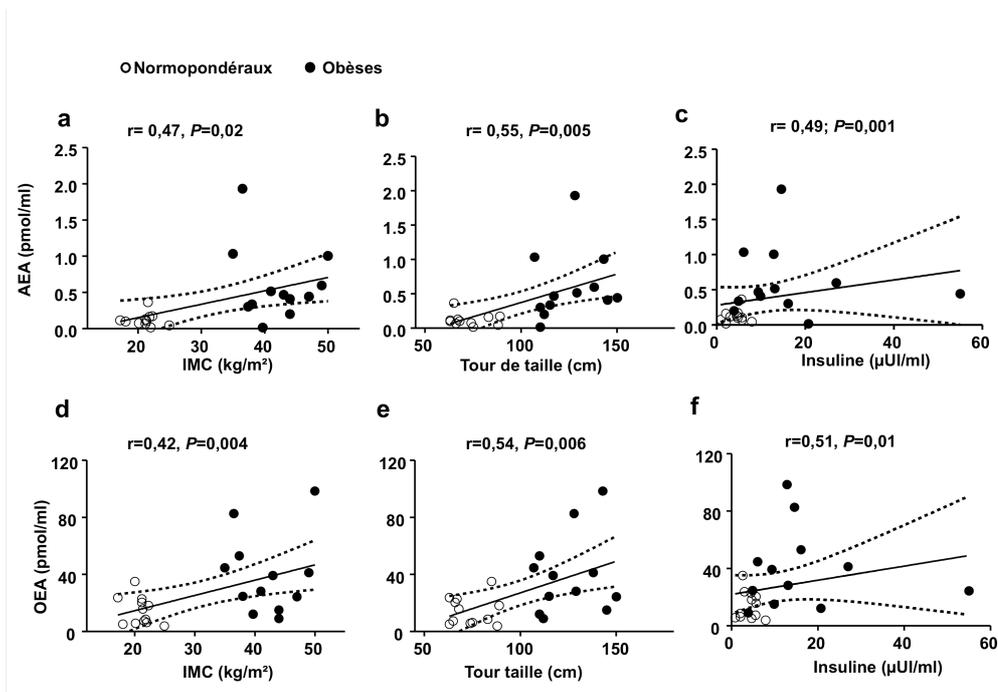


Figure 19. Corrélations entre les concentrations salivaires d'AEA et d'OEA à jeun et l'indice de masse corporelle (IMC) (a, d), le tour de taille (b, e) et l'insulinémie à jeun (c, f).

Nous n'avons pas retrouvé, à quel que temps que ce soit, de corrélation significative entre les concentrations salivaires et les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes ou de composés apparentés mais il existait néanmoins une tendance pour une corrélation entre les concentrations plasmatiques et salivaires d'AEA à jeun ($r=0,39$, $P=0,068$).

Le SEC est présent dans les glandes salivaires humaines

Nous avons pu déterminer les concentrations tissulaires des endocannabinoïdes et de leurs congénères au niveau de 4 fragments de glandes salivaires sous maxillaires humaines. Ces échantillons proviennent du même patient et ont été prélevés en zone macroscopiquement saine.

Les concentrations mesurées au niveau de chacun des 4 échantillons sont représentées dans la table 13. La moyenne des concentrations pour chaque composé est représentée sur la figure 20.

Table 13. Concentration d'AEA (fmol/mg), de 2-AG (pmol/mg), PEA (pmol/mg) et de OEA (pmol/mg) au niveau de 4 échantillons de glande sous-maxillaire.

	N°	AEA fmol/mg	2AG pmol/mg	PEA pmol/mg	OEA pmol/mg
Echantillons	3-SG	4,2016	7,7071	0,118905	0,002086
	4-SG	4,1668	5,2450	0,047321	0,000592
	5-SG	5,5911	7,5631	0,035600	0,000489
	6-SG	6,2404	8,3051	0,038285	0,000499
	mean	5,05	7,21	0,060028	0,000917
	SD	1,03	1,35	0,039570	0,000781
	SEM	0,45	0,58	0,017134	0,000338

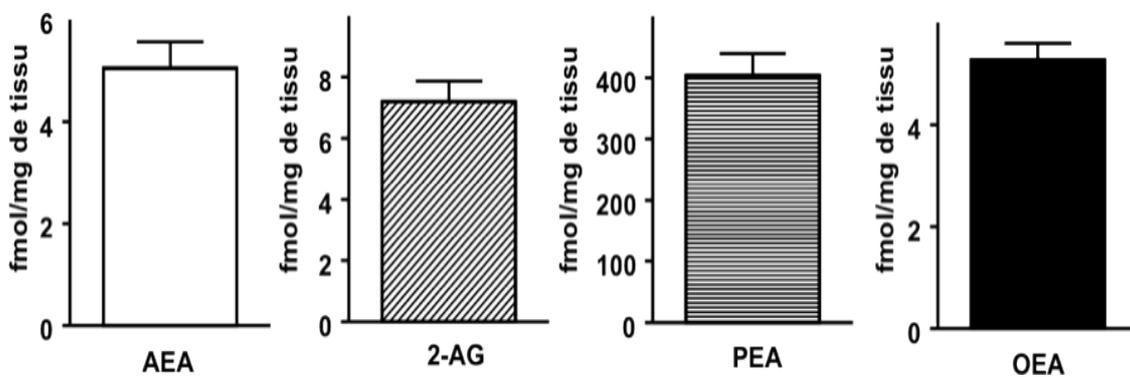


Figure 20. Concentrations tissulaires (moyenne \pm SEM) d'AEA (a), de 2-AG (b), de PEA (c) et d'OEA (d) au niveau de fragments de glandes sous maxillaires humaines.

Nous avons mis en évidence par PCR la présence de l'ARNm de CB₁, de l'enzyme de synthèse DAG et des enzymes de dégradation FAAH et MAGL au niveau des glandes salivaires sous maxillaires et des glandes salivaires accessoires (Figure 21).

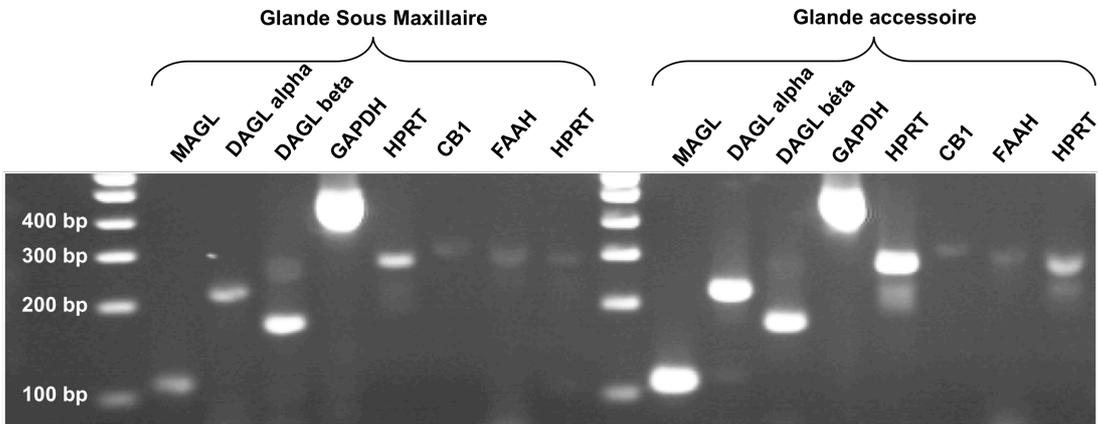


Figure 21. RT-PCR pour CB₁, FAAH, MAGL, DAGalpha, DAGbêta et les gènes de ménage GAPDH and HRPT réalisées sur les glandes salivaires sous maxillaires et accessoires. Une échelle avec des bandes de 100bp, 200bp, 300bp et 400bp est montrée.

Réponse des endocannabinoïdes et N-acyléthanolamines salivaires à la prise alimentaire

A la différence des résultats que nous avons obtenus pour le plasma (Cf partie 1), nous n'avons pas mis en évidence de variations significative des concentrations salivaires d'endocannabinoïdes, d'OEA ou de PEA en fonction de la prise alimentaire (Figure 22 et table 14).

Table 14. Variations des endocannabinoïdes et des N-Acyléthanolamines salivaires en fonction de la prise alimentaire.

	Normopondéraux	Obèses	P
AEA 1PRE (pmol/ml)	0,0724 ± 0,0212	0,1927 ± 0,0300	NS ; P<0,01#
AEA PRE (pmol/ml)	0,0802 ± 0,0212	0,2662 ± 0,0590	P<0,05
AEA 1POST (pmol/ml)	0,0799 ± 0,01785	0,2055 ± 0,0600	NS ; P<0,01#
2-AG 1PRE (pmol/ml)	9,1857 ± 1,8566	18,4500 ± 4,7779	NS
2-AG PRE (pmol/ml)	10,4490 ± 1,6579	19,7350 ± 5,6526	NS
2-AG 1POST (pmol/ml)	12,7540 ± 3,1193	25,1210 ± 6,8937	NS
OEA 1PRE (pmol/ml)	8,0791 ± 1,4490	23,5950 ± 4,2247	P<0,05
OEA PRE (pmol/ml)	7,7434 ± 1,1919	19,4330 ± 4,2367	NS ; P<0,01#
OEA 1POST (pmol/ml)	7,8553 ± 1,6594	19,9490 ± 3,9033	NS ; P<0,01#
PEA 1PRE (pmol/ml)	26,1670 ± 3,9788	47,5360 ± 5,0513	NS ; P<0,05#
PEA PRE (pmol/ml)	27,6980 ± 3,5942	43,6010 ± 8,0235	NS ; P<0,05#
PEA 1POST (pmol/ml)	23,0300 ± 4,3780	34,8470 ± 5,3166	NS ; P<0,05#

= effet groupe

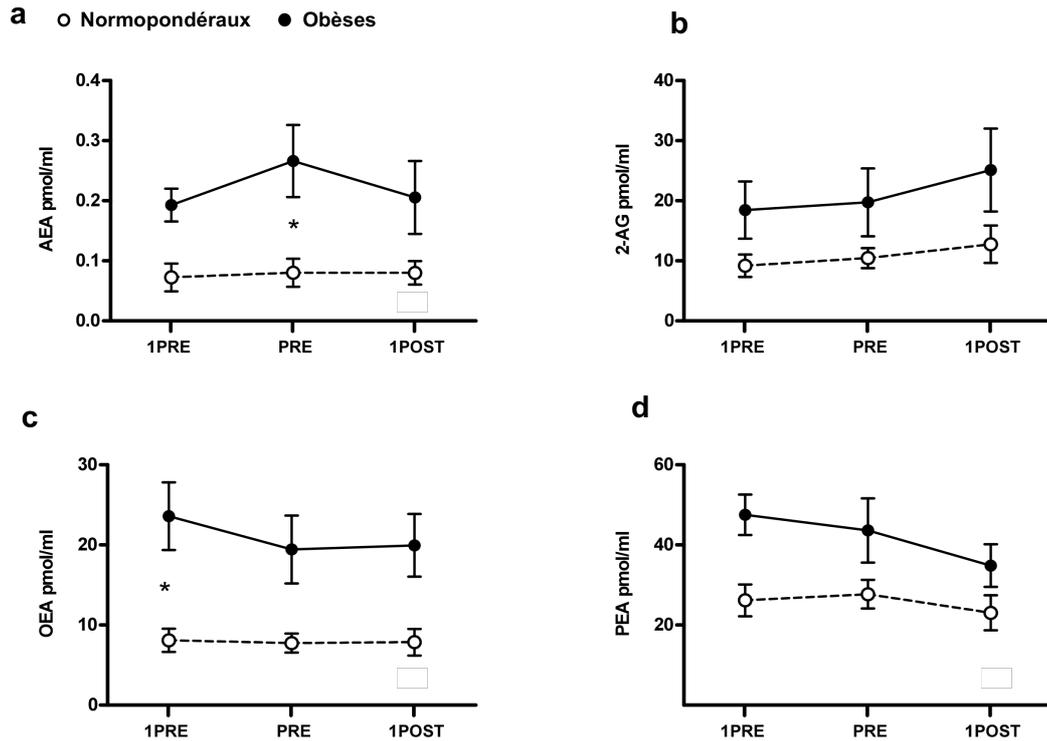


Figure 22. Concentrations salivaires d'AEA (a), de 2-AG (b), d'OEA (c) et de PEA (d) 1 heure avant (1h PRE), immédiatement avant (PRE) et 1 heure après la fin du repas (1h POST). * $P < 0,05$ normo pondéraux vs obèses à un temps donné ; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ normopondéraux versus obèses.

Réponse des endocannabinoïdes et N-acyléthanolamines à la perte de poids

La prise en charge des patients a permis une perte de poids moyenne de 5% ainsi qu'une diminution significative de l'IMC, du tour de taille, des transaminases ASAT et ALAT et des GammaGT (Table 15).

Table 15. Caractéristiques des sujets participant à la prise en charge hygiéno-diénétique.

	Avant l'intervention	Après l'intervention
Sexe (M/F)	4/8	4/8
Age (années)	45,0 ± 2,5	45,0 ± 2,5
Poids (Kg)	121,74 ± 8,93	115,0 ± 7,98 **
IMC (Kg/m ²)	44,3 ± 3,1	41,8 ± 2,8 **
Tour de taille (cm)	123,5 ± 5,3	118,7 ± 5,2 **
PAS (<140 mmHg)	127,3 ± 7,5	118,3 ± 3,9 *
PAD (<90 mmHg)	74,7 ± 3,9	71,1 ± 2,5
Glucose (4,0-5,6 mmol/l)	5,97 ± 0,21	5,6 ± 0,20 *
HDL cholestérol (1,0-1,80 mmol/l)	1,17 ± 0,07	1,08 ± 0,32
Triglycerides (0,3-1,7 mmol/l)	1,45 ± 0,44	0,95 ± 0,08 *
ASAT (10-35 U/l)	20,25 ± 1,67	16,25 ± 1,19 *
ALAT (5-40U/l)	31,08 ± 4,31	25,33 ± 3,56 **
Gamma-GT (5-38 UI/l)	33,42 ± 6,58	25,55 ± 4,33 *

Les valeurs entre parenthèse correspondent aux valeurs normales. PAS: pression artérielle systolique; PAD: pression artérielle diastolique; ASAT: aspartate aminotransferase; ALAT: alanine aminotransferase; gamma-GT: gamma-glutamyl transferase. *P < 0,05, **P < 0,01 avant vs après l'intervention.

Après la prise en charge ayant permis une perte de poids de 5,32 ± 0,97 %, les concentrations salivaires d'AEA à jeun sont significativement diminuées (Figure 23 a). En revanche, les concentrations du 2-AG, du PEA et de l'OEA ne sont pas significativement modifiées (Figure 23 b, c et d et table 16).

Table 16. Variations des endocannabinoïdes et des N-Acyléthanolamines salivaires avant et après une perte de poids obtenue par mesures hygiéno-diététiques.

	Avant l'intervention	Après l'intervention	P
AEA (pmol/ml)	2,01 ± 0,8	0,51 ± 0,12	P<0,05
2-AG (pmol/ml)	30,26 ± 3,96	23,81 ± 3,88	P=0,15
OEA (pmol/ml)	59,76 ± 8,2	42,54 ± 8,94	P=0,26
PEA (pmol/ml)	200,06 ± 60,4	138,8 ± 28,39	P=0,17

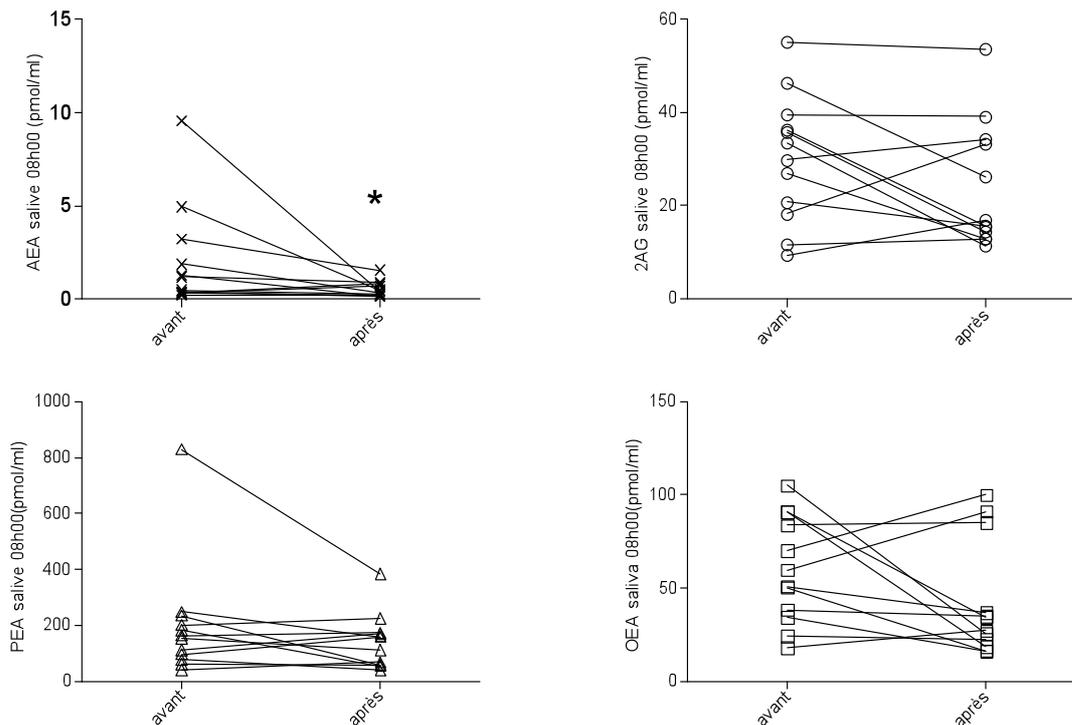


Figure 23. Concentrations salivaires à jeun d'AEA (a), de 2-AG (b), de PEA (c) et d'OEA (d) avant et après une perte de poids obtenue après 12 semaines d'un programme de règles hygiéno-diététiques. *P < 0,05 avant vs après l'intervention.

Nous n'avons pas retrouvé de corrélations significatives entre les variations d'AEA et les variations des marqueurs anthropométriques ou métaboliques.

Discussion et conclusion

Le recueil salivaire est un outil non invasif et rapide pour la détermination des concentrations de marqueurs biologiques. Nous avons pu déterminer pour la première fois les concentrations d'endocannabinoïdes et de leurs congénères dans la salive humaine. De plus, à l'instar des résultats obtenus avec les concentrations plasmatiques de ces composés, nous retrouvons une augmentation significative des concentrations salivaires des 4 composés (AEA, 2-AG, PEA et OEA) chez les sujets obèses par rapport aux sujets de poids normal et une corrélation entre l'AEA et l'OEA salivaires mesurés à jeun et les marqueurs anthropométriques d'obésité (IMC, tour de taille) ainsi qu'entre l'AEA et l'OEA salivaire mesurés au même moment et l'insulinémie à jeun. Nous ne retrouvons pas de corrélation entre les valeurs plasmatiques et salivaires, mais il existe néanmoins une tendance importante ($p=0,068$) en faveur d'une corrélation positive entre l'AEA salivaire et plasmatique à jeun. La significativité pourrait peut-être être obtenue pour des effectifs plus importants.

En revanche, nous ne mettons pas en évidence de variations prandiales des endocannabinoïdes salivaires et en particulier de l'AEA alors que nous avons mis en évidence cette cinétique caractéristique d'un système orexigène (augmentation préprandiale et diminution post prandiale) pour l'AEA plasmatique. Ceci permet d'envisager que les endocannabinoïdes mesurés dans la salive ne proviennent pas du plasma et permet d'émettre l'hypothèse qu'un SEC propre est présent au niveau des glandes salivaires chez l'Homme. Ceci permet aussi d'envisager que cet outil pourrait être utilisé quel que soit le statut nutritionnel du patient, ce qui n'est pas le cas pour le dosage plasmatique de l'AEA puisque sa concentration varie avec la prise alimentaire (77).

De façon intéressante, nous mettons effectivement en évidence que le SEC (récepteurs, enzymes de synthèse et de dégradation) est présent au niveau

des glandes salivaires humaines. Il s'agit là néanmoins de résultats préliminaires. Pour mieux caractériser les différents composants du SEC au niveau des glandes salivaires, il serait nécessaire de préciser par immunohistochimie la localisation exacte (acini, canaux excréteurs) de ces composants ou encore d'étudier ces éléments en fonction du statut énergétique ou encore de l'IMC.

Par ailleurs, l'absence de lien entre aliments et endocannabinoïdes salivaires ne peut être affirmée sur nos résultats. En effet, il a été montré chez la souris que CB₁ était exprimé au niveau des organes du goût (154). L'activation de ce récepteur par les endocannabinoïdes augmente la réponse nerveuse, électrophysiologique et comportementale au goût sucré mais pas au goût salé, amer ou unami (155). L'existence d'un SEC au niveau des cellules du goût n'a jamais été montrée chez l'Homme. Néanmoins, nous pouvons envisager qu'une variation des concentrations salivaires d'endocannabinoïdes pourrait être observée en fonction du goût des aliments et qu'il pourrait exister une communication entre les récepteurs CB₁ salivaires et les récepteurs CB₁ des organes du goût. Une étude mesurant les concentrations salivaires des endocannabinoïdes ou quantifiant l'expression des récepteurs CB₁ ou des enzymes de synthèse ou de dégradation en fonction du goût de différents aliments, possédant par ailleurs la même texture pourrait être envisagée.

Nous mettons par ailleurs en évidence qu'une perte de poids de 5% en moyenne obtenue par des mesures hygiéno-diététiques au cours de 12 semaines permet de diminuer significativement la concentration salivaire d'AEA. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'effet d'une perte de poids sur les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes est variable selon les études et varie vraisemblablement en fonction de l'intensité de la perte de poids et de son délai d'obtention (56, 62). Di Marzo et collaborateurs retrouvaient une corrélation positive entre la diminution du 2-AG plasmatique et l'amélioration des paramètres métaboliques et anthropométriques tandis qu'il existait une corrélation inverse entre la diminution de l'AEA plasmatique et la diminution du C-peptide, et de la glycémie à jeun (62). L'absence de corrélation significative dans notre étude entre les variations des paramètres anthropométriques ou biochimiques et les variations des concentrations

salivaires des endocannabinoïdes après perte de poids peut être due au faible effectif et au manque de puissance (n=12 contre n=49 dans l'étude de Di Marzo et collaborateurs). Il serait intéressant certainement d'inclure un plus grand nombre de sujets.

D'autres facteurs peuvent aussi expliquer ces différences de corrélations ou d'absence de corrélations entre variables anthropométriques et concentrations salivaires d'AEA comme la rapidité de perte de poids, ou encore le moment du prélèvement par rapport à la cinétique de la perte de poids.

Les endocannabinoïdes salivaires pourraient être un biomarqueur de l'obésité humaine d'autant plus utile que le recueil de salive ne présente aucun caractère invasif, peut être effectué à domicile et répété à plusieurs moments du nycthémère ou en fonction d'une intervention. Ce type d'outils pourrait ainsi être utilisé pour rechercher l'existence d'un rythme nyctéméral des endocannabinoïdes chez l'Homme ou encore pour confirmer l'existence d'une variation en fonction du sexe (156). De plus, les endocannabinoïdes salivaires sont certainement des biomarqueurs plus sensibles que les endocannabinoïdes plasmatiques puisque le rapport entre concentration salivaire chez le sujet normopondéral et concentration salivaire chez le sujet obèse est plus élevé que ce même rapport effectué avec les concentrations plasmatiques. D'autres études seront nécessaires pour confirmer l'intérêt de cet outil.

Ce travail a été soumis pour publication à *Diabetologia* (Cf Annexe).

Conclusion générale

Identifié au cours des années 90, le SEC est maintenant considéré comme un système clé de la régulation de l'équilibre énergétique. Dans les modèles murins d'obésité, les concentrations d'endocannabinoïdes dans des tissus différents sont augmentées. Chez l'Homme aussi, les concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes mesurées à jeun sont élevées dans les situations d'obésité ou de diabète de type 2. Néanmoins, les liens entre SEC et pathologies métaboliques chez l'Homme sont peu étudiés et mal connus. Nos résultats permettent de mieux comprendre ces relations.

Ainsi, dans notre première étude, nous avons pu pour la première fois mettre en évidence une augmentation préprandiale et une diminution post prandiale des concentrations plasmatiques d'AEA conférant à celui-ci un rôle d'initiateur de la prise alimentaire et permettant ainsi d'asseoir sa fonction physiologique dans la régulation de la prise alimentaire chez l'Homme. Bien sûr, ce rôle d'initiateur de la prise alimentaire devra être confirmé en particulier par des études recréant une séquence prandiale spontanée (77). Dans cette même étude, si nous avons pu confirmer les anomalies statiques du SEC dans l'obésité, c'est à dire l'augmentation des concentrations plasmatiques d'AEA, nous avons surtout mis en évidence des anomalies dynamiques de ce système orexigène puisque la diminution post prandiale des concentrations d'AEA est présente chez le sujet obèse mais retardée dans le temps par rapport au sujet normopondéral, comme cela est aussi confirmé dans notre travail sur les effets du CCG. Ceci confirme la participation du SEC dans la physiopathologie des maladies métaboliques et en particulier dans l'obésité. Nous mettons enfin en évidence un dysfonctionnement concomitant d'un système anorexigène et d'un système orexigène dans l'obésité ce qui illustre la complexité de cette maladie et la probable nécessité d'approches pharmacologiques combinées. A l'heure des premiers résultats métaboliques obtenus chez l'animal avec d'une part ces approches combinées et d'autre part des antagonistes périphériques de CB₁, ces résultats chez l'Homme sont particulièrement importants (38, 90).

Nos résultats concernant non seulement les variations pré et post prandiales des concentrations plasmatiques d'AEA mais aussi leurs variations pré et post CCG soulignent, à l'instar des travaux réalisés chez l'animal, l'importance du SEC du tractus gastro-intestinal chez l'Homme. Ceci conforte aussi l'importance et l'intérêt d'un ciblage périphérique de ce système dans le traitement des maladies métaboliques et de l'obésité en particulier alors que les antagonistes périphériques de CB₁ améliorent significativement les anomalies métaboliques de souris obèses (38).

Nos résultats posent aussi des questions en particulier en ce qui concerne les variations des concentrations d'AEA après CCG. Ces résultats sont bien sûr très préliminaires et l'étude de l'évolution de ces concentrations à plus long terme après la chirurgie seront importants ainsi que l'étude de l'évolution des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes de patients ayant bénéficié d'autres procédés chirurgicaux, comme les gastrectomies en manchon, sera très intéressante. Ces résultats illustrent la complexité des mécanismes mis en jeu après chirurgie bariatrique et rappellent l'importance des systèmes opposants en physiologie.

Nos travaux sont aussi en faveur d'un rôle spécifique de la résistance à l'insuline dans les anomalies du SEC chez l'Homme et en particulier dans la cinétique prandiale de l'AEA. Ces liens entre hyperglycémie, résistance à l'insuline et SEC restent à préciser et des études à plus long terme seront nécessaires.

Enfin, pour la première fois, nous avons pu déterminer les concentrations salivaires d'endocannabinoïdes et de N-Acyléthanolamines dans la salive humaine et mis en évidence une augmentation de ces concentrations chez les sujets obèses par rapport aux sujets de poids normal. De plus, nous avons pu identifier le SEC au niveau des glandes salivaires. Ainsi, nous identifions un nouvel outil qui sera probablement particulièrement utile pour l'étude du SEC chez l'Homme puisqu'il ne requiert aucun geste invasif.

Bien sûr, ces résultats comme ceux des études précédemment publiées concernant le SEC chez l'Homme doivent être interprétés avec précaution car elles portent sur de petits effectifs, il n'existe pas toujours d'appariement sur

l'âge et le sexe. En plus de ces limites méthodologiques, ces résultats sont aussi soumis à des limites techniques. En effet, les méthodes de recueil des échantillons et de dosage des endocannabinoïdes ne sont pas standardisées et ceci peut conduire à de grandes variations dans les concentrations obtenues (156). La mise en place de méthodes de dosage standardisées et l'établissement d'intervalles de référence reproductibles chez les sujets normo pondéraux et obèses apparaît comme une étape indispensable.

Quoi qu'il en soit, le SEC est un système clé dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire et nos résultats permettent de mieux comprendre ses liens avec les pathologies métaboliques comme l'obésité. Dans le contexte d'augmentation croissante de la prévalence de l'obésité et compte tenu de la pauvreté des armes pharmacologiques dont nous disposons à ce jour, ces connaissances sont importantes pour pouvoir cibler ces systèmes et développer des molécules efficaces et sûres pour combattre l'obésité et ses complications métaboliques.

Références bibliographiques

1. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*. 2010 Jan 20;303(3):235-41.
2. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet*. 2011 Aug 27;378(9793):815-25.
3. Diouf I, Charles MA, Ducimetiere P, Basdevant A, Eschwege E, Heude B. Evolution of obesity prevalence in France: an age-period-cohort analysis. *Epidemiology*. 2010 May;21(3):360-5.
4. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ*. 2007 Dec 1;335(7630):1134.
5. Sjostrom L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M, Golay A, Koppeschaar HP, et al. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group. *Lancet*. 1998 Jul 18;352(9123):167-72.
6. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006 Sep 21;443(7109):289-95.
7. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):13-23.
8. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5992.
9. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1714-9.
10. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001 Apr;50(4):707-9.
11. Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y, et al. Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1574-81.

12. Bennetzen MF, Wellner N, Ahmed SS, Ahmed SM, Diep TA, Hansen HS, et al. Investigations of the human endocannabinoid system in two subcutaneous adipose tissue depots in lean subjects and in obese subjects before and after weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Nov;35(11):1377-84.
13. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*. 2006 Feb;27(1):73-100.
14. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):61-5.
15. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):561-4.
16. Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:619-31.
17. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*. 2005 May;8(5):585-9.
18. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):1017-66.
19. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Nov;4(11):873-84.
20. Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. Endocannabinoids Part I: molecular basis of endocannabinoid formation, action and inactivation and development of selective inhibitors. *Expert Opin Ther Targets*. 2001 Apr;5(2):241-65.
21. Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):923-30.
22. Hansen HS, Diep TA. N-acyl ethanolamines, anandamide and food intake. *Biochem Pharmacol*. 2009 Sep 15;78(6):553-60.
23. Di Marzo V, Ligresti A, Morera E, Nalli M, Ortar G. The anandamide membrane transporter. Structure-activity relationships of anandamide and oleoylethanolamine analogs with phenyl rings in the polar head group region. *Bioorg Med Chem*. 2004 Oct 1;12(19):5161-9.
24. Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 2003 Aug;112(3):423-31.

25. Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, et al. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Feb;284(2):R345-53.
26. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Apr;143(3):315-7.
27. Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*. 2001 Nov;134(6):1151-4.
28. Bermudez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J Psychopharmacol*. 2011 Aug 8.
29. Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*. 2002 Jun;136(4):550-7.
30. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):822-5.
31. Bellocchio L, Lafenetre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, et al. Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci*. 2010 Mar;13(3):281-3.
32. Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol*. 2003 Apr;63(4):908-14.
33. Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Buning J, Drenckhan M, Zarse K, et al. Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Feb;12(2):158-66.
34. Nogueiras R, Veyrat-Durebex C, Suchanek PM, Klein M, Tschöp J, Caldwell C, et al. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes*. 2008 Nov;57(11):2977-91.

35. Verty AN, Allen AM, Oldfield BJ. The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity* (Silver Spring). 2009 Feb;17(2):254-61.
36. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1298-305.
37. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3160-9.
38. Tam J, Vemuri VK, Liu J, Batkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest*. 2010 Aug 2;120(8):2953-66.
39. Lindborg KA, Teachey MK, Jacob S, Henriksen EJ. Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Aug;12(8):722-30.
40. Li C, Bowe JE, Jones PM, Persaud SJ. Expression and function of cannabinoid receptors in mouse islets. *Islets*. 2010 Sep-Oct;2(5):293-302.
41. Li C, Jones PM, Persaud SJ. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacol Ther*. 2011 Mar;129(3):307-20.
42. Li C, Jones PM, Persaud SJ. Cannabinoid receptors are coupled to stimulation of insulin secretion from mouse MIN6 beta-cells. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(2):187-96.
43. Bermudez-Silva FJ, Suarez Perez J, Nadal A, Rodriguez de Fonseca F. The role of the pancreatic endocannabinoid system in glucose metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;23(1):87-102.
44. Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie SH, Velasquez DA, Tschöp J, Lopez M, et al. The endocannabinoid system: role in glucose and energy metabolism. *Pharmacol Res*. 2009 Aug;60(2):93-8.
45. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *Jama*. 2006 Feb 15;295(7):761-75.

46. Despres JP, Golay A, Sjostrom L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2121-34.
47. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 2005 Apr 16-22;365(9468):1389-97.
48. Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet*. 2006 Nov 11;368(9548):1660-72.
49. Cluny NL, Chambers AP, Vemuri VK, Wood JT, Eller LK, Freni C, et al. The neutral cannabinoid CB receptor antagonist AM4113 regulates body weight through changes in energy intake in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011 Jan;97(3):537-43.
50. Sipe JC, Waalen J, Gerber A, Beutler E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int J Obes (Lond)*. 2005 Jul;29(7):755-9.
51. Chiang KP, Gerber AL, Sipe JC, Cravatt BF. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Hum Mol Genet*. 2004 Sep 15;13(18):2113-9.
52. Sipe JC, Scott TM, Murray S, Harismendy O, Simon GM, Cravatt BF, et al. Biomarkers of endocannabinoid system activation in severe obesity. *PLoS One*. 2010;5(1):e8792.
53. Jensen DP, Andreasen CH, Andersen MK, Hansen L, Eiberg H, Borch-Johnsen K, et al. The functional Pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5,801 whites. *J Mol Med (Berl)*. 2007 May;85(5):445-9.
54. Bluher M, Engeli S, Kloting N, Berndt J, Fasshauer M, Batkai S, et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*. 2006 Nov;55(11):3053-60.
55. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP, et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Apr;31(4):692-9.

56. Engeli S, Heusser K, Janke J, Gorzelniak K, Batkai S, Pacher P, et al. Peripheral endocannabinoid system activity in patients treated with sibutramine. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 May;16(5):1135-7.
57. Engeli S, Jordan J. The endocannabinoid system: body weight and metabolic regulation. *Clin Cornerstone*. 2006;8 Suppl 4:S24-35.
58. Quarta C, Mazza R, Obici S, Pasquali R, Pagotto U. Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends Mol Med*. 2011 Sep;17(9):518-26.
59. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*. 2005 Oct;54(10):2838-43.
60. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(3 Suppl):15-26.
61. Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A, Petrosino S, Mertens I, Lundbom N, et al. Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol*. 2009 Nov;161(5):715-22.
62. Di Marzo V, Cote M, Matias I, Lemieux I, Arsenault BJ, Cartier A, et al. Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia*. 2009 Feb;52(2):213-7.
63. Jumpertz R, Guizarro A, Pratley RE, Piomelli D, Krakoff J. Central and peripheral endocannabinoids and cognate acylethanolamides in humans: association with race, adiposity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar;96(3):787-91.
64. Annuzzi G, Piscitelli F, Di Marino L, Patti L, Giacco R, Costabile G, et al. Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids Health Dis*. 2010;9:43.
65. Bennetzen MF. Investigations of the endocannabinoid system in adipose tissue: effects of obesity/ weight loss and treatment options. *Dan Med Bull*. 2011 Apr;58(4):B4269.
66. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ*. 2007 Dec 8;335(7631):1194-9.

67. Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I, et al. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci*. 2002 Nov 1;22(21):9612-7.
68. Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Aviello G, Romano B, Borrelli F, et al. Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol*. 2009 Sep;158(2):451-61.
69. Sjostrom L. Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32 Suppl 7:S93-7.
70. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2683-93.
71. Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med*. 2007 Aug 23;357(8):741-52.
72. Sjostrom L, Peltonen M, Jacobson P, Sjostrom CD, Karason K, Wedel H, et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA*. 2012 Jan 4;307(1):56-65.
73. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Jan-Feb;18(1):27-37.
74. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Aug;91(8):3171-80.
75. Fezza F, Dillwith JW, Bisogno T, Tucker JS, Di Marzo V, Sauer JR. Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary glands of the lone star tick. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jul 4;1633(1):61-7.
76. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, de la Cal C, Iribarne M, Suburo AM, Rettori V, et al. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 Sep;231(8):1421-9.
77. Gatta-Cherifi B, Matias I, Vallee M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV, et al. Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Aug 16.

78. Kirkham TC, Williams CM. Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutr Res Rev.* 2001 Jun;14(1):65-86.
79. Kirkham TC, Williams CM. Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology (Berl).* 2001 Jan 1;153(2):267-70.
80. le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, Patterson M, Borg CM, Wynne KJ, et al. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):3-8.
81. le Roux CW, Bloom SR. Peptide YY, appetite and food intake. *Proc Nutr Soc.* 2005 May;64(2):213-6.
82. Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Marini P, Cristino L, Petrosino S, et al. Basal and fasting/refeeding-regulated tissue levels of endogenous PPAR-alpha ligands in Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2010 Jan;18(1):55-62.
83. Di Marzo V, Ligresti A, Cristino L. The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int J Obes (Lond).* 2009 Jun;33 Suppl 2:S18-24.
84. Godlewski G, Alapafuja SO, Batkai S, Nikas SP, Cinar R, Offertaler L, et al. Inhibitor of fatty acid amide hydrolase normalizes cardiovascular function in hypertension without adverse metabolic effects. *Chem Biol.* 2010 Nov 24;17(11):1256-66.
85. Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellesmann C, et al. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1781(4):200-12.
86. Gatta B, Zuberbuehler C, Arnold M, Aubert R, Langhans W, Chapelot D. Acute effects of pharmacological modifications of fatty acid metabolism on human satiety. *Br J Nutr.* 2009 Jun;101(12):1867-77.
87. Di Marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis.* 1998 Dec;5(6 Pt B):386-404.
88. Petrosino S, Ligresti A, Di Marzo V. Endocannabinoid chemical biology: a tool for the development of novel therapies. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Jun;13(3):309-20.
89. Cable JC, Tan GD, Alexander SP, O'Sullivan SE. The activity of the endocannabinoid metabolising enzyme fatty acid amide hydrolase in subcutaneous adipocytes correlates with BMI in metabolically healthy humans. *Lipids Health Dis.* 2011;10:129.

90. Bojanowska E, Radziszewska E. Combined stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor and inhibition of cannabinoid CB1 receptor act synergistically to reduce food intake and body weight in the rat. *J Physiol Pharmacol*. 2011 Aug;62(4):395-402.
91. Sjostrom CD, Lissner L, Wedel H, Sjostrom L. Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: the SOS Intervention Study. *Obes Res*. 1999 Sep;7(5):477-84.
92. Sjostrom L, Gummesson A, Sjostrom CD, Narbro K, Peltonen M, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol*. 2009 Jul;10(7):653-62.
93. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. 2009 Mar;122(3):248-56 e5.
94. Thaler JP, Cummings DE. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2518-25.
95. Dhahri A, Qassemyar Q, Verhaeghe P, Desailoud-Godard R, Badaoui R, Regimbeau JM. [Bariatric surgery in the treatment of severe obesity]. *Rev Prat*. 2009 Nov 20;59(9):1198-203.
96. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg*. 1995 Sep;222(3):339-50; discussion 50-2.
97. Torquati A, Lutfi R, Abumrad N, Richards WO. Is Roux-en-Y gastric bypass surgery the most effective treatment for type 2 diabetes mellitus in morbidly obese patients? *J Gastrointest Surg*. 2005 Nov;9(8):1112-6; discussion 7-8.
98. Wittgrove AC, Clark GW. Laparoscopic gastric bypass, Roux-en-Y- 500 patients: technique and results, with 3-60 month follow-up. *Obes Surg*. 2000 Jun;10(3):233-9.
99. Rubino F, Schauer PR, Kaplan LM, Cummings DE. Metabolic surgery to treat type 2 diabetes: clinical outcomes and mechanisms of action. *Annu Rev Med*. 2010;61:393-411.
100. le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state,

facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg.* 2006 Jan;243(1):108-14.

101. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 2002 May 23;346(21):1623-30.

102. Korner J, Bessler M, Inabnet W, Taveras C, Holst JJ. Exaggerated glucagon-like peptide-1 and blunted glucose-dependent insulinotropic peptide secretion are associated with Roux-en-Y gastric bypass but not adjustable gastric banding. *Surg Obes Relat Dis.* 2007 Nov-Dec;3(6):597-601.

103. Morinigo R, Moize V, Musri M, Lacy AM, Navarro S, Marin JL, et al. Glucagon-like peptide-1, peptide YY, hunger, and satiety after gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1735-40.

104. Laferrere B, Swerdlow N, Bawa B, Arias S, Bose M, Olivan B, et al. Rise of oxyntomodulin in response to oral glucose after gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;95(8):4072-6.

105. Rubino F, Zizzari P, Tomasetto C, Bluet-Pajot MT, Forgione A, Vix M, et al. The role of the small bowel in the regulation of circulating ghrelin levels and food intake in the obese Zucker rat. *Endocrinology.* 2005 Apr;146(4):1745-51.

106. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, et al. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab.* 2008 Sep;8(3):201-11.

107. Mithieux G. A Synergy between Incretin Effect and Intestinal Gluconeogenesis Accounting for the Rapid Metabolic Benefits of Gastric Bypass Surgery. *Curr Diab Rep.* 2012 Feb 5.

108. Izzo AA, Camilleri M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut.* 2008 Aug;57(8):1140-55.

109. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther.* 2010 Apr;126(1):21-38.

110. DiPatrizio NV, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12904-8.

111. Guijarro A, Osei-Hyiaman D, Harvey-White J, Kunos G, Suzuki S, Nadochiy S, et al. Sustained weight loss after Roux-en-Y gastric bypass is characterized by down regulation of endocannabinoids and mitochondrial function. *Ann Surg.* 2008 May;247(5):779-90.

112. Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons: kinetics and role in influencing neurochemical phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Jul;299(1):G63-9.
113. Charles MA, Basdevant A, Eschwege E. [Prevalence of obesity in adults in France: the situation in 2000 established from the OBEPI Study]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2002 Apr;63(2 Pt 1):154-8.
114. Kindel TL, Martins PJ, Yoder SM, Jandacek RJ, Seeley RJ, D'Alessio DA, et al. Bypassing the duodenum does not improve insulin resistance associated with diet-induced obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Feb;19(2):380-7.
115. Hansen EN, Tamboli RA, Isbell JM, Saliba J, Dunn JP, Marks-Shulman PA, et al. Role of the foregut in the early improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 May;300(5):G795-802.
116. Tschop J, Kasten KR, Nogueiras R, Goetzman HS, Cave CM, England LG, et al. The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis. *J Immunol*. 2009 Jul 1;183(1):499-505.
117. Kullberg J, Sundbom M, Haenni A, Freden S, Johansson L, Bornert P, et al. Gastric bypass promotes more lipid mobilization than a similar weight loss induced by low-calorie diet. *J Obes*. 2011;2011:959601.
118. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1990 Mar 29;322(13):882-9.
119. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*. 2001 Sep 13;345(11):790-7.
120. Reeves G, Wallis R, Crowston JG, Small KM, Wells AP. The effect of ICG on mitomycin C cytotoxicity in human tenon fibroblasts. *J Glaucoma*. 2007 Aug;16(5):479-82.
121. Simon D. [Epidemiological features of type 2 diabetes]. *Rev Prat*. 2010 Apr 20;60(4):469-73.
122. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011 Jul 9;378(9786):169-81.

123. D'Eon TM, Pierce KA, Roix JJ, Tyler A, Chen H, Teixeira SR. The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1262-8.
124. Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Feb;29(2):183-7.
125. Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J, et al. Hepatic Cannabinoid Receptor-1 Mediates Diet-Induced Insulin Resistance Via Inhibition of Insulin Signaling and Clearance in Mice. *Gastroenterology*. 2012 Jan 31.
126. Juan-Pico P, Fuentes E, Bermudez-Silva FJ, Javier Diaz-Molina F, Ripoll C, Rodriguez de Fonseca F, et al. Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*. 2006 Feb;39(2):155-62.
127. Bermudez-Silva FJ, Suarez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Munoz AL, et al. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia*. 2008 Mar;51(3):476-87.
128. Triay J, Mundi M, Klein S, Toledo FG, Smith SR, Abu-Lebdeh H, et al. Does rimonabant independently affect free Fatty Acid and glucose metabolism? *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Mar;97(3):819-27.
129. Harris JA, Benedict FG. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1918 Dec;4(12):370-3.
130. Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. 2005 Mar 15;142(6):403-11.
131. Fricker J, Rozen R, Melchior JC, Apfelbaum M. Energy-metabolism adaptation in obese adults on a very-low-calorie diet. *Am J Clin Nutr*. 1991 Apr;53(4):826-30.
132. Bogardus C, Taskinen MR, Zawadzki J, Lillioja S, Mott D, Howard BV. Increased resting metabolic rates in obese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus and the effect of sulfonylurea therapy. *Diabetes*. 1986 Jan;35(1):1-5.
133. Gougeon R, Lamarche M, Yale JF, Venuta T. The prediction of resting energy expenditure in type 2 diabetes mellitus is improved by factoring for glycemia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Dec;26(12):1547-52.

134. Kirk JK, Graves DE, Craven TE, Lipkin EW, Austin M, Margolis KL. Restricted-carbohydrate diets in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Am Diet Assoc.* 2008 Jan;108(1):91-100.
135. Kirk E, Reeds DN, Finck BN, Mayurranjan SM, Patterson BW, Klein S. Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. *Gastroenterology.* 2009 May;136(5):1552-60.
136. Sargrad KR, Homko C, Mozzoli M, Boden G. Effect of high protein vs high carbohydrate intake on insulin sensitivity, body weight, hemoglobin A1c, and blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Diet Assoc.* 2005 Apr;105(4):573-80.
137. Goodpaster BH, Katsiaras A, Kelley DE. Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes.* 2003 Sep;52(9):2191-7.
138. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Nov;295(5):E1009-17.
139. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1802-12.
140. Bantle JP, Wylie-Rosett J, Albright AL, Apovian CM, Clark NG, Franz MJ, et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2008 Jan;31 Suppl 1:S61-78.
141. Rigalleau V, Rabemanantsoa C, Gin H. A three-day insulin-induced normoglycemia improves carbohydrate oxidation in type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2002 Nov;51(11):1484-8.
142. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000 May;49(5):677-83.
143. Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB, Rault A, Loiseau H, Gatta B, et al. Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;94(2):456-62.
144. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011 May;17(4):345-54.
145. Tribout B, Gras-Champel V, Pannier M, Andrejak M. [Physiology and pharmacology of lacrymal and salivary secretions]. *Rev Prat.* 2001 Jan 31;51(2):133-9.

146. Acosta A, Hurtado MD, Gorbatyuk O, La Sala M, Duncan D, Aslanidi G, et al. Salivary PYY: a putative bypass to satiety. *PLoS One*. 2011;6(10):e26137.
147. Li BB, Chen ZB, Li BC, Lin Q, Li XX, Li SL, et al. Expression of ghrelin in human salivary glands and its levels in saliva and serum in Chinese obese children and adolescents. *Arch Oral Biol*. 2011 Apr;56(4):389-94.
148. Benedix F, Westphal S, Patschke R, Granowski D, Luley C, Lippert H, et al. Weight loss and changes in salivary ghrelin and adiponectin: comparison between sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass and gastric banding. *Obes Surg*. 2011 May;21(5):616-24.
149. Mamali I, Roupas ND, Armeni AK, Theodoropoulou A, Markou KB, Georgopoulos NA. Measurement of salivary resistin, visfatin and adiponectin levels. *Peptides*. 2012 Jan;33(1):120-4.
150. Marczylo TH, Lam PM, Nallendran V, Taylor AH, Konje JC. A solid-phase method for the extraction and measurement of anandamide from multiple human biomatrices. *Anal Biochem*. 2009 Jan 1;384(1):106-13.
151. Ware MA, Doyle CR, Woods R, Lynch ME, Clark AJ. Cannabis use for chronic non-cancer pain: results of a prospective survey. *Pain*. 2003 Mar;102(1-2):211-6.
152. Robson P. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *Br J Psychiatry*. 2001 Feb;178:107-15.
153. Dall'Aglio C, Mercati F, Pascucci L, Boiti C, Pedini V, Ceccarelli P. Immunohistochemical localization of CB1 receptor in canine salivary glands. *Vet Res Commun*. 2010 Jun;34 Suppl 1:S9-12.
154. Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, et al. Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 12;107(2):935-9.
155. Niki M, Jyotaki M, Yoshida R, Ninomiya Y. Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids. *Results Probl Cell Differ*. 2010;52:101-14.
156. Fanelli F, Di Lallo VD, Belluomo I, De lasio R, Baccini M, Casadio E, et al. Estimation of reference intervals of five endocannabinoids and endocannabinoid related compounds in human plasma by two dimension-LC/MS/MS. *J Lipid Res*. 2011 Dec 14.

Annexes

Annexe 1 : 1er article publié dans *International Journal of Obesity*

Annexe 2 : 2ème article soumis à *Diabetologia*

SHORT COMMUNICATION

Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity

B Gatta-Cherifi^{1,2,3,6}, I Matias^{3,4,6}, M Vallée^{3,5}, A Tabarin^{1,2,3}, G Marsicano^{3,4}, PV Piazza^{3,5,7} and D Cota^{1,3,7}

¹Group 'Energy Balance and Obesity', INSERM U862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France; ²Endocrinology Department, Haut-Lévêque Hospital, Pessac, France; ³Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France; ⁴Group 'Endocannabinoids and Neuroadaptation', INSERM U862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France and ⁵Group 'Physiopathology of Addiction', INSERM U862, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France

Background: The endocannabinoid system is a potential pharmacotherapy target for obesity. However, the role of this system in human food intake regulation is currently unknown.

Methods: To test whether circulating endocannabinoids might functionally respond to food intake and verify whether these orexigenic signals are deregulated in obesity alongside with anorexigenic ones, we measured plasma anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and peptide YY (PYY) changes in response to a meal in 12 normal-weight and 12 non-diabetic, insulin-resistant obese individuals.

Results: Both normal-weight and obese subjects had a significant preprandial AEA peak. Postprandially, AEA levels significantly decreased in normal-weight, whereas no significant changes were observed in obese subjects. Similarly, PYY levels significantly increased in normal-weight subjects only. No meal-related changes were found for 2-AG. Postprandial AEA and PYY changes inversely correlated with waist circumference, and independently explained 20.7 and 21.3% of waist variance. Multiple regression analysis showed that postprandial AEA and PYY changes explained 34% of waist variance, with 8.2% of the variance commonly explained.

Conclusion: These findings suggest that AEA might be a physiological meal initiator in humans and furthermore show that postprandially AEA and PYY are concomitantly deregulated in obesity.

International Journal of Obesity advance online publication, 16 August 2011; doi:10.1038/ijo.2011.165

Keywords: endocannabinoid; PYY; food intake; meal

Introduction

Obesity has recently become a major medical, social and economic burden. Its epidemic prevalence is largely explained by the unprecedented increase in both the availability and caloric content of food, which constantly challenge the control of food intake.¹

Two opposing systems principally regulate food intake. Orexigenic systems promote appetite and food consumption, while anorexigenic ones inhibit food intake and induce

satiety.^{2,3} Several potential treatments targeting one or the other of these systems have been developed over the years and tested in clinical trials.^{4,5} Surprisingly, neither blocking orexigenic systems nor activating anorexigenic ones, satisfactorily reduces adiposity in obese subjects. One possible explanation for this lack of therapeutic efficacy could be that in obese subjects not one or the other, but both systems are deregulated.

Endocannabinoids, like the fatty acid amide anandamide (AEA) and the ester of the arachidonic acid 2-arachidonoylglycerol (2-AG), exert known orexigenic effects in animals by acting at cannabinoid receptors.^{6,7} Elevated circulating AEA and 2-AG levels have been described in obese humans and, depending on the study, directly correlated with different measures of adiposity, including waist circumference, body fat percentage and body mass index.^{8–10} However, endocannabinoids function in the context of human food intake

Correspondence: Dr D Cota, Group 'Energy Balance and Obesity', INSERM U862, Neurocentre Magendie, Université de Bordeaux 2, 146 Rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux, France.

E-mail: daniela.cota@inserm.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 11 April 2011; revised 1 July 2011; accepted 11 July 2011

regulation has remained elusive, and it is currently unknown whether they may participate in the pathophysiology of human obesity. Indeed, there are no information available about possible dynamic changes in plasma endocannabinoids before and after the consumption of a meal and on the possible alteration of such changes in obesity.

Conversely, anorexigenic hormones, such as the peptide YY (PYY), are secreted by the gastrointestinal tract at the end of each meal, and decrease food intake by causing satiety.¹¹ Obese subjects have a blunted postprandial PYY increase,¹² implying that an altered satiety signal might favor further food intake. Both the endocannabinoid and satiety systems have been so far independently investigated as a potential targets for therapy.^{11,13} Thus, to test whether circulating endocannabinoids might functionally respond to food intake, and verify whether these orexigenic signals are deregulated in obesity alongside with anorexigenic ones, we measured plasma AEA, 2-AG and PYY levels in 12 normal-weight and 12 non-diabetic, insulin-resistant obese individuals.

Subjects and methods

Study outline

The study was approved by the Haut-Lévêque Hospital Research Ethics Committee and was undertaken after informed written consent was obtained. The characteristics of the 24 subjects (12 normal-weight and 12 non-diabetic, insulin-resistant obese) participating in the study are reported in Table 1. The meal was designed by a hospital nutritionist to guarantee that, independently from the food items consumed, it contained an equal amount of

macronutrients (35% lipids, 45% carbohydrates and 20% proteins) and calories. The meal consisted of a starter (a small portion of salad or vegetables), a main dish (roasted pork, lamb, chicken, salmon or tuna) accompanied by pasta or rice and vegetables, white bread and a cheese and fruit portion. Subjects randomly consumed meals containing different food items, so to avoid any potential effect on endocannabinoids precursors' pools.¹⁴

Blood sampling

Overnight fasted subjects underwent blood sampling soon after the arrival at the hospital (0900 h), 1 h before the meal (1100 h), immediately before the meal (1200 h) and 1 h after the termination of the meal. To carefully control for postcollection alterations in endocannabinoid levels, immediately after collection in heparin tubes, blood samples were centrifuged at 4 °C, frozen and stored at -80 °C until analysis.

Endocannabinoids measurement

Endocannabinoids were extracted, purified and quantified following a set of different biochemical steps.¹⁵ Briefly, human plasma was homogenized and extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v) containing internal deuterated standards (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) and then prepurified by open bed chromatography.

Tandem mass spectral analyses were performed on a TSQ Quantum Access triple quadrupole instrument (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization source and operating in positive ion mode. A new sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis method was developed and validated for endocannabinoids quantification in selected reaction monitoring mode. To demonstrate the method's applicability, the analytical performance of the new LC-MS/MS method was investigated using a validation program based on Food and Drug Administration guidelines. Our method provided high recoveries of endocannabinoids and is sufficiently linear, sensitive, precise and accurate (see Supplementary Table 1) for application to endocannabinoids measurement in human plasma. Endocannabinoids were then quantified by isotopic dilution using a seven-point calibration curve.

Hormonal, lipids and glucose measurements

Lipids, glucose and liver enzymes were determined by enzymatic and fluorometric methods using an Olympus analyzer AU2700 (Beckman Coulter, Villepinte, France). Insulin was measured using CIS bio IRMA kit (intra-assay CV: 3.8%, inter-assay CV: 8%; CIS bio international, Gif-sur-Yvette, France), whereas total PYY was measured using a Millipore ELISA kit (for a concentration of 83.2 pg ml⁻¹, intra-assay CV: 1.79% and inter-assay CV: 6.07%; for a

Table 1 Characteristics of the subjects

	Normal-weight (12)	Obese (12)
Sex (male/female)	2/10	4/8
Age (years)	39.1 ± 3.7	37.4 ± 3.4
BMI (Kg m ⁻²)	21.0 ± 0.6	42.0 ± 1.4**
Waist circumference (cm)	73.8 ± 2.9	125.0 ± 4.5**
SBP (<140 mm Hg)	111.3 ± 2.6	125.0 ± 4.0*
DBP (<90 mm Hg)	70.0 ± 3.5	70.8 ± 4.7
Glucose (4.0–5.6 mmol l ⁻¹)	5.0 ± 0.1	4.8 ± 0.2
Insulin (2.0–17.0 µU l ⁻¹)	4.1 ± 0.6	16.1 ± 4.0*
HOMA	0.9 ± 0.1	3.4 ± 0.8*
LDL cholesterol (2.88–4.87 mmol l ⁻¹)	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.2
HDL cholesterol (1.0–1.80 mmol l ⁻¹)	1.9 ± 0.1	1.3 ± 0.09
Triglycerides (0.3–1.7 mmol l ⁻¹)	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2
ASAT (10–35 U l ⁻¹)	24.0 ± 2.0	31.0 ± 2.7
ALAT (5–40 U l ⁻¹)	19.8 ± 2.6	39.3 ± 5.3**
Gamma-GT (5–38 U l ⁻¹)	20.2 ± 3.4	42.0 ± 7.2*

Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase; DBP, diastolic blood pressure; gamma-GT, gamma-glutamyl transferase; HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA, homeostatic model assessment; LDL cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure. **P* < 0.05. ***P* < 0.01 vs normal-weight group. Values in parenthesis indicate normal range.

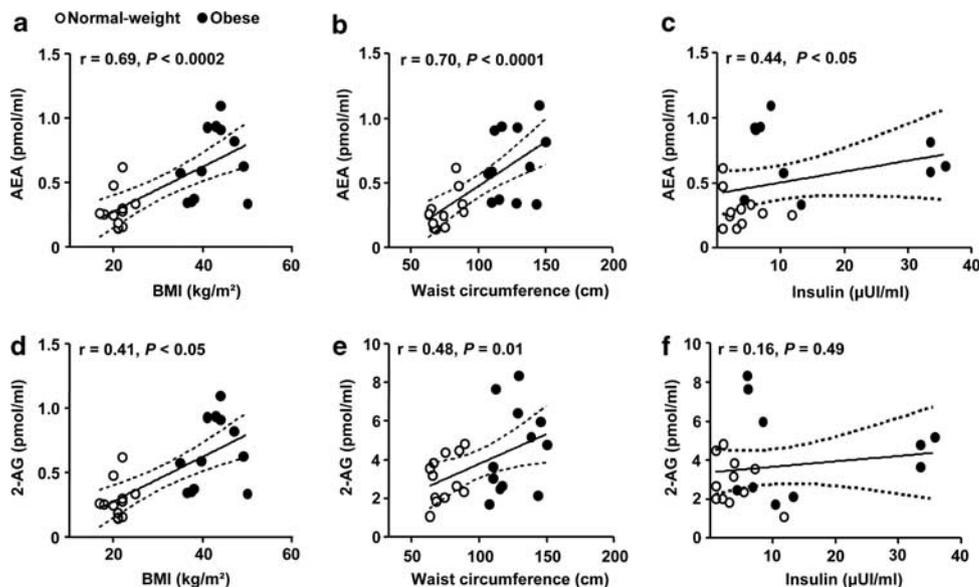


Figure 1 Basal plasma AEA and 2-AG correlation with body mass index (BMI) (a, d), waist circumference (b, e) and fasting insulin levels (c, f).

concentration of 115 pg ml⁻¹, intra-assay CV: 1.00% and inter-assay CV: 16.50%; Millipore, St Charles, MO, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica version 8.0. (StatSoft, Tulsa, OK, USA). All values are reported as means ± s.e.m., unless otherwise specified. Data were analyzed by 1-way and 2-way repeated measurements ANOVA or by two-tailed Student's *t*-tests when appropriate. Significant ANOVAs were followed by Tukey *post-hoc* test. For correlation analysis, Pearson's or Spearman's were used when appropriate. *P*-values < 0.05 denote statistical significance.

Results

Subject characteristics are shown in Table 1. Normal-weight and obese had similar energy intake (normal-weight: 2851.21 ± 37.68 kJ vs obese: 2876.33 ± 87.92 kJ, *P* = 0.8).

As expected,⁸⁻¹⁰ obese subjects had increased basal plasma AEA and 2-AG levels, which were positively correlated with body mass index and waist circumference, and also with insulin levels in the case of AEA (Figure 1). Just before the meal, AEA significantly increased in both normal-weight and obese individuals (Figure 2a). One hour after the consumption of the meal, AEA levels decreased significantly in normal-weight, but not in obese subjects (Figures 2a and b). Consistent with its anorexigenic function,^{11,12} PYY plasma levels significantly increased after the meal in normal-weight, whereas no change was observed in the obese group (Figures 2d and e). 2-AG levels were elevated in obese subjects (*P* < 0.05), but they did not change in

response to the meal, neither in normal-weight nor in obese (Figure 3).

Postprandial AEA changes were negatively correlated with waist circumference (Figure 2c) and explained 20.7% of the variance observed for waist (*r* = 0.455, *r*² = 0.207, *P* = 0.04). Likewise, postprandial PYY changes were inversely correlated with waist circumference (Figure 2f) and explained 21.3% of waist variance (*r* = 0.462, *r*² = 0.213, *P* = 0.04). Postprandial AEA and PYY changes were not correlated (Pearson: *r* = 0.242, *P* = 0.30). However, a multiple regression analysis showed that postprandial AEA and PYY changes explained 34% of the waist variance (*r* = 0.582, *r*² = 0.34, *P* < 0.03), with only 8.2% of the variance commonly explained.

Discussion

The current findings allow proposing a physiological function for the endocannabinoid AEA in the context of human food intake regulation.

Similar to the orexigenic hormone ghrelin,¹⁶ AEA displays a circulating profile consistent with a role as a physiological meal initiator. This is in agreement with observations from rodent studies demonstrating that this endocannabinoid rapidly induces feeding and increases gastric acid secretion, when administered either centrally or peripherally.^{6,17} Interestingly, the preprandial peak of AEA was observed in both normal-weight and obese subjects. This suggests that, despite the already elevated levels found in obesity, meal-related stimuli are still able to further increase circulating AEA. Because subjects were provided food at specified times, it is also possible that the preprandial surge of AEA occurred

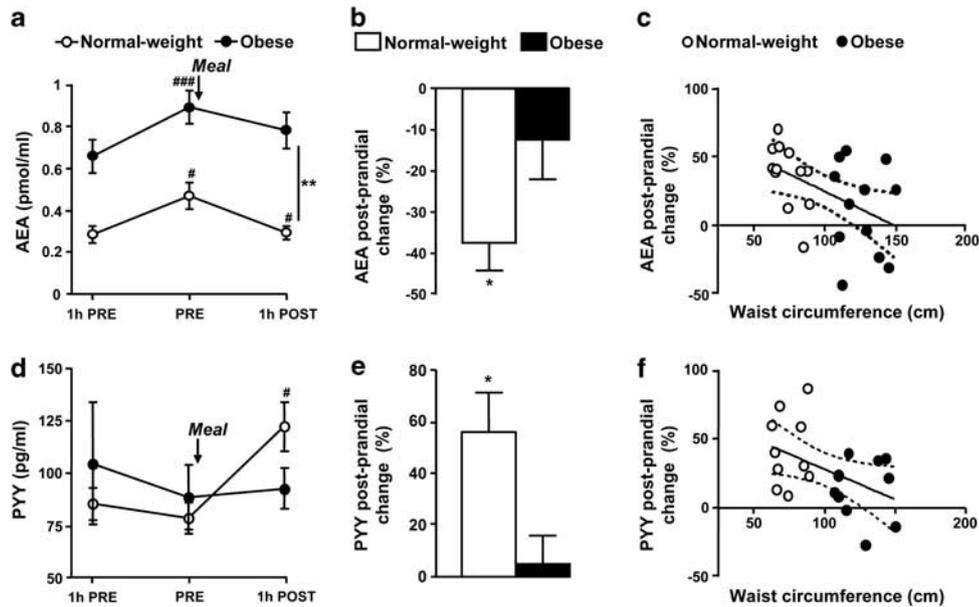


Figure 2 Postprandial deregulation of orexigenic and anorexigenic signals in obesity. (a) Plasma AEA 1 h before (1 h PRE), immediately before (PRE) and 1 h after the meal termination (1 h POST). (b) AEA postprandial change. (c) Correlation between AEA postprandial change and waist circumference (Pearson: $r = -0.479$; $P = 0.02$). (d) Plasma PYY levels 1 h before, immediately before and 1 h after the meal termination. (e) PYY postprandial change. (f) Correlation between PYY postprandial change and waist circumference (Pearson: $r = -0.462$; $P = 0.04$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ normal-weight vs obese; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs previous time point.

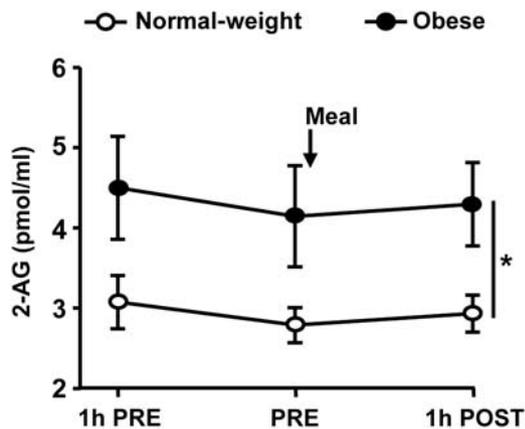


Figure 3 Plasma 2-AG 1 h before (1 h PRE), immediately before (PRE) and 1 h after the termination of the meal (1 h POST). * $P < 0.05$ vs normal-weight group.

as an anticipatory response to the meal. In addition, it is currently unknown where the observed plasma AEA changes originate from. An obvious candidate would be the gastrointestinal tract, where tissular AEA levels are increased and decreased by fasting and refeeding, respectively, in rodents.¹⁸

Differently from AEA, 2-AG plasma levels did not change in response to the meal, thus, suggesting a different physiological role for this endocannabinoid in humans. This result, on the other hand, further strengthens the possibility that circulating AEA might be of physiological relevance in

the regulation of human eating behavior, implying that it is likely more than a mere tissue spill out by-product.

In obesity, AEA levels are postprandially deregulated, a phenomenon observed concomitantly to the postprandial deregulation of the anorexigenic hormone PYY (see also ref. 12). This implies that the simultaneous deregulation of these orexigenic and anorexigenic signals might favor food intake, and it is in agreement with previous studies showing that obese subjects have delayed onset of satiety after consuming a meal *ad libitum*, likely because of inappropriate hormonal responses to food intake.^{12,19} Importantly, both obese and normal-weight subjects display lower levels of circulating AEA 1 h before meal as compared with immediately before the meal. This suggests that obese subjects do not fully lose meal-related regulation of plasma AEA, on the other hand, they seem to be characterized by a delayed postprandial AEA decrease. Future studies will have to further detail the time course of the AEA levels in normal-weight and obese subjects, in order to define the exact way by which endocannabinoid signaling relates to meal patterning in humans. Interestingly, and again in support for a potential role of the gastrointestinal tract as main source of the AEA measured in plasma, it has been recently shown that obese Zucker rats (a model of genetic obesity characterized by important hyperphagia) have elevated AEA levels in the duodenum even after 30 min refeeding, a condition known to decrease AEA content in this tissue.²⁰

In addition, the obese subjects included in the current study were insulin resistant. Insulin resistance characterizes

obese subjects with blunted postprandial PYY response.²¹ Such condition has also been proposed as one of the main events associated with the increased endocannabinoid tone observed in obesity.²² In fact, insulin infusion decreases AEA levels in humans, but it is unable to do so once insulin resistance has developed.²² Thus, the presence of insulin resistance might be a further reason for the lack of a significant postprandial decrease in AEA levels herein found in obese subjects.

Lastly, the fact that the postprandial AEA and PYY changes explain a part of the waist variance in the studied subjects strongly indicates that the concurrent deregulation of orexigenic and anorexigenic systems contributes in an independent and additive way to the establishment of a vicious cycle that favors excessive caloric intake and body weight gain. Accordingly, it has been recently reported that the co-administration of a cannabinoid type 1 receptor antagonist with PYY has additive effects on food intake regulation in mice.²³ Hence, obesity therapies need to concomitantly target both aspects of the equation that assures the control of caloric intake and not one or the other as it has been until now. Combinatorial pharmacological strategies should be favored in order to not only increase efficacy but also to decrease adverse effects limiting compliance to the treatment and its safety, as this type of strategies often allow reaching effectiveness with lower drugs doses.

Despite the withdrawal of the first generation of cannabinoid type 1 antagonists from the pharmaceutical market due to the occurrence of psychiatric adverse events, recent evidence suggests that peripherally restricted cannabinoid type 1 antagonists might be efficacious for the treatment of obesity and its associated metabolic disorders.^{24–27} Our data and in particular the finding that peripheral AEA levels might have a role in meal initiation, indicate that the use of combinatorial multi-target pharmacological approaches, including low doses of peripherally acting cannabinoid type 1 antagonists together with drugs altering other pathways impacting on food intake and energy balance, might represent a valid strategy to tackle obesity limiting undesired side effects.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank S Vitiello, F Bermudez-Silva, JB Corcuff, A Georges and the nurses of the Endocrinology Department at the Haut-Lévêque Hospital for their help in the study; we also thank the subjects who participated in the study. This study was supported by the INSERM/AVENIR (DC, GM), INSERM/

interface (DC), Aquitaine Region (DC), French Society of Endocrinology (BGC), EU-FP7 HEALTH-F2-2008-223713 and EU-FP7 ENDOFOOD ERC-2010-StG (GM).

References

- Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science* 2003; **299**: 853–855.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; **443**: 289–295.
- Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; **128**: 175–191.
- Robinson JR, Niswender KD. What are the risks and the benefits of current and emerging weight-loss medications? *Curr Diab Rep* 2009; **9**: 368–375.
- Halford JC, Boyland EJ, Blundell JE, Kirkham TC, Harrold JA. Pharmacological management of appetite expression in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2010; **6**: 255–269.
- Cota D. CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; **23**: 507–517.
- Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 585–589.
- Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S *et al*. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; **54**: 2838–2843.
- Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP *et al*. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007; **31**: 692–699.
- Jumpertz R, Guijarro A, Pratley RE, Piomelli D, Krakoff J. Central and peripheral endocannabinoids and cognate acylethanolamides in humans: association with race, adiposity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: 115–121.
- Karra E, Chandarana K, Batterham RL. The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *J Physiol* 2009; **587**: 19–25.
- le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, Patterson M, Borg CM, Wynne KJ *et al*. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology* 2006; **147**: 3–8.
- Lee HK, Choi EB, Pak CS. The current status and future perspectives of studies of cannabinoid receptor 1 antagonists as anti-obesity agents. *Curr Top Med Chem* 2009; **9**: 482–503.
- Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellesmann C *et al*. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1781**: 200–212.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C *et al*. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 3171–3180.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; **50**: 1714–1719.
- Minowa S, Ishihara S, Tsuchiya S, Horie S, Murayama T. Capsaicin- and anandamide-induced gastric acid secretion via vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in rat brain. *Brain Res* 2005; **1039**: 75–83.
- Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I *et al*. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci* 2002; **22**: 9612–9617.
- Delgado-Aros S, Cremonini F, Castillo JE, Chial HJ, Burton DD, Ferber I *et al*. Independent influences of body mass and gastric volumes on satiation in humans. *Gastroenterology* 2004; **126**: 432–440.

- 20 Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Aviello G, Romano B, Borrelli F *et al*. Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol* 2009; **158**: 451–461.
- 21 Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS *et al*. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 2003; **349**: 941–948.
- 22 Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A, Petrosino S, Mertens I, Lundbom N *et al*. Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol* 2009; **161**: 715–722.
- 23 White NE, Dhillon WS, Liu YL, Small CJ, Kennett GA, Gardiner JV *et al*. Co-administration of SR141716 with peptide YY3-36 or oxyntomodulin has additive effects on food intake in mice. *Diabetes Obes Metab* 2008; **10**: 167–170.
- 24 Tam J, Vemuri VK, Liu J, Batkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G *et al*. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 2010; **120**: 2953–2966.
- 25 Son MH, Kim HD, Chae YN, Kim MK, Shin CY, Ahn GJ *et al*. Peripherally acting CB1-receptor antagonist: the relative importance of central and peripheral CB1 receptors in adiposity control. *Int J Obes (Lond)* 2010; **34**: 547–556.
- 26 Pavon FJ, Serrano A, Perez-Valero V, Jagerovic N, Hernandez-Folgado L, Bermudez-Silva FJ *et al*. Central versus peripheral antagonism of cannabinoid CB1 receptor in obesity: effects of LH-21, a peripherally acting neutral cannabinoid receptor antagonist, in Zucker rats. *J Neuroendocrinol* 2008; **20** (Suppl 1): 116–123.
- 27 Haas MJ. Peripheral CNR1 antagonists to the fore. *Science-Business eXchange* 2010; **3**; <http://www.nature.com/scibx/journal/v3/n32/full/scibx.2010.972.html>.

Supplementary Information accompanies the paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

**ENDOCANNABINOIDS MEASUREMENT IN HUMAN SALIVA AS
POTENTIAL BIOMARKER OF OBESITY**

Journal:	<i>Diabetologia</i>
Manuscript ID:	Diab-12-0395
Manuscript Type:	Article
Keywords:	1.02 Clinical science, 2.10 Human, 3.04.13 Weight regulation and obesity

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

1 **ENDOCANNABINOIDS MEASUREMENT IN HUMAN SALIVA AS POTENTIAL**
2 **BIOMARKER OF OBESITY**

3 I. Matias^{2,4*}, B. Gatta-Cherifi^{1,4,5*}, A. Tabarin^{1,4,5}, S. Clark^{1,4}, T. Leste-Lasserre^{3,4},
4 G. Marsicano^{2,4}, P. V. Piazza^{3,4}, D. Cota^{1,4#}

5 Groups¹“Energy Balance and Obesity”,²“Endocannabinoids and Neuroadaptation”,
6³“Physiopathology of Addiction”, INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie
7 de la Plasticité Neuronale, U862, F-33000 Bordeaux, France; ⁴University of
8 Bordeaux, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale,
9 U862, F-33000 Bordeaux, France; ⁵Endocrinology Department, Haut-Lévêque
10 Hospital, F-33604 Pessac, France.

11

12 ***These authors contributed equally to the work**

13 **#Correspondence and offprint requests to:** Daniela Cota, MD, Group “Energy
14 Balance and Obesity”, INSERM U862, Neurocentre Magendie, 146 Rue Léo
15 Saignat, 33077 Bordeaux, France; phone number: ++33-5-5757-3705; fax number:
16 ++33-5-5757-3669; e-mail: daniela.cota@inserm.fr

17 **Word count:** Abstract: 250; Main text: 3116

18

19 **Abstract**

20 **Aims:** To explore endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines in saliva and
21 verify changes in relation to body weight status and in response to a meal or to body
22 weight loss.

23 **Methods:** We measured fasting plasma and salivary endocannabinoids and *N*-
24 acylethanolamines through liquid mass spectrometry in 12 normal weight and 12
25 obese, insulin-resistant subjects. Salivary endocannabinoids and *N*-
26 acylethanolamines were also evaluated in the same cohorts before and after the
27 consumption of a meal. Changes in salivary endocannabinoids and *N*-
28 acylethanolamines after body weight loss were investigated in a second group of 12
29 obese subjects following a 12-weeks lifestyle intervention program. The levels of
30 mRNAs coding for enzymes regulating the metabolism of endocannabinoids and of
31 cannabinoid type 1 (CB₁) receptor, together with endocannabinoids and *N*-
32 acylethanolamines content, were assessed in human salivary glands.

33 **Results:** The endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol (2-AG), *N*-
34 arachidonylethanolamide (anandamide, AEA), and the *N*-acylethanolamines
35 (oleoylethanolamide, OEA and palmitoylethanolamide, PEA) were quantifiable in
36 saliva and their levels were significantly higher in obese than in normal weight
37 subjects. Fasting salivary AEA and OEA directly correlated with BMI, waist
38 circumference and fasting insulin. Salivary endocannabinoids and *N*-
39 acylethanolamines did not change in response to a meal. CB₁ receptors, ligands
40 and enzymes were expressed in the salivary glands. Finally, a body weight loss of
41 5.3% obtained after a 12-weeks lifestyle program significantly decreased salivary
42 AEA levels.

43 **Conclusions:** Endocannabinoids and *N*-acylethanolamines are quantifiable in saliva
44 and their levels correlate with obesity but not with feeding status. Body weight loss
45 significantly decreases salivary AEA, which might represent a useful biomarker in
46 obesity.

47 **Keywords:** endocannabinoid, saliva, meal, obesity, body weight loss

48 **Abbreviations:** 2-AG: 2-arachidonoylglycerol; AEA: anandamide; ASAT: aspartate
49 aminotransferase; ALAT: alanine aminotransferase; CB₁: cannabinoid receptor type
50 1; CB₂: cannabinoid receptor type 2; DAGL alpha: diacylglycerol lipase alpha; DAGL
51 beta: diacylglycerol lipase beta; DBP: diastolic blood pressure; ECS:
52 endocannabinoid system; FAAH: fatty acid amide hydrolase; gamma-GT: gamma-
53 glutamyl transferase; glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH);
54 hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT); MAGL: monoacylglycerol lipase;
55 OEA: oleoylethanolamide; PEA: palmitoylethanolamide; PYY: peptide-YY; SBP:
56 systolic blood pressure.

57

58 Introduction

59 The discovery of the endocannabinoid system (ECS) and of its impact on the
60 regulation of energy homeostasis represents a significant advance in the study of
61 obesity and type 2 diabetes [1-4].

62 The ECS comprises two distinct membrane cannabinoid receptors, CB₁ and CB₂,
63 specific ligands named endocannabinoids, such as anandamide (AEA) and 2-
64 arachidonoylglycerol (2-AG), and enzymes for ligand biosynthesis and inactivation
65 [5]. Endocannabinoids have known appetite-stimulating effects in animals by acting
66 at cannabinoid CB₁ receptors [1, 2]. Furthermore, there is evidence for an up-
67 regulation of endocannabinoids and endocannabinoid-related N-acylethanolamines
68 oleoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) in both blood and
69 adipose tissue of obese humans [6-9]. Recently, we have shown that changes in
70 plasma AEA levels might have physiological relevance in the anticipatory or
71 preparatory phase of the meal in humans, since both normal weight and obese
72 subjects have a pre-prandial peak in plasma AEA levels [10]. However, obese
73 subjects show blunted post-prandial plasma AEA and peptide-YY (PYY) changes,
74 suggesting that the concomitant deregulation of both orexigenic and anorexigenic
75 systems contributes to the establishment of the obese phenotype [10].

76 The saliva is the first digestive secretion produced in response to the ingestion of
77 food [11]. Therefore, it is reasonable to investigate whether signals and systems
78 involved in the regulation of food intake, such as the ECS, might be present in saliva
79 and exert a functional role. Besides, saliva offers distinctive advantages over serum
80 or plasma as a diagnostic tool, thanks to the non-invasiveness of the collection
81 procedure.

82 The saliva is produced and secreted by the three pairs of major salivary glands
83 (parotid, submandibular, sublingual) and minor salivary glands after the stimulation
84 of both sympathetic and parasympathetic nervous system to protect the mouth and
85 to participate to the digestion [11, 12]. It is composed mostly of water, but it also
86 contains important compounds such as electrolytes, mucus, various enzymes for
87 food tasting and digestion, bacteria for mucosa protection and serum derivatives,
88 including hormones [11, 12]. The saliva therefore derives from both local and
89 systemic sources and is often collected for the diagnosis of systemic pathologies [11,
90 12].

91 Interestingly, gastrointestinal hormones known to play key roles in food intake and
92 energy balance, like PYY and ghrelin, have been identified in human saliva [13, 14].
93 Analysis of salivary ghrelin levels in obese subjects undergoing body weight loss
94 through bariatric surgery has demonstrated that there is an autonomous production
95 of ghrelin in salivary glands, which is irrespective of nutritional status and weight loss
96 [15]. While, salivary PYY is synthesized in the taste cells of the mouse tongue and
97 its Y2R receptor is expressed in von Ebner's lingual salivary glands [13].
98 Interestingly, gene-transfer mediated increase in mouse salivary PYY production
99 significantly decreases food intake [13].

100 At present, there is no information concerning the presence and potential role of the
101 ECS in human saliva and salivary glands. This is possibly due to the lack of a
102 sensitive analytical method that has not allowed the reliable quantification of
103 endocannabinoids and related compounds in human saliva [16, 17]. Nonetheless,
104 endocannabinoids have been detected in the salivary glands of the lone star tick [18]
105 and the rat [19] and CB₁ receptors have been localized in the major salivary glands

106 of both rats [20] and dogs [21]. In addition, there is some evidence suggesting that
107 the ECS might inhibit salivary secretion [20, 22]. In this respect, one of the major
108 side effects of marijuana intoxication in humans is a decrease of saliva production
109 (dry mouth) [23].

110 In the present study we therefore sought to determine whether quantification of
111 endocannabinoids and *N*-acylethanolamines in saliva is feasible and reliable, and
112 whether salivary endocannabinoids and *N*-acylethanolamines levels might differ
113 between normal weight and obese subjects and might change in relation to the
114 consumption of a meal or to body weight loss.

115
116

117 **Methods**118 *Subjects*

119 The study was approved by the Haut-Lévêque Hospital Research Ethics Committee
120 and all participants provided written informed consent.

121 The characteristics of the 24 subjects (12 normal weight and 12 non diabetic, insulin-
122 resistant obese) participating to the meal study were as previously described [10].

123 The meal was designed by a hospital nutritionist to guarantee that, independently
124 from the food items consumed, it contained an equal amount of macronutrients (35%
125 lipids, 45% carbohydrates and 20% proteins) and calories. The meal consisted of a
126 starter (a small portion of salad or vegetables), a main dish (roasted pork, lamb,
127 chicken, salmon or tuna) accompanied by pasta or rice and vegetables, white bread
128 and a cheese and fruit portion. Subjects randomly consumed meals containing
129 different food items, so to avoid any potential effect on endocannabinoids precursors'
130 pools [24].

131 The lifestyle intervention program of the Haut-Lévêque Hospital, which is based on
132 [25, 26], consists of 12 weekly sessions of group meetings with a dietician, a
133 physical activity teacher, a psychologist and a medical doctor. The characteristics of
134 the 12 obese subjects enrolled in the hospital lifestyle intervention program and
135 whose salivary samples were used for the study are reported in Table 1. These 12
136 subjects included 4 patients with type 2 diabetes and 1 patient with fasting
137 hyperglycemia. Eight of these patients were suffering from hypertension, while 5
138 had apnea syndrome. Anthropometric measurements (weight, height, waist
139 circumference) and blood pressure as well as blood samples for the analysis of
140 biochemical parameters (blood glucose, lipid profile, liver enzymes) were collected at

141 the beginning and at the end of the 12 weeks of the lifestyle intervention. Fasting
142 salivary samples were also collected at the beginning and at the end of the 12
143 weeks. The subjects included in the study achieved a mean body weight loss of
144 5.33 ± 0.97 % at the end of the program.

145 Submandibular gland fragments and accessory salivary glands were obtained from 2
146 patients who respectively underwent maxillofacial surgery for suspicion of tumour
147 and accessory salivary gland biopsy for suspicion of amyloidosis. No tissue
148 collection was superimposed and leftover tissues were used. Only macroscopically
149 intact tissues were used for subsequent PCR, endocannabinoids and *N*-
150 acylethanolamines content analyses.

151 *Blood and saliva sampling*

152 For the meal study, subjects underwent blood and saliva sampling after an overnight
153 fast, soon after the arrival at the hospital (09:00 h). Saliva samples were then also
154 collected 1 h before the meal (11:00 h), immediately before the meal (12:00 h) and 1
155 h after the termination of the meal. For the lifestyle intervention study, salivary
156 samples were collected before and after body weight loss and always after an
157 overnight fast. Subjects were asked to wash their mouth with water and to not drink
158 or eat anything at least half hour before spitting into a falcon 15-ml tube. In all the
159 studies, subjects were forbidden to tooth brush on the day of the salivary sample
160 collection, so to avoid blood contamination of the samples. The salivary samples
161 were immediately placed at 4 °C without centrifugation and then kept at -80 °C until
162 analysis. Blood samples were collected in heparin tubes, immediately centrifuged at
163 4 °C at 1500 g for 20 min and then kept at -80 °C until analysis.

164 *Plasma lipids, glucose and liver enzymes measurements*

165 Lipids, glucose and liver enzymes were determined by enzymatic and fluorometric
166 methods, as described in [10].

167 *Endocannabinoids and N-acylethanolamines measurement in plasma, saliva and*
168 *salivary glands*

169 Endocannabinoids and N-acylethanolamines were extracted, purified and quantified
170 following a set of different biochemical steps [27]. Briefly, human plasma, saliva or
171 submandibular salivary glands were homogenized and extracted with
172 chloroform/methanol (2:1, v/v) containing internal deuterated standards (Cayman
173 Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) and then pre-purified by open bed chromatography
174 if necessary. Tandem mass spectral analyses were performed on a TSQ Quantum
175 Access triple quadrupole instrument (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA)
176 equipped with an atmospheric pressure chemical ionization source and operating in
177 positive ion mode. A new sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass
178 spectrometric analysis (LC-MS/MS) method was developed and validated [10].
179 Endocannabinoids and N-acylethanolamines were then quantified by isotopic dilution
180 using a seven-point calibration curve.

181 *RNA extraction and PCR procedure*

182 RNA was extracted with Tri Reagent following the manufacturer's instructions
183 (Fermentas, Villebon sur Yvette, France). After extraction and ethanol precipitation,
184 RNA was treated with Turbo DNA-free (Ambion, Austin, TX, USA). The integrity of
185 the RNA was checked by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Nano Lab-
186 on-a-Chip kit and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

187 cDNA was synthesized from 2 µg total RNA, with RevertAid™ Premium Reverse
188 Transcriptase (Fermentas), using random hexamer primers and Oligo(dT)18 primer
189 (Fermentas). The RT-PCR amplification of primers was carried out with a
190 denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C
191 for 30s, primer annealing at 60°C (or 55°C depending on primer condition) for 30s,
192 and primer extension at 72°C for 1 min. Upon completion of the cycling steps, a final
193 extension was done at 72°C for 5 min. RT-PCR was carried out using a PTC-200
194 Biorad Thermal Cycler. The primer (Eurogentec, Seraing, Belgium) sequences were
195 the following: CB₁, Forward (F): 5' GAT GTC TTT GGG AAG ATG AAC AAG C 3',
196 Reverse (R): 5' AGA CGT GTC TGT GGA CAC AGA CAT GG 3'; fatty acid amide
197 hydrolase (FAAH), F: 5' GTG GTG CT(G/A) ACC CCC ATG CTG G 3', R: 5' TCC
198 ACC TCC CGC ATG AAC CGC AGA CA 3'; monoacylglycerol lipase (MAGL), F: 5'
199 TCT TCC TTC TGG GCC ACT CCA 3', R: 5' GGA TTG GCA AGA ACC AGA GG
200 3'; diacylglycerol lipase alpha (DAGL alpha) F: 5' GCC ATC TTC CTC TTT CTC
201 CTG 3', R: 5' GAG CAC GTA CTG CAT GGA GTC 3'; diacylglycerol lipase beta
202 (DAGL beta) F: 5' AAG CTG CCA GAT ACG TTT ACC 3', R: 5' GGA GAA GGC
203 GTA GCA CCT GAC 3'; glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), F: 5'
204 CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG GT 3', R: 5' GAG GGG CCA TCC ACA
205 GTC TTC TG 3'; hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), F: 5' CTT GCT
206 CGA GAT GT(C/G) ATG AAG 3', R: 5' TGC ATT GTT TT(A/G) CCA GTG 3'.
207 Housekeeping genes GAPDH and HPRT were used as internal controls. PCR
208 products were analyzed by electrophoresis on a 1.8 % agarose gel.

209 *Statistical analysis*

210 Statistical analysis was performed using Statistica version 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK,
211 USA). All values are reported as means \pm SEM. For the meal study, data were
212 analyzed by 1-way and 2-way repeated measurements ANOVA or by two-tailed
213 Student's *t*-tests when appropriate. For the lifestyle intervention study, data were
214 analyzed with paired *t*-test or wilcoxon test if data were not normally distributed.
215 Significant ANOVAs were followed by Tukey post-hoc test. For correlation analysis,
216 Pearson's or Spearman's were used when appropriate. *p* values less than 0.05
217 denote statistical significance.

218

219

For Peer Review

220 **Results**

221 *Endocannabinoids and N-acylethanolamines can be detected in saliva*

222 Salivary endocannabinoids and *N*-acylethanolamines were reliably detectable and
223 quantifiable in human saliva (Figure 1). Fasting saliva endocannabinoids (AEA and
224 2-AG) and *N*-acylethanolamines (PEA and OEA) levels were significantly higher in
225 obese, insulin-resistant subjects as compared to normal weight controls (Figure 1).
226 Conversely, in the same subjects, only fasting AEA and OEA plasma levels were
227 higher in obese than in controls (Figure 1). Interestingly, compared to normal weight
228 subjects, the increase was significantly higher in obese salivary than plasma
229 samples for all the compounds analyzed but OEA (Figure 1).

230 There were no significant correlations between fasting salivary 2-AG and *N*-
231 acylethanolamines and their respective plasma levels. However, a trend towards a
232 significant correlation was found between salivary and plasma AEA levels ($r=0.39$,
233 $p=0.068$).

234 Similarly to what has been previously reported for plasma measurements [7, 9, 10],
235 fasting salivary AEA and OEA levels were significantly correlated with BMI, waist
236 circumference, and fasting insulin (Figure 2). Fasting salivary 2-AG levels positively
237 correlated with waist circumference ($r=0.50$, $p=0.002$) and insulin ($r=0.48$, $p=0.027$),
238 while fasting salivary PEA did not correlate with any of these variables (data not
239 shown).

240

241 *The ECS is present in human salivary glands*

242 Gene expression analysis of samples from human submandibular and salivary
243 accessory glands revealed that MAGL, DAGL alpha and beta, FAAH and CB₁
244 mRNAs were all expressed in saliva-producing organs (Figure 3a). However, while
245 MAGL, DAGL alpha and beta mRNAs were highly expressed, particularly in the
246 accessory glands, mRNA levels of expression of CB₁ and FAAH were relatively low.
247 AEA, 2-AG, PEA and OEA were also detectable in the gland tissues (Figure 3b).

248

249 *Salivary endocannabinoids and N-acylethanolamines meal-related responses*

250 Normal weight and obese subjects had similar energy intake (normal weight:
251 2851.21 ± 37.68 kJ vs obese: 2876 ± 87.92 kJ, $p=0.8$). Whatever the time point
252 analyzed, salivary AEA, PEA and OEA levels were significantly higher in obese than
253 in normal weight subject (Figure 4). However, salivary endocannabinoids and *N*-
254 acylethanolamines levels did not change in response to the meal, neither in normal
255 weight nor in obese (Figure 4).

256

257 *Salivary endocannabinoids and N-acylethanolamines weight loss-related responses*

258 The characteristics of the 12 obese subjects before and after the 12-weeks lifestyle
259 intervention program are shown in Table 1. The compliance to the program led to
260 significantly reduced body weight, BMI, waist circumference as well as systolic blood
261 pressure (Table 1). It also significantly ameliorated fasting blood glucose,
262 triglycerides, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and gamma-
263 glutamyl transferase (Table 1). Notably, at the end of the 12-weeks program the

264 subjects had a significant reduction of fasting salivary AEA levels ($p < 0.05$, Figure
265 5a), while salivary 2-AG, OEA and PEA did not change (Figure 5, b-d).

266

For Peer Review

267 **Discussion**

268 Saliva collection is often used as a rapid, non-invasive diagnostic tool for the
269 analysis of biomarkers in the clinical practice, and salivary samples can provide a
270 cost-effective approach for the screening of large populations [11, 12].

271 Here we demonstrate that endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines can
272 be reliably detected and quantified in human saliva. Similarly to what already
273 reported for circulating levels in the blood [7, 9, 10], the salivary concentration of
274 AEA and OEA were significantly increased in obese, insulin-resistant subjects as
275 compared to normal weight controls. Fasting salivary, but not plasma levels of 2-AG
276 and PEA were also higher in obese patients than controls. Interestingly, obese
277 subjects had actually higher levels of endocannabinoids and related *N*-
278 acylethanolamines in saliva than plasma. In addition, fasting salivary AEA and OEA
279 levels directly correlated with BMI, waist circumference and fasting insulinemia, while
280 a strong tendency towards a direct correlation between fasting salivary and plasma
281 AEA levels was found.

282 Differently from our previous observations concerning the relationship between
283 plasma AEA and food intake in humans [10], we were unable to observe any
284 significant change in salivary AEA, 2-AG or *N*-acylethanolamines in response to the
285 consumption of a meal, suggesting that this pool of endocannabinoids and related
286 compounds is not affected by the feeding status of the subject. However, the
287 relatively constant levels of salivary endocannabinoids observed during the meal
288 study suggest that saliva might represent a good source of biological material for
289 diagnostic purposes involving assessment of the ECS. Indeed, besides the easier
290 access to saliva than plasma, the use of salivary samples would not require a tight

291 control of the feeding status of the patients, which might represent an important
292 source of variability in plasma measurements [10]. These findings also imply that
293 plasma and salivary endocannabinoids might originate from separate compartments
294 and serve different roles. In support of an autonomous production of
295 endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines in saliva, we have also found
296 that the ECS, with its ligands, receptors and enzymes, localizes within the human
297 salivary glands. However, further studies will have to detail the exact localization of
298 the different components of the system within these tissues.

299 Interestingly, it has been recently shown that the administration of AEA or 2-AG in
300 mice increases gustatory nerve responses to sweeteners in a CB₁-dependent
301 manner without affecting responses to salty, sour, bitter, and umami compounds
302 [28]. In the same study, CB₁ receptors were localized on taste bud cells expressing
303 sweet taste receptors [28]. Thus, taking this evidence into account, it is possible that
304 salivary endocannabinoids might work as sweet taste enhancers in humans as well.
305 Furthermore, the ECS is known to affect salivary secretion [20, 22, 29]. Interestingly,
306 it has been shown that salivary secretion differs between normal weight and obese
307 subjects [30-33]. The ECS might therefore have a role in determining such
308 differences.

309 Importantly, a mean body weight loss of 5% obtained at the end of a 12 weeks
310 lifestyle intervention program, significantly decreased salivary AEA levels, without
311 affecting any of the other compounds measured. These are the first findings
312 associating a decrease in salivary AEA with body weight loss, while the data
313 provided so far on the response of plasma endocannabinoids to body weight loss
314 have been inconsistent. For instance, Engeli and colleagues showed that in obese

315 women fasting circulating endocannabinoid levels were not affected by a 5% weight
316 loss obtained after 13-15 weeks of dietary weight reduction protocol [34]. The study
317 was however carried out only once the subjects had maintained their weight stable
318 for 3 months [34]. In contrast, in viscerally obese men, 1 year lifestyle intervention
319 led to 7% weight loss and to a significant decrease in plasma AEA and 2-AG levels
320 [35]. Probably such inconsistency across the studies published so far depends on
321 several factors, including the rate of body weight loss, the point in time when the
322 endocannabinoids measurement was carried out respect to when the body weight
323 loss goal was reached and the gender of the studied subjects.

324 Altogether, the present findings indicate that salivary AEA might be a useful
325 biomarker in human obesity, in particular considering that salivary samples are easy
326 to collect, require a non-invasive procedure advantageous when performing studies
327 in obese subjects in whom venipuncture may be difficult, and can be repeatedly
328 collected at home by the patient during a therapeutic intervention. This type of tool
329 could therefore be used to assess responses to treatment, or to further study the
330 physiology of the ECS in humans, by investigating salivary endocannabinoid
331 responses under various conditions.

332

333

334

335

336

337 **Acknowledgements**

338 We thank the Gene Profiling Platform of the NeuroCentre Magendie, M. Vallée, S.
339 Vitiello, C. Majoufre-Lefebvre and the nurses of the Endocrinology Department at the
340 Haut-Lévêque Hospital for help with the study; we thank the subjects that have
341 participated to the study. This work was supported by INSERM/AVENIR (D.C.,
342 G.M.), INSERM/ interface (D.C.), Aquitaine Region (D.C., G.M.), French Society of
343 Endocrinology (B.G.C.), Fondation Recherche Médicale, EU-FP7 HEALTH-F2-2008-
344 223713 and EU-FP7 ENDOFOOD ERC-2010-StG (G.M.).

345 **Duality of interest:** The authors declare that there is no duality of interest
346 associated with this manuscript.

347 **Contribution statement:** I.M. formulated the initial hypothesis, I.M., B.G.C., S.C.
348 and T.L.L. generated and analysed data and contributed to drafting and editing the
349 manuscript. A.T., G.M., and P.V.P. contributed to interpretation of the data, and to
350 the editing and revising of the manuscript. D.C. designed the study, analyzed and
351 interpreted the data, drafted and finalised the manuscript. All the authors gave final
352 approval to the submission of the manuscript.

353

354 **References**

- 355 1. Bermudez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D (2012) The role of the
356 endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. J
357 Psychopharmacol 26:114-124
- 358 2. Quarta C, Mazza R, Obici S, Pasquali R, Pagotto U (2011) Energy balance
359 regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. Trends Mol Med 17:
360 518-526

- 361 3. Kunos G, Tam J (2011) The case for peripheral CB receptor blockade in the
362 treatment of visceral obesity and its cardiometabolic complications. *Br J Pharmacol*
363 163: 1423-1431
- 364 4. Di Marzo V, Piscitelli F, Mechoulam R (2011) Cannabinoids and
365 endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb Exp*
366 *Pharmacol*: 75-104
- 367 5. Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and
368 energy balance. *Nat Neurosci* 8: 585-589
- 369 6. Matias I, Bisogno T, Di Marzo V (2006) Endogenous cannabinoids in the brain
370 and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes*
371 (Lond) 30 Suppl 1: S7-S12
- 372 7. Matias I, Gonthier MP, Petrosino S, et al. (2007) Role and regulation of
373 acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br J*
374 *Pharmacol* 152: 676-690
- 375 8. Cote M, Matias I, Lemieux I, et al. (2007) Circulating endocannabinoid levels,
376 abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J*
377 *Obes (Lond)* 31: 692-699
- 378 9. Sipe JC, Scott TM, Murray S, et al. (2010) Biomarkers of endocannabinoid
379 system activation in severe obesity. *PLoS One* 5: e8792
- 380 10. Gatta-Cherifi B, Matias I, Vallee M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV, Cota
381 D. (2011) Sinergistic post-prandial deregulation of orexigenic and anorexigenic
382 systems in obesity. *Int J Obes (Lond)* doi: 10.1038/ijo.2011.165
- 383 11. Spielmann N, Wong DT (2011) Saliva: diagnostics and therapeutic
384 perspectives. *Oral Dis* 17: 345-354

- 385 12. Lawrence HP (2002) Salivary markers of systemic disease: noninvasive
386 diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 68: 170-
387 174
- 388 13. Acosta A, Hurtado MD, Gorbatyuk O, et al. (2011) Salivary PYY: a putative
389 bypass to satiety. *PLoS One* 6: e26137
- 390 14. Li BB, Chen ZB, Li BC, et al. (2011) Expression of ghrelin in human salivary
391 glands and its levels in saliva and serum in Chinese obese children and adolescents.
392 *Arch Oral Biol* 56: 389-394
- 393 15. Benedix F, Westphal S, Patschke R, et al. (2011) Weight loss and changes in
394 salivary ghrelin and adiponectin: comparison between sleeve gastrectomy and Roux-
395 en-Y gastric bypass and gastric banding. *Obes Surg* 21: 616-624
- 396 16. Marczylo TH, Lam PM, Nallendran V, Taylor AH, Konje JC (2009) A solid-
397 phase method for the extraction and measurement of anandamide from multiple
398 human biomatrices. *Anal Biochem* 384: 106-113
- 399 17. Lam PM, Marczylo TH, Konje JC (2010) Simultaneous measurement of three
400 N-acylethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid
401 chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 398: 2089-2097
- 402 18. Fezza F, Dillwith JW, Bisogno T, Tucker JS, Di Marzo V, Sauer JR (2003)
403 Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary
404 glands of the lone star tick. *Biochim Biophys Acta* 1633: 61-67
- 405 19. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, Medina V, Rettori V, Elverdin JC (2009)
406 Role of the endocannabinoid system in ethanol-induced inhibition of salivary
407 secretion. *Alcohol Alcohol* 44: 443-448

- 408 20. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, de la Cal C, et al. (2006) Inhibition of
409 salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med* (Maywood)
410 231: 1421-1429
- 411 21. Dall'Aglio C, Mercati F, Pascucci L, Boiti C, Pedini V, Ceccarelli P (2010)
412 Immunohistochemical localization of CB1 receptor in canine salivary glands. *Vet Res*
413 *Commun* 34 Suppl 1: S9-12
- 414 22. Ware MA, Doyle CR, Woods R, Lynch ME, Clark AJ (2003) Cannabis use for
415 chronic non-cancer pain: results of a prospective survey. *Pain* 102: 211-216
- 416 23. Robson P (2001) Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *Br J*
417 *Psychiatry* 178: 107-115
- 418 24. Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, et al. (2008) Influence of dietary fatty
419 acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small
420 intestine. *Biochim Biophys Acta* 1781: 200-212
- 421 25. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. (2001) Prevention of type 2
422 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose
423 tolerance. *N Engl J Med* 344: 1343-1350
- 424 26. Unick JL, Beavers D, Jakicic JM, et al. (2011) Effectiveness of lifestyle
425 interventions for individuals with severe obesity and type 2 diabetes: results from the
426 Look AHEAD trial. *Diabetes Care* 34: 2152-2157
- 427 27. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, et al. (2006) Regulation, function, and
428 dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells
429 and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3171-3180
- 430 28. Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, et al. (2010) Endocannabinoids selectively
431 enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 935-939

- 432 29. Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Ossola CA, Rettori V, Elverdin JC (2010)
433 Participation of the endocannabinoid system in lipopolysaccharide-induced inhibition
434 of salivary secretion. *Arch Oral Biol* 55: 583-590
- 435 30. Modeer T, Blomberg CC, Wondimu B, Julihn A, Marcus C (2010) Association
436 between obesity, flow rate of whole saliva, and dental caries in adolescents. *Obesity*
437 (Silver Spring) 18: 2367-2373
- 438 31. Powers PS, Holland P, Miller C, Powers HP (1982) Salivation patterns of
439 obese and normal subjects. *Int J Obes* 6: 267-270
- 440 32. Wooley OW, Wooley SC, Dunham RB (1976) Deprivation, expectation and
441 threat: effects on salivation in the obese and nonobese. *Physiol Behav* 17: 187-193
- 442 33. Epstein LH, Paluch R, Coleman KJ (1996) Differences in salivation to
443 repeated food cues in obese and nonobese women. *Psychosom Med* 58: 160-164
- 444 34. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, et al. (2005) Activation of the peripheral
445 endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 54: 2838-2843
- 446 35. Di Marzo V, Cote M, Matias I, et al. (2009) Changes in plasma
447 endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle
448 modification programme and waist circumference reduction: associations with
449 changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 52: 213-217
- 450
- 451

452 **Table 1.** Characteristics of the subjects of the lifestyle intervention study.

	Obese before lifestyle intervention	Obese after lifestyle intervention
Sex (M/F)	4/8	4/8
Age (years)	45.0 ± 2.5	45.0 ± 2.5
Weight (Kg)	121.74 ± 8.93	115.0 ± 7.98 **
BMI (Kg/m ²)	44.3 ± 3.1	41.8 ± 2.8 **
Waist circumference (cm)	123.5 ± 5.3	118.7 ± 5.2 **
SBP (<140 mmHg)	127.3 ± 7.5	118.3 ± 3.9 *
DBP (<90 mmHg)	74.7 ± 3.9	71.1 ± 2.5
Glucose (4.0-5.6 mmol/l)	5.97 ± 0.21	5.6 ± 0.20 *
HDL cholesterol (1.0-1.80 mmol/l)	1.17 ± 0.07	1.08 ± 0.32
Triglycerides (0.3-1.7 mmol/l)	1.45 ± 0.44	0.95 ± 0.08 *
ASAT (10-35 U/l)	20.25 ± 1.67	16.25 ± 1.19 *
ALAT (5-40U/l)	31.08 ± 4.31	25.33 ± 3.56 **
Gamma-GT (5-38 UI/l)	33.42 ± 6.58	25.55 ± 4.33 *

453 Values in parenthesis indicate normal range. SBP: systolic blood pressure; DBP:

454 diastolic blood pressure; ASAT: aspartate aminotransferase; ALAT: alanine

455 aminotransferase; gamma-GT: gamma-glutamyl transferase. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$
456 before vs. after lifestyle intervention program.

457

458

For Peer Review

459 **Figure legends**

460 **Figure 1.** Fasting salivary and plasma AEA (**a**), 2-AG (**b**), PEA (**c**) and OEA (**d**)
461 levels in normal weight and obese subjects. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

462 **Figure 2.** Fasting salivary AEA and OEA correlation with body mass index (BMI) (**a**,
463 **d**), waist circumference (**b, e**) and fasting insulin levels (**c, f**).

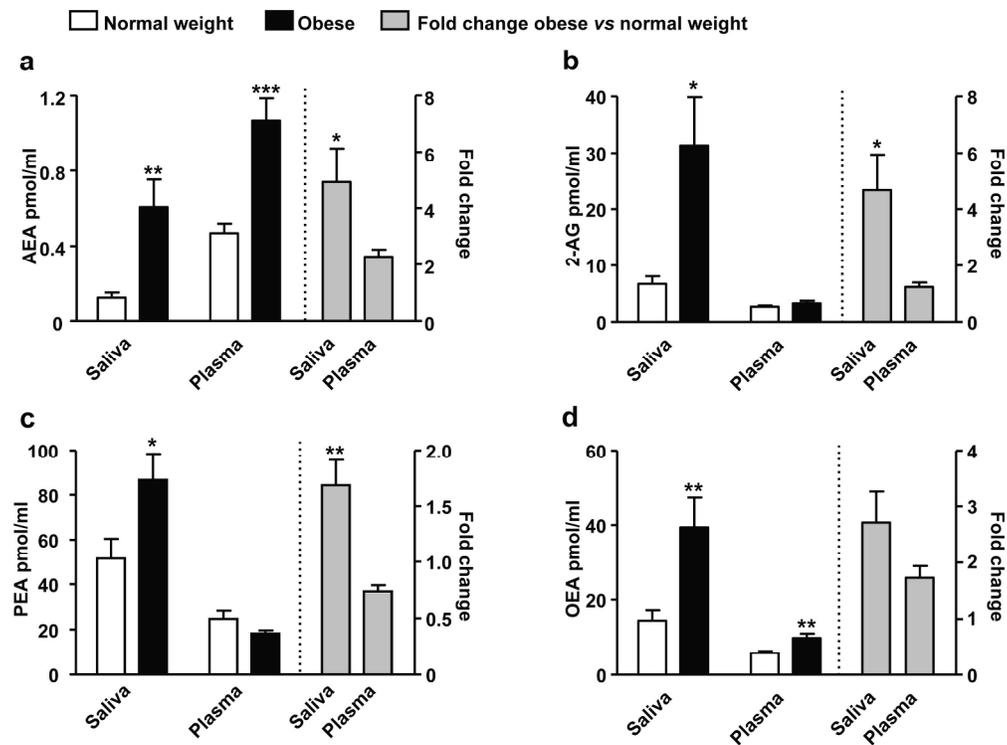
464 **Figure 3.** (**a**) RT-PCR for CB₁, FAAH, MAGL, DAGL alpha, DAGL beta and
465 housekeeping genes GAPDH and HPRT performed on submandibular and
466 accessory salivary glands. A 100-bp ladder is shown. (**b**) Endocannabinoids and
467 related *N*-acylethanolamines content in submandibular salivary glands. CB₁:
468 Cannabinoid receptor type 1, FAAH: Fatty acid amide hydrolase, MAGL:
469 Monoacylglycerol lipase, DAGL alpha: Diacylglycerol lipase alpha, DAGL beta:
470 Diacylglycerol lipase beta, GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase,
471 HPRT: hypoxanthine phosphoribosyl transferase.

472 **Figure 4.** Salivary AEA (**a**), 2-AG (**b**), OEA (**c**) and PEA (**d**) levels 1 h before (1h
473 PRE), immediately before (PRE) and 1 h after the termination of the meal (1h
474 POST). * $p < 0.05$ normal weight vs. obese at a specific time point; # $p < 0.05$, ## $p <$
475 0.01 normal weight vs. obese.

476

477 **Figure 5.** Salivary AEA (**a**), 2-AG (**b**), PEA (**c**) and OEA (**d**) before and after body
478 weight loss obtained through a 12 weeks life-style intervention program. * $p < 0.05$
479 before vs. after the lifestyle intervention program.

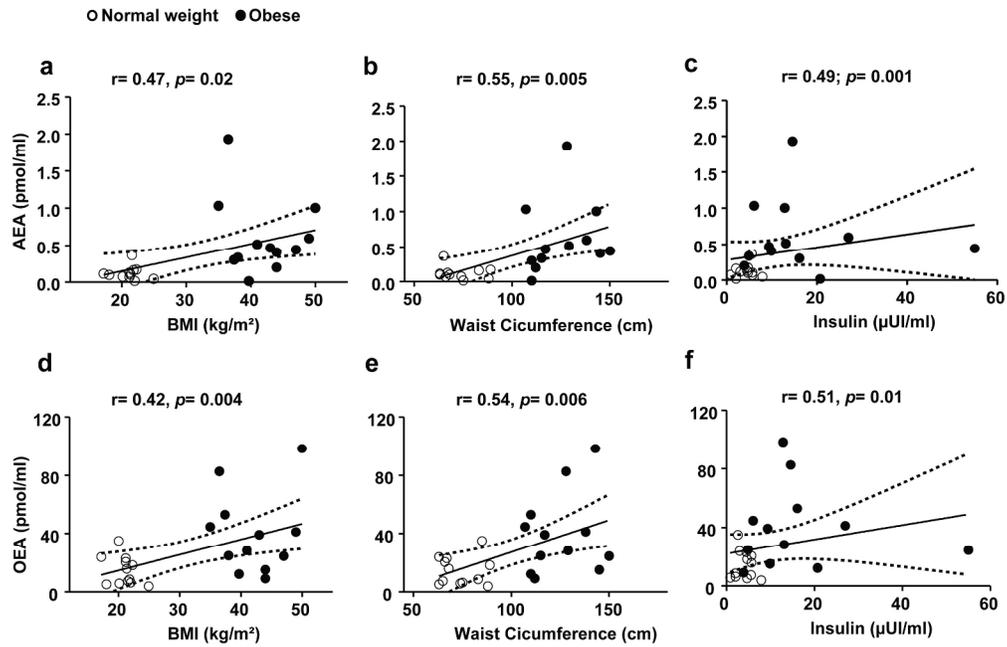
Figure 1, Matias et al.



Fasting salivary and plasma AEA (a), 2-AG (b), PEA (c) and OEA (d) levels in normal weight and obese subjects. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

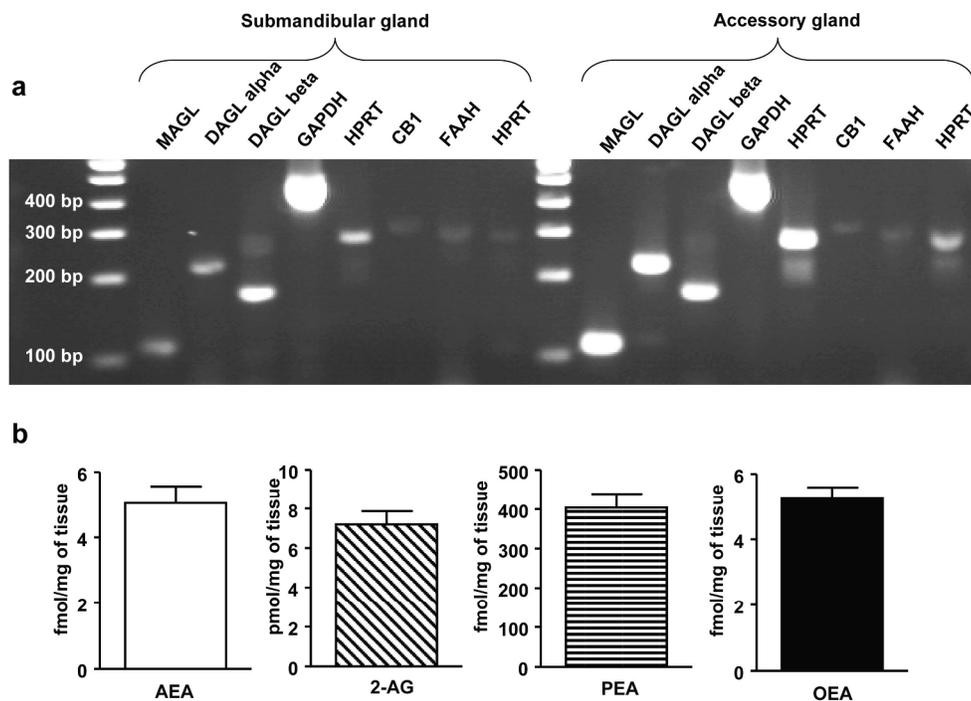
224x177mm (300 x 300 DPI)

Figure 2, Matias et al.



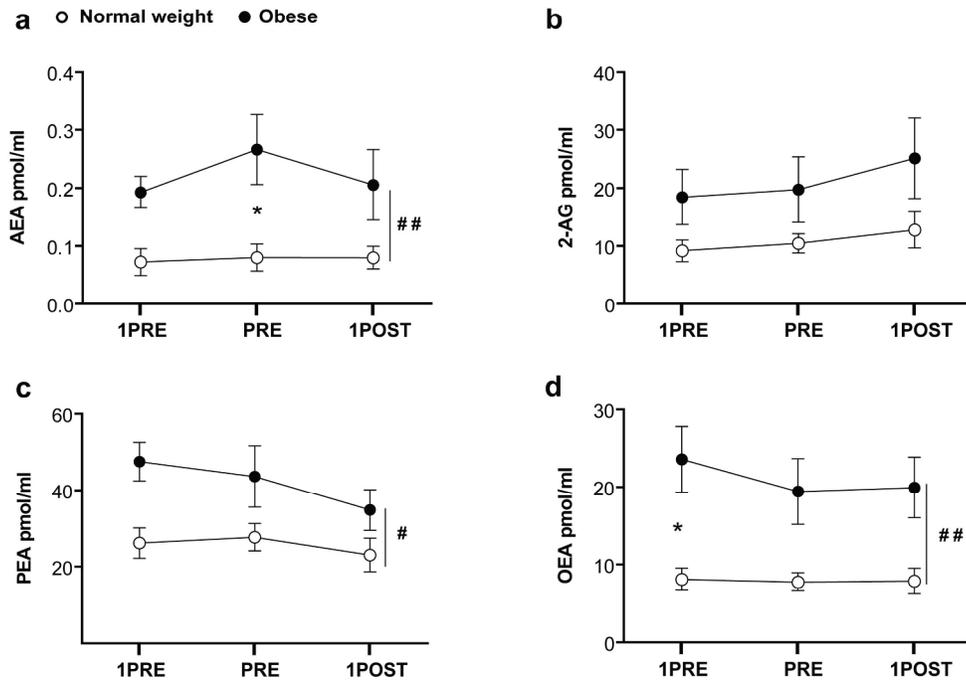
Fasting salivary AEA and OEA correlation with body mass index (BMI) (a, d), waist circumference (b, e) and fasting insulin levels (c, f).
247x172mm (300 x 300 DPI)

Figure 3, Matias et al.



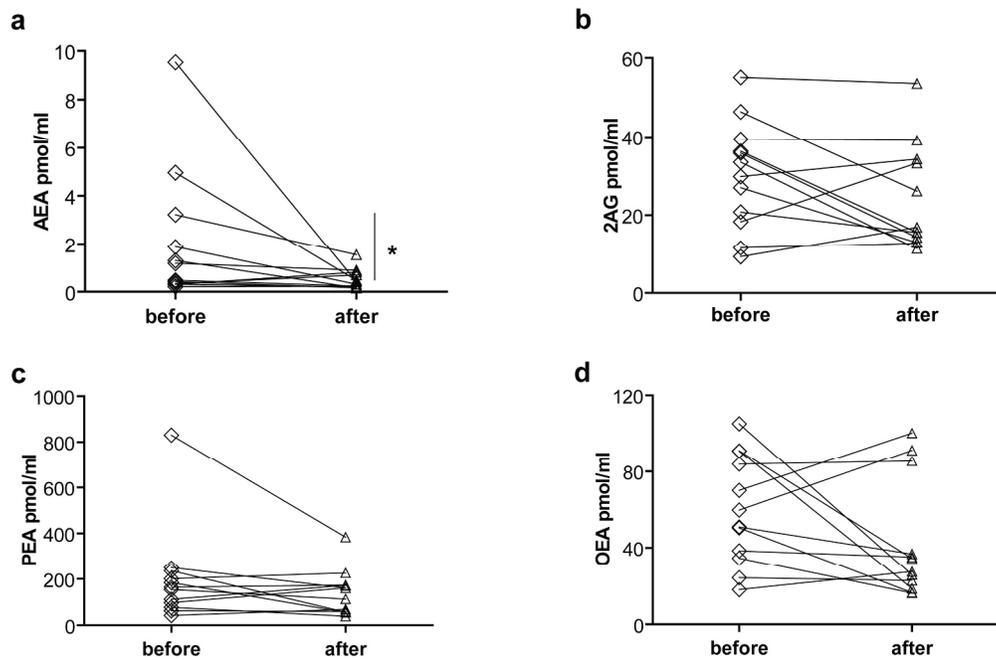
(a) RT-PCR for CB1, FAAH, MAGL, DAGL alpha, DAGL beta and housekeeping genes GAPDH and HPRT performed on submandibular and accessory salivary glands. A 100-bp ladder is shown. (b) Endocannabinoids and related N-acylethanolamines content in submandibular salivary glands. CB1: Cannabinoid receptor type 1, FAAH: Fatty acid amide hydrolase, MAGL: Monoacylglycerol lipase, DAGL alpha: Diacylglycerol lipase alpha, DAGL beta: Diacylglycerol lipase beta, GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, HPRT: hypoxanthine phosphoribosyl transferase.
229x168mm (300 x 300 DPI)

Figure 4, Matias et al.



Salivary AEA (a), 2-AG (b), OEA (c) and PEA (d) levels 1 h before (1h PRE), immediately before (PRE) and 1 h after the termination of the meal (1h POST). * $p < 0.05$ normal weight vs. obese at a specific time point; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ normal weight vs. obese.
217x166mm (300 x 300 DPI)

Figure 5, Matias et al.



Salivary AEA (a), 2-AG (b), PEA (c) and OEA (d) before and after body weight loss obtained through a 12 weeks life-style intervention program. * $p < 0.05$ before vs. after the lifestyle intervention program.
225x169mm (300 x 300 DPI)