

Université de Sherbrooke

**Étude des rôles du récepteur de type 2 de l'angiotensine II lors de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1**

Par

**Stéphanie Larrivée Vanier**

**Département de Médecine, service d'Endocrinologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en Physiologie (endocrinologie)**

**Sherbrooke, Québec, Canada  
Février 2013**

**Membre du jury d'évaluation**

**Pr Nicole Gallo-Payet, Ph.D. (directrice de recherche)  
Programme de Physiologie**

**Dr Marie-France Langlois M.D. (directrice de recherche)  
Programme de Physiologie**

**Pr Pedro Miguel Geraldès Ph.D.  
Programme de Physiologie**

**Pr Éléonor Riesco Ph.D.  
Faculté d'éducation physique et sportive  
Université de Sherbrooke**



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-96250-3*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-96250-3*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

# **Étude des rôles du récepteur de type 2 de l'angiotensine II lors de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1**

Par

Stéphanie Larrivée Vanier

Département de Physiologie, Service d'Endocrinologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en Physiologie (endocrinologie), Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Plusieurs problèmes de santé peuvent être associés à un déséquilibre de l'homéostasie énergétique tels l'obésité, le diabète, les cancers et les maladies cardiovasculaires. Il est bien établi que l'angiotensine II (Ang II) joue un rôle dans le développement de ces pathologies. La plupart des effets néfastes de l'Ang II sont attribués au récepteur de type I (R-AT1) alors que l'activation du récepteur de type 2 (R-AT2) génère des effets qui s'opposent souvent à ceux du R-AT1. Des travaux suggèrent un rôle de l'Ang II dans la physiologie de l'adipocyte. Afin d'étudier l'implication du R-AT2 lors de l'adipogenèse dans des conditions normales et de perturbations de l'homéostasie, les cellules 3T3-L1 ont été choisies. Elles sont un modèle de différenciation adipocytaire utilisé depuis longtemps puisqu'elles possèdent les mêmes caractéristiques principales que les adipocytes et plusieurs résultats obtenus avec ce modèle ont été validés dans des modèles *in vivo*. Nos expériences de RT-PCR et d'études de liaison hormone-récepteur montrent que le R-AT2 n'est pas présent dans les préadipocytes, mais que son expression augmente au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1. Nous avons utilisé un nouvel agoniste non-peptidique sélectif du R-AT2, le M24, afin d'éclaircir les rôles de ce récepteur lors de l'adipogenèse. L'activation du R-AT2 par le M24, en condition normale de différenciation, ne modifie pas l'expression des R-AT1 et R-AT2 ainsi que celle des marqueurs de la différenciation fonctionnelle tels  $\alpha P2$  et  $PPAR\gamma$ . De plus, l'activation du R-AT2 n'affecte pas l'accumulation lipidique. Nous avons utilisé des traitements avec les acides gras, oléate et palmitate, afin de perturber l'homéostasie des cellules. Ces traitements n'ont pas modifié de manière significative les différents paramètres étudiés. Par conséquent, les effets bénéfiques potentiels de l'activation du R-AT2 par le M24, notamment sur la différenciation adipocytaire, n'ont pu être observés. D'autres études seront donc nécessaires afin d'éclaircir l'implication du R-AT2 lors de la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1 et son effet bénéfique potentiel en condition de désordres métaboliques. Les causes possibles de cette absence d'effet sont discutées.

Mot clés : Adipogenèse | 3T3-L1 | Angiotensine II | R-AT2 | M24 | surcharge lipidique

# Table des matières

Liste des figures .....	vi
Liste des tableaux .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 Équilibre énergétique.....	1
1.2 Le tissu adipeux.....	2
1.2.1 Rôle du tissu adipeux .....	2
1.2.2 Types de tissu adipeux .....	4
1.2.2.1 Le tissu adipeux blanc.....	5
1.2.2.2 Différence entre le TAB viscéral et sous-cutané .....	7
1.3 Les adipocytes.....	9
1.3.1 Gardiens de l'homéostasie énergétique .....	9
1.3.2 L'adipogenèse.....	11
1.3.2.1 Facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse.....	12
1.3.3 Les adipocytes, cellules endocrines .....	14
1.3.4 Modèles cellulaires.....	16
1.4 Le système rénine-angiotensine .....	18
1.4.1 La synthèse de l'angiotensine II .....	18
1.4.2 Les récepteurs de l'Ang II .....	20
1.4.2.1 Les rôles du R-AT1 .....	22
1.4.2.2 Les rôles du R-AT2 .....	24
1.4.2.3 Outils pour étudier le R-AT2.....	28
1.4.2.4 Les voies de signalisation des R-AT1 et R-AT2.....	32
1.4.3 Rôles du SRA dans l'obésité et le syndrome métabolique.....	38
1.4.3.1 Les effets d'une suractivation du SRA .....	40
<b>Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs du projet .....</b>	<b>42</b>
<b>Chapitre 3 : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>44</b>
3.1 Culture cellulaire .....	44
3.1.1 Culture cellulaire des cellules 3T3-L1.....	44
3.1.2 Différenciation adipocytaire.....	45
3.2 Traitements pharmacologiques.....	46
3.3 Analyse des lipides intracellulaires .....	48
3.4 Analyse de l'expression génique.....	48
3.4.1 Extraction de l'ARNm .....	49
3.4.2 Transcription de l'ADNc.....	50
3.4.3 Réaction de polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR).....	50
3.5 Analyse de l'expression protéique.....	54
3.5.1 Extraction et dosage protéique.....	54
3.5.2 Immunobuvardage de type Western .....	55
3.6 Quantification des lipides .....	58

3.7 Études de liaison hormone-récepteur .....	58
3.8 Diminution de l'expression du R-AT2 à l'aide de shRNA .....	59
3.8.1 Production et purification des plasmides contenant les séquences de shRNA .....	61
3.8.2 Production de particules lentivirales .....	63
3.8.3 Infection des cellules 3T3-L1 par les lentivirus .....	64
3.9 Essai de prolifération (MTS assay) .....	64
3.10 Incorporation des acides gras .....	65
3.11 Analyses statistiques .....	66
<b>Chapitre 4 : Résultats .....</b>	<b>68</b>
4.1 Validation du modèle cellulaire, les cellules 3T3-L1 .....	68
4.2 Expression des R-AT1 et R-AT2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 .....	70
4.3 Invalidation du R-AT2 avec les shRNA .....	73
4.4 Effet de l'Ang II et du M24 sur la différenciation adipocytaire en conditions normales.....	75
4.4.1 Choix des concentrations du M24.....	75
4.4.2 L'Ang II et le M24 n'ont pas d'effets sur les marqueurs de la différenciation adipocytaire en conditions normales.....	76
4.4.3 L'Ang II et le M24 n'ont pas d'effet sur les niveaux d'expression des R-AT1 et AT2 en conditions normales .....	78
4.4.4 L'Ang et le M24 n'ont pas d'effet sur l'accumulation des lipides en conditions normales.....	80
4.5 Conditions de surcharge lipidique .....	81
4.5.1 Effet d'une surcharge lipidique sur les marqueurs de la différenciation et les R-AT1 et R-AT2.....	83
4.6 Effet du M24 en conditions de surcharge lipidique.....	88
4.7 Effet de l'activation des R-AT1 et AT2 sur la prolifération cellulaire des préadipocytes.....	92
4.8 Effet de l'activation des R-AT1 et AT2 sur l'incorporation des acides gras .....	93
<b>Chapitre 5 : Discussion .....</b>	<b>95</b>
5.1 Choix du modèle cellulaire.....	95
5.2 Choix et validation du protocole de différenciation.....	96
5.3 Expression des récepteurs de l'Ang II lors de l'adipogenèse.....	97
5.4 L'invalidation du R-AT2 .....	99
5.5 Implication de l'Ang II et du M24 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3- L1 en conditions normales .....	101
5.5.1 Effet de l'Ang II et du M24 sur l'expression des marqueurs de l'adipogenèse .....	101
5.5.2 Effet de l'Ang II et du M24 sur l'expression des récepteurs de l'Ang II .....	103
5.5.3 Effet de l'Ang II et du M24 sur l'accumulation lipidique.....	104
5.6 Implication du M24 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 différenciées en conditions de surcharges lipidiques.....	107
5.6.1 Effet d'une surcharge lipidique sur l'expression des marqueurs de l'adipogenèse .....	108

5.6.2 Effet d'une surcharge lipidique sur l'expression des récepteurs de l'Ang II...	110
5.6.3 Effet d'un cotraitement au M24 sur les différents paramètres étudiés.....	110
5.7 Changement du protocole de différenciation .....	111
5.8 Comparaison des résultats obtenus avec les protocoles 1 et 2 .....	111
5.9 Expériences complémentaires réalisées : effet du M24 sur la prolifération des préadipocytes et sur l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes matures .....	115
<b>Chapitre 6 : Conclusion.....</b>	<b>117</b>
Remerciements.....	120
Bibliographie.....	121

## Liste des figures

Figure 1: Métabolisme des lipides dans les adipocytes .....	3
Figure 2: Modèle d'accumulation ectopique du tissu adipeux suite à une surcharge lipidique.....	6
Figure 3: Différents types de tissus adipeux blancs .....	8
Figure 4: Les adipocytes, gardiens de l'homéostasie énergétique .....	9
Figure 5: L'hyperplasie et l'hypertrophie sont deux mécanismes impliqués dans l'augmentation de la masse du tissu adipeux.....	10
Figure 6: Processus d'adipogenèse.....	11
Figure 7: PPAR $\gamma$ 2 est le facteur de transcription essentiel à la différenciation adipocytaire.....	13
Figure 8: Différentes adipokines sécrétées par les adipocytes .....	15
Figure 9: Voie classique de la synthèse de l'angiotensine II (Ang II) .....	19
Figure 10: Schéma plus détaillé du système rénine angiotensine (SRA).....	20
Figure 11: Effets physiologiques du récepteur AT1 (R-AT1).....	24
Figure 12: Effets connus et proposés du récepteur AT2 (R-AT2) .....	28
Figure 13: Structure de l'agoniste non peptidique M24 (C21).....	30
Figure 14: Voies de Signalisation du R-AT1 par la protéine G .....	33
Figure 15: Rôles des protéines d'échaffaudages liées au R-AT1 .....	34
Figure 16: Rôles des protéines d'échaffaudages liées au R-AT2 .....	36
Figure 17: Voies de signalisation connus du R-AT2 .....	37
Figure 18: Effets potentiels de l'Ang II dans les pathologies liées au syndrome métabolique .....	41
Figure 19: Schéma des protocoles de différenciation des cellules 3T3-L1 .....	46
Figure 20: Schéma résumé des étapes d'une amplification par PCR .....	51
Figure 21: Représentation schématique d'une infection lentivirale avec un shRNA.....	60
Figure 22: Schéma du vecteur pLKO.1-puro .....	62
Figure 23: Expression de PPAR $\gamma$ et d'aP2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 ..	69
Figure 24: Expression des R-AT1 et R-AT2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 ..	72
Figure 25: Invalidation du R-AT2 à l'aide de shRNAs.....	73
Figure 26: Diminution du R-AT2 à l'aide de shAT2 D.....	74
Figure 27: Expression du R-AT2 suite à une infection lentivirale .....	75
Figure 28: Expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 en présence de différents traitements.....	76
Figure 29: Expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 (les cellules ont été différenciées selon le protocole 1) .....	77
Figure 30: Niveaux d'ARNm et de protéines de PPAR $\gamma$ lors de l'utilisation du deuxième protocole de différenciation .....	78
Figure 31: Expression protéique des R-AT1 et R-AT2 au cours de l'adipogenèse lorsque les cellules sont différenciées selon le protocole 1 .....	79
Figure 32: Expression des R-AT1 et R-AT2 lors de la différenciation adipocytaire réalisée avec le protocole 2 .....	80
Figure 33: Effet de l'Ang II et du M24 sur la quantification des lipides à J8 .....	81

<b>Figure 34: Quantification des lipides à J6 en présence d'oléate ou de palmitate (expérience réalisée selon le protocole 1).....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 35: Quantification des lipides à J6 en présence d'oléate ou de palmitate (expériences réalisées avec le protocole 2).....</b>	<b>83</b>
<b>Figure 36: Expression de PPAR<math>\gamma</math>2 et d'aP2 en conditions de surcharge lipidique .....</b>	<b>85</b>
<b>Figure 37: Expression des R-AT1 et R-AT2 en conditions de surcharge lipidique .....</b>	<b>87</b>
<b>Figure 38: Effet du M24 en conditions de surcharge lipidique (cellules différenciées selon le protocole 1) .....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 39: Effet du M24 en conditions de surcharge lipidique (cellules différenciées selon le protocole 2) .....</b>	<b>92</b>
<b>Figure 40: Activité mitochondriale dans les préadipocytes (essai MTS).....</b>	<b>93</b>
<b>Figure 41: Captation et incorporation des triglycérides dans les adipocytes matures.....</b>	<b>94</b>



## Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des différents composés liés au système rénine-angiotensine.....	47
Tableau 2: Solutions à préparer pour réaliser une expérience de RT-PCR .....	53
Tableau 3: Séquences des amorces utilisées pour le RT-PCR.....	53
Tableau 4: Anticorps utilisés lors des expériences d'immunobuvardage de type Western.....	57
Tableau 5: Séquences des shRNAs utilisés contre le R-AT2 lors des infections.....	61

## Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADNdb	ADN double brin
ADNc	ADN complémentaire
AGL	Acide gras libre
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
AP2/(FABP4)	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
ARNm	ARN messenger
ARAP	<i>AT1 receptor-associated protein</i>
ATGL	Lipase des triglycérides adipocytaires
ÁTIP/ATBP	Protéine interagissant avec le R-AT2 ( <i>AT2R interacting protein</i> )
ATRAP	<i>AT1 receptor-associated protein</i>
BCS	Sérum bovin de veau ( <i>bovine calf serum</i> )
BRA	Bloqueur du R-AT1
C21/M24	Composé 21
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer binding proteins</i>
CPT1	<i>Carnitine palmitoyl transferase 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification eagle's medium</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique ( <i>epidermal growth factor</i> )
FBS	Sérum de bovin foetal ( <i>foetal bovine serum</i> )
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HDL	Lipoprotéine de haute densité ( <i>high density lipoprotein</i> )
HSL	Lipase hormonosensible
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
IGF-1	<i>Insulin growth factor 1</i>
IL-6	Interleukine 6
KLF	<i>Krüppel like factor</i>
LPL	Lipoprotéine lipase
MAPK	<i>Mitogen/microtubule activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MKP-1	Phosphatase 1 des MAPK ( <i>MAPK phosphatase 1</i> )
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
ORO	Coloration à l'huile rouge
PI3-K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PG12	Prostaglandine 12
PGF2 $\alpha$	Prostaglandine F2 $\alpha$
PKB/AKT	Protéine kinase B

PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PLZF	<i>Promyelocytic sinc finger protein</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
R-AT1	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
R-AT2	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
RISC	<i>RNA inducer silencing complex</i>
rt-PCR	PCR inverse
RT-PCR	PCR en temps réel
SDS-PAGE	Gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate
SHP-1	<i>SH2 domain containing phosphatase 1</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	Petit ARN interférant
SRA	Système rénine-angiotensine
TA	Tissu adipeux
TAB	Tissu adipeux blanc
TG	Triglycérides
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale $\alpha$
TP	Température pièce
UCP-1	Protéine découplante de la phosphorylation de type 1 ( <i>uncoupling protein 1</i> )
VLDL	Lipoprotéines de faible densité ( <i>very low density lipoprotein</i> )

# Chapitre 1 : Introduction

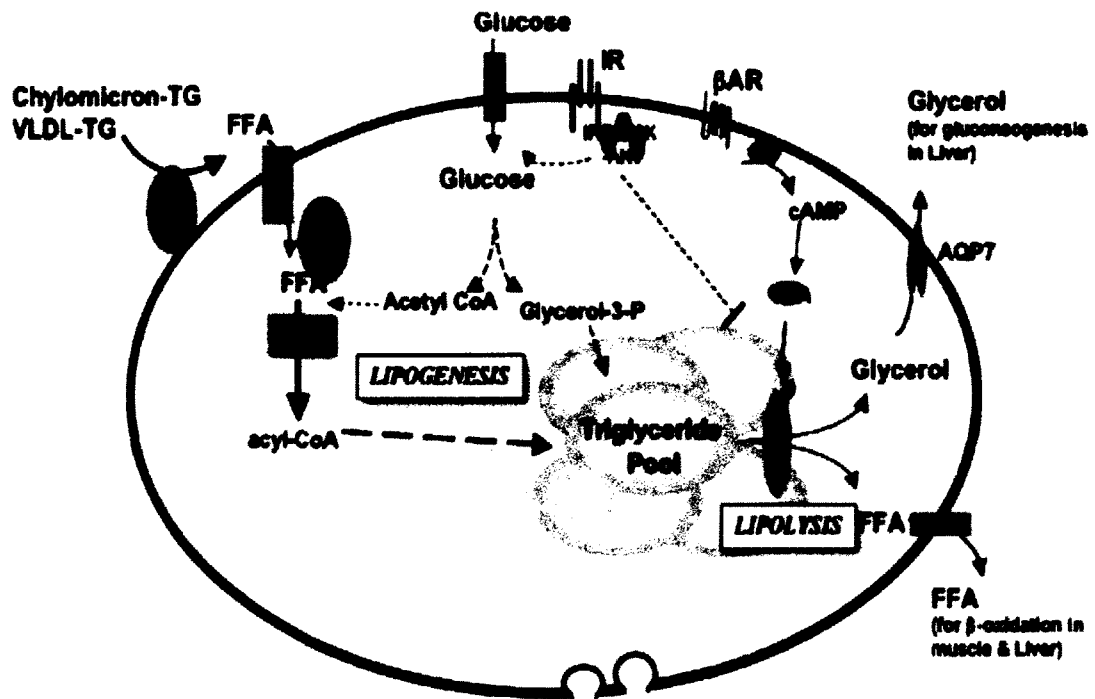
## 1.1 Équilibre énergétique

L'équilibre énergétique est la balance entre l'apport et la dépense énergétique. Cette balance peut être influencée par différentes composantes telles la densité énergétique des aliments absorbés, le métabolisme de base et l'activité physique. Une mauvaise gestion de cet équilibre peut mener à l'obésité (Gesta *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008). Il est bien connu que l'obésité associée à plusieurs problèmes de santé et que les complications se manifestent entre autres au niveau métabolique, endocrinien, et cardiovasculaire (Wajchenberg, 2000; Rajala et Scherer, 2003). De plus, l'obésité est un facteur de risque important pour le développement de maladies telles l'hypertension, les dyslipidémies, le syndrome métabolique, le diabète de type 2, et certains cancers (Marx, 2003; Sethi et Vidal-Puig, 2007; Guilherme *et al.*, 2008; Tan et Vidal-Puig, 2008; Giacca *et al.*, 2011). La prévalence de l'obésité est maintenant très élevée à travers le monde (Eckel *et al.*, 2004). En 2012, 12 % de la population, soit un demi-milliard de personnes, étaient considérées comme obèses (World Health Organization 2012). C'est une pathologie qui coûte des milliards de dollars aux services de santé (Katzmarzyk et Janssen, 2004). Il est donc important de l'étudier afin de comprendre ses fondements et de découvrir des avenues pour tenter de la prévenir et la réduire. L'équilibre énergétique peut aussi être défini comme la balance entre la mise en réserve des lipides et leur utilisation. Le tissu impliqué dans cet équilibre est le tissu adipeux blanc (TAB).

## 1.2 Le tissu adipeux

### 1.2.1 Rôle du tissu adipeux

Le rôle principal du TAB est de stocker l'excès d'énergie sous forme de triglycérides (TG) et de libérer des acides gras libres pour fournir de l'énergie lorsque la dépense énergétique est plus élevée (Müller *et al.*, 2008; Vázquez-Vela *et al.*, 2008; Palou *et al.*, 2009). Ces deux phénomènes sont respectivement appelés lipogenèse et lipolyse. La figure 1 illustre ces deux procédés qui surviennent dans les adipocytes, les cellules majoritaires du TAB. Il est à noter que chez le rat, la lipogenèse se produit dans le TAB et dans le foie, mais que chez l'humain elle se produit principalement dans le foie et légèrement dans le TAB (Vázquez-Vela *et al.*, 2008).



**Figure 1: Métabolisme des lipides dans les adipocytes.** La lipogenèse permet de stocker les lipides sous forme de triglycérides tandis que la lipolyse hydrolyse les triglycérides pour donner des acides gras libres et du glycérol. AC, adényl cyclase; ACS, acyl-CoA synthase; AKT, AKR mouse thymoma viral pro-oncogène; AR, adrenergic receptor; FFA, Free fatty acid; HSL, hormone sensitive lipase; IR, insulin receptor; PI3K, phophatidylinositol 3-kinase; PKA, protein kinase A.; TG, triglyceride; VLDL, very low density lipoprotein. Tiré de Sethi *et al.*, 2007.

Les acides gras libres (AGL), présents dans les chylomicrons et dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), présente à la surface des adipocytes, et transportés par des transporteurs à l'intérieur des cellules, comme le CD36, FABP, et FATP (Schwenk *et al.*, 2010). En présence de glycérol, les AGL sont réestérifiés en TG par des enzymes lipogéniques et stockés sous forme de gouttelettes lipidiques (Sethi et Vidal-Puig, 2007).

La lipolyse, quant à elle, est sous le contrôle de lipases, qui hydrolysent les TG en AGL et en glycérol. Les AGL pourront ensuite être transportés jusqu'au foie et dans les muscles pour être  $\beta$ -oxydés et le glycérol sera transporté jusqu'au foie pour être utilisé dans la gluconéogenèse (Sethi et Vidal-Puig, 2007). La lipogenèse et la lipolyse peuvent être contrôlées par l'insuline, mais aussi par une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Sethi et Vidal-Puig, 2007; Vázquez-Vela *et al.*, 2008).

Par le passé, le TAB était considéré comme un tissu inactif du point de vue métabolique, mais aujourd'hui la communauté scientifique s'entend pour dire que c'est un tissu très actif (Sethi et Vidal-Puig, 2007; Guilherme *et al.*, 2008; Vázquez-Vela *et al.*, 2008). Le TAB contrôle le métabolisme énergétique en sécrétant des hormones et des cytokines, appelées adipokines, qui ont des activités endocrines, paracrines, et autocrines (Frühbeck *et al.*, 2001). La famille des adipokines a augmenté rapidement suite à la découverte de la leptine, un facteur de satiété, par Friedman *et al.* en 1994. Dans cette famille, il y a entre autres, l'adiponectine, la résistine, l'apeline, le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), et le *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1). Ces adipokines ont des effets notamment sur le métabolisme des tissus périphériques, l'homéostasie énergétique, l'inflammation, et la pression artérielle (Frühbeck *et al.*, 2001; Vázquez-Vela *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Types de tissu adipeux

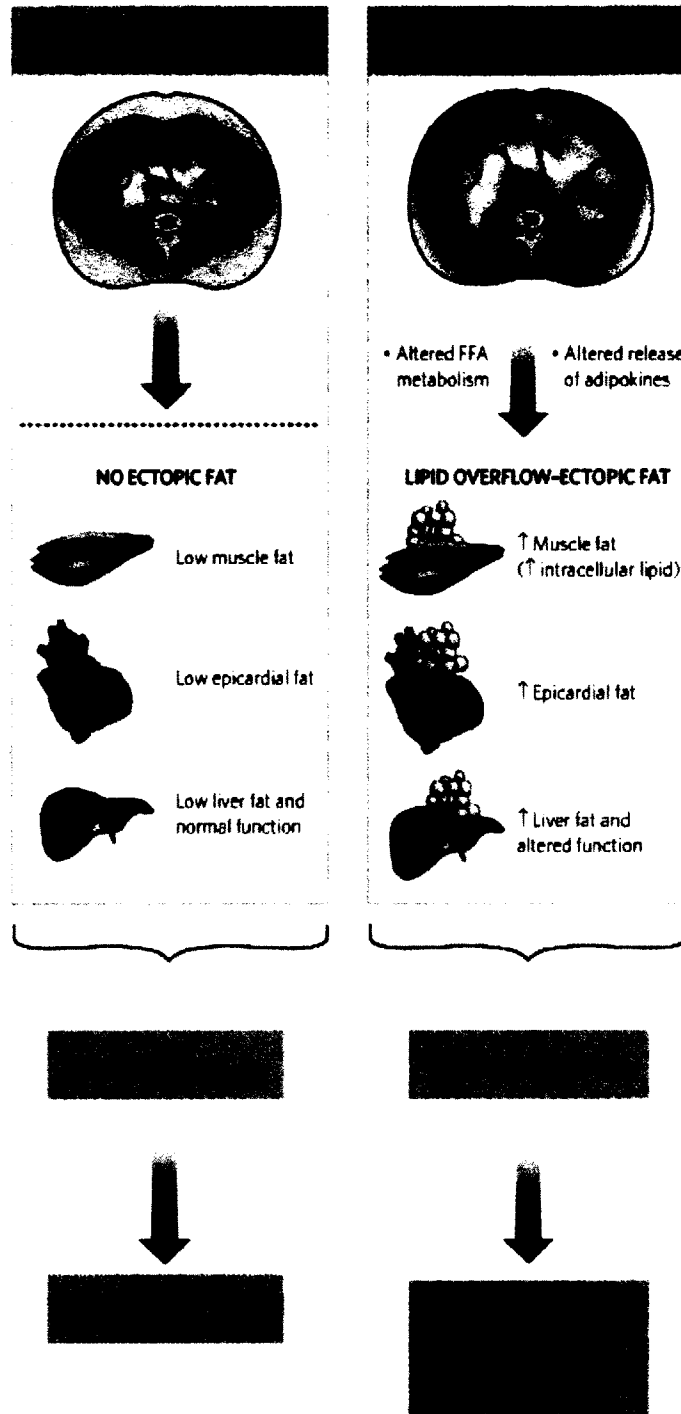
Il existe 2 types de tissu adipeux qui peuvent être différenciés par leur couleur, leur structure, leur vascularisation, leur localisation, et leur fonction : le tissu adipeux brun et le TAB (Vázquez-Vela *et al.*, 2008). Le tissu adipeux brun est thermogène, c'est-à-dire qu'il brûle de l'énergie sous forme de chaleur (Sell *et al.*, 2004; Ouellet *et al.*, 2012). Il se caractérise par un contenu élevé en mitochondries possédant des protéines découplantes de la phosphorylation de type 1 (UCP-1), un marqueur spécifique des adipocytes bruns, ce qui lui permet d'avoir un pouvoir thermogène élevé. Il emmagasine

les lipides sous forme de petites gouttelettes qu'il utilisera pour produire de la chaleur (Richard *et al.*, 2010).

### **1.2.2.1 Le tissu adipeux blanc**

Comme il a été mentionné précédemment, le TAB est conçu pour emmagasiner les lipides. Il est composé en majorité d'adipocytes, soit environ le tiers, mais aussi de fibroblastes, de macrophages, de cellules stromales et endothéliales, de monocytes, et de préadipocytes (Sethi et Vidal-Puig, 2007). Il existe deux types de TAB : le TAB sous-cutané et le TAB viscéral. Bien que très impliqué dans le développement de l'obésité, le TAB sous-cutané est souvent considéré comme un tissu sain et une accumulation importante des lipides dans cette région, suite à une balance énergétique positive, n'est généralement pas associé à des problèmes métaboliques (Figure 2). Il est à noter que certains articles suggèrent que le TAB sous-cutané au niveau abdominal est associé au développement de maladies chroniques, mais il n'y a pas de consensus dans la littérature (Ibrahim, 2010; Newton *et al.*, 2011). Des différences au niveau physiologique et métabolique existent entre les dépôts de TAB sous-cutané qui peuvent expliquer les différents résultats présents dans la littérature (Yim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012). Le TAB viscéral est quant à lui, considéré comme un tissu néfaste, bien qu'il permette un métabolisme rapide des lipides dû à sa grande plasticité (Wajchenberg, 2000; Palou *et al.*, 2009). Une accumulation lipidique importante dans ce tissu est associée à une dysfonction de ce dernier et est fortement liée avec la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'hypertension, et les maladies cardiovasculaires (Shadid et Jensen, 2003; Després et Lemieux, 2006; Palou *et al.*, 2009;; Arsenault *et al.*, 2011; McLaughlin *et al.*, 2011).





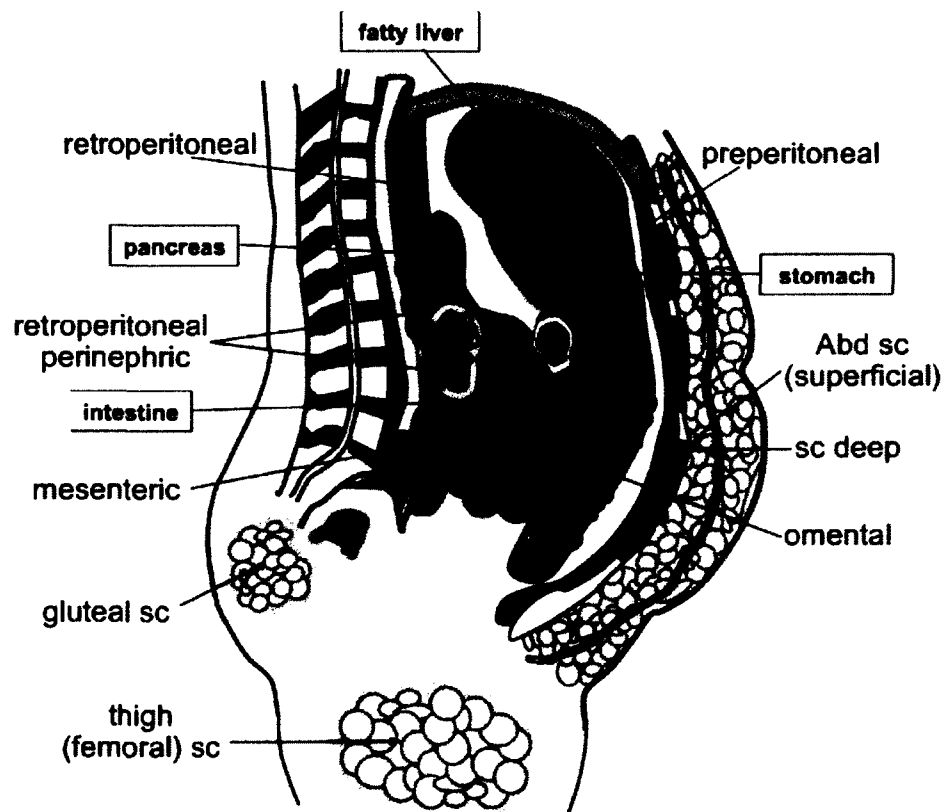
**Figure 2: Modèle d'accumulation ectopique du tissu adipeux suite à une surcharge lipidique.** Une accumulation importante de lipides dans le TAB sous-cutané n'est pas liée à des effets métaboliques néfastes. Par contre, l'accumulation importante dans le TAB viscéral est associée avec un profil métabolique altéré et une accumulation ectopique de gras. Tiré de Després et Lemieux, 2006.

### 1.2.2.2 Différence entre le TAB viscéral et sous-cutané

Il existe des différences majeures entre le TAB viscéral et sous-cutané qui peuvent expliquer les effets délétères du TAB viscéral (Ibrahim, 2010; Manolopoulos *et al.*, 2010). Par exemple, le TAB viscéral a une irrigation sanguine plus importante que le TAB sous-cutané et il capte plus rapidement les acides gras absorbés dans la journée (Koutsari *et al.*, 2008; Manolopoulos *et al.*, 2010). De plus, leur localisation est différente. Le TAB viscéral est plutôt présent au niveau abdominal, tandis que le TAB sous-cutané se retrouve en périphérie, un peu au niveau abdominal, et dans le bas du corps (Ibrahim, 2010; Lee *et al.*, 2012). Fait intéressant, le TAB sous-cutané présent au niveau abdominal est associé à un risque de maladies cardiovasculaires plus élevé, tout comme l'est le TAB viscéral (Newton *et al.*, 2011). Nonobstant, d'autres régions du TAB sous-cutané sont associées à un effet protecteur (Manolopoulos *et al.*, 2010). Par exemple, le TAB glutéofémoral est associé à des taux de VLDL et LDL plus bas, des taux de lipoprotéine de haute densité (HDL) plus élevés, et un niveau de calcification aortique plus bas (Yim *et al.*, 2008; Manolopoulos *et al.*, 2010).

D'autre part, les adipocytes présents dans les deux types de tissus ont des propriétés différentes (Wajchenberg, 2000; Palou *et al.*, 2009). Il a été montré que les adipocytes du TAB viscéral ont un renouvellement des TG plus élevé, une réponse lipolytique aux catécholamines plus importante, une sensibilité plus élevée aux stimuli  $\beta$ -adrénergiques, et une plus grande densité de récepteurs des androgènes (Rebuffé-Scrive *et al.*, 1990; Martin et Jensen, 1991; Wajchenberg, 2000). D'autre part, l'expression de plusieurs gènes diffère dans les deux types de tissus (Palou *et al.*, 2009). Par exemple, les gènes impliqués dans la lipogénèse tels *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  2* (PPAR $\gamma$ 2), LPL, CD36, et GLUT 4 présentes des niveaux d'ARNm plus élevés dans le TAB rétropéritonéal que dans le TAB inguinal, considéré comme un TAB sous-cutané (Palou *et al.*, 2009).

Le TAB viscéral est réparti en 4 grandes régions : le TAB omental, le TAB rétropéritonéal, le TAB épидидymal, et le TAB mésentérique (Figure 3). Il existe des différences entre les TAB viscéraux, par exemple, l'expression de la lipase hormonosensible (HSL) et la lipase des triglycérides adipocytaires (ATGL) est plus élevée dans le TAB rétropéritonéal que dans le TAB mésentérique tandis que c'est l'inverse pour l'expression de *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ) et de la *Carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT1), soit une expression plus importante dans le TAB mésentérique que dans le TAB rétropéritonéal (Palou *et al.*, 2009).

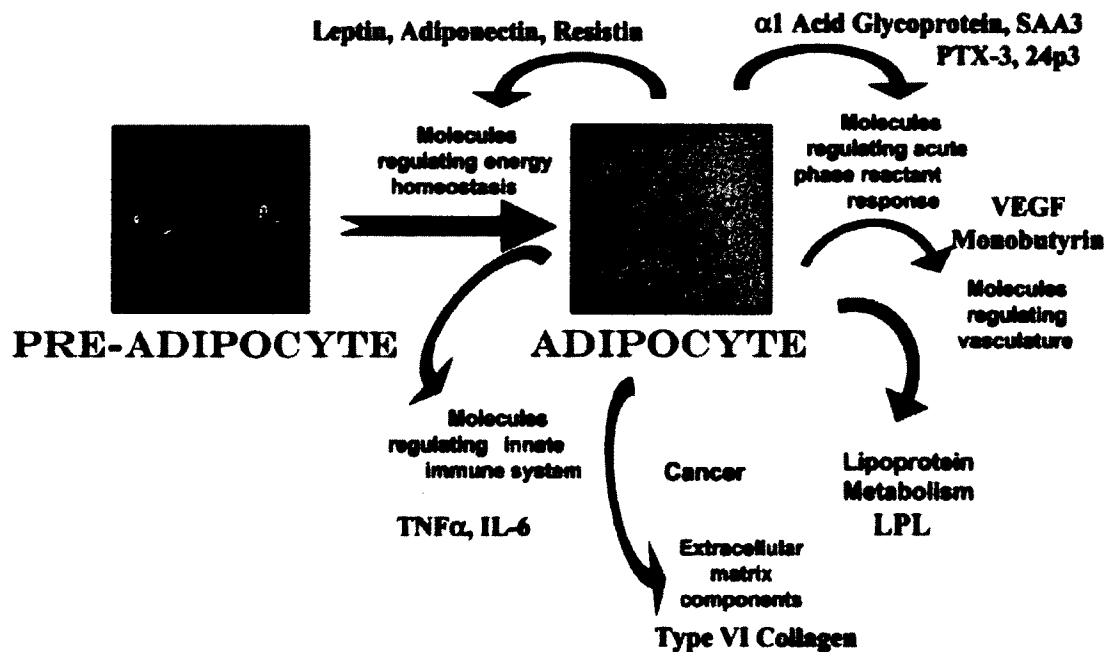


**Figure 3: Différents types de tissus adipeux blancs.** Le tissu adipeux blanc sous-cutané comprend le tissu fémoral, l'abdominal et le glutéal. Le tissu adipeux viscéral comprend le mésentérique, le rétropéritonéal, l'omental, et l'épididymal (non représenté sur le schéma). Abd sc : abdominal subcutaneous. Tiré de Lee *et al.*, 2012.

## 1.3 Les adipocytes

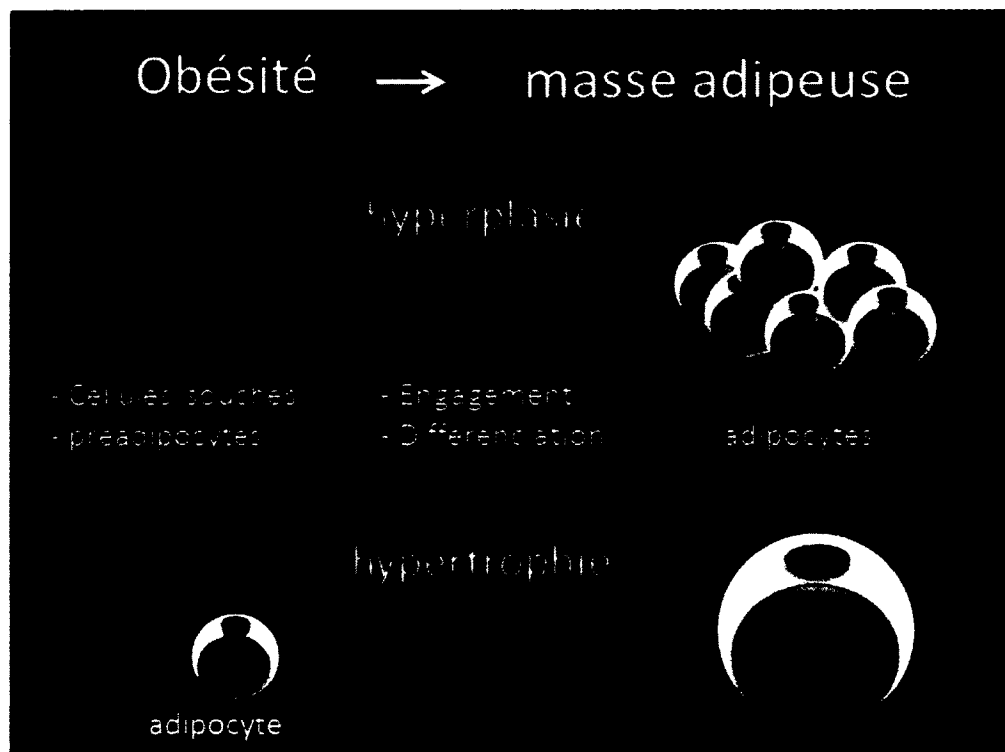
### 1.3.1 Gardiens de l'homéostasie énergétique

Les adipocytes sont le type cellulaire majoritaire dans le TAB. Ce sont eux qui emmagasinent les lipides et qui sécrètent la plupart des adipokines. Ils peuvent être considérés comme les gardiens de l'homéostasie énergétique étant donné leurs implications diverses dans l'angiogenèse, la régulation de la matrice extracellulaire, le système immunitaire, et le métabolisme lipidique (Figure 4) (Rajala et Scherer, 2003; Vázquez-Vela *et al.*, 2008).



**Figure 4: Les adipocytes, gardiens de l'homéostasie énergétique.** Schéma de certaines adipokines sécrétées par les adipocytes et de leur implication physiologique. IL-6, interleukin-6; LPL, lipoprotéine lipase; SAA3, sérum amyloïde A 3; TNFα, facteur de nécrose tumorale α; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Tiré de Rajala et Scherer, 2003.

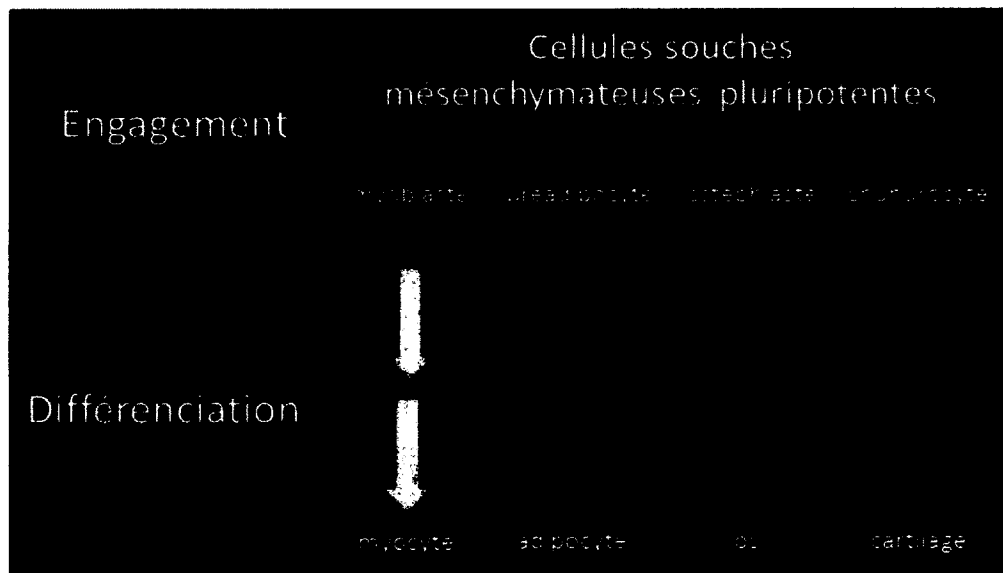
Lors d'une balance énergétique positive, l'excès d'acides gras va être emmagasiné dans les adipocytes. Afin de répondre à la demande de stockage, le tissu adipeux a deux possibilités, soit l'hyperplasie ou l'hypertrophie de ses adipocytes (Figure 5) (Otto et Lane, 2005). L'hyperplasie, aussi appelée adipogenèse, est l'augmentation du nombre d'adipocytes et l'hypertrophie est l'augmentation de leur volume. Les deux processus peuvent se produire de façon concomitante ou séparément dépendamment des dépôts, du poids et du sexe (Drolet *et al.*, 2008; Arner *et al.*, 2010; Tchoukalova *et al.*, 2010). Par exemple, chez la femme obèse, l'hyperplasie semble être plus importante dans le tissu adipeux sous-cutané, tandis que l'hypertrophie arrive de façon similaire dans les types de tissu (Drolet *et al.*, 2008). D'autre part, chez l'homme de poids normal, le tissu adipeux sous-cutané abdominal semble être plus hypertrophique tandis que celui présent dans le bas de corps semble être hyperplasique (Tchoukalova *et al.*, 2010).



**Figure 5: L'hyperplasie et l'hypertrophie sont deux mécanismes impliqués dans l'augmentation de la masse du tissu adipeux. Adapté d'Otto et Lane, 2005.**

### 1.3.2 L'adipogenèse

L'adipogenèse est le processus biologique permettant d'obtenir des adipocytes matures et fonctionnels. Celle-ci s'effectue en deux étapes, soit la détermination et la différenciation adipocytaire. Les adipocytes proviennent des cellules souches mésenchymateuses (Rosen et MacDougald, 2006). Ces cellules ont la capacité de se programmer en plusieurs types cellulaires, soit des myoblastes, des ostéoblastes, des chondrocytes, ou encore des préadipocytes (Figure 6) (Otto et Lane, 2005). Ces différents types cellulaires sont morphologiquement identiques aux cellules souches, mais ils ne possèdent plus la capacité de se différencier en d'autres types cellulaires, par exemple les préadipocytes n'ont plus la capacité de se différencier en ostéoblastes (Rosen et MacDougald, 2006). En présence des signaux adéquats, il y aura induction de la différenciation et les préadipocytes vont amorcer les changements nécessaires pour devenir des adipocytes.

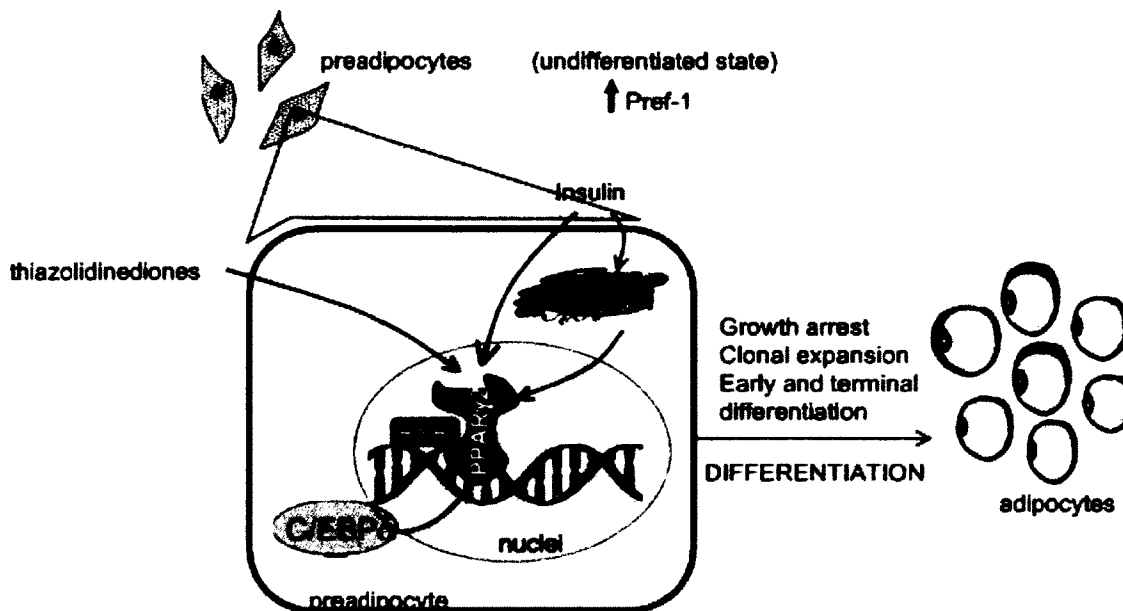


**Figure 6: Processus d'adipogenèse.** L'engagement des cellules souches mésenchymateuses permet d'obtenir 4 lignées différentes: les myoblastes, les préadipocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes. Le processus de différenciation permet d'obtenir des cellules de muscles, d'os, de cartilage, et des adipocytes. Adapté d'Otto et Lane, 2005.

Suite à l'induction de la différenciation, les préadipocytes vont en général subir une phase d'expansion clonale d'un ou deux cycles cellulaires, aussi appelée phase de prolifération. Après cette phase les préadipocytes entrent dans la phase de différenciation fonctionnelle. Ils deviendront des cellules plutôt sphériques qui commenceront à accumuler des lipides, et ils vont acquérir toute la machinerie nécessaire à la fonctionnalité des adipocytes matures (Gregoire *et al.*, 1998). Lorsque les adipocytes sont matures et fonctionnels, ils accumulent principalement des lipides et sécrètent des adipokines (Rosen et MacDougald, 2006).

#### **1.3.2.1 Facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse**

Le facteur de transcription essentiel et suffisant à la différenciation adipocytaire est le *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) (Otto et Lane, 2005; Rosen et MacDougald, 2006; White et Stephens, 2010). Il fait partie de la famille des PPAR qui sont des récepteurs nucléaires. Il existe deux protéines isoformes de PPAR $\gamma$ , soit PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2; c'est cette dernière qui semble être la plus importante pour la différenciation (Otto et Lane, 2005). La différenciation des préadipocytes est possible seulement si PPAR $\gamma$  est activé, par conséquent, plusieurs molécules vont être impliquées dans son activation (Figure 7) (Rosen et MacDougald, 2006; Sethi et Vidal-Puig, 2007).



**Figure 7: PPAR $\gamma$ 2 est le facteur de transcription essentiel à la différenciation adipocytaire. PPAR $\gamma$ 2 va s'hétérodimériser avec le récepteur RXR afin de stimuler l'expression des gènes impliqués dans la différenciation. Plusieurs autres facteurs, tels C/EBP $\alpha$  et SREBP-1, sont impliqués dans la différenciation et ils ont pour rôle d'activer l'expression de PPAR $\gamma$ 2. Les thiazolidinédiones sont des agonistes des PPARs. Tiré de Vázquez-Vela *et al.*, 2008.**

Nonobstant le fait que PPAR $\gamma$  soit le facteur de transcription clé de l'adipogenèse, plusieurs autres facteurs de transcription sont impliqués et contrôlent le développement des adipocytes (Gregoire *et al.*, 1998; Otto et Lane, 2005; Rosen et MacDougald, 2006). Une famille importante pour l'adipogenèse est celle des CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP). C/EBP $\delta$  et C/EBP $\beta$  sont présents chez les préadipocytes et leur niveau d'expression augmente transitoirement au début de la différenciation (Gregoire *et al.*, 1998). L'hétérodimérisation et l'activation subséquente de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  précèdent la phase d'expansion clonale et sont importantes pour l'induction de plusieurs gènes nécessaires à la différenciation adipocytaire. De plus, l'activation de ces deux facteurs augmente l'expression de PPAR $\gamma$  et de C/EBP $\alpha$ . Ce dernier est lui aussi un facteur important impliqué dans l'activation de plusieurs gènes

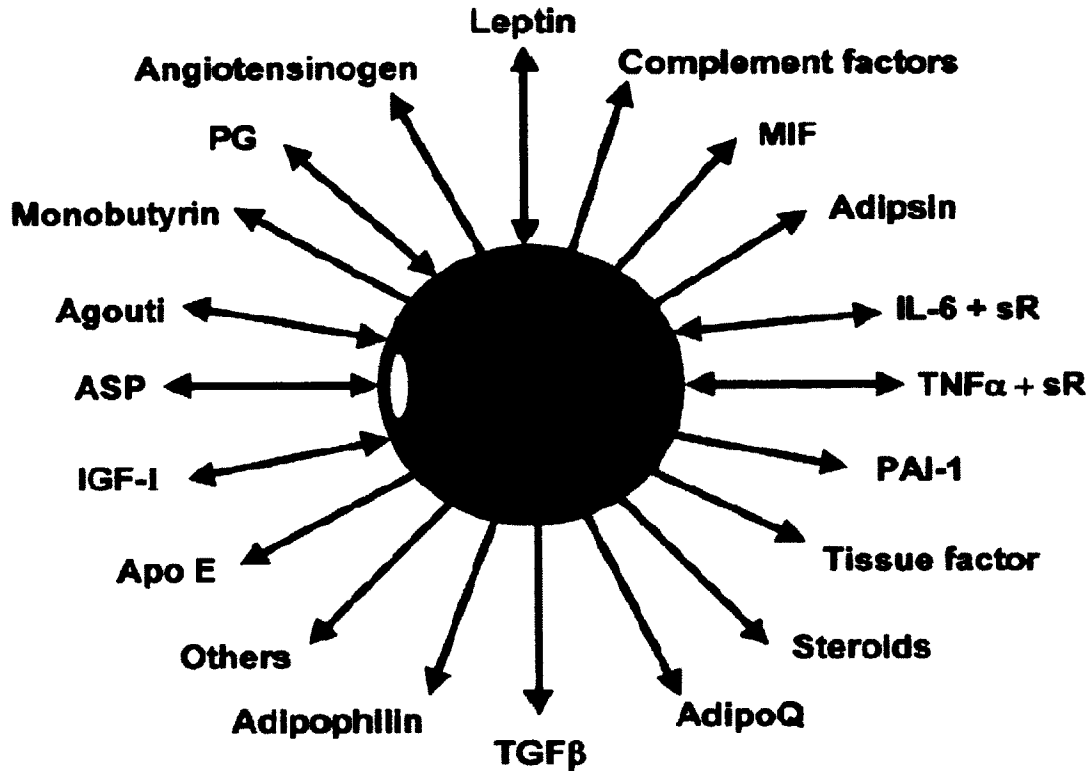


nécessaires à l'obtention d'adipocytes matures (Gregoire *et al.*, 1998; Otto et Lane, 2005).

D'autres facteurs qui ne sont pas des facteurs de transcription peuvent aussi moduler la différenciation des adipocytes. Ils peuvent soit favoriser l'adipogenèse (IGF-1, PG12) soit l'inhiber (EGF, cytokines, PGF2 $\alpha$ ) (Gregoire *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Les adipocytes, cellules endocrines

Les adipocytes sécrètent une myriade d'adipokines, qui vont influencer plusieurs organes et tissus tels l'hypothalamus, le pancréas, le foie, le système immunitaire, les reins, les muscles squelettiques, et le tissu adipeux (Frühbeck *et al.*, 2001). De plus, les cytokines sécrétées par les adipocytes peuvent avoir une réponse autocrine, c'est-à-dire agir directement sur les adipocytes qui les ont produits ou paracrine en agissant sur les adipocytes voisins. La figure 8 présente quelques-unes de ces adipokines.



**Figure 8: Différentes adipokines sécrétées par les adipocytes.** Légende : → adipokines qui sont sécrétées par les adipocytes, ↔ adipokines qui sont sécrétées par les adipocytes et qui agissent de manière autocrine. adipoQ, adipocyte complement-related protein of 30kDa; ASP, acylation-stimulating protein; IGF-1, insuline-like growth factor-1; IL-6, interleukin-6; MIF, macrophage migrating inhibitory factor; Pai-1, plasminogen activator inhibitor-1; PG, prostaglandine; sR, soluble receptor; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ . Tiré de Frühbeck *et al.*, 2001

La première hormone identifiée comme une adipokine a été la leptine (Zhang *et al.*, 1994). La leptine est principalement sécrétée par le tissu adipeux et son niveau de sécrétion est proportionnel à la masse du TA. Elle a plusieurs rôles : par exemple, elle inhibe la lipogenèse et stimule la lipolyse, elle agit directement sur l'hypothalamus comme signal de satiété, ainsi que sur la reproduction en la rétablissant lorsque celle-ci est diminuée (Chehab *et al.*, 1996; Frühbeck *et al.*, 2001; Vázquez-Vela *et al.*, 2008). Une

autre adipokine très étudiée est l'adiponectine. Cette hormone est produite entre autre par les adipocytes et elle est connue pour favoriser la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des lipides, notamment en augmentant l'activation des *Mitogen/Microtubule Activated Protein Kinase* (MAPK) dans le foie et les muscles squelettique et l'expression de PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux (Rajala et Scherer, 2003; Sethi et Vidal-Puig, 2007; Zhu *et al.*, 2008). De plus, les niveaux plasmatiques d'adiponectine sont diminués lors de résistance à l'insuline (Fasshauer *et al.*, 2004). Une autre adipokine qui est sécrétée par les adipocytes est l'angiotensinogène. Cette hormone fait partie du système rénine-angiotensine, qui sera discuté ultérieurement.

D'un autre côté, les adipocytes expriment plusieurs récepteurs membranaires, ce qui permet à différentes protéines d'aller agir sur la fonction et la physiologie de l'adipocyte. Par exemple, le récepteur de la leptine est présent à la membrane des adipocytes, donc elle peut agir de manière autocrine et paracrine sur ceux-ci (Frühbeck *et al.*, 2001). Le récepteur de l'insuline est aussi retrouvé à la surface des adipocytes et il joue un rôle important, notamment sur la lipolyse, la lipogenèse, et l'adipogenèse (Olivares-Reyes *et al.*, 2009). L'angiotensine II, une autre hormone du système rénine-angiotensine influence aussi la fonction adipocytaire, puisque ses récepteurs ont été retrouvés à la surface des adipocytes. Parmi les autres récepteurs présents sur la membrane des adipocytes, il y a les récepteur des hormones thyroïdiennes, de l'hormone de croissance (GH), de l'œstrogène, du TNF- $\alpha$ , de l'interleukine-6 (IL-6), de la vitamine D, et des glucocorticoïdes (Frühbeck *et al.*, 2001).

#### 1.3.4 Modèles cellulaires

Différents modèles existent afin d'étudier l'adipogenèse et la fonction des adipocytes. Les adipocytes peuvent se différencier à partir de préadipocytes, de cellules souches mésenchymateuses, de fibroblastes, et de cellules vasculaires stromales. Par contre, les meilleurs modèles à utiliser pour avoir une population de cellules homogènes

et une différenciation adéquate restent les lignées cellulaires de préadipocytes (Otto et Lane, 2005). Il est aussi possible d'effectuer des cultures primaires, donc d'utiliser directement le tissu adipeux d'animaux ou d'humains et d'en extraire les préadipocytes.

Une lignée cellulaire de préadipocytes très bien connue et utilisée depuis longtemps est la lignée murine 3T3-L1. Les cellules de cette lignée proviennent de fibroblastes de souris embryonnaire et elles possèdent les 3 caractéristiques principales des adipocytes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de stocker des lipides, ce sont des cellules endocrines, et elles sont sensibles à l'insuline (Gregoire *et al.*, 1998; Otto et Lane, 2005). Elles se différencient lorsqu'elles sont en présence des signaux adéquats.

Les principaux agents de différenciation pour ces cellules sont : l'insuline, la dexaméthasone, et le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (l'IBMX) (Gregoire *et al.*, 1998; Otto et Lane, 2005). L'insuline *via* la voie des kinases phosphoinositol-3 (PI3-K), de la protéine kinase B (PKB/AKT), et de la protéine kinase C (PKC) va induire l'expression de plusieurs gènes et favoriser la captation du glucose par la translocation du transporteur GLUT 4 à la membrane plasmique. L'insuline lie aussi le récepteur à *l'insulin-like growth factor-1* (IGF-1), aidant ainsi le processus de différenciation (Gregoire *et al.*, 1998; Otto et Lane, 2005). La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse qui active donc les récepteurs des glucocorticoïdes en plus de favoriser l'expression de C/EBP $\delta$  et son hétérodimérisation avec C/EBP $\beta$  (Gregoire *et al.*, 1998). Finalement, l'IBMX est un inhibiteur de phosphodiésterases qui bloque la dégradation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) favorisant ainsi son accumulation (Gregoire *et al.*, 1998; Otto et Lane, 2005). Le mélange de ces 3 molécules stimule fortement la différenciation des 3T3-L1, qui exprimeront par la suite des protéines comme la leptine, l'adiponectine, et la *Fatty acid binding protein 4* (FABP4, aP2). AP2 est un transporteur important des acides gras libres dans les adipocytes.

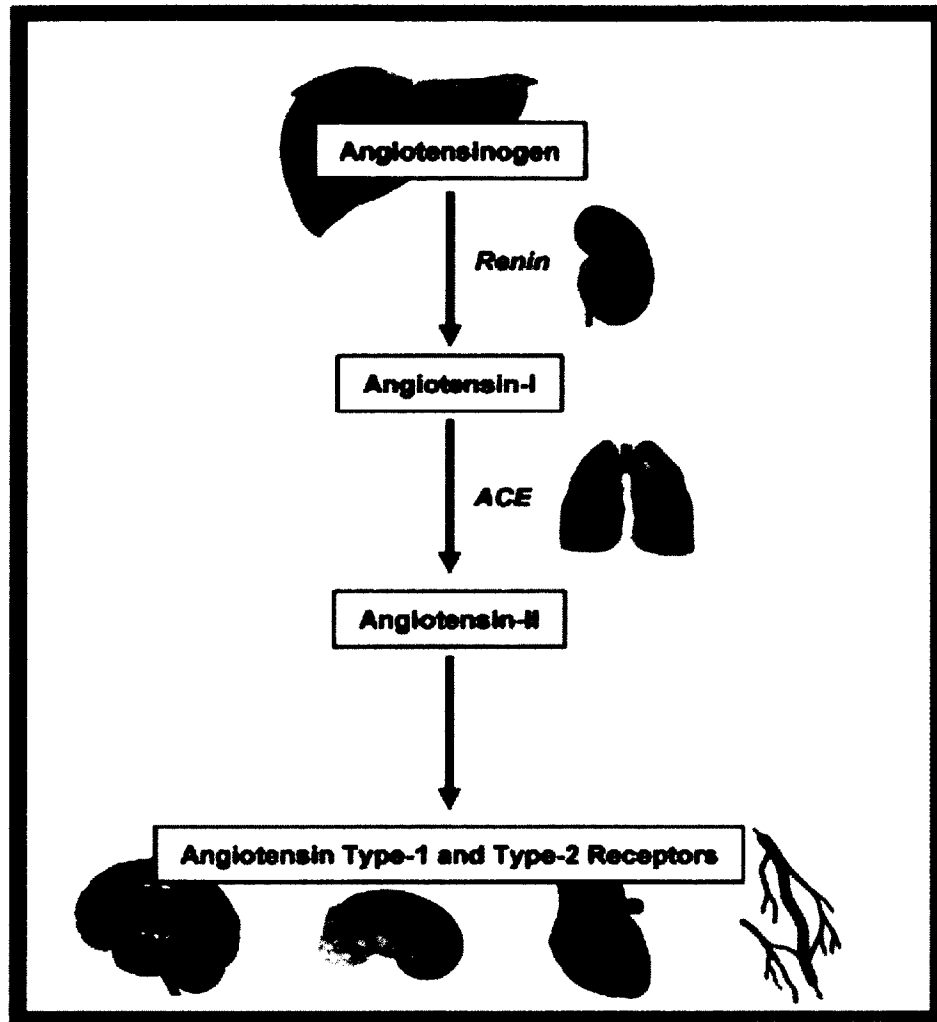
## 1.4 Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine (SRA) influence plusieurs fonctions physiologiques et il est très bien connu pour son implication dans l'équilibre hydrominéral, la fonction cardiovasculaire, et la réponse au stress. (Iwai et Horiuchi, 2009; Olivares-Reyes *et al.*, 2009; de Kloet *et al.*, 2010; Gallo-Payet *et al.*, 2012).

### 1.4.1 La synthèse de l'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est le composé le plus actif du SRA même si d'autres molécules ont aussi des effets physiologiques (Figure 9) (de Kloet *et al.*, 2010; Munoz *et al.*, 2012). La voie classique de la production d'Ang II débute par la synthèse d'angiotensinogène par le foie, qui est ensuite relâchée dans la circulation. Par la suite, l'angiotensinogène est clivée par la rénine, pour produire l'angiotensine I. La rénine est produite et sécrétée par le rein et elle est l'enzyme limitante dans la production de l'Ang II (de Kloet *et al.*, 2010). Finalement, l'angiotensine I est convertie en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), principalement produite par les poumons (Abassi *et al.*, 2009; de Kloet *et al.*, 2010). L'Ang II agit sur plusieurs organes tels les reins, les grandes surrénales, les muscles, le cerveau, et le tissu adipeux (de Gasparo *et al.*, 2000; de Kloet *et al.*, 2010). De plus, différents composés biologiquement actifs peuvent être obtenus par la dégradation de l'Ang II comme l'angiotensine 1-7 et l'angiotensine III (Figure 10) (Schmieder *et al.*, 2007).

En plus du SRA circulant, certains tissus et organes sont maintenant connus pour posséder un SRA tissu spécifique, où tous les intervenants du SRA sont présents. Parmi ces organes, il y a le cœur, le cerveau, le pancréas, et le TAB (de Kloet *et al.*, 2010; Kalupahana et Moustaid-Moussa, 2012). Le TAB est connu pour être un tissu qui produit beaucoup d'angiotensinogène (Engeli *et al.*, 2003).



**Figure 9: Voie classique de la synthèse de l'angiotensine II (Ang II).** L'angiotensinogène produite par le foie est clivée par la rénine, permettant ainsi la production de l'angiotensine I. La rénine est sécrétée par les reins. L'Ang II sera obtenue par le clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), qui est principalement produite par les poumons. L'Ang II va agir sur différents organes *via* ses deux récepteurs, le récepteur AT1 (R-AT1) et le récepteur AT2 (R-AT2). Tiré de de Kloet *et al.*, 2010.

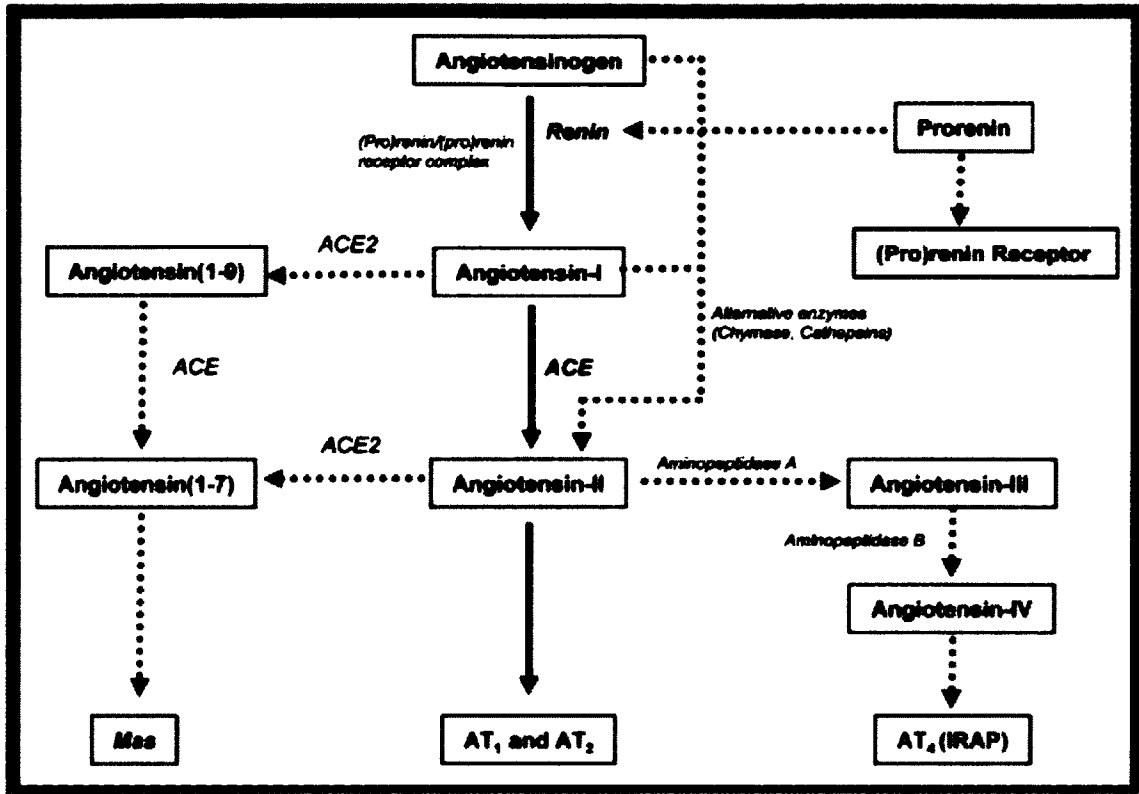


Figure 10: Schéma plus détaillé du système rénine-angiotensine (SRA). L'Ang II est le composé le plus actif de ce système, mais d'autres molécules comme la pro-rénine, l'angiotensine (1-7) (Ang 1-7), et l'angiotensine IV possèdent des récepteurs et jouent un rôle physiologique. Tiré de de Kloet *et al.*, 2010

#### 1.4.2 Les récepteurs de l'Ang II

L'Ang II possède 2 types de récepteurs : les récepteurs AT1 (R-AT1) et AT2 (R-AT2) (Engeli *et al.*, 2003; de Kloet *et al.*, 2010). Ce sont tous les deux des récepteurs couplés aux protéines G et ils possèdent une homologie d'environ 34% (Porrello *et al.*, 2009; Steckelings *et al.*, 2011). Le R-AT1 a été découvert sur les membranes des adipocytes de rat en 1993 par Crandall *et al.* Il est présent de manière ubiquitaire chez l'adulte et plusieurs études montrent que la densité des R-AT1 est beaucoup plus élevée que celle des R-AT2 (Engeli *et al.*, 2003; Steckelings *et al.*, 2010). Chez l'humain, un seul type de R-AT1 a été trouvé et caractérisé, mais chez la souris et le rat il y en a deux : le

R-AT1a et le R-AT1b (de Gasparo *et al.*, 2000). Les deux récepteurs ont des voies de signalisation très similaires, mais ils ont des expressions tissulaires différentes. Le R-AT1a est présent dans le cerveau, les glandes surrénales, les testicules, le foie, le cœur, les ovaires, et le tissu adipeux. Le R-AT1b, est quant à lui, limité au cerveau, aux glandes surrénales, et aux testicules (Kalupahana et Moustaid-Moussa, 2012). La majorité des effets de l'Ang II incluant la vasoconstriction, la rétention de sodium dans le rein, et l'activation sympathique du système nerveux central sont attribués au R-AT1 (Steckelings *et al.*, 2011).

Les actions du R-AT2 sont pour leur part un peu moins bien caractérisées en raison de trois facteurs importants : sa faible expression chez l'adulte comparé au R-AT1, le manque d'outils pharmacologiques sélectifs, et la complexité de ses mécanismes de signalisation qui sont non conventionnels (Steckelings *et al.*, 2011). La plupart des études suggèrent qu'il est très exprimé chez le fœtus et que son expression diminue rapidement après la naissance (Engeli *et al.*, 2003; Porrello *et al.*, 2009). Par contre, des études récentes remettent en question ces observations (Yu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, ). De plus, plusieurs travaux suggèrent qu'il reste présent dans certains organes chez l'adulte tels le cœur, certaines régions du cerveau, les glandes surrénales, et les ovaires (Chiu *et al.*, 1989; de Gasparo *et al.*, 2000; Steckelings *et al.*, 2011). D'autre part, son expression est augmentée dans des conditions pathologiques, comme des dommages tissulaires, des infarctus, des ischémies au cerveau, dans certains cancers hormonaux-dépendants, et dans les maladies cardiovasculaires (Deshayes et Nahmias, 2005; Savoia *et al.*, 2007; Siragy, 2009; Steckelings *et al.*, 2011; Uemura *et al.*, 2008; Unger et Sandmann, 2000). La présence du R-AT2 dans le tissu adipeux n'a pas été démontrée de façon claire. Des études réalisées sur les adipocytes du tissu adipeux humain viscéral et sous-cutané n'ont pas été en mesure de déceler le R-AT2 (Giacchetti *et al.*, 2002). En revanche, une autre étude montre que le rapport R-AT1/R-AT2 augmente lors de la différenciation des adipocytes du tissu adipeux sous-cutané humain en culture (Crandall *et al.*, 1999; Schling, 2002). Qui plus est, le R-AT2 a été identifié dans les cellules 3T3-L1 (Weiland et



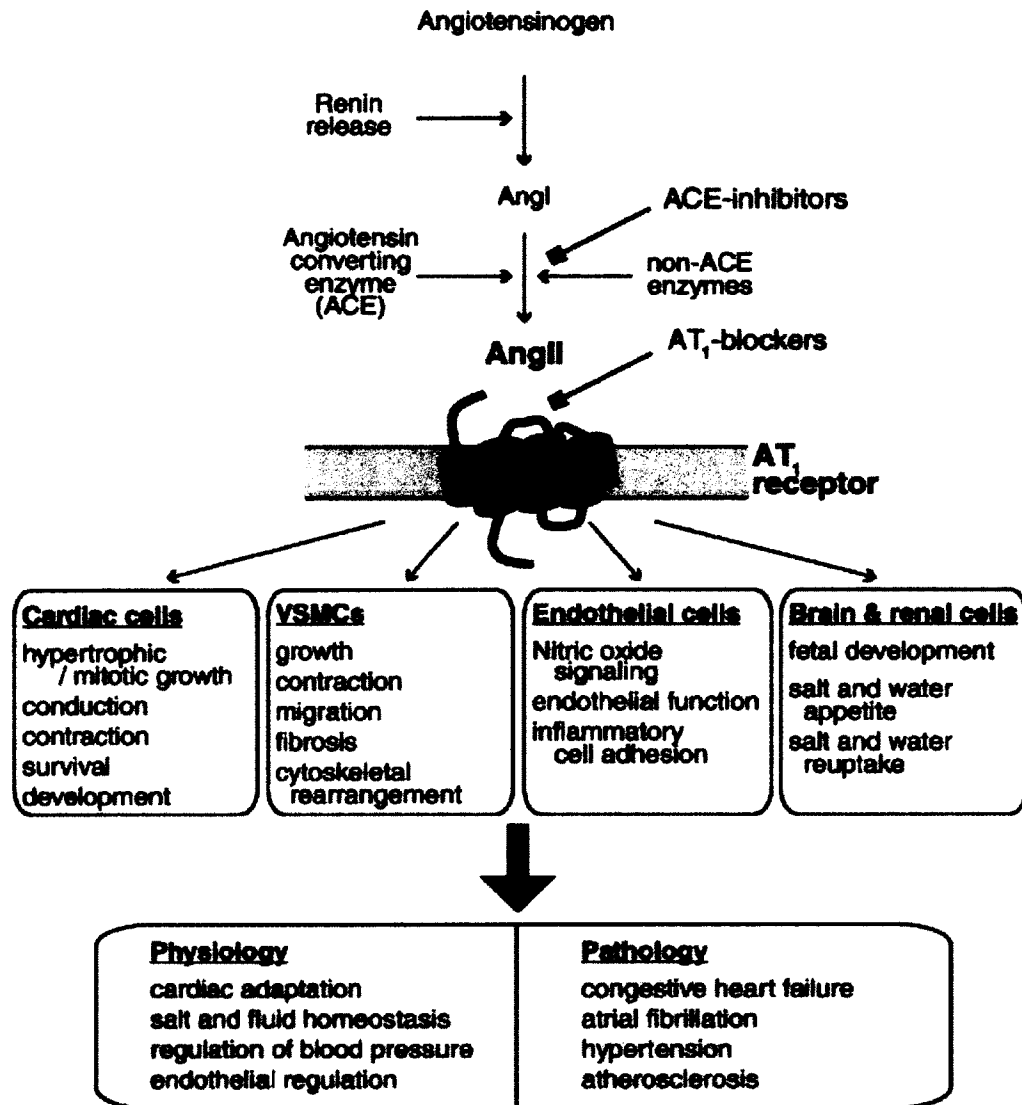
Verspohl, 2008). Certaines études indiquent que l'expression des R-AT2 et AT1 dans le tissu adipeux est contrôlée par la nutrition et certaines hormones (Jones *et al.*, 1997; Safonova *et al.*, 1997; Gorzelnik *et al.*, 2002). De plus, le R-AT2 est augmenté dans les artères de patients hypertendus et dans les cardiomyocytes suite à un infarctus (Steckelings *et al.*, 2005; Savoia *et al.*, 2007). Finalement, des études très récentes (publiées durant la rédaction de ce mémoire) ont montré que le R-AT2 est impliqué dans l'adipogenèse et que ce récepteur varie lors de la différenciation cellulaire dans des modèles *in vivo* de résistance à l'insuline (Ohshima *et al.*, 2012; Shum *et al.*, 2013)

#### **1.4.2.1 Les rôles du R-AT1**

Le R-AT1 est connu pour son effet sur la régulation de la pression artérielle et sur l'équilibre hydrominéral. Par contre, lorsqu'il est stimulé en excès, il est associé à la dysfonction endothéliale, à l'hypertrophie cardiaque, à la résistance à l'insuline, et au syndrome métabolique (Figure 11) (Aplin *et al.*, 2008). L'activation du R-AT1 a plusieurs effets au niveau cellulaire, tels l'augmentation de la vasoconstriction, de la prolifération cellulaire, de l'hypertrophie, et de la production de résidus oxygénés libres (Unger et Sandmann, 2000; Hunyady et Catt, 2006; Aplin *et al.*, 2008). Il agit autant au niveau du système nerveux central qu'en périphérie (de Gasparo *et al.*, 2000).

Les effets du R-AT1 sur le TAB sont aussi bien décrits. Plusieurs études réalisées sur des adipocytes en culture et des modèles *in vivo* montrent que l'Ang II *via* le R-AT1 augmente l'expression de la leptine, la taille du tissu adipeux, l'accumulation lipidique, et la relâche d'adipokines pro-inflammatoires (Crandall *et al.*, 1999; Saint-Marc *et al.*, 2001; Skurk *et al.*, 2004; Lumeng *et al.*, 2007; Tomono *et al.*, 2008). Par exemple, il est possible d'observer une augmentation du contenu lipidique des adipocytes matures humains ainsi qu'une diminution de la différenciation adipocytaire avec un traitement à l'Ang II (Janke *et al.*, 2002).

Des bloqueurs du R-AT1 (BRA) sont utilisés pour traiter les complications telles l'hypertension et les néphropathies due à l'obésité et au diabète de type 2. L'utilisation des BRA est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion d'adiponectine en plus d'améliorer la dysfonction endothéliale (Furuhashi *et al.*, 2004; Hunyady et Catt, 2006; Lee *et al.*, 2008; Munoz *et al.*, 2009). L'utilisation du valsartan diminue l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux de souris soumis à un régime riche en gras et diminue la taille des adipocytes chez des rats diabétiques de type 2 (Cole *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2007). Les effets de l'utilisation des BRA peuvent être en partie expliqués par le blocage du R-AT1, mais aussi par l'activation plus importante du R-AT2 par l'Ang II, le seul disponible dans ces situations (Goossens *et al.*, 2007; Unger *et al.*, 2008; Lemarié et Schiffrin, 2010; Steckelings *et al.*, 2010).



**Figure 11: Effets physiologiques du récepteur AT<sub>1</sub> (R-AT<sub>1</sub>).** Le R-AT<sub>1</sub> a plusieurs rôles sur différents types cellulaires. Les effets du R-AT<sub>1</sub> peuvent être inhibés par les bloqueurs du R-AT<sub>1</sub> (BRA), Tiré de Aplin *et al.*, 2008.

#### 1.4.2.2 Les rôles du R-AT<sub>2</sub>

Les effets associés à l'activation du R-AT<sub>2</sub> sont en général opposés à ceux observés par l'activation du R-AT<sub>1</sub>, c'est-à-dire qu'ils induisent une augmentation de la vasodilatation, de la différenciation cellulaire ainsi qu'une diminution de la prolifération

cellulaire et de l'inflammation (Gendron *et al.*, 2003; Porrello *et al.*, 2009; Steckelings *et al.*, 2011; Gallo-Payet *et al.*, 2012). Son activation a donc pour effet de contrecarrer les effets délétères associés à une stimulation trop forte du R-AT1. Il est bien admis que le R-AT2 est associé à la stimulation de la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), *via* la stimulation de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la production du monoxyde d'azote (NO), ce qui est fortement associé à la vasodilatation et la relaxation des artères et des vaisseaux (Gohlke *et al.*, 1998; Carey *et al.*, 2001; Widdop *et al.*, 2003; Savoia *et al.*, 2006; Verdonk *et al.*, 2012). En outre, le R-AT2 diminue la prolifération des adipocytes notamment en inhibant les voies de signalisation des facteurs de croissance comme l'EGF et l'insuline par l'activation des phosphatases (Elbaz *et al.*, 2000; Shibasaki *et al.*, 2001; Verdonk *et al.*, 2012). L'activation du R-AT2 pourrait aussi être impliquée dans l'apoptose de certains types cellulaires, mais les évidences le suggérant proviennent seulement d'études *in vitro* et non *in vivo* (Gendron *et al.*, 2003; Porrello *et al.*, 2009; Steckelings *et al.*, 2010).

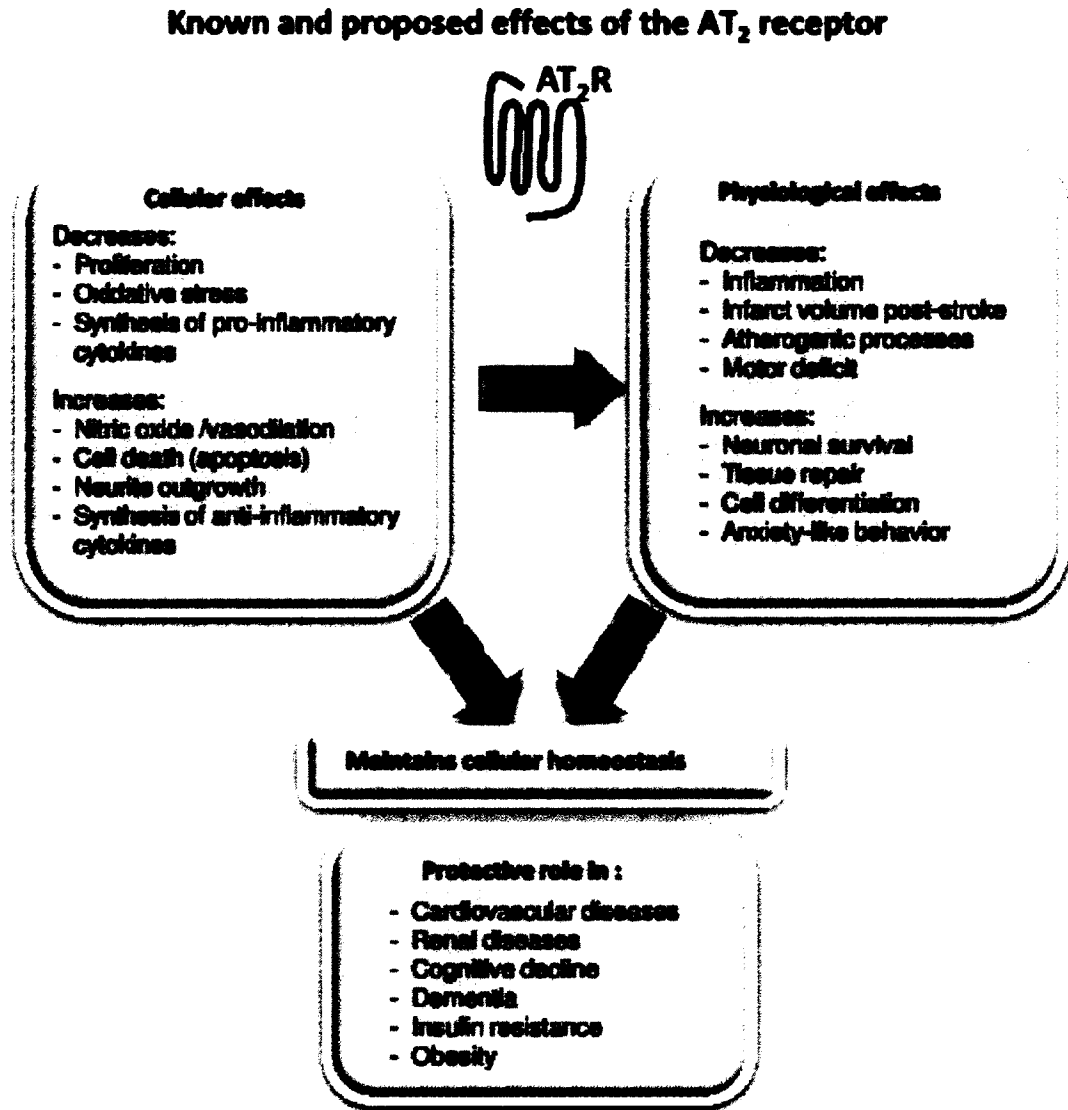
Toutes les études réalisées sur le R-AT2 ne sont pas concordantes. Ainsi, certaines études suggèrent que l'activation du R-AT2 pourrait amplifier les effets du R-AT1 (D'Amore *et al.*, 2005), contrairement à la plupart des études qui prônent l'inverse (Reudelhuber, 2005; Porrello *et al.*, 2009). Par exemple, une étude D'Amore *et al.* suggère que l'activation du R-AT1 augmente l'hypertrophie des cardiomyocytes et que l'activation du R-AT2 au lieu de la diminuer, vient l'amplifier (D'Amore *et al.*, 2005; Porrello *et al.*, 2009). L'effet antiprolifératif du R-AT2 est lui aussi controversé (Porrello *et al.*, 2009).

D'autre part, l'expression élevée du R-AT2 dans la période foetale suggère que ce récepteur pourrait jouer un rôle important dans la régulation du développement. Ainsi, l'activation du R-AT2 stimule l'élongation neuritique dans des lignées cellulaires neuronales (Gendron *et al.*, 2003; Mogi *et al.*, 2006) et il semble aussi impliqué dans la différenciation des cellules pancréatiques (Leung *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le tissu adipeux, les résultats diffèrent, encore une fois, selon les études (Goossens *et al.*, 2003; Lenz et Fornoni, 2008; Iwai et Horiuchi, 2009; Olivares-Reyes *et al.*, 2009). Étant donné la faible densité du R-AT2 en condition basale et des différences dans les protocoles expérimentaux, il est difficile de connaître l'implication réelle du R-AT2. Deux approches semblables ayant utilisé des souris invalidées pour le R-AT2 ont donné des conclusions différentes. La première étude suggère que l'inactivation du R-AT2 chez des souris athérosclérotiques diminue la différenciation notamment en diminuant le nombre d'adipocytes fonctionnels et en augmentant la taille du tissu adipeux. Ces résultats sont observés lorsque les souris sont soumises à une diète riche en cholestérol (Iwai *et al.*, 2009). La deuxième étude suggère que cette même inactivation augmente le nombre de petits adipocytes et diminue la taille du tissu adipeux. Ces résultats sont aussi significatifs sous diète riche en gras (Yvan-Charvet *et al.*, 2005). Par contre, dans les deux cas, les marqueurs de la différenciation fonctionnelle tels PPAR $\gamma$ 2 et aP2 sont diminués. Dans le premier article, les auteurs concluent que le R-AT2 est important pour la différenciation et qu'il est nécessaire pour avoir un tissu adipeux fonctionnel et sain. Les auteurs du second article concluent que le R-AT2 est impliqué dans la différenciation, mais qu'il a un effet néfaste puisque les souris invalidées pour ce récepteur sont protégées contre la prise de poids. Par contre, en condition de surcharge lipidique, si ce ne sont pas les adipocytes qui emmagasinent les lipides, il y aura une accumulation des lipides dans les tissus non adipeux, ce qui va mener à un dysfonctionnement de ces derniers et à de la lipotoxicité. De plus, des adipocytes qui ne peuvent augmenter ou diminuer leur taille en fonction des conditions physiologiques indiquent qu'ils peuvent être qualifiés de dysfonctionnels.

Le R-AT2 pourrait aussi être impliqué dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Plusieurs études effectuées avec des modèles de rats et de souris indiquent que l'utilisation de BRA augmente le nombre d'adipocytes et leur différenciation en plus d'augmenter la sécrétion d'adiponectine. Dans ces études, l'expression du R-AT2 est

aussi augmentée et elle est associée à une diminution de l'expression d'adipokines pro-inflammatoires (Furuhashi *et al.*, 2004; Clasen *et al.*, 2005; Di Filippo *et al.*, 2005; Zorad *et al.*, 2006; Tomono *et al.*, 2008). Puisque l'utilisation des BRA est liée à une plus grande activation du R-AT2 par l'Ang II, les effets des BRA pourraient être en partie dus au R-AT2. La figure suivante illustre les effets connus et proposés du R-AT2 (Figure 12).



**Figure 12: Effets connus et proposés du récepteur AT<sub>2</sub> (R-AT<sub>2</sub>).** Le R-AT<sub>2</sub> a plusieurs effets au niveau cellulaire et physiologique qui influence l'homéostasie cellulaire. Certains sont bien connus tandis que d'autres sont plutôt proposés. L'activation du R-AT<sub>2</sub> est associée à un rôle protecteur dans plusieurs pathologies. Tiré de Gallo-Payet *et al.*, 2011

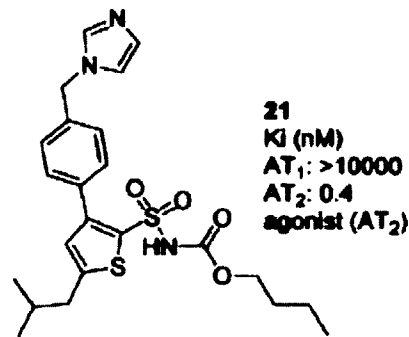
#### 1.4.2.3 Outils pour étudier le R-AT<sub>2</sub>

Par le passé, les études sur le R-AT<sub>2</sub> étaient assez limitées et les résultats obtenus souvent contradictoires (Steckelings *et al.*, 2010). La principale limitation pour

l'étude du R-AT2 est associée au fait qu'il existait sur le marché très peu de ligands sélectifs pour ce récepteur (CGP42112A (agoniste), PD123319 (antagoniste), PD123317 (antagoniste qui n'est plus disponible)), comparativement au R-AT1 qui lui, en possède plusieurs, notamment en ce qui concerne les antagonistes (losartan, candersartan, valsartan, telmisartan). De plus, l'agoniste CGP42112A agit comme un antagoniste lorsqu'il est utilisé à fortes concentrations. Par ailleurs, sa nature peptidique en fait un outil difficilement utilisable pour les études *in vivo* (Gallo-Payet *et al.*, 2012; Steckelings et Unger, 2012; Verdonk *et al.*, 2012). Par conséquent, en plus des études utilisant le CGP42112A, des études indirectes ont été réalisées soit en inactivant ou en surexprimant le R-AT2, soit en effectuant des traitements pharmacologiques en combinant l'Ang II et un BRA. Par contre, étant donné que plusieurs métabolites de l'Ang II ont été identifiés et qu'ils sont maintenant connus pour avoir eux aussi des effets, il est difficile d'associer les effets d'un cotraitement aux BRA et à l'Ang II uniquement au R-AT2, et ce, même si les BRA augmentent l'activation de ce récepteur (Goossens *et al.*, 2007; Steckelings *et al.*, 2010).

En 2004, notre groupe de recherche en collaboration avec celui d'Anders Hallberg a synthétisé et caractérisé un nouvel agoniste spécifique pour le R-AT2, le M24 aussi appelé le composé 21 (C21) (Figure 13). C'est un composé ayant une très forte affinité pour le R-AT2 avec une constante de dissociation de 0.4 nM (Wan *et al.*, 2004). De plus, tout récemment, le groupe a synthétisé plusieurs antagonistes du R-AT2. Les études en cours indiquent que l'un d'entre eux sera intéressant pour remplacer le PD123319 (Guimond *et al.*, 2012; Murugaiah *et al.*, 2012).





**Figure 13: Structure de l'agoniste non peptidique M24 (C21).** L'agoniste spécifique du R-AT<sub>2</sub>, le M24 aussi appelé le C21, possède une très forte affinité pour le R-AT<sub>2</sub> (0.4 nM) mais très peu pour le R-AT<sub>1</sub> (>1000 nM). K<sub>i</sub>, constante de dissociation. Tiré de Wan *et al.*, 2004

Les premières études réalisées avec le M24 ont montré qu'il induisait une augmentation de l'élongation neuritique des cellules NG108-15 en activant de manière soutenue la voie P42/P44<sup>MAPK</sup> (Wan *et al.*, 2004). Une diminution de la prolifération de ces cellules a aussi été observée suite à un traitement au M24. De plus, un traitement au M24 chez des rats hypertendus est associé à une diminution de la pression artérielle (Wan *et al.*, 2004; Gelosa *et al.*, 2009; Bosnyak *et al.*, 2010). Plus récemment, des études indiquent qu'un traitement au M24 diminue l'inflammation dans des cultures primaires de fibroblastes et dans un modèle de rat (Kaschina *et al.*, 2008; Rompe *et al.*, 2010).

Plusieurs études ayant utilisé le M24 ont été publiées dans les dernières années, dont onze en 2011 (Kaschina *et al.*, 2008; Gelosa *et al.*, 2009; Gao et Zucker, 2011; Jehle *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2012). Neuf d'entre elles montraient des effets bénéfiques et deux suggéraient des effets non bénéfiques ou une absence d'effet. Les différentes études ont parfois révélé des résultats diamétralement opposés, suggérant que même avec un agoniste très sélectif, les effets du R-AT<sub>2</sub> demeurent difficiles à identifier.

Ainsi, l'un des résultats très controversé est l'implication du R-AT2 dans le remodelage du ventricule gauche suite à un infarctus du myocarde. La première étude parue sur le sujet a été réalisée en 2008 par Kaschina *et al.* Cette étude montre que suite à un infarctus du myocarde chez des rats Wistar, un traitement au M24, débutant 24h après l'infarctus, à 0.3mg/kg/par jour pendant 7 jours améliore la fonction systolique et diastolique du ventricule gauche. Cette amélioration passerait par des mécanismes anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Kaschina *et al.*, 2008). De plus, une diminution de la taille de la cicatrice a été observée. D'un autre côté, l'étude publiée en 2012 par Jehle *et al.* montre qu'un traitement similaire chez des souris ayant subi un infarctus du myocarde n'est pas associé à une amélioration du ventricule gauche. Ces derniers ont réalisé l'expérience avec des souris en utilisant le même traitement, soit une dose de 0.3mg/kg/par jour, mais sur une période de 28 jours. Un des résultats obtenus était une détérioration du remodelage du ventricule gauche suite au M24 représenté par une augmentation du volume d'éjection à la fin de la systole et de la diastole (Jehle *et al.*, 2012). Les auteurs suggèrent donc que, contrairement à l'étude de Kaschina *et al.*, l'utilisation du M24 suite à un infarctus du myocarde chez des souris n'est pas associée à une amélioration du remodelage du ventricule gauche. Les différences entre leurs résultats et ceux de Kaschina *et al.* peuvent s'expliquer par un modèle et un protocole expérimental différent. Par contre, une autre étude parue récemment dans le journal *Hypertension* semble appuyer en partie celle de Kaschina *et al.*, puisqu'eux aussi suggèrent des effets bénéfiques sur le remodelage de la matrice extracellulaire suite à un traitement au M24 chez des rats hypertendus (Rehman *et al.*, 2012).

D'autre part, deux études récentes utilisant deux modèles différents de résistance à l'insuline concluent à un effet bénéfique d'un traitement au M24 par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'une des études provient de notre groupe, qui a utilisé des rats soumis à 6 semaine de diète riche en fructose et riche gras (Shum *et al.*, 2013). L'autre groupe a utilisé des souris génétiquement résistance à l'insuline (Ohshima *et al.*, 2012 ).

Une autre méthode pour étudier le R-AT2 est d'utiliser des animaux transgéniques où le R-AT2 est surexprimé ou inactivé. Il existe deux modèles de souris invalidées pour le R-AT2 et deux modèles avec une surexpression du récepteur pour l'étude au niveau cardiovasculaire. Les études effectuées avec ces modèles ont donné beaucoup de résultats opposés (Avila *et al.*, 2011; Verdonk *et al.*, 2012). Pour l'étude sur le tissu adipeux, 2 groupes ont généré des souris invalidées pour le R-AT2 et les résultats, qui étaient opposés ont été présentés dans la section précédente (Yvan-Charvet *et al.*, 2005; Iwai *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.4 Les voies de signalisation des R-AT1 et R-AT2

Les deux récepteurs de l'Ang II sont des récepteurs couplés aux protéines G. Le R-AT1 est principalement couplé à  $G_{\alpha_q/11}$ , mais aussi à  $G_{\alpha_{12/13}}$  et à  $G_{i/o}$ . La première voie de signalisation activée par le R-AT1 est la voie  $G_{\alpha_q/11}/IP3/Ca^{2+}$  (Figure 14) (Touyz et Schiffrin, 2000; Hunyady et Catt, 2006). Par l'activation de la sous-unité  $G_{i/o}$ , le R-AT1 inhibe l'adénylyl cyclase (AC) dans certains tissus comme le foie et les reins (de Gasparo *et al.*, 2000). La phospholipase C (PLC) est activée suite à l'interaction avec la sous-unité  $G_q$ . D'autre part, le R-AT1 active aussi d'autres voies telles les voies des  $\beta$ -arrestines et de Jak/STAT sont activés par les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G ou par les échaffaudages protéiques présents dans les vésicules d'internalisations du complexe hormone-récepteur. Le R-AT1 se lie aussi à des protéines partenaires comme les *AT1 receptor-associated protein* (ATRAP et ARAP) qui peuvent elles aussi jouer un rôle dans les mécanismes d'action et avoir des effets physiologiques (Figure 15) (Hunyady et Catt, 2006; Mori *et al.*, 2007).

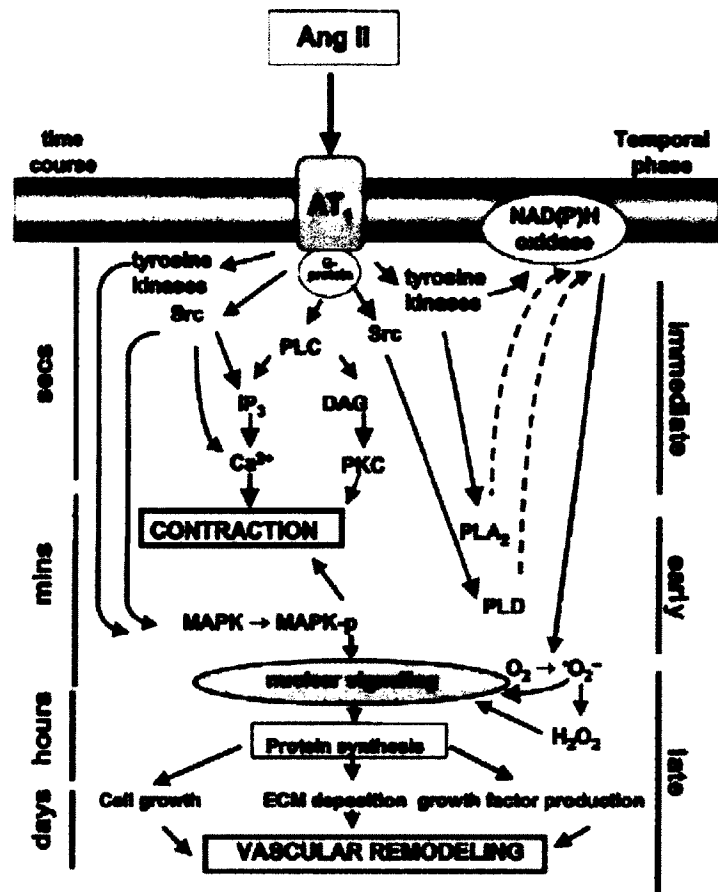
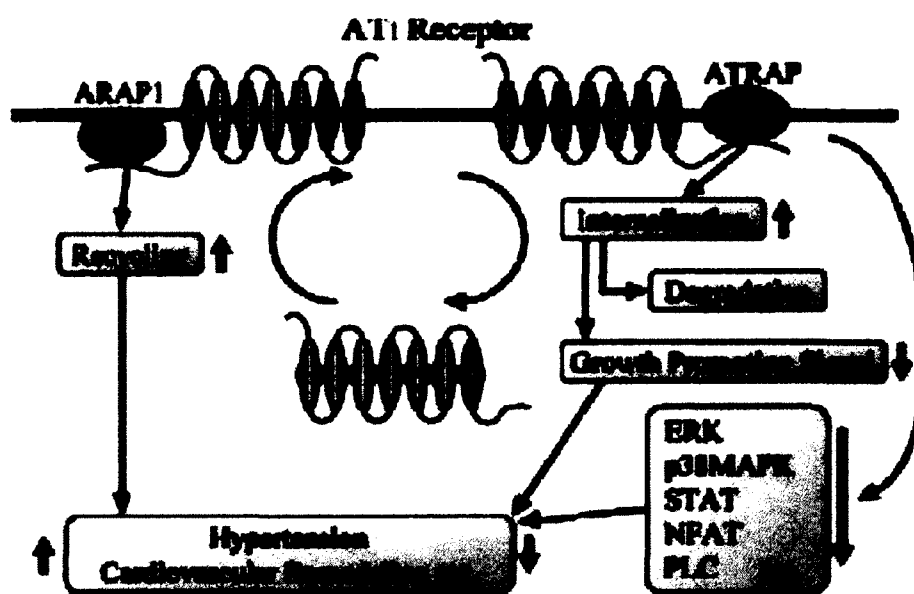


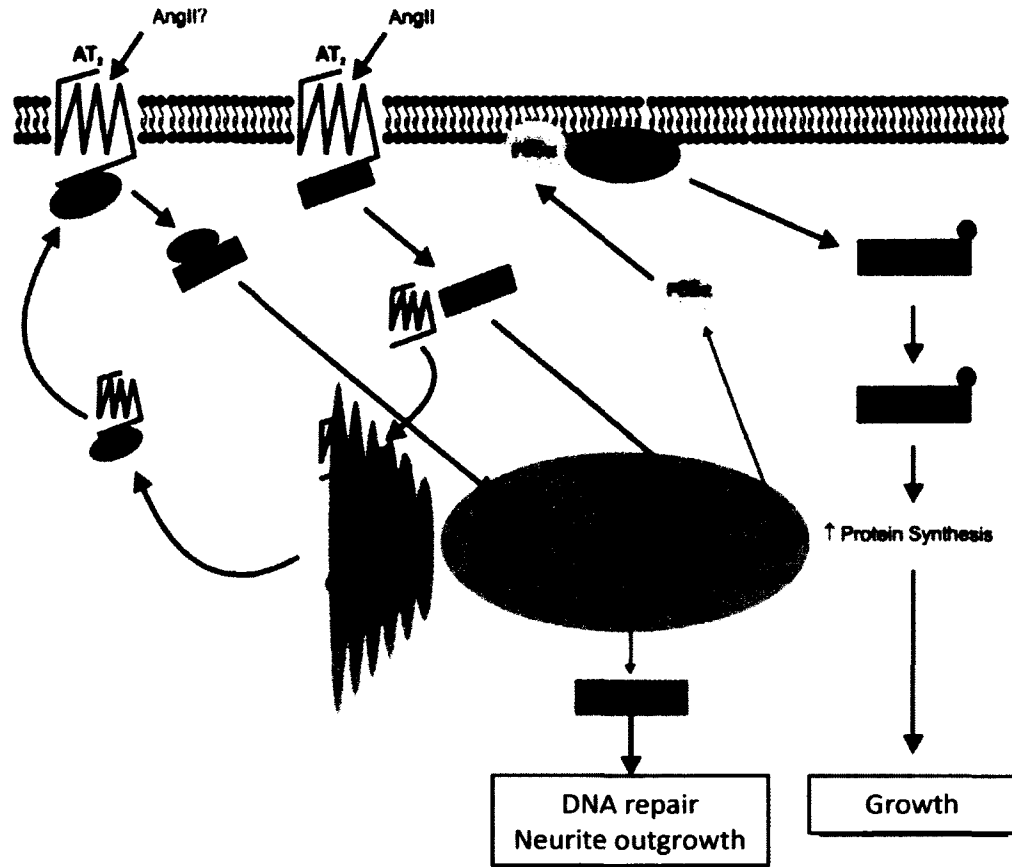
Figure 14: Voies de Signalisation du R-AT<sub>1</sub> par la protéine G. L'activation du R-AT<sub>1</sub> active en premier lieu la PLC et Src. En une seconde étape, PLA<sub>2</sub>, PLD, les tyrosines kinases, et les MAPK sont activées. La production de résidus oxygénés libres et la synthèse protéique se produisent dans les heures qui suivent la liaison hormone-récepteur. Tiré de Touyz et Schiffrin, 2000.



**Figure 15: Rôles des protéines d'échaffaudages liées au R-AT1.** ATRAP se lie au domaine C-terminal du récepteur et favorise son internalisation. Il peut agir comme un régulateur négatif du R-AT1. ARAP 1 est quant à lui associé au recyclage de R-AT1. Tiré de Mogi *et al.*, 2007.

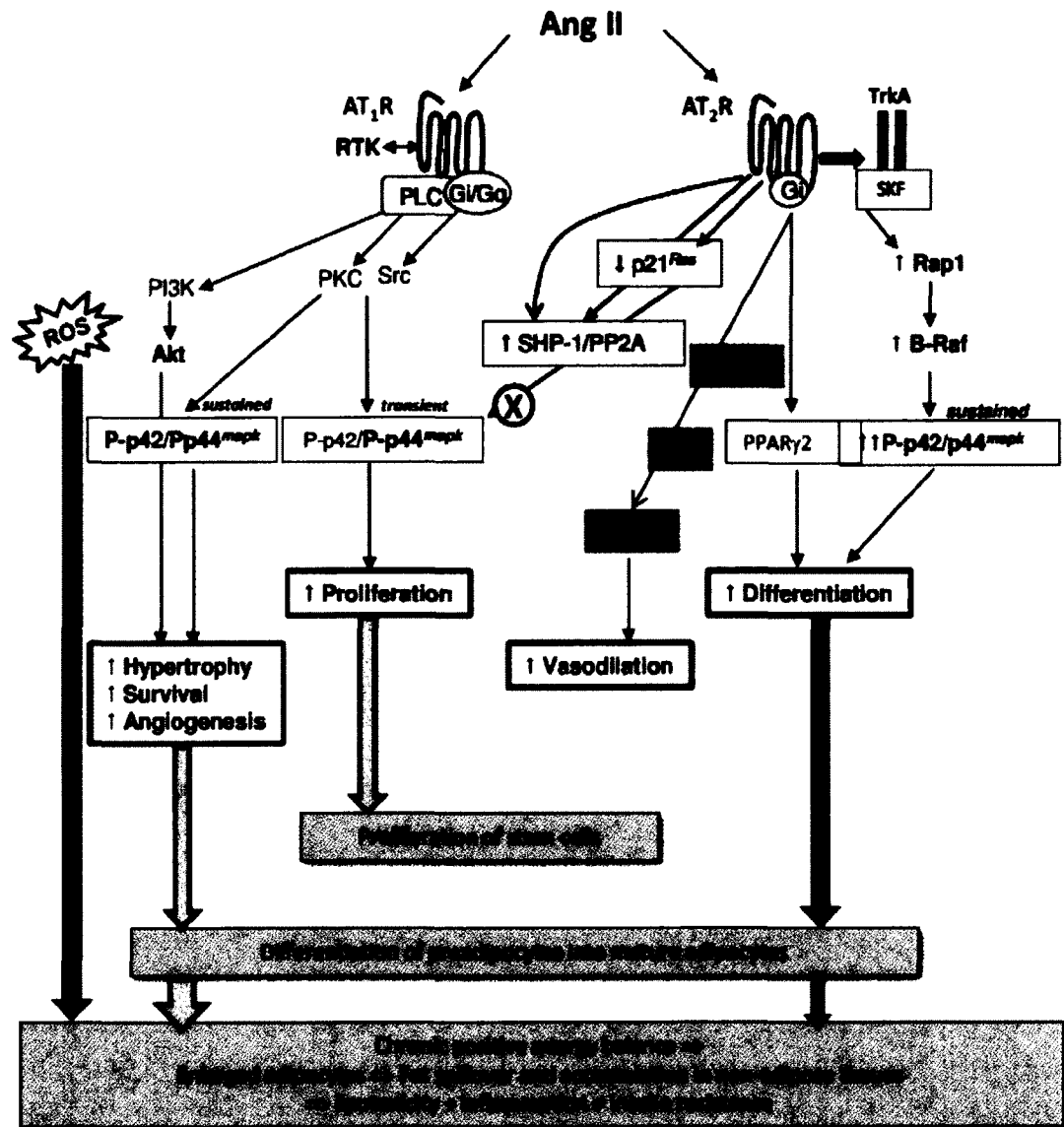
En ce qui concerne le R-AT2, malgré le nombre important de publications, les mécanismes de signalisation demeurent plus ou moins clairs. Le R-AT2 semble avoir des voies de signalisation très complexes qui peuvent varier dépendamment de l'environnement intracellulaire et des conditions physiologiques. Les principaux effets du R-AT2 sont liés à l'activation de voies phosphatases et kinases ainsi qu'à la production de NO/GMPc. De plus, certains effets du R-AT2 sont liés à l'activation de la protéine  $G_{\alpha i}$ , notamment par l'activation de NOS (Gendron *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Roberge *et al.*, 2007; Porrello *et al.*, 2009; Gallo-Payet *et al.*, 2012). Des études montrent aussi que le R-AT2 pourrait interagir avec le récepteur de la bradykinine et augmenter la production de NO en plus d'activer le GMPc (Gohlke *et al.*, 1998; Searles et Harrison, 1999; Porrello *et al.*, 2009).

L'interaction entre le R-AT2 et les phosphatases des MAPK est assez bien connue. Le R-AT2 semble interagir avec 3 phosphatases spécifiques : *SH2 domain-containing phosphatase 1* (SHP-1), *MAPK phosphatase 1* (MKP-1) et *protein phosphatase 2A* (PP2A) (Porrello *et al.*, 2009). L'activation de ses phosphatases est connu pour diminuer la prolifération cellulaire et l'inflammation, mais favoriser l'apoptose (Porrello *et al.*, 2009; Guimond et Gallo-Payet, 2012; Verdonk *et al.*, 2012). Par exemple, le R-AT2, via l'activation de MKP-1, induit l'apoptose des cellules PC12W en déphosphorylant le *B-cell lymphoma 2* (Horiuchi *et al.*, 1997). De plus, l'activation de SHP-1 par le R-AT2 est associé à l'arrêt de prolifération de plusieurs type cellulaire, incluant les cellules neuronales et vasculaires lisses (Shibasaki *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). D'autre part, l'activation de PP2A augmente la migration neuronale (Kilian *et al.*, 2008). Finalement, le R-AT2 possède lui aussi des protéines partenaires qui ont un rôle dans ses mécanismes d'action. Les deux plus connues sont *promyelocytic zinc finger protein* (PLZF) et la protéine interagissant avec le R-AT2 (ATIP), aussi appelé ATBP. ATIP serait nécessaire pour l'internalisation du R-AT2 et il diminuerait l'activité d'ERK en plus d'affecter l'expression de *methane methylsulfonate-sensitive 2* (MMS2), une protéine impliqué dans le système ubiquitine-protéasome (Figure 16) (Porrello *et al.*, 2009). Cela aurait pour effet de stimuler l'élongation neuritique (Li *et al.*, 2007)



**Figure 16: Rôles des protéines d'échaffaudages liées au R-AT2.** La protéine ATIP interagit avec le domaine C-terminal du R-AT2 et est impliquée dans la translocation du récepteur de la membrane de l'appareil de Golgi à la membrane cellulaire. L'activation du R-AT2 induit l'hétérodimérisation du complexe ATIP/SHP-1 et son internalisation, puis le transfert au noyau où il favorise la transcription de l'enzyme MMS2. MMS2 va ensuite permettre la réparation de l'ADN et favoriser l'élongation neuritique (Li *et al.*, 2007). PLZF, une autre protéine liée au R-AT2, est un facteur de transcription qui transloque au noyau suite à l'activation du R-AT2. Il est impliqué dans la transcription de la sous-unité p85 $\alpha$ , un régulateur de la kinase phosphatidylinositol-3 (PI3K) qui joue un rôle dans la croissance et l'hypertrophie cellulaire. Adapté de Porrello *et al.*, 2009.

Finalement, de récentes études suggèrent que les R-AT1 et AT2 pourraient s'hétérodimériser, ce qui conduirait à des effets différents de ceux observés lors de l'activation d'un des 2 récepteurs (Porrello *et al.*, 2009; Funke-Kaiser *et al.*, 2010). La figure 17 présente un résumé des voies de signalisation activées par le R-AT2.



**Figure 17: Voies de signalisation connus du R-AT2.** Du côté gauche du schéma, l'Ang II peut agir par le R-AT1 en activant les sous-unités G<sub>i</sub>/G<sub>q</sub> des protéines G et la phospholipase C (PLC), ce qui va mener à l'activation des inositol phosphates (InsPs) et du diacylglycérol (DAG). L'activation du R-AT1 mène aussi à l'activation des voies des MAPK, p42/p44<sup>MAPK</sup>. Du côté droit du schéma, l'activation du R-AT2 inactive rapidement p21<sup>ras</sup> et PKCα due à l'activation de la phosphatase SHP-1. L'oxyde nitrique (NO) et le GMPc sont activés en partie par la sous G<sub>ai</sub>, mais aussi peut-être par l'hétérodimérisation avec le récepteur de la bradykinine. Tiré de Gallo-Payet *et al.*, 2011.



### 1.4.3 Rôles du SRA dans l'obésité et le syndrome métabolique

En excès, l'Ang II est non seulement impliquée dans l'hypertension, mais elle semble aussi être impliquée dans le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline, ce qui pourrait fournir un lien entre tous les effets observés dans le syndrome métabolique (Yvan-Charvet et Quignard-Boulangé, 2010). Comme il a été mentionné précédemment, l'Ang II, via le R-AT1, favorise la résistance à l'insuline et le blocage de ce récepteur est associé à une amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion de certaines adipokines (Clasen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; de Kloet *et al.*, 2010). L'amélioration de la sensibilité à l'insuline augmente la captation du glucose dans le muscle squelettique et le TAB en activant GLUT 4 et en augmentant le flot sanguin (Iwai et Horiuchi, 2009). Le SRA semble aussi être associé à la régulation du poids, puisque des études montrent que lors d'une perte de poids, l'activité du SRA est diminuée (Engeli *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation des BRA ou d'inhibiteur d'ACE sur des animaux mène à un phénotype plus mince (de Kloet *et al.*, 2010).

L'Ang II est aussi associée à une augmentation des molécules pro-inflammatoires et angiogéniques, deux marqueurs qui sont associés à l'obésité et au syndrome métabolique (de Kloet *et al.*, 2010; Yvan-Charvet et Quignard-Boulangé, 2010). Encore une fois, ces effets sont associés au R-AT1, tandis que le R-AT2 a plutôt des effets anti-inflammatoires et anti-angiogéniques (de Gasparo *et al.*, 2000; Steckelings *et al.*, 2005; Jing *et al.*, 2012). Une étude réalisée avec des patients souffrant d'hypertension et ayant un taux d'IL-6 élevé montre que l'utilisation d'un BRA diminue les niveaux d'IL-6 (Kintscher *et al.*, 2010).

Comme mentionné précédemment, les adipocytes sécrètent de l'Ang II qui peut jouer un rôle sur la sécrétion des autres adipokines. Par exemple, l'Ang II augmente la sécrétion de la leptine, mais diminue celle de l'adiponectine, ce qui est associé à une

diminution de la sensibilité à l'insuline (de Kloet *et al.*, 2010). D'autre part, l'Ang II semble plutôt favoriser le stockage de l'énergie. En effet, une étude parue en 1996 montre que l'Ang II augmente la lipogenèse dans les cellules 3T3-L1 et dans les adipocytes humains (Jones *et al.*, 1997). Par contre, des études montrent que l'Ang II injectée directement dans le cerveau semblerait favoriser la dépense énergétique. De plus, dans le tissu adipeux brun l'Ang II semble favoriser la thermogenèse (de Kloet *et al.*, 2010). Finalement, l'Ang 1-7 et le récepteur MAS semblent avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme. Des souris invalidées pour le récepteur MAS ont une obésité abdominale plus élevée, une dyslipidémie, et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Santos *et al.*, 2008). Toutes ses études montrent que le SRA est impliqué dans l'homéostasie énergétique en ayant principalement des effets délétères, mais il peut aussi avoir certains effets bénéfiques.

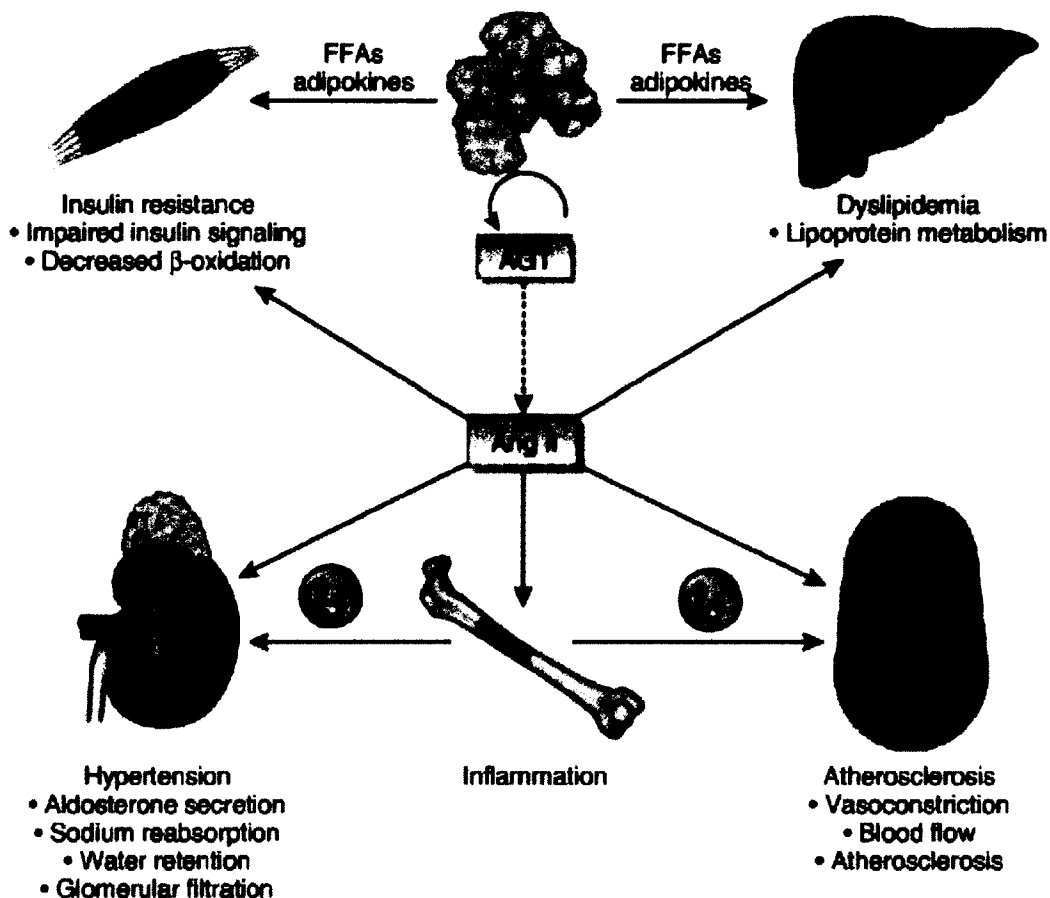
En ce qui concerne le rôle de l'Ang II lors de l'adipogenèse, les études sont controversées. Une étude montre que la surexpression de l'angiotensinogène chez des souris diminue le nombre d'adipocytes suggérant une inhibition de la différenciation adipocytaire par l'Ang II (Yvan-Charvet *et al.*, 2009). Une autre étude montre que la co-culture d'adipocytes matures et de préadipocytes inhibe la différenciation de ces derniers, et que cet effet est dû à l'Ang II sécrétée par les adipocytes matures (Janke *et al.*, 2002). De plus, les mêmes auteurs suggèrent que les BRA favorisent l'adipogenèse des préadipocytes humains en culture (Janke *et al.*, 2006). Par contre, il a été montré que l'angiotensinogène était augmentée lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 et que l'inhibition de l'angiotensinogène était associée à une diminution de la différenciation des préadipocytes (Safonova *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 2010). De plus, une étude réalisée chez des souris montre que l'utilisation d'irbesartan, un BRA, diminue la différenciation adipocytaire (Di Filippo *et al.*, 2005). D'un autre côté, une étude montre que l'inactivation du R-AT2 chez des souris diminue des facteurs impliqués dans l'adipogenèse, tels PPAR $\gamma$ 2 et C/EBP (Iwai *et al.*, 2009). Finalement, les souris knock-out pour le R-AT1a ont une différenciation adipocytaire normale (Kouyama *et al.*, 2005). Par

conséquent, les rôles de l'Ang II et de ses récepteurs restent à éclaircir en ce qui concerne l'adipogenèse.

#### **1.4.3.1 Les effets d'une suractivation du SRA**

Lorsque le SRA est suractivé, cela peut aggraver plusieurs pathologies telles l'hypertension, l'athérosclérose, le diabète, et les maladies cardiovasculaires et rénales (Steckelings *et al.*, 2009; Olivares-Reyes *et al.*, 2009; Yvan-Charvet et Quignard-Boulangé, 2010). Comme illustré dans la figure 18, l'Ang II a des effets sur plusieurs organes et sa sur-activation peut mener à des problèmes au niveau de chacun d'eux.

Malgré le nombre important de publications sur le SRA et ses composantes, plusieurs effets observés sont controversés. Ces controverses pourraient être dues aux conditions d'expérimentations différentes. D'autres études restent à effectuer afin de mieux cibler les rôles du SRA dans la pathologie de l'obésité et du syndrome métabolique, même si certains effets ont clairement été mis en évidence.



**Figure 18: Effets potentiels de l'Ang II dans les pathologies liées au syndrome métabolique.** L'augmentation de la masse du tissu adipeux blanc est associée à une augmentation de l'angiotensinogène et donc de l'Ang II. L'Ang II a des effets délétères au niveau de la résistance à l'insuline, de l'inflammation, de l'athérosclérose, et de l'hypertension. FFA, free fatty acid. Tiré de Laurent-Charvest et Quignard-Boulangé, 2011.

## Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs du projet

L'Ang II est impliquée dans la physiologie de l'adipocyte. L'utilisation des BRA améliore certains aspects de cette physiologie, indiquant une implication du R-AT1 dans les perturbations de la physiologie de l'adipocyte. Par contre, cette action bénéfique pourrait aussi être due à l'activation du R-AT2 par l'Ang II, le seul disponible pour lier l'Ang II en présence de BRA. Notre hypothèse est que l'activation du R-AT2 favorise la différenciation adipocytaire en augmentant notamment l'expression de facteurs tel PPAR $\gamma$ 2 et aP2. D'autre part, en condition d'exposition excessive à des acides gras, le tissu adipeux peut réagir en augmentant le nombre ou la taille des adipocytes. L'activation du R-AT2 dans ces conditions, pourrait améliorer la différenciation adipocytaire et favoriser l'accumulation lipidique dans le tissu adipeux et prévenir les accumulations ectopiques de graisse.

Les objectifs de ce projet étaient:

1. de valider la présence des récepteurs de l'Ang II dans les cellules 3T3-L1 au cours de leur différenciation.
2. d'étudier les effets de l'activation des R-AT1 et AT2 sur l'expression (génique et protéique) des récepteurs de l'Ang II, de PPAR $\gamma$ 2, et d'aP2, et sur l'accumulation lipidique au cours d'une différenciation normale.
3. d'étudier les mêmes paramètres, mais en conditions de surcharge lipidique.
4. de vérifier l'effet de l'inactivation de l'expression du R-AT2 sur la différenciation des cellules 3T3-L1.

Ce projet avait pour but de mieux comprendre les rôles des R-AT1 et AT2 lors de la différenciation adipocytaire. De plus, il devait valider l'effet bénéfique ou l'absence d'effet du R-AT2 lors d'un déséquilibre de l'homéostasie énergétique. Une meilleure compréhension de l'implication du R-AT2 dans la physiologie de l'adipocyte permettrait

de déterminer s'il pourrait être une cible potentielle afin d'améliorer les effets délétères observés lors d'un dysfonctionnement du tissu adipeux, par exemple lors de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.

## Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

### 3.1 Culture cellulaire

#### 3.1.1 Culture cellulaire des cellules 3T3-L1

Les cellules 3T3-L1 (CL-173, ATCC) proviennent d'une lignée cellulaire de fibroblastes de souris embryonnaires. Elles ont été isolées d'embryons de souris 3T3 en 1963 par Todaro et Green (Green et Kehinde, 1975). Elles ont la capacité de se différencier en adipocytes matures. Elles vont dans un premier temps passer d'un état prolifératif à un état de quiescence pour poursuivre avec une phase d'expansion clonale et de différenciation fonctionnelle. L'activation de certains facteurs de transcription et de plusieurs gènes permettra aux cellules d'acquies les caractéristiques spécifiques aux adipocytes (Tang *et al.*, 2003).

Les cellules 3T3-L1 ont été maintenues dans du milieu de culture *Dulbecco's modification eagle's medium* 1X (DMEM) contenant 4.5 g/L de glucose, 110 mg/L de pyruvate de sodium et 2 mM de glutamine enrichi avec 10 % de sérum bovin de veau (BCS, *heat inactivated*, Multicell, Wisent). Elles ont été incubées à 37 °C dans un environnement contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les passages ont été effectués lors d'une confluence d'environ 70 %. Les cellules 3T3-L1 ont été utilisées avant leur dixième passage puisqu'au-delà de ce passage, les préadipocytes perdent leur pouvoir de différenciation. Les cellules 3T3-L1 ont été cultivées dans des flacons de culture (T75 rouge ventilé) et lors des expériences, les cellules ont été transférées dans des pétris de 35 mm ou des plaques de 24 ou 96 puits dépendamment des expériences.

Lors d'un passage, les cellules ont d'abord été rincées avec du PBS 1X, pH 7.2, à 37 °C. La trypsine (2 mL) a ensuite été utilisée pendant 2 min afin de faire décoller les

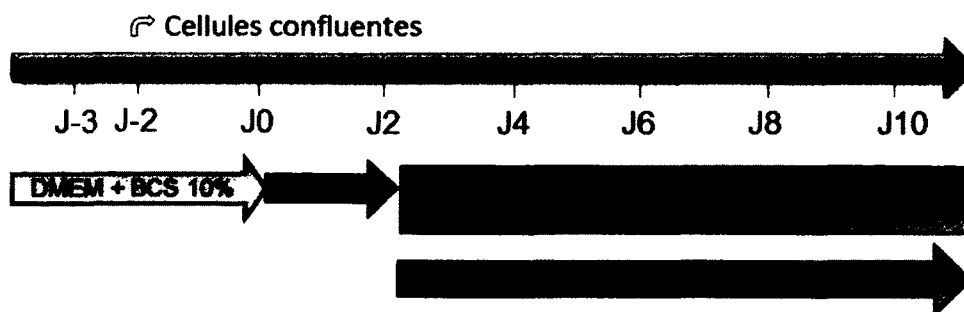
cellules de la boîte de pétris. Par la suite, l'effet de la trypsine a été inhibé par l'ajout de DMEM enrichi avec 10 % de BCS et les cellules ont été transférées dans d'autres flacons à une dilution prédéterminée.

### 3.1.2 Différenciation adipocytaire

Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées deux jours postconfluence dans du DMEM enrichi avec 10 % de sérum de bovin foetal (FBS, *heat inactivated*, Multicell, Wisent). Le cocktail d'induction était composé d'insuline (Sigma-Aldrich) à 2  $\mu\text{M}$ , de dexaméthasone à 1  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich) et de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich) à 0.25 mM. Suivant 48 heures d'incubation, le milieu de culture a été changé pour du DMEM contenant 10 % de FBS et enrichi avec 2  $\mu\text{M}$  d'insuline pour 2 jours. Par la suite, les changements de culture ont été effectués aux 2 jours avec du DMEM enrichi avec 10 % de FBS en présence d'insuline à 2  $\mu\text{M}$  (protocole 1) ou sans insuline (protocole 2) (Figure 19).



### Protocole 1



### Protocole 2

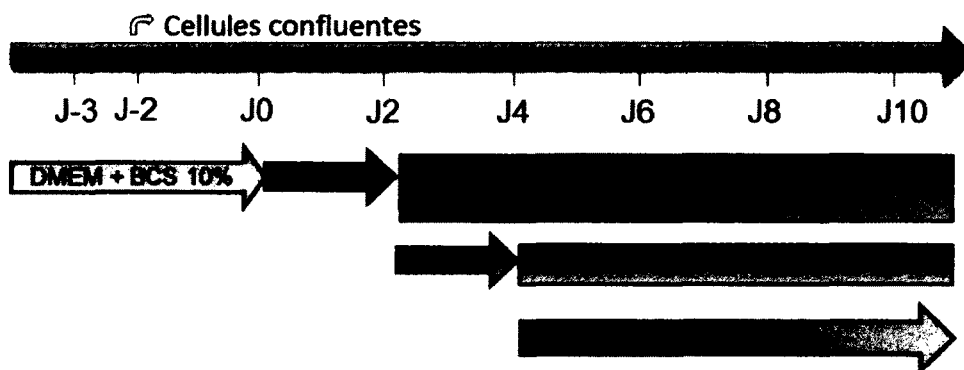


Figure 19: Schéma des protocoles de différenciation des cellules 3T3-L1.

## 3.2 Traitements pharmacologiques

Plusieurs traitements ont été effectués sur les cellules 3T3-L1. Ceux-ci ont généralement été faits en même temps que les changements de milieu. Ces traitements ont servi à étudier les effets de l'activation des récepteurs de l'Ang II sur la différenciation adipocytaire, sur l'accumulation lipidique, sur la prolifération cellulaire, et sur l'incorporation des acides gras dans les adipocytes matures. Tout d'abord, l'Ang II 100 nM et le losartan 1  $\mu$ M ont été respectivement utilisés comme agoniste et antagoniste du R-AT1. Ces concentrations ont été choisies suite à des expériences préliminaires action-dose. Afin d'étudier les effets du R-AT2, deux agonistes ont été utilisés : le CGP42112A, le seul disponible jusqu'à récemment et le M24, un agoniste non peptidique très sélectif. Les antagonistes utilisés ont été le PD123319, le seul

antagoniste disponible et un nouveau composé caractérisé par notre groupe, le M132 (Guimond *et al.*, 2012). Le PD123319 utilisé à forte concentration perd de sa sélectivité pour le R-AT2 (Unger et Dahlöf, 2010). De plus, le M132 a une plus grande affinité que le PD123319 pour le R-AT2. Le tableau 1 résume les caractéristiques de chacun de ces composés.

Composés	Caractéristiques	Constante de dissociation (nM)	
		R-AT1	R-AT2
Angiotensine II	agoniste du R-AT1 et R-AT2	7.92	5.22
Losartan	antagoniste du R-AT1	12.1	> 10 000
M24/C21	agoniste du R-AT2	> 10 000	0.4
CGP42112A	agoniste peptidique du R-AT2	> 10 000	0.2
M132	antagoniste du R-AT2	> 10 000	19
PD123319	antagoniste du R-AT2	> 10 000	34

**Tableau 1: Caractéristiques des différents composés liés au système rénine-angiotensine.**

Des traitements à l'oléate et au palmitate ont été effectués afin d'étudier l'effet d'une surcharge lipidique sur la différenciation cellulaire, l'accumulation lipidique, ainsi que sur l'expression des récepteurs de l'Ang II. L'oléate est un acide gras mono-insaturé tandis que le palmitate est un acide gras saturé, qui est connu pour avoir plus d'effets néfastes que l'oléate. Les concentrations de 150, 200, ou 300  $\mu$ M d'oléate ou de palmitate ont généralement été ajoutées au milieu de culture à chaque 2 jours à partir du jour 0. De plus, certaines expériences ont été réalisées avec différentes combinaisons de composés.

Des extractions d'ARN et/ou de protéines ont été réalisées à différents jours suivant l'induction de la différenciation afin d'étudier le profil d'expression des récepteurs de l'Ang II et de certains marqueurs de la différenciation adipocytaire.

### 3.3 Analyse des lipides intracellulaires

Les lipides intracellulaires ont été identifiés à l'aide d'une coloration à l'huile rouge (ORO). Cette technique consiste à colorer les lipides présents dans les adipocytes à l'aide du colorant Oil Red O. Cette huile rouge est un colorant liposoluble, c'est-à-dire plus soluble dans les lipides que dans son solvant, il va donc lier les triglycérides, les acides gras, et les lipoprotéines présents dans le milieu et les colorer en rouge.

Tout d'abord, une solution de 0,5 % d'ORO (Sigma-Aldrich) a été préparée à partir d'une poudre, qui a été dissoute dans de l'isopropanol à 100 %. Cette solution était stable pendant un an. La solution utilisée pour colorer les lipides était la solution d'ORO 0,5 % diluée 6:4 avec de l'eau filtrée.

Les cellules 3T3-L1 (pétris de 35 mm) ont été rincées avec du PBS pH 7.2 (2 mL) conservé à la température de la pièce (TP), puis fixées avec 3 ml de formaldéhyde 3,7 % pour une période de 20 min. Suite à la fixation, les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS à TP afin d'éliminer toute trace de formaldéhyde. Les cellules ont ensuite été colorées à l'aide de la solution d'ORO (2 mL) diluée pendant 20 min puis rincées 3 fois avec du PBS. Pour terminer, des photos ont été prises avec un appareil photo numérique (CoolPix P6000, Nikon) et un adaptateur pour le microscope optique (Nikon CoolPix P6000 *Lens Conversion Adapter*, P6000 LCA, Zarf Enterprises).

### 3.4 Analyse de l'expression génique

Les modifications de l'expression génique suite à différents traitements peuvent être évaluées en mesurant les niveaux d'ARN messager (ARNm). Pour ce faire, l'ARNm doit être extrait et isolé des cellules pour être ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par le principe de la transcription inverse (rt-PCR). L'ARNm est une molécule très instable et facilement dégradable, c'est pour cette raison qu'il est transcrit en ADNc, qui

est beaucoup plus stable. L'ADNc obtenu peut être utilisé afin d'effectuer des réactions de polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR), ce qui permet d'évaluer les modifications de l'expression génique de manière quantitative (Livak et Schmittgen, 2001).

### 3.4.1 Extraction de l'ARNm

L'ARNm a été extrait avec la solution de TRI Reagent (Molecular Research Center, inc.) qui est une solution qui permet d'isoler l'ADN, l'ARN, et les protéines des cellules ou des tissus. Cette solution combine du phénol et de la guanidine thiocyanate qui facilite l'inhibition de l'activité des ribonucléases. Lors de ma maîtrise, le TRI-Reagent a été utilisé uniquement pour extraire et isoler l'ARNm. L'ARNm a été extrait selon le protocole du fournisseur.

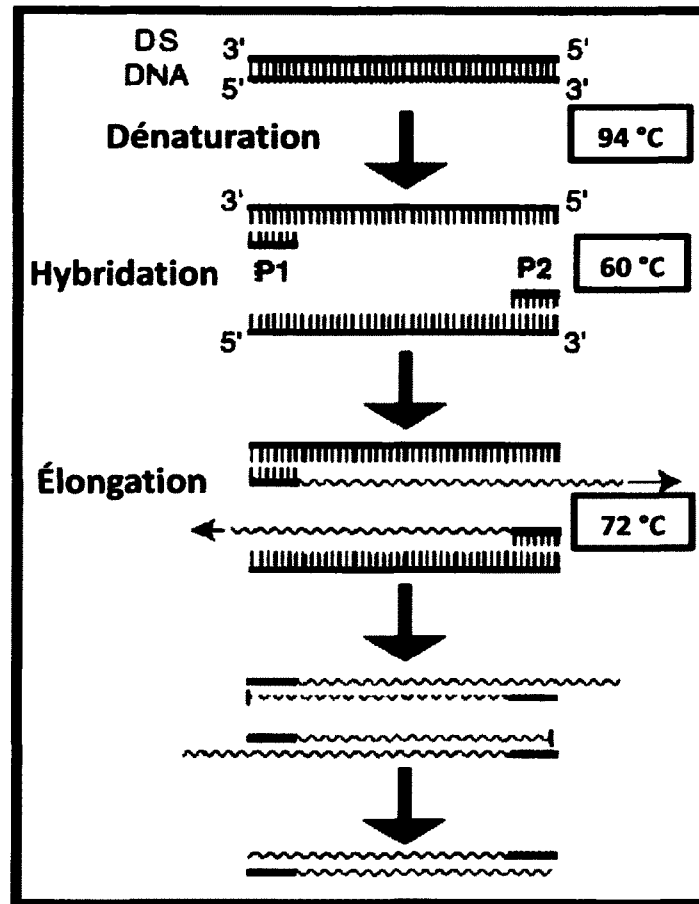
Brièvement, le milieu de culture a été enlevé des pétris de 35 mm et du TRI Reagent (1 mL) a été ajouté afin d'homogénéiser les cellules. La suspension a été recueillie dans des tubes de 1.5 ml qui ont été incubés à TP pendant 5 min afin de dissocier complètement les complexes de nucléoprotéines. Ensuite, du chloroforme (200  $\mu$ L), un solvant organique, a été ajouté au TRI Reagent, les échantillons ont été mélangés, et incubés à TP de 2 min à 15 min. Les échantillons ont par la suite été centrifugés à 12 000 g (Micromax RF, thermo IEC) pendant 15 min à 4 °C et la phase aqueuse contenant l'ARN a été prélevée et mise dans un autre tube de 1.5 mL. L'ADN et les protéines se retrouvent dans l'interphase et la phase organique. L'ARN a été précipité avec de l'isopropanol à 100 % (500  $\mu$ L) et rincé avec de l'éthanol à 75 % (1 mL). Finalement, l'ARN a été dissout dans de l'eau distillée et conservé à -80 °C, jusqu'à utilisation, pour éviter sa dégradation.

### 3.4.2 Transcription de l'ADNc

Suite au dosage de l'ARN avec le spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), 2 µg d'ARN ont été utilisés pour réaliser la transcription inverse et ainsi obtenir de l'ADNc. Le protocole utilisé est celui de Biorad. Un µL d'Oligo(dt)<sub>12-18</sub> (500 µg/mL, Invitrogen), 2 µg d'ARN, et 1 µL d'un mélange de nucléotides à 10 mM chacun (dNTP, Amersham Pharmacia Biotech, inc.) ont été déposés dans des tubes de microcentrifugeuse sans nucléase. Le volume a été ajusté à 12 µL avec de l'eau et les échantillons ont été chauffés pendant 5 min à 65 °C. Ensuite, du *5X First-Strand Buffer* (4 µL, Invitrogen) et du DTT 0.1 M (2 µL, DL-Dithiothreitol, Invitrogen) ont été ajoutés au mélange. Suite à un chauffage de 2 min à 42 °C, 1 µL de polymérase SuperScript II RT (200 unités, Invitrogen) a été ajouté et les échantillons ont été incubés à 42 °C pendant 50 min. La réaction a été inactivée en incubant les échantillons à 70 °C pendant 15 min. L'ADNc ainsi obtenu a été conservé à -20 °C. Toutes les étapes du rt-PCR ont été effectuées avec l'appareil C1000™ Thermal Cycler (Biorad).

### 3.4.3 Réaction de polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR)

La dernière étape de cette expérience est la RT-PCR. Tout d'abord, une réaction de PCR permet d'amplifier de petites quantités d'ADN double brin. En choisissant des amorces spécifiques au gène d'intérêt, une partie de ce gène pourra être amplifiée tandis que le reste de l'ADNc restera présent en petite quantité. Il y a 3 étapes importantes pour le PCR : la séparation du double brin d'ADN qui s'effectue à 94 °C, l'hybridation des amorces qui est réalisée autour de 60 °C dépendamment des amorces, et l'élongation des brins complémentaires qui est réalisée à 72 °C (Figure 20). Ces 3 étapes forment un cycle et celui-ci est répété de 30 à 50 fois tout dépendant de l'amplicon et de la nature de l'ADN que l'on veut amplifier.



**Figure 20: Schéma résumé des étapes d'une amplification par PCR.** Le PCR consiste en 3 étapes: une première étape de dénaturation réalisée à 94 °C où les doubles brins d'ADN sont séparés. Une deuxième étape d'hybridation des amorces est effectuée autour de 60 °C et une dernière étape d'élongation se fait à 72 °C. Cette technique permet d'amplifier de l'ADN double brin. Tiré de Sangar, 1998.

Une réaction de RT-PCR permet de visualiser l'amplification du double brin d'ADN cible en temps réel, donc au fur et à mesure que l'amplification s'effectue. Pour ce faire, il existe deux techniques : la technique de SYBR Green et celle de Taqman. La technique qui a été utilisée durant ma maîtrise est celle de SYBR® Green. Le SYBR® Green est un fluorophore qui devient beaucoup plus fluorescent (environ 1000 x) lorsqu'il se lie à l'ADN double brin (ADNdb) que lorsqu'il n'est pas lié. La fluorescence captée est proportionnelle à la concentration d'ADNdb présent dans le milieu. Cette fluorescence peut être captée par un appareil de RT-PCR et plus elle apparaît tôt durant

l'expérience, plus il y avait d'ADNc présent au départ et donc d'ARNm. Par contre, une des limitations du SYBR® green est son manque de spécificité, il lie n'importe quel ADNdb présent dans le milieu. Par conséquent, la spécificité de la réaction est uniquement due aux amorces utilisées.

Les réactions de RT-PCR ont été réalisées avec le fluorophore Evagreen (Feldan) à l'aide de l'appareil Realplex<sup>2</sup> Master Cycler (Eppendorf). Ce fluorophore a les mêmes propriétés que le SYBR® Green, donc il absorbe à 497 nm et il émet à 520 nm. Le tableau ci-dessous indique le mélange à effectuer pour réaliser une expérience de RT-PCR. Les RT-PCR ont été réalisées d'après le protocole de Feldan. Brièvement, la première étape réalisée à 95 °C pendant 15 min sert à activer la polymérase. Par la suite, les 3 étapes du PCR ont été effectuées 40 fois d'après le protocole suivant : 20 sec à 95 °C, 40 sec à 60 °C, et 30 sec à 72 °C. Finalement, la réaction a été arrêtée par une incubation de 5 min à 72 °C. Chaque échantillon a été amplifié en triplicata ou en duplicata. Les résultats ont été normalisés sur les résultats d'une différenciation adipocytaire à J6 afin de les uniformiser. Généralement, les résultats sont normalisés sur la condition basale, qui aurait pu être un J0, donc sur les préadipocytes. Par contre, puisque plusieurs des gènes étudiés ne sont pas exprimés dans les préadipocytes, le J6 a été choisi.

produits	concentration	quantité (µL)
H <sub>2</sub> O		13,8
qPCR pol		0,2
10X qPCR Buffer		2
10mM dNTP mix		0,5
20X Evagreen		1
Amorce sens (diluée à 10µM)	500 nM	1
Amorce anti-sens (diluée à 10µM)	500 nM	1
RT	50 ng	0,5
total		20

**Tableau 2: Solutions à préparer pour réaliser une expérience de RT-PCR.** qPCR pol, quantitative polymerase chain reaction polymerase; dNTP, deoxyribonucleotide; RT, reverse transcriptase.

Trois gènes ont été étudiés par RT-PCR durant ma maîtrise, celui du R-AT1, du R-AT2, et de PPAR $\gamma$ . Les gènes GAPDH et 18S ont été testés comme gènes de référence et c'est GAPDH qui a été choisi, puisque son expression était la plus stable (Tableau 3).

gènes	amorces
R-AT2	FWD 5'- ATTACCTGCAGTGTCTGATAAG -3' REV 5'- GGGATTCCTTTGAGACAGAAA -3'
R-AT1a	FWD 5'- TGGCTCACGACCAAAGGACCA -3' REV 5'- CGCTGCGATTGCGTGTCTGC -3'
PPAR $\gamma$	FWD 5'- GCCCACCAACTTCGGAATC -3' REV 5'- TGCGAGTGGTCTTCCATCAC -3'
GAPDH	FWD 5'- ACTCCTGGAGGCCATGTAGG -3' REV 5'- ACTCCACTCTCCACCTTCG -3'
18S	FWD 5'- CACGCCCGGTACAGTGAAAG -3' REV 5'- AGAGGAGCGAGCGACCAAA -3'

**Tableau 3: Séquences des amorces utilisées pour le RT-PCR.**



## 3.5 Analyse de l'expression protéique

L'analyse de l'expression protéique permet entre autres d'étudier les variations d'expression de certaines protéines cibles suite à des traitements. À l'aide d'anticorps, il est possible de visualiser une seule protéine et d'observer l'effet d'une condition physiologique sur son expression. Afin de mesurer l'expression protéique, il a fallu extraire les protéines des cellules, les doser, et réaliser des immunobuvardages de type Western.

### 3.5.1 Extraction et dosage protéique

Les protéines ont été extraites des cellules à l'aide d'une solution de lyse. La solution de lyse utilisée était la solution commerciale Rip A (Cell Signaling). Des inhibiteurs protéiques (Protéine G-Agarose, Roche) ont été ajoutés à la solution Rip A avant son utilisation. Suite à un lavage des cellules avec du PBS froid (2 mL), 50 µL de solution de lyse Rip A 1X ont été ajoutés pour les expériences réalisées à J0 et à J2, et 100 µL pour les journées suivantes. Les cellules ont été décollées de la boîte de pétris à l'aide d'un grattoir et incubées sur glace dans des tubes pendant 30 min. Par la suite, les cellules ont été centrifugées pendant 30 min, transférées dans des tubes de 750 µL et congelées à -80 °C afin d'être dosées et utilisées ultérieurement.

Le dosage protéique a été fait avec la méthode de Bradford (Biorad). Brièvement, une courbe standard, avec un minimum de 5 points, a été réalisée. Les extraits protéiques (4 µL) ont été dilués dans 16 µL d'eau et 5 µL de ce mélange ont été déposés dans des puits de plaques de 96 puits. Chaque échantillon a été dosé en triplicata. Du tampon S (25 µL) dilué 1/50 dans le tampon A (solution alcaline de cuivre-tartrate) a été déposé dans chaque puits et du tampon B (200 µL) (réactif de Folin dilué) a été ajouté. La plaque a été incubée pendant 15 min à TP et l'absorbance a été mesurée à 695 nm avec un lecteur de plaque (Infinity M200, Tecan).

### 3.5.2 Immunobuvardage de type Western

L'immunobuvardage de type Western consiste tout à bord à faire migrer des protéines préalablement dénaturées sur un gel de polyacrylamide afin de les séparer en fonction de leur taille. La migration est effectuée par électrophorèse et les protéines de tailles plus importantes vont moins migrer tandis que les protéines plus petites vont migrer plus loin. Par la suite, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF et exposées à un premier anticorps spécifique pour une protéine. Un second anticorps couplé à l'enzyme *horse-radish-peroxydas* (HRP) est ensuite utilisé pour lier le premier anticorps. Finalement, la membrane est exposée à une solution de révélation ECL (enhanced chemiluminescent) qui contient du luminol, un composé qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé par la HRP. La protéine d'intérêt reconnue par le premier anticorps, qui lui-même est lié à un deuxième anticorps couplé à HRP est donc révélée par chimiluminescence.

Les gels utilisés lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) étaient faits de deux parties distinctes, soit un gel de migration de 10 ou 15 % d'acrylamide (10 ou 15 % Bis acrylamide 19:1, 40 % (Omnipur), 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, TEMED) sur lequel reposait un gel de retardement de 5 % d'acrylamide (5 % Bis acrylamide 40 %, 0.187 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, TEMED). Le gel de retardement permet de concentrer les échantillons en fines bandes. Des gels de 10 ou 15 puits ont été utilisés dépendamment du nombre d'échantillons à tester. Trente µg de protéines préalablement diluées dans une solution tampon 6X (0.35 mM Tris-HCl pH 6.8, 10.28 % SDS, 36 % glycérol, 5 % β-mercaptoéthanol, 0.012 % bleu de bromophénol) et chauffées pendant 10 min à 95 °C ont été déposées dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire (Fermentas) a aussi été déposé dans le premier puits de chaque gel. La migration a été effectuée dans un tampon de migration (0.25 M Tris base, 1.92 M de glycine, 1 % SDS) avec une tension

électrique de 100 V jusqu'à ce que les protéines soient sorties du gel de retardement. Par la suite, le voltage a été augmenté à 150 V pour le reste de la migration.

Le transfert des protéines s'effectue du gel vers une membrane à l'aide d'un courant électrique. Suivant la migration, un transfert rapide sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF, Roche) a été réalisé dans un tampon de transfert froid (38 mM Tris base, 0.29 M glycine, 30 % méthanol) pendant 1 h à 100 V à 4 °C, dans un bac de glace. Les membranes de PVDF ont été préalablement activées pendant 30 sec dans du méthanol, puisque ces dernières sont hydrophobes (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting, instruction manual, Bio-Rad). Suite au transfert, les membranes ont été conservées à 4 °C dans du TBS-T (TBS : 50 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1 % Tween 20).

Pour quantifier les protéines, les membranes ont d'abord été bloquées dans du lait 5 % (5 % lait, TBS-T) pendant 1 h afin de minimiser les interactions non spécifiques entre les membranes et les anticorps. Un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt a ensuite été hybridé à la membrane. Par la suite, plusieurs lavages de 10 min au TBS-T ont été effectués et un second anticorps dirigé contre la portion Fc du premier anticorps et couplé à HRP a été utilisé. Suivant l'hybridation du second anticorps et d'autres lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées dans la solution de révélation ECL (ECL+, Perkin Elmer) pendant 1 min. Le tableau 4 ci-dessous liste les conditions pour chacun des anticorps utilisés.

Anticorps	Dilution anticorps	Solution de dilution	Température d'incubation	Durée d'incubation	Hôte	fournisseur
aP2/FABP (C-15)	1/8000	5 % lait, TBS-T	4 °C	1h	chèvre	Santa Cruz
PPAR $\gamma$ (81B8)	1/2000	5 % BSA, TBS-T	4 °C	ON	lapin	Cell Signaling
AT1 (N-10)	1/1000	5 % BSA, TBS-T	4 °C	ON	lapin	Santa Cruz
AT2 (H-143)	1/1000	5 % BSA, TBS-T	4 °C	ON	lapin	Santa Cruz
$\alpha$ -goat	1/4000	5 % lait, TBS-T	4 °C	1h		Santa Cruz
$\alpha$ -rabbit	1/2000	5 % lait, TBS-T	4 °C	1h		Cell Signaling

**Tableau 4: Anticorps utilisés lors des expériences d'immunobuvardage de type Western.** Condition d'utilisation des anticorps. FABP, fatty acid binding protein; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; ON, overnight; BSA, bovine serum albumine

Les révélations d'anticorps ont été réalisées avec des films (GE Healthcare) spécifiques pour la chimiluminescence. Différents temps d'exposition ont été nécessaires pour obtenir des bandes claires de bonne intensité. Afin de mesurer l'expression des protéines, les bandes ont été quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel *Image J*. Les premiers résultats d'analyses Western ont été normalisés sur les résultats d'une différenciation normale à J8, puisque plusieurs des protéines étudiées ne sont pas exprimées à J0.

Plusieurs anticorps ont été utilisés sur la même membrane. Pour ce faire, les premiers anticorps ont été détachés à l'aide de deux solutions de détachement. La première était une solution acide de glycine (0.2 M Glycine à pH 2.5, 0.02 % Tween 20). Les membranes ont été incubées 2 fois 1 h sous agitation dans cette solution pour être ensuite rincées 3 fois pendant 10 min dans du TBS-T et conservées à 4 °C. La seconde solution utilisée était basique (NaOH 0.4 N). Les membranes ont été incubées 2 fois 20 min sous agitation et ensuite rincées 2 fois pendant 20 min dans du TBS-T. Les membranes ont été conservées à 4 °C. Un maximum de 4 anticorps ont été utilisés sur les membranes de PVDF.

### 3.6 Quantification des lipides

La quantification lipidique permet d'évaluer la quantité de lipides accumulés dans les cellules. Pour cette expérience, l'Adipored™ Assay Reagent (Lonza) a été utilisé. L'agent actif de l'Adipored est le *Nile Red*, un composé hydrophile qui devient fluorescent dans un environnement hydrophobe. À l'intérieur des gouttelettes lipidiques, le *Nile Red* possède une fluorescence spécifique. Ce réactif a été mis au point pour mesurer spécifiquement les triglycérides intracellulaires. La longueur d'onde d'excitation à utiliser est 485 nm et la longueur d'onde d'émission est 572 nm.

Pour réaliser cette expérience, les cellules ont été cultivées dans des plaques noires de 24 puits avec ou sans traitement selon les protocoles décrits précédemment et l'expérience a généralement été réalisée à J6. Les plaques noires ont été choisies pour s'assurer que lors de la mesure d'un puits, la fluorescence présente dans les autres puits n'interfère pas le résultat obtenu. Pour réaliser l'expérience, le milieu de culture a été enlevé des plaques et un lavage avec du PBS (1 mL) à TP a été effectué. Par la suite, 1 mL de PBS a été ajouté dans chaque puits et la solution d'Adipored (10 µL) a été ajoutée. La plaque a été légèrement agitée et incubée pendant 8 min à TP. La fluorescence a ensuite été mesurée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du *Nile Red* par le lecteur de plaque Infinity M200 (Tecan) (soit 485 et 572 nm).

### 3.7 Études de liaison hormone-récepteur

Les études de liaison hormone-récepteur ont été réalisées afin d'évaluer la proportion de chaque type de récepteurs de l'Ang II présents dans les cellules 3T3-L1 au cours de la différenciation.

Les expériences ont été réalisées avec des cellules cultivées dans des pétris de 35 mm. Les cellules ont été incubées avec 0.1 nM [I]<sup>125</sup>-Ang II et des quantités

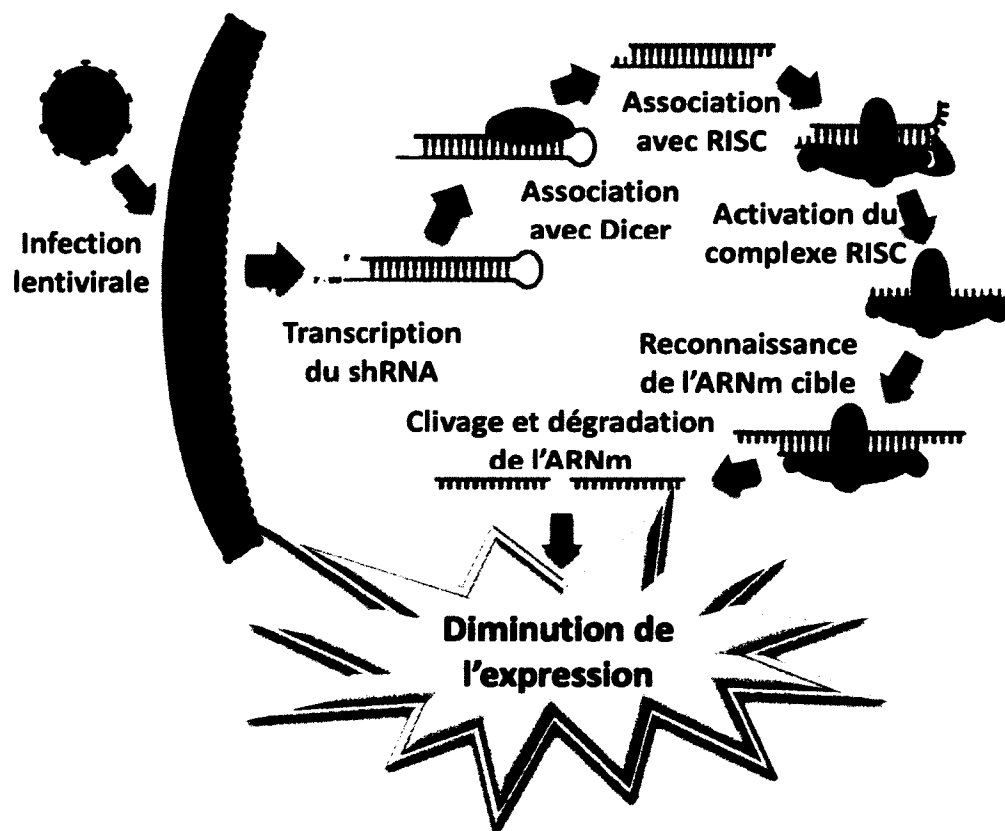
croissantes de ligand non radiomarqué (Ang II, losartan, CGP42112A, M24). Les ligands ont été préparés dans une solution de HBS (0.13 M NaCl, 3.5 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.98 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mM Hepes, 0.5 mM EGTA, pH 7.4, avec 5.55 mM de dextrose, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, et 0.1 % de BSA). Suite à une incubation de 30 min avec du DMEM sans sérum, les cellules ont été lavées avec une solution de lavage froide (HBS) et équilibrées. Cette solution a ensuite été enlevée et l'Ang II avec ou sans ligands non radiomarqués a été déposé dans les pétris pour 30 min. Les cellules ont été frottées et la radioactivité incorporée dans les cellules a été recueillies après filtration rapide sur des filtres GF-C préincubés avec 2 % BSA. La radioactivité a été comptée à l'aide d'un compteur de radiation gamma.

### 3.8 Diminution de l'expression du R-AT2 à l'aide de shRNA

Pour comprendre les rôles du R-AT2 lors de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1, l'invalidation de ce récepteur par la méthode des shRNA (*short hairpin RNA*) a été utilisée (figure 21). La technique des shRNA, qui permet de diminuer l'expression d'un gène cible, a été choisie puisque nous désirions effectuer une invalidation du R-AT2 sur une longue période. Les shRNA, contrairement aux petits ARN interférants (siRNA), sont connus pour être plus efficaces à long terme et donner des résultats plus stables. Afin d'introduire les shRNA à l'intérieur des cellules, la technique d'infection par lentivirus a été choisie puisque les cellules 3T3-L1 sont un modèle cellulaire difficile à transfecter (Rubinson *et al.*, 2003).

Les infections à l'aide des lentivirus permettent d'introduire du matériel génétique à l'intérieur de cellules hôtes. Les lentivirus ont plusieurs avantages : ils ne requièrent aucun récepteur pour entrer dans les cellules, ils ont la capacité de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte permettant ainsi une diminution continue du gène d'intérêt, et ils n'ont pas besoin d'un cycle de mitose pour s'intégrer au génome (Sigma-Aldrich, mission shRNA). Suite à l'intégration de la séquence du shRNA dans le génome

de la cellule hôte, il y a transcription de ce dernier par le promoteur U6. Le shRNA transcrit prend la forme d'une épingle et lie la protéine Dicer, qui clive la boucle du shRNA. Le complexe RISC (*RNA inducer silencing complex*) peut alors se lier avec le shRNA double brin et le séparer permettant ainsi l'activation du complexe. L'ARNm du gène cible est alors reconnu par le complexe RISC, il y a liaison entre le complexe et l'ARNm cible, clivage, et dégradation de ce dernier. Il en résulte une diminution de l'expression protéique du gène cible (figure 21).



**Figure 21: Représentation schématique d'une infection lentivirale avec un shRNA.** Suite à une infection lentivirale, la séquence du shRNA est insérée dans le génome de la cellule hôte puis transcrite. Le shRNA va se lier avec le complexe RISC, l'activer et l'ARNm du gène cible sera dégradé. Adapté du site internet [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), Mission shRNA, Mission shRNA.

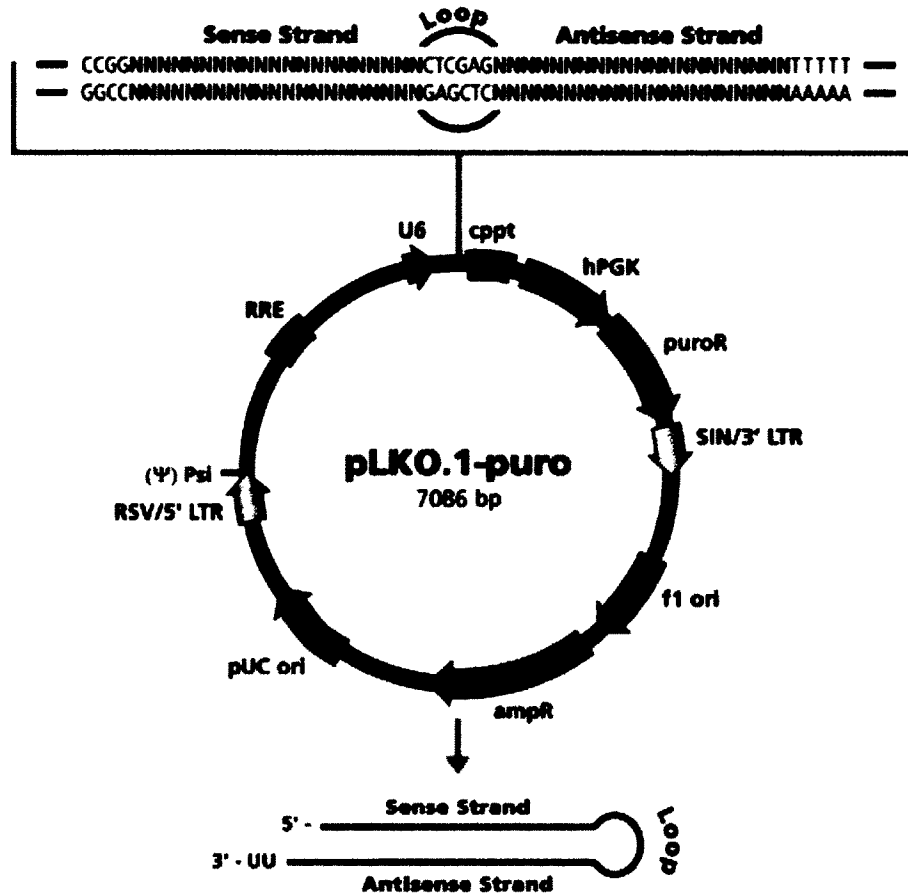
### 3.8.1 Production et purification des plasmides contenant les séquences de shRNA

Les shRNA ont été achetés sous forme de stock de bactéries, permettant ainsi l'amplification et la purification des vecteurs contenant la séquence des shRNA. Le vecteur vide (pLKO.1-puro, Sigma-Aldrich), utilisé comme contrôle, et 5 séquences différentes pour le R-AT2 ont été testées (tableau 5 et figure 22).

Séquences	Clones	Séquence des shRNA
A	TRCN0000027316	CCGGGCATTCATCATTGCTGGCTTCTCGAGAAGCCAGCAAATGATGAATGCTTTTT
B	TRCN0000027346	CCGGCGCCTTTAATTGCTCACACAACCTCGAGTTGTGTGAGCAATTAAGGCGTTTTT
C	TRCN0000027384	CCGGCCAATCGGTCATCTACCTTTCTCGAGAAAGGGTAGATGACCGATTGGTTTTT
D	TRCN0000027390	CCGGCTTAGAGAAATGGACACCTTTCTCGAGAAAGGTGTCCATTTCTCTAAGTTTTT
E	TRCN0000027398	CCGGGCTCACACAAACCATCAGATACTCGAGTATCTGATGGTTTGTGTGAGCTTTTT

**Tableau 5: Séquences des shRNAs utilisés contre le R-AT2 lors des infections**





**Figure 22: Schéma du vecteur pLKO.1-puro.** Vecteur utilisé comme contrôle lors des infections lentivirales. Tiré du site internet [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com), Mission shRNA.

Les bactéries reçues de la compagnie ont d'abord été déposées sous forme de stries sur des géloses de LB-Agar (Luria Broth Agar Miller, 100 µg/mL ampicilline) dans des pétris de 100 mm sous une flamme. Les pétris ont été incubés à 37 °C ON. Une colonie a ensuite été sélectionnée et ensemencée dans 10 mL de milieu HB Broth contenant 100 µg/mL d'ampicilline pour la nuit. Le lendemain, 500 µL de bactéries ont été mélangées à 500 µL de glycérol 80 % et congelées à -80 °C afin de faire un stock de bactéries.

La purification des plasmides a été réalisée avec l'ensemble QIAfilter Maxi kit de QIAGEN. Pour amplifier le plasmide, 125 µL de bactéries précédemment ensemencées ont été ajoutées à 125 mL de milieu LB Broth contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Les bactéries ont été mises à 37 °C avec une agitation de 200 rpm ON. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 6000 g pendant 15 min à 4 °C (Beckman Coulter). Le surnageant a été enlevé et les bactéries ont été resuspendues dans du tampon P1 froid (10 mL). Elles ont été lysées avec du tampon P2 (10 mL) pendant 5 min à TP. Le tampon P3 (10 mL) a ensuite été ajouté au lysat, les tubes ont été bien mélangés, et la solution a immédiatement été déposée sur les cartouches QIAfilter Maxi pour une période de 10 min, afin que les protéines et l'ADN génomique se retrouvent sur le dessus de la solution permettant une meilleure filtration. Une colonne QIAGEN-tip a été équilibrée avec du tampon QBT (10 mL) et ensuite le lysat présent dans les cartouches a été filtré. La colonne a été rincée 2 fois avec le tampon QC (30 mL) et l'ADN resté dans la colonne a été élué avec le tampon QF (15 mL). Par la suite, l'ADN recueilli a été précipité avec de l'isopropanol à l'aide d'une centrifugation de 30 min à 15 000 g à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et l'ADN a été rincé avec de l'éthanol 70 % (5 mL) puis centrifugé pendant 10 min à 15 000 g à 4 °C. L'éthanol a été enlevé, l'ADN a été dissout dans de l'eau, dosé à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop 2000, puis conservé à -20 °C.

### 3.8.2 Production de particules lentivirales

Les particules lentivirales ont été produites dans les cellules HEK-393T à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). L'approche des mutliplasmides pour produire des lentivirus a été utilisée puisque cette technique rend la réplication virale plus difficile, donc cela permet une utilisation plus sécuritaire des lentivirus. Trois vecteurs ont été utilisés pour produire les lentivirus : psPAX2, pMD2G, et le vecteur d'intérêt. Les 2 premiers vecteurs sont nécessaires à la formation de la capsid du virus, tandis que le vecteur d'intérêt est le plasmide qui contient la séquence du shRNA.

Les cellules HEK-293T ont étéensemencées ( $6 \times 10^6$  cellules) dans du DMEM enrichi avec 10 % de FBS dans des pétris de 100 mm. Le lendemain, 750  $\mu$ L de DMEM sans sérum et 60  $\mu$ L de lipofectamine 2000 ont été incubés pendant 5 min à TP. Une solution contenant 750  $\mu$ L de DMEM sans sérum, 9  $\mu$ g du vecteur psPAX2, 3  $\mu$ g du vecteur MD2G, et 12  $\mu$ g du vecteur d'intérêt a été préparée, mélangée à la solution précédente, et incubée pendant 30 min. Le milieu de culture des pétris a été remplacé par 5 mL de DMEM sans sérum et 1.5 ml du mélange à transfection préincubé a été ajouté. Les pétris ont ensuite été incubés pendant 3 h à 37 °C. Subséquemment, le milieu de culture a été changé pour du DMEM (10 mL) enrichi avec 10 % de FBS et les pétris ont été incubés pendant 2 jours à 37 °C. Finalement, le milieu de culture contenant les lentivirus produits a été recueilli à l'aide d'une seringue de 10 mL, filtré avec un filtre de 0.45  $\mu$ m, réparti en portions de 1 mL, et congelé à -80 °C.

### 3.8.3 Infection des cellules 3T3-L1 par les lentivirus

Les cellules 3T3-L1 ont été mises en culture dans des pétris de 35 mm au moins une journée avant l'infection et celle-ci a été effectuée 3 jours avant l'induction de la différenciation. Les lentivirus ont été dilués 1:3 dans du DMEM enrichi avec 10 % de BCS et 8  $\mu$ g/mL d'*hexadimethrine bromide* (HB, Sigma-Aldrich). Un changement de milieu de culture a été effectué avec du DMEM enrichi avec 10 % de BCS et les lentivirus ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées pendant 18 h à 37 °C. Par la suite, le milieu de culture a été changé. Les effets des shRNA sur la différenciation adipocytaire ont été observés par microscopie ainsi qu'en ARN et en protéine à différents jours avant et après l'induction de la différenciation.

## 3.9 Essai de prolifération (MTS assay)

La prolifération cellulaire a été évaluée à l'aide de l'ensemble Cell titer 96 aqueous one-solution cell proliferative assay (Promega Corp.). C'est un ensemble

colorimétrique qui permet de mesurer la viabilité des cellules en prolifération ou la cytotoxicité. L'objectif était de vérifier les effets de différents composés sur la prolifération des cellules 3T3-L1.

Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées avec du DMEM enrichi avec 10 % de BCS dans des plaques de 96 puits à raison de  $5 \times 10^3$  cellules par puits. Après 24 h d'incubation, le milieu a été changé pour 75  $\mu$ L de DMEM sans sérum contenant 0.1 % de BSA pour 2 h afin de synchroniser les cycles cellulaires. Par la suite, 25  $\mu$ L de différents composés ont été ajoutés (Insuline 50 nM, Ang 100 nM, M24 0.1, 1, et 10 nM, PD123319 1  $\mu$ M, M132 10 et 100 nM) et les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Les échantillons ont été traités en duplicata. Subséquemment, le composé tetrazolium MTS (20  $\mu$ L) (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolum, inner salt, MTS) a été ajouté à chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 3 h à 37 °C. Le MTS tetrazolium est réduit par les cellules en Formazan, un composé soluble coloré, soit par la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) ou la NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) produite par des enzymes déshydrogénases. Finalement, l'absorbance a été mesurée à 490 nm par l'appareil Infinity 2000 et un dosage protéique selon la méthode de Bradford a été réalisé afin de normaliser les résultats obtenus.

### 3.10 Incorporation des acides gras

L'incorporation des acides gras dans les adipocytes matures est une fonction importante de ces cellules. Pour déterminer les effets de l'Ang II et de l'activation de ses récepteurs, l'incorporation des acides gras a été mesurée par l'ensemble QBT fluorescent fatty acid assay (Bodipy) (Molecular devices). Le protocole utilisé a été basé sur celui du fournisseur.

Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées selon le protocole 2 décrit précédemment et elles ont été utilisées à J8 ou J9 (voir section 3.1.2). Le milieu de culture des adipocytes matures a été enlevé et remplacé par 150  $\mu$ L de DMEM sans sérum pour une période de 2 h. Par la suite, 50  $\mu$ L des composés choisis (Insuline 50 nM, Ang 100 nM, M24 0.1, 1, et 10 nM, PD123319 1  $\mu$ M, et PD123319 1  $\mu$ M + M24 nM) ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant 1 h à 37 °C. Les échantillons ont été traités en duplicata. Le réactif Bodipy (200  $\mu$ L, réactif A dilué dans 10 mL de solution salée balancée Hank, 0.2 % BSA sans acide gras, 1 M Hepes) a été ajouté à chaque puits et l'incorporation des acides gras a été mesurée en temps réel par fluorescence à toutes les 20 sec pendant 120 min avec un lecteur de plaque (Synergy HT, Biotek). La longueur d'onde d'excitation était 485 nm et celle d'émission était 528 nm. Immédiatement après les lectures, le milieu a été enlevé et les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS. De l'isopropanol-heptane (2:3) a été ajouté (250  $\mu$ L) pour extraire les lipides. La plaque a été incubée ON à 4 °C, le solvant a été déposé dans des tubes de verre et les puits ont été rincés avec le même solvant (250  $\mu$ L). Le solvant a été évaporé à l'aide d'une centrifugeuse-évaporateur (Canberra-Packard Canada) et l'extrait lipidique a été dissout dans de l'isopropanol-heptane (2:3) (100  $\mu$ L). Les triglycérides ont été mesurés à l'aide d'un essai colorimétrique enzymatique (Roche). Brièvement, une courbe standard de glycérol a été réalisée avec 6 points. Les échantillons (10  $\mu$ L) ont été déposés en duplicata dans une plaque de 96 puits et 100  $\mu$ L du réactif TG ont été déposés dans les puits. Après 15 min d'incubation sous agitation légère, l'absorbance a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Synergy HT).

### 3.11 Analyses statistiques

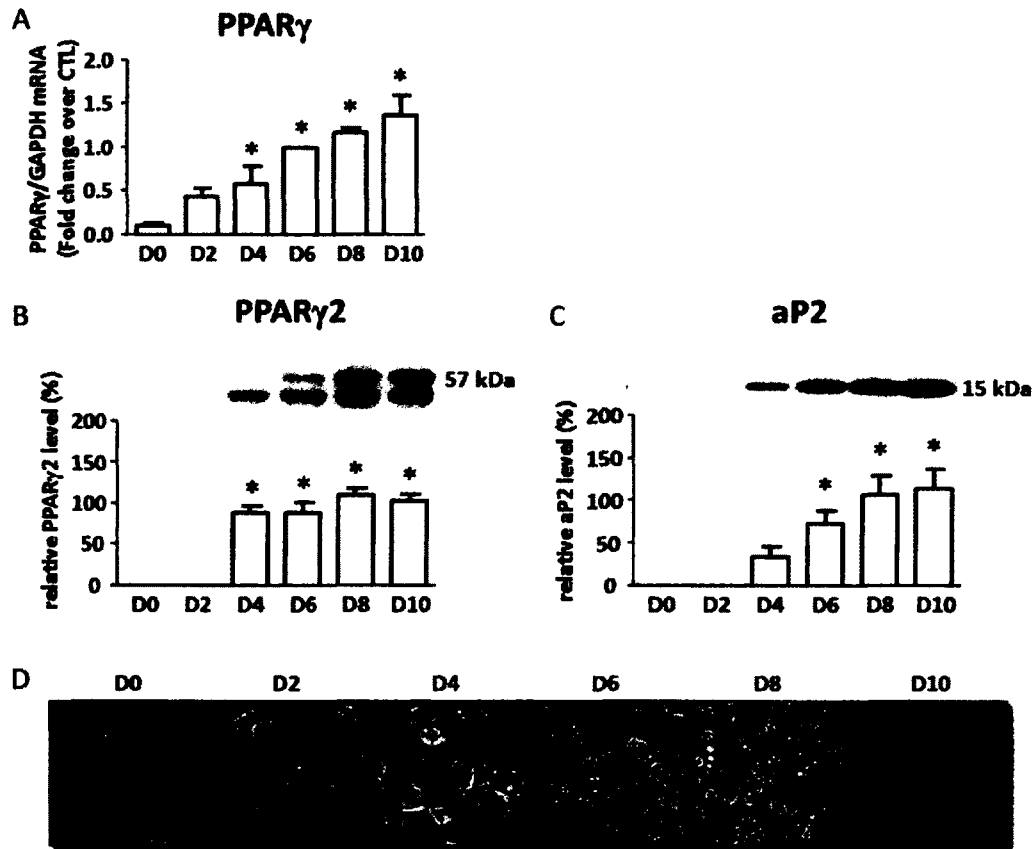
La plupart des expériences n'ont pas été faites un nombre de fois suffisante pour pouvoir effectuer des tests statistiques. Par contre, lorsque cela était possible, les différences statistiques ont généralement été vérifiées à l'aide d'un One-Way ANOVA, puisque plusieurs conditions étaient comparées. Lorsque le résultat du One-Way

ANOVA était positif, le test de Dunnett a été utilisé afin de comparer chaque condition aux conditions témoins ou au JO dépendamment de l'expérience. D'autre part, afin de comparer deux traitements, un t-test non pairé avec un intervalle de confiance de 95 % a été effectué.

## Chapitre 4 : Résultats

### 4.1 Validation du modèle cellulaire, les cellules 3T3-L1

La lignée cellulaire 3T3-L1 est un modèle d'adipogenèse très bien connu et très utilisé pour étudier les fonctions des adipocytes (Otto et Lane, 2005). Suite à l'induction de la différenciation, les cellules 3T3-L1 expriment des facteurs de transcription et des protéines spécifiques aux adipocytes en plus d'accumuler des lipides. La première expérience à réaliser était donc de valider l'augmentation de deux marqueurs de la différenciation, PPAR $\gamma$  et aP2, ainsi que l'accumulation de lipides intracellulaires suite aux protocoles d'induction utilisés. La figure 23 montre que l'ARNm de PPAR $\gamma$  augmente dès le jour 2 (J2) et que les protéines de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 apparaissent à partir de J4. Les deux isoformes de PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2) proviennent du même gène et leur séquence est la même exceptée pour 30 acides aminés située dans la partie N-terminale (Savage, 2005). Par conséquent, ces deux isoformes sont mesurées en même temps en RT-PCR avec les amorces utilisées. Par contre, puisque leur protéine n'a pas le même poids moléculaire, il est possible d'identifier leur bande respective par l'analyse de Western Blot. Il n'y a que la bande de PPAR $\gamma$ 2, celle du haut, qui a été mesurée par densitométrie puisque c'est cette isoforme qui est connue pour être indispensable à la différenciation adipocytaire (Otto et Lane, 2005). La partie inférieure montre que les adipocytes commencent à avoir des gouttelettes lipidiques à J4. À J10, les cellules sont pleinement différenciées et contiennent beaucoup de gouttelettes lipidiques qui sont mises en évidence par une coloration à l'huile rouge. Les résultats montrés dans cette figure ont été réalisés avec le protocole de différenciation 1, mais des résultats identiques ont été obtenus avec le protocole 2.



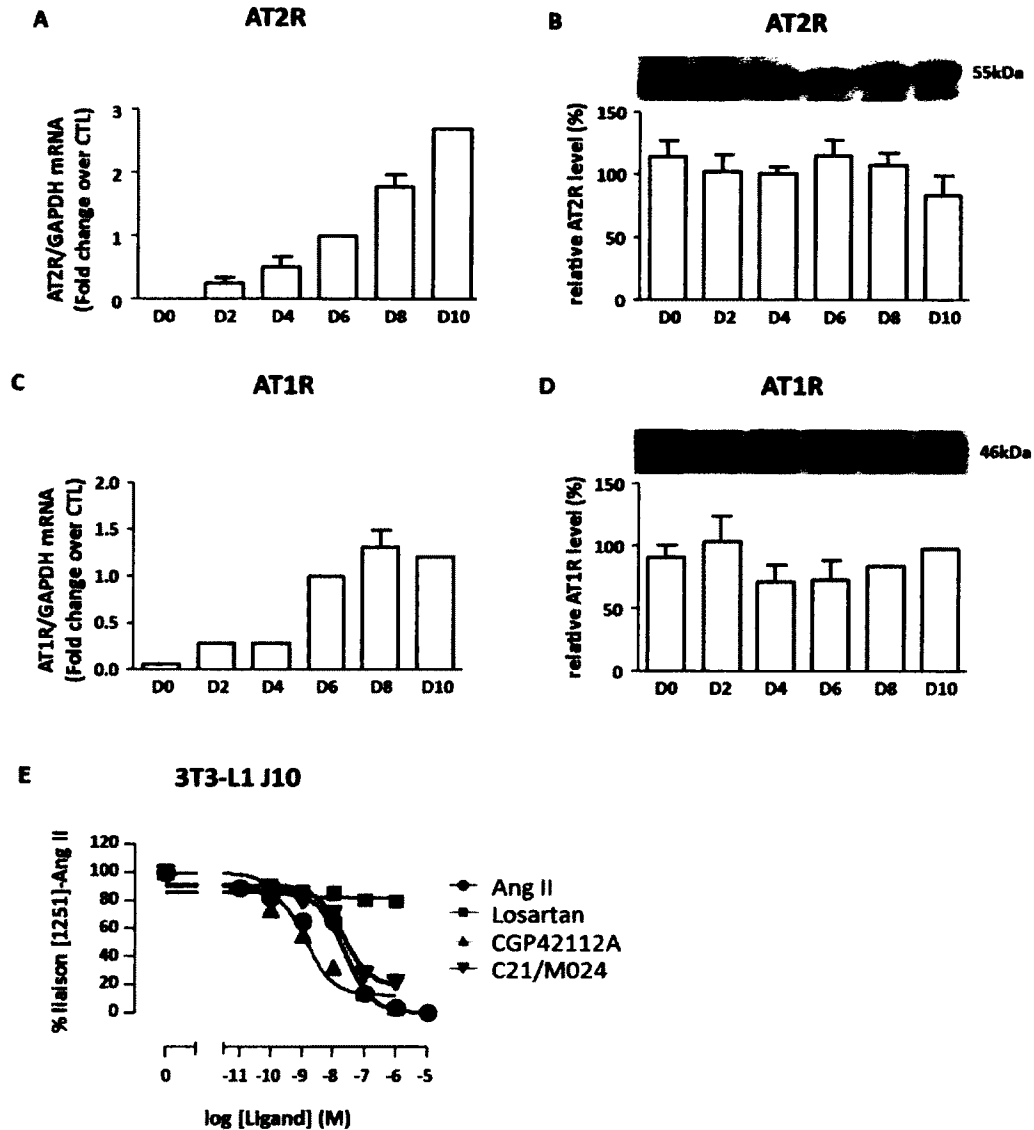
**Figure 23: Expression de PPAR $\gamma$  et d'aP2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1.** Expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  (A) et des protéines de PPAR $\gamma$ 2 (B) et d'aP2 (C) au cours de la différenciation adipocytaire. Les résultats de RT-PCR de 3 expériences indépendantes sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Des quantifications densitométriques de 4 expériences indépendantes d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées, avec le protocole 1, afin d'évaluer les niveaux protéiques. Des immunobuvardages représentatifs des expériences effectuées sont présentés au-dessus des graphiques. Les résultats des analyses Western sont présentés en pourcentage relatif comparé à un témoin (différenciation normale à J8)  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.001$  en comparaison à J0 calculées avec un One-Way ANOVA suivi d'un test de Dunnett. D) Morphologie des cellules 3T3-L1 de J0 à J10. À J10, la coloration à l'huile rouge des cellules 3T3-L1 met en évidence les gouttelettes lipidiques.



## 4.2 Expression des R-AT1 et R-AT2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1

Puisque le but du projet était de vérifier l'effet de l'activation du R-AT2 lors de l'adipogenèse, il fallait débiter par la démonstration de la présence du récepteur dans les cellules 3T3-L1. Pour ce faire, des expériences de RT-PCR, d'immunobuvardage de type Western et de liaison hormone-récepteur ont été réalisées. Les résultats obtenus avec les RT-PCR et les études de liaison hormone-récepteur pour le R-AT2 sont semblables, tandis que les résultats obtenus avec les analyses Western ne concordent pas avec ceux des deux autres expériences. La quantité d'ARNm mesurée par RT-PCR et les études de liaison hormone-récepteur réalisées avec le protocole 2, suggèrent qu'il n'y a pas de R-AT2 dans les préadipocytes. À J0, l'ARNm du R-AT2 n'a pas été détecté dans ces cellules et il n'y a eu aucune liaison spécifique des agonistes du R-AT2 lors des études de liaison hormone-récepteur. En revanche, l'ARNm a été détecté à partir du J2 et il semble augmenter tout au long du processus de différenciation (Figure 24A). Pour ce qui est des analyses Western, elles suggèrent qu'il n'y a pas de variation dans l'expression du R-AT2 lors de la différenciation (Figure 24B). Les analyses Western présentées pour le R-AT2 ont été effectuées avec le protocole 1, mais elles ont été validées avec le protocole 2. En ce qui concerne le R-AT1, de l'ARNm a été détecté à partir du J2 et augmente au cours de la différenciation (Figure 24C). Par contre, il semble être présent en moins grande quantité que le R-AT2, puisque, lors des expériences de RT-PCR, la fluorescence est détectée beaucoup plus tard dans les cycles d'amplification comparée à celle du R-AT2. Il aurait été possible de comparer l'expression des deux récepteurs de l'Ang II en effectuant des courbes standard lors des expériences de RT-PCR. Finalement, les analyses Western suggèrent qu'il y a du R-AT1, mais qu'il n'y a pas de variation lors de la différenciation, comme pour le R-AT2 (Figure 24D). Pour ce qui est des études de déplacement, le CGP42112A et le M24 déplacent la liaison de l'Ang II marquée de façon identique à l'Ang II non marquée indiquant la présence de sites AT2 dans les adipocytes à J10 (Figure 24E). Par contre, le losartan n'induit pas de

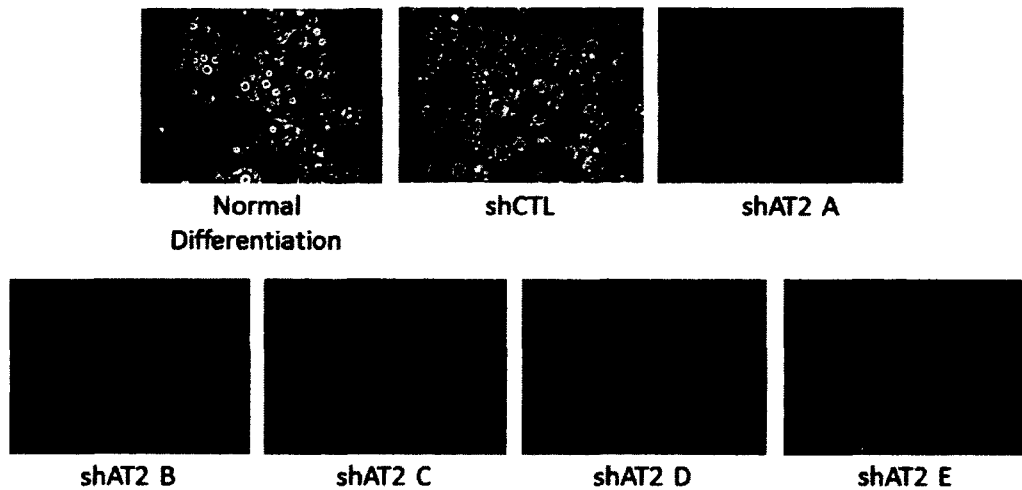
déplacement de l'Ang II radiomarqué autant dans les préadipocytes que dans les adipocytes à J10 indiquant l'absence du R-AT1 (Figure 24E). Tous les résultats présentés pour le R-AT1 ont été effectués avec le deuxième protocole de différenciation.



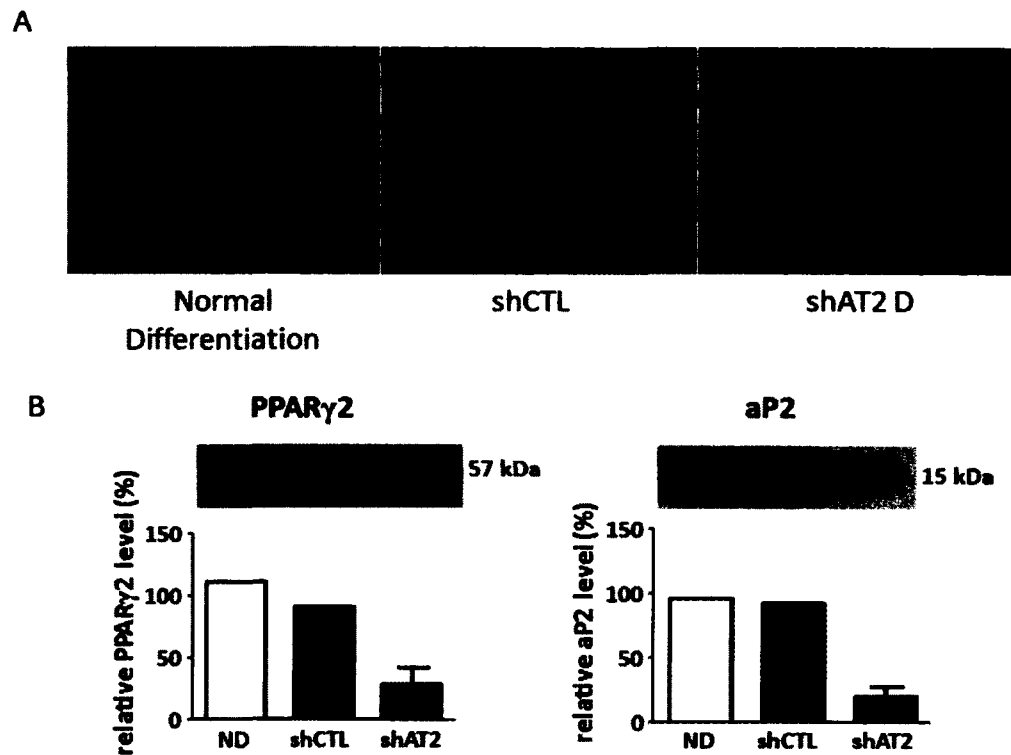
**Figure 24: Expression des R-AT1 et R-AT2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1.** Niveaux d'ARNm et de protéines du R-AT2 (A, B) et du R-AT1 (C, D) au cours de la différenciation normale des cellules 3T3-L1. Les cellules ont été différenciées avec le protocole 1 (B) ou avec le protocole 2 (A, C, D, E). L'ARNm des récepteurs a été mesuré à partir d'au moins 1 expérience de RT-PCR, tandis que les niveaux protéiques ont été calculés à partir d'au moins 2 expériences d'immunobuvardage de type Western indépendante. Les résultats de RT-PCR sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM tandis que les résultats de Western sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. Des immunobuvardages représentatifs des expériences de Western sont présentés au-dessus des graphiques. E) Études de déplacement réalisées en duplicata sur les cellules 3T3-L1 à J10. Les résultats sont présentés en % de liaison par rapport à la liaison maximale de [ $I^{125}$ ]-Ang II en absence d'agent compétiteur.

### 4.3 Invalidation du R-AT2 avec les shRNA

La technique d'invalidation du R-AT2 à l'aide d'infection lentivirale contenant un shRNA contre le R-AT2 a été utilisée afin de vérifier l'importance du R-AT2 dans l'adipogenèse. Une étude préliminaire avec les 5 séquences disponibles de shRNA contre le R-AT2 a été effectuée afin de choisir la séquence à utiliser (Figure 25). La séquence D a été choisie puisqu'elle diminue la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1 (cellules allongées sans gouttelettes lipidiques) en plus de diminuer de façon importante les niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 (Figure 26). De plus, très peu de mort cellulaire était observée suite à son utilisation.

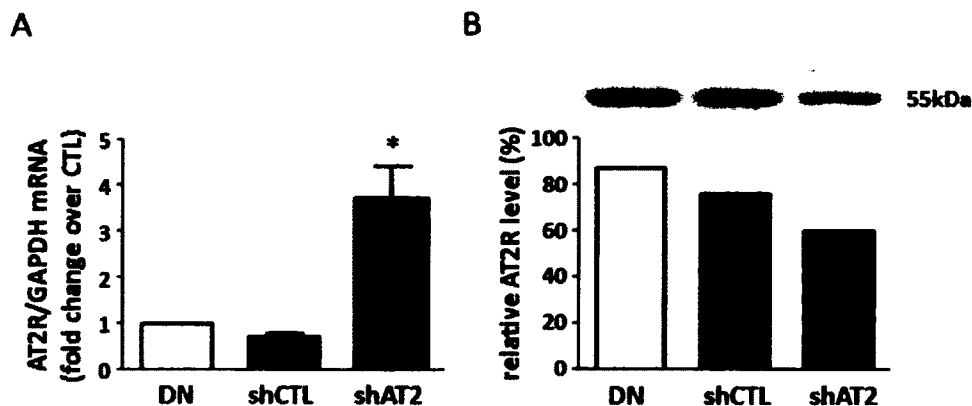


**Figure 25: Invalidation du R-AT2 à l'aide de shRNAs.** Phénotype des cellules 3T3-L1 à J8 suivant l'induction de la différenciation en présence d'une infection lentivirale contenant un shRNA CTL ou une séquence de shRNA pour inactiver le R-AT2 (A à E). Les infections ont été réalisées 3 jours avant l'induction (J-3) et les photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase.



**Figure 26: Diminution du R-AT2 à l'aide de shAT2 D.** A) Morphologie des cellules à J8 suite à l'utilisation du shAT2 D. B) Diminution des niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 à J8 suite à l'infection avec des virus contenant le shAT2 D. Des immunobuvardages de type Western représentatifs d'au moins 2 expériences indépendantes sont représentés au-dessus des graphiques. Les résultats sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée contrôle.

Afin de valider l'efficacité du virus à diminuer l'expression du R-AT2, les niveaux d'ARNm et de protéines ont été quantifiés. Étonnamment, l'ARNm du R-AT2 est augmenté et les niveaux protéiques semblent diminuer suite à l'utilisation des lentivirus. Par contre, les protéines ont été mesurées une seule fois (Figure 27). Nous nous attendions plutôt à une diminution de l'ARNm et des protéines. De plus, lorsque l'expérience a été refaite, l'infection lentivirale ne semblait plus fonctionner puisque les cellules 3T3-L1 se différençaient et il n'y avait plus de variation entre l'ARNm du R-AT2 d'une différenciation normale et d'une infection lentivirale.

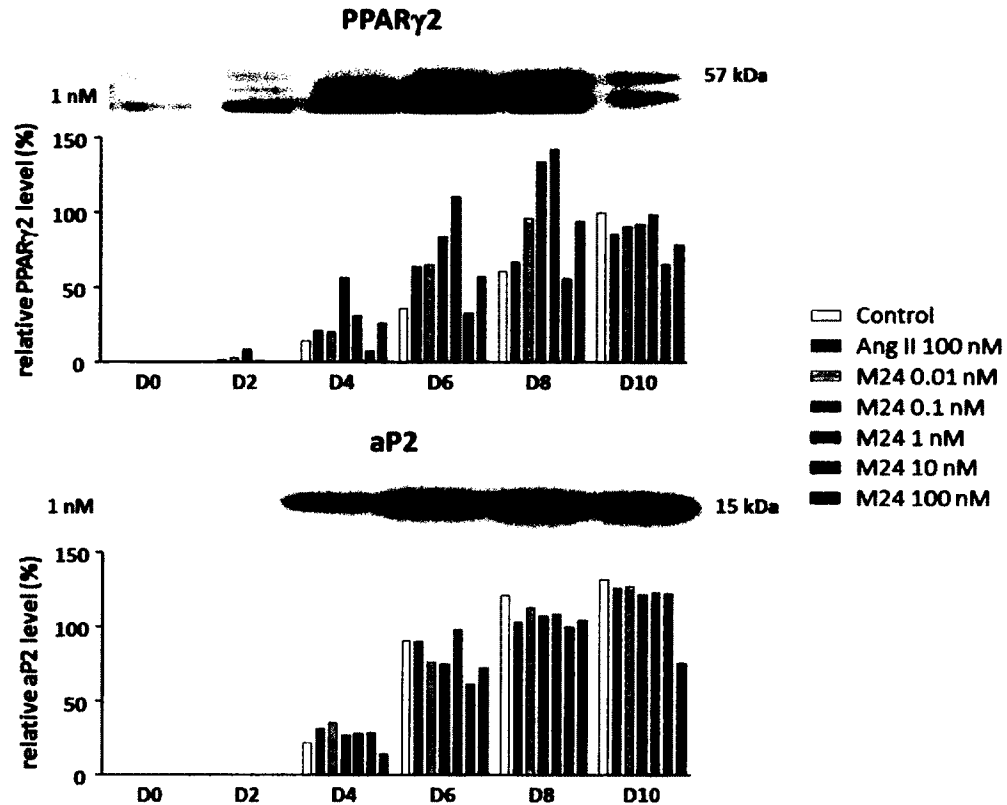


**Figure 27: Expression du R-AT2 suite à une infection lentivirale.** Niveaux d'ARNm et de protéines à J8 suite à l'utilisation du shAT2 D. A) L'ARNm a été mesuré d'après 3 expériences de RT-PCR indépendantes et les résultats sont présentés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. B) L'expression protéique du R-AT2 a été mesurée d'après 1 seule expérience d'immunobuvardage de type Western représentée au-dessus du graphique et les résultats sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée contrôle (différenciation normale à J8). \*  $P < 0.05$  comparé à une différenciation normale calculé à l'aide d'un One-Way ANOVA, suivi d'un test de Dunnett.

## 4.4 Effet de l'Ang II et du M24 sur la différenciation adipocytaire en conditions normales

### 4.4.1 Choix des concentrations du M24

Des expériences préliminaires ont été effectuées afin de choisir les concentrations de M24 à utiliser. Cinq concentrations de M24 ont été testées (0.01, 0.1, 1, 10, et 100 nM) et les protéines de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 ont été mesurées à tous les 2 jours de J0 à J10. Ces expériences ont été effectuées avec le premier protocole de différenciation et les concentrations de 0.1 et 1 nM ont été choisies puisqu'elles semblaient avoir le plus d'effets sur l'expression de PPAR $\gamma$ 2 (Figure 28). Par contre, étant donné que la concentration de 0.1 nM est en dessous de la constante de dissociation du M24 pour le R-AT2 ( $k_i = 0.4$  nM), cette concentration a été utilisée uniquement pour certaines expériences.

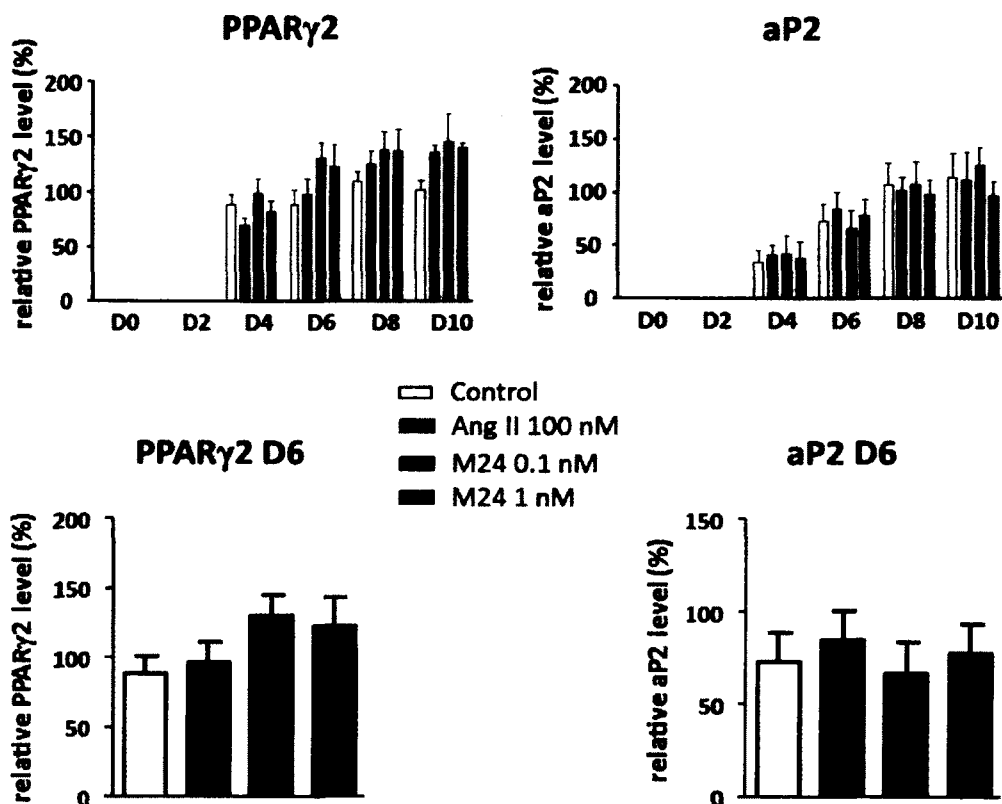


**Figure 28: Expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 en présence de différents traitements.** Niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 lors de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 en présence d'Ang II 100 nM ou de 5 concentrations de M24 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM). Les résultats d'analyses densitométriques de 2 expériences indépendantes d'immunobuvardage de type Western sont exprimés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin. Des immunobuvardages représentatifs des expériences de Western sont présentés au-dessus des graphiques. Les cellules ont été différenciées selon le protocole 1.

#### 4.4.2 L'Ang II et le M24 n'ont pas d'effets sur les marqueurs de la différenciation adipocytaire en conditions normales

Afin de tester les effets de l'activation des R-AT1 et R-AT2 sur le processus de différenciation, un traitement à l'Ang II 100 nM et deux traitements au M24 (0.1 et 1 nM) ont été comparés à une différenciation normale. Les différents traitements n'affectent pas de manière significative les niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2

lorsque le protocole 1 est utilisé, donc lorsqu'il y a toujours de l'insuline 2  $\mu$ M dans le milieu de culture (Figure 29).

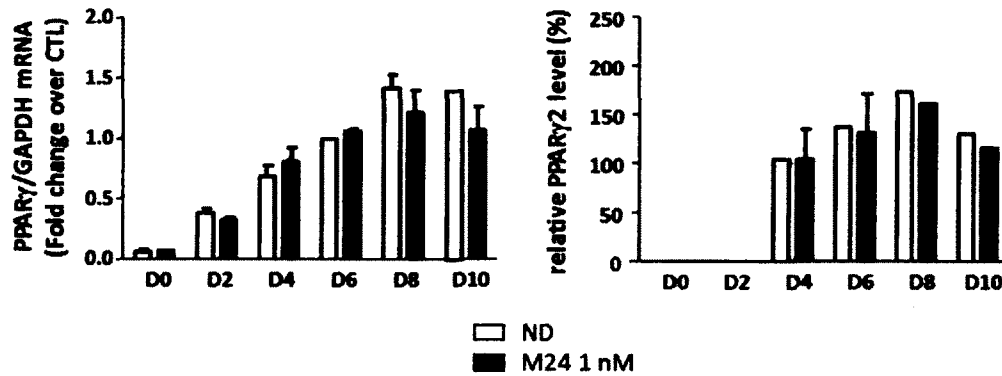


**Figure 29: Expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 (les cellules ont été différenciées selon le protocole 1).** Niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 lors d'une différenciation normale des cellules 3T3-L1, en présence d'Ang II 100 nM ou de M24 (0.1 ou 1 nM). La partie inférieure de la figure illustre les résultats à J6. Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 4 expériences indépendantes sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM. Les différences statistiques ont été vérifiées à l'aide d'un One-Way ANOVA, mais aucune différence significative n'a été observée.

Puisque l'utilisation du protocole 1 stimule de manière maximale la différenciation adipocytaire principalement dû à la présence d'insuline présente tous les jours, le protocole 2 a été testé (même mélange pour l'induction de la différenciation, mais avec de l'insuline 2  $\mu$ M uniquement pendant les 4 premiers jours). Dans ce cas-ci,



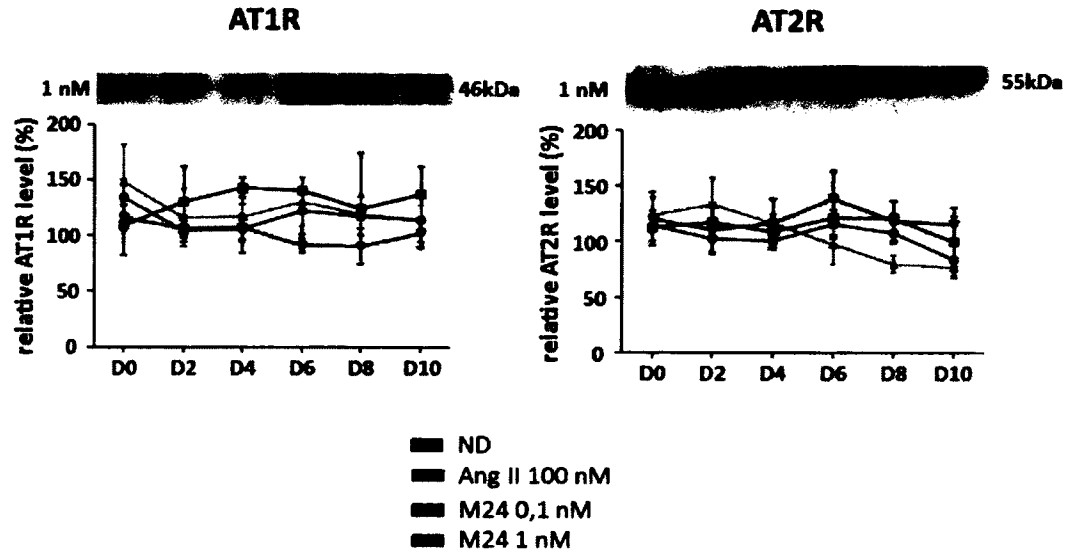
une seule concentration de M24 (1 nM) a été comparée à une différenciation normale. Les effets sur PPAR $\gamma$  ont été évalués en ARNm et en protéines (Figure 30). Encore une fois, le M24 ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de PPAR $\gamma$ .



**Figure 30: Niveaux d'ARNm et de protéines de PPAR $\gamma$  lors de l'utilisation du deuxième protocole de différenciation.** ARNm de PPAR $\gamma$  et expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 lors d'une différenciation normale (ND) des cellules 3T3-L1 ou en présence de M24 1 nM. L'ARNm est présenté en moyenne  $\pm$  SEM et les résultats ont été évalués à partir d'au moins 1 expérience. Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 2 expériences indépendantes sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. Les différences statistiques ont été vérifiées à l'aide d'un t-test non païré, mais aucune différence significative n'a été observée.

#### 4.4.3 L'Ang II et le M24 n'ont pas d'effet sur les niveaux d'expression des R-AT1 et AT2 en conditions normales

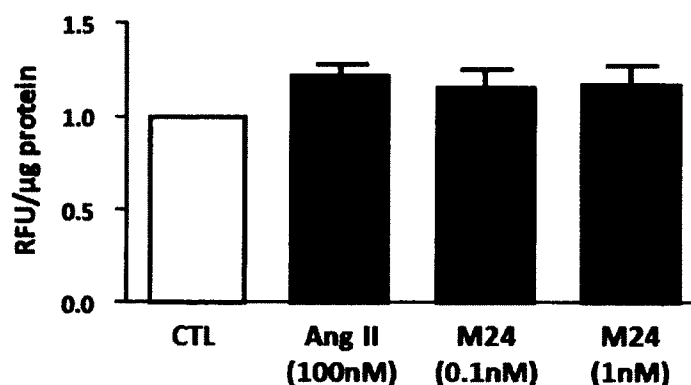
Nous voulions savoir si l'Ang II ou le M24 pouvait stimuler l'expression des R-AT1 et R-AT2. Par conséquent, leurs niveaux protéiques ont été mesurés tout au long de la différenciation des cellules 3T3-L1 suite à un traitement à l'Ang II (100 nM) ou au M24 (0.1 ou 1 nM). Avec le protocole 1, ces traitements n'influencent pas les niveaux protéiques des récepteurs (Figure 31). Les mêmes résultats ont été obtenus suite à un traitement au M24 avec l'utilisation du protocole 2 (Figure 32).



**Figure 31: Expression protéique des R-AT1 et R-AT2 au cours de l'adipogénèse lorsque les cellules sont différenciées selon le protocole 1. Niveaux protéiques des R-AT1 et R-AT2 lors d'une différenciation normale (ND) des cellules 3T3-L1, en présence d'Ang II 100 nM, ou de M24 (0.1 ou 1 nM). Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 3 expériences indépendantes d'immunobuvardage de type Western, représentés au-dessus des graphiques, sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM. Les différences statistiques ont été vérifiées à l'aide d'un One-Way ANOVA, mais aucune différence significative n'a été observée.**



l'accumulation des lipides intracellulaires à J8 (Figure 33). Cette durée a été choisie afin d'éviter une accumulation trop forte de lipides, car les adipocytes contenant beaucoup de gouttelettes lipidiques ont tendance à décoller plus facilement. Par contre, pour la suite des expériences de quantification lipidique, le J6 a été choisi afin d'uniformiser les résultats étant donné que les effets de plusieurs traitements ont été observés à cette journée.

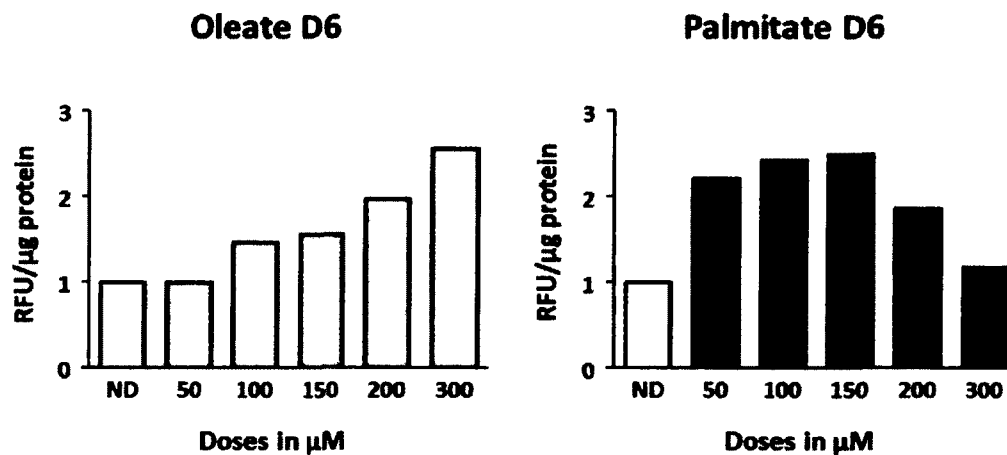


**Figure 33: Effet de l'Ang II et du M24 sur la quantification des lipides à J8.** Accumulation lipidique mesurée avec l'Adipored lors d'une différenciation normale des cellules 3T3-L1, en présence d'Ang II 100 nM, ou de M24 (0.1 ou 1 nM). Les cellules ont été différenciées selon le protocole 1. Chaque condition a été mesurée 4 fois. Les résultats sont présentés en unité relative de fluorescences (RFU) par  $\mu\text{g}$  de protéine  $\pm$  SEM de 9 expériences indépendantes. Les différences statistiques ont été vérifiées à l'aide d'un One-Way ANOVA, mais aucune différence significative n'a été observée.

#### 4.5 Conditions de surcharge lipidique

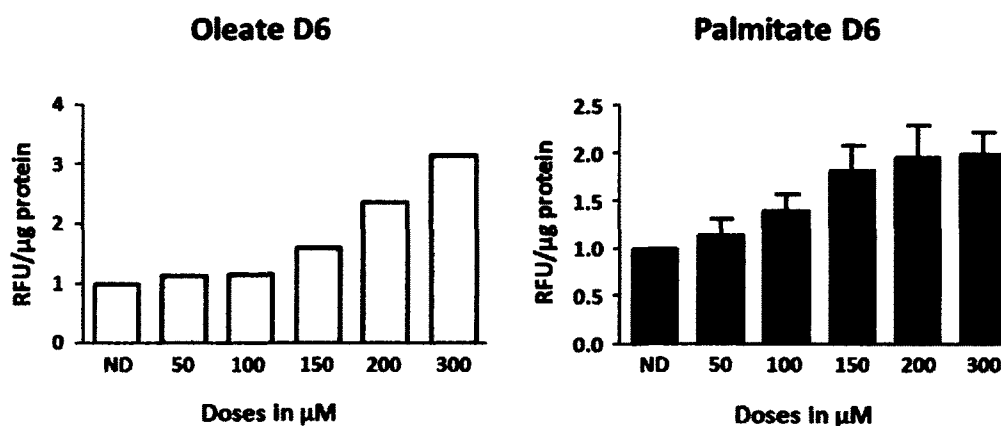
Le R-AT2 est réexprimé lors de pathologies ou d'un déséquilibre de l'homéostasie, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle plus important dans ces conditions (Deshayes et Nahmias, 2005; Savoia *et al.*, 2007; Siragy, 2009; Steckelings *et al.*, 2011). Par conséquent, nous voulions voir l'effet potentiel de l'activation du R-AT2 lors de la différenciation adipocytaire en condition de surcharge lipidique, une condition pouvant simuler un état de déséquilibre de l'homéostasie énergétique. L'oléate, un

acide gras monoinsaturé, et le palmitate, un acide gras saturé, ont été utilisés afin d'induire la surcharge lipidique. Une expérience de quantification lipidique à J6, réalisée avec le protocole 1, a été effectuée avec des concentrations variant de 50 à 300  $\mu\text{M}$  de lipides afin de déterminer les concentrations à utiliser (Figure 34). Le traitement à l'oléate augmente les lipides intracellulaires de façon dose-dépendante. Un traitement au palmitate à 50, 100, ou 150  $\mu\text{M}$  est associé à une augmentation rapide et importante des lipides intracellulaires, mais cette accumulation atteint un plateau à 150  $\mu\text{M}$ . À des concentrations plus élevées de palmitate (200 ou 300  $\mu\text{M}$ ), l'accumulation des lipides intracellulaires diminue. De plus, de la mort cellulaire est observée à ces concentrations, ce qui suggère que le palmitate à fortes concentrations est toxique pour les cellules 3T3-L1. Les concentrations de 150 et 300  $\mu\text{M}$  ont été choisies pour effectuer les expériences subséquentes. La concentration de 300  $\mu\text{M}$  de palmitate a été choisie malgré son effet toxique, puisque nous pensons que le cotraitement avec le M24 pourrait avoir un effet protecteur et diminuer la toxicité observée.



**Figure 34: Quantification des lipides à J6 en présence d'oléate ou de palmitate (expérience réalisée selon le protocole 1).** Des concentrations d'oléate et de palmitate allant de 50 à 300  $\mu\text{M}$  ont été comparées à une différenciation normale (ND). Les cellules ont été différenciées selon le protocole 1. Chaque condition a été mesurée 4 fois et l'expérience a été effectuée 1 fois. Les résultats sont présentés en unité relative de fluorescence (RFU) par  $\mu\text{g}$  de protéine et ils sont comparés à une différenciation normale.

Pour les expériences réalisées selon le protocole 2, les résultats obtenus sont un peu différents. Lorsque l'insuline est présente dans le milieu pour les quatre premiers jours uniquement, un traitement au palmitate à fortes concentrations (200 ou 300  $\mu\text{M}$ ) ne semble plus être toxique pour les cellules (Figure 35). Nous avons donc choisi les concentrations de 150 et 200  $\mu\text{M}$  pour effectuer les expériences utilisant le protocole 2.

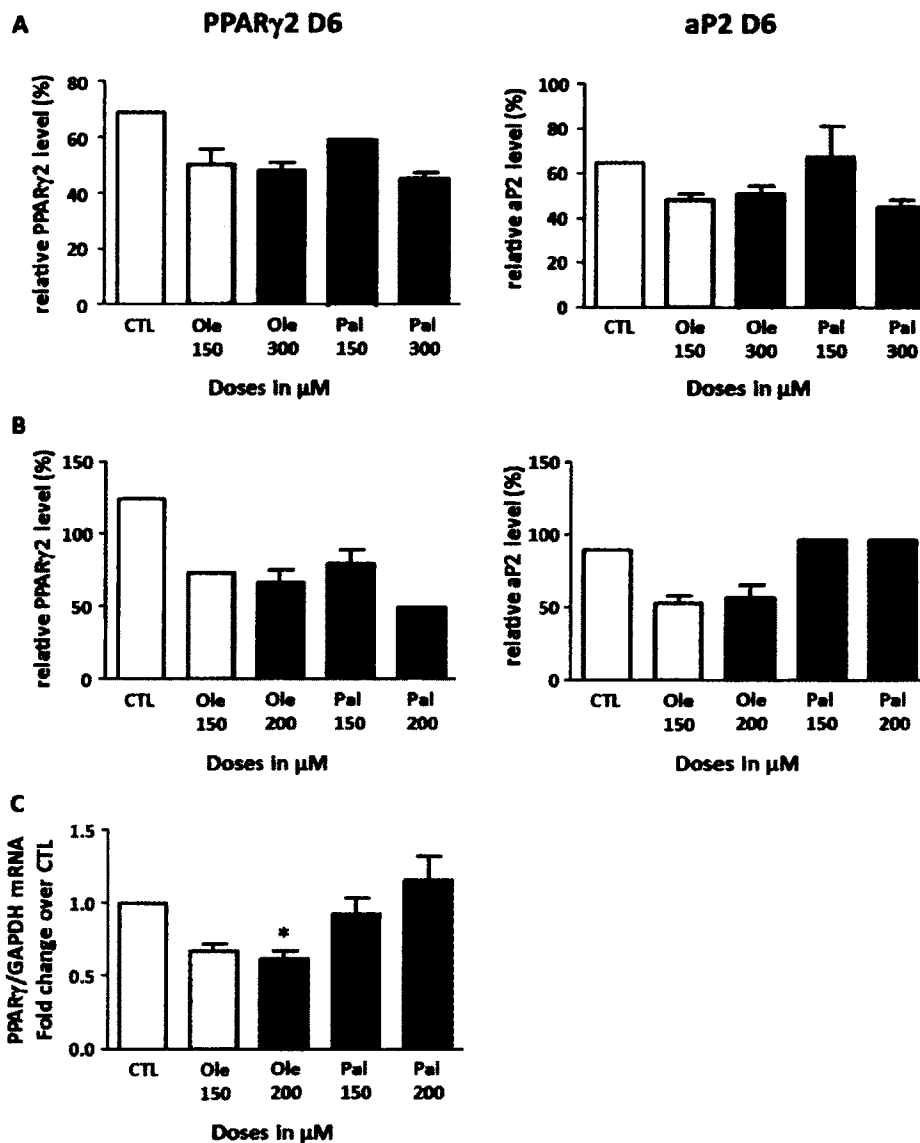


**Figure 35: Quantification des lipides à J6 en présence d'oléate ou de palmitate (expériences réalisées avec le protocole 2).** Des concentrations d'oléate et de palmitate allant de 50 à 300  $\mu\text{M}$  ont été comparées à une différenciation normale (ND). Chaque condition a été mesurée 4 fois et l'expérience a été effectuée 2 fois pour le traitement à l'oléate et 3 fois pour celui au palmitate. Les résultats sont présentés en unité relative de fluorescence (RFU) par  $\mu\text{g}$  de protéine  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. Les différences statistiques ont été vérifiées à l'aide d'un One-Way ANOVA, mais aucune différence significative n'a été observée.

#### 4.5.1 Effet d'une surcharge lipidique sur les marqueurs de la différenciation et les R-AT1 et R-AT2

Un traitement à l'oléate semble être associé à une diminution de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 peu importe le protocole et les concentrations utilisés (figure 36A, B). Lorsque les cellules sont différenciées selon le protocole 1, un traitement au palmitate à 150  $\mu\text{M}$  ou

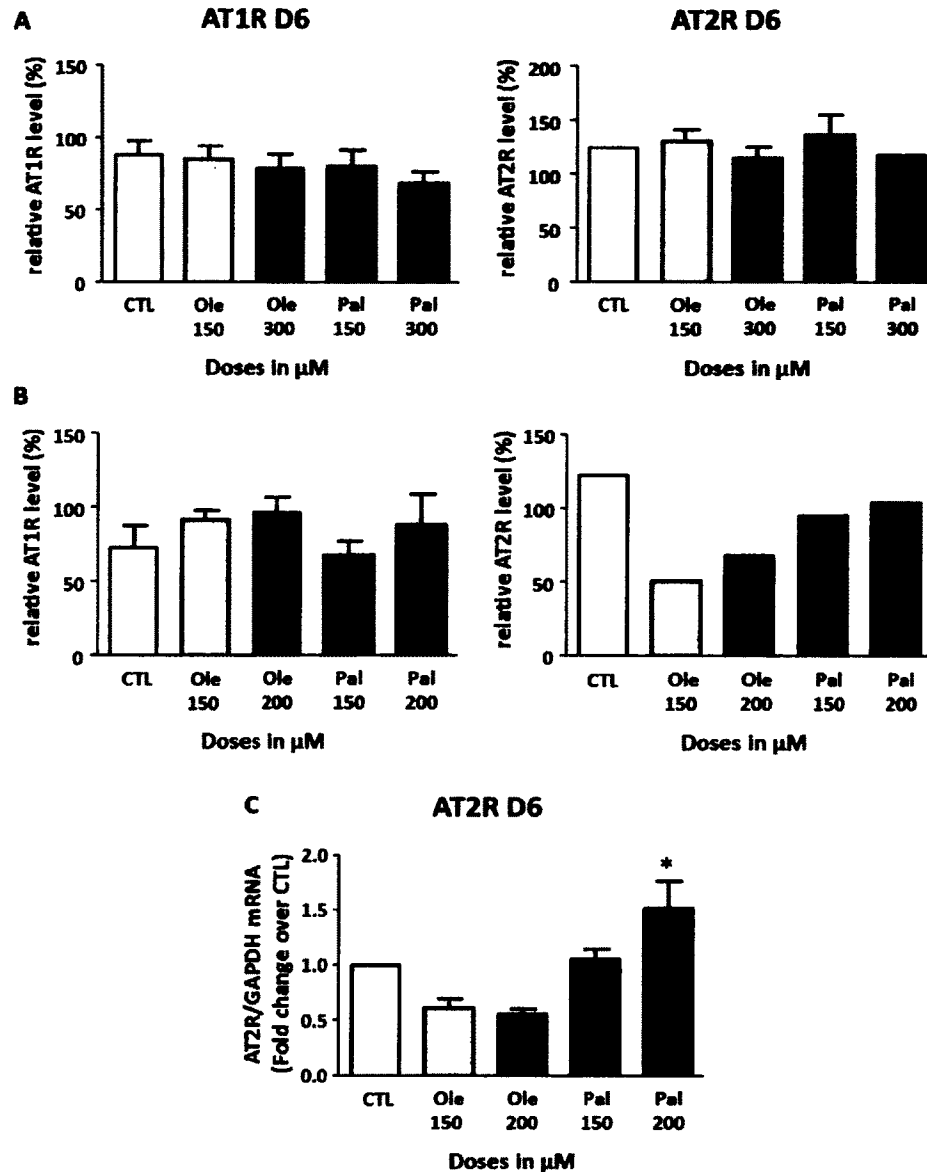
300  $\mu\text{M}$  semble diminuer l'expression de PPAR $\gamma$ 2, tandis que l'expression d'aP2 semble diminuer seulement suite à 300  $\mu\text{M}$  de palmitate (figure 36A). Avec le protocole 2, un traitement au palmitate à 150 ou 200  $\mu\text{M}$  semble diminuer uniquement l'expression de PPAR $\gamma$ 2 (figure 36B). Les extraits protéiques ont été effectués à J6. L'ARNm de PPAR $\gamma$  a aussi été mesuré avec l'utilisation du deuxième protocole (Figure 36C). L'ARNm de PPAR $\gamma$  est légèrement diminué suite à 150  $\mu\text{M}$  d'oléate, mais significativement diminué suite à 200  $\mu\text{M}$ . Il n'est pas modifié de manière significative par le palmitate.



**Figure 36: Expression de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 en conditions de surcharge lipidique.** A) Niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 à J6 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 selon le protocole 1 et B) selon le protocole 2. L'expression de ces deux marqueurs a été étudiée en présence d'oléate ou de palmitate (150 ou 300  $\mu$ M pour le protocole 1 et 150 ou 200  $\mu$ M pour le protocole 2). Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 2 expériences indépendantes sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. C) ARNm de PPAR $\gamma$  lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 selon le protocole 2. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. \*  $P < 0.05$  en comparaison avec la condition témoin (différenciation normale à J6) calculées avec un One-Way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.



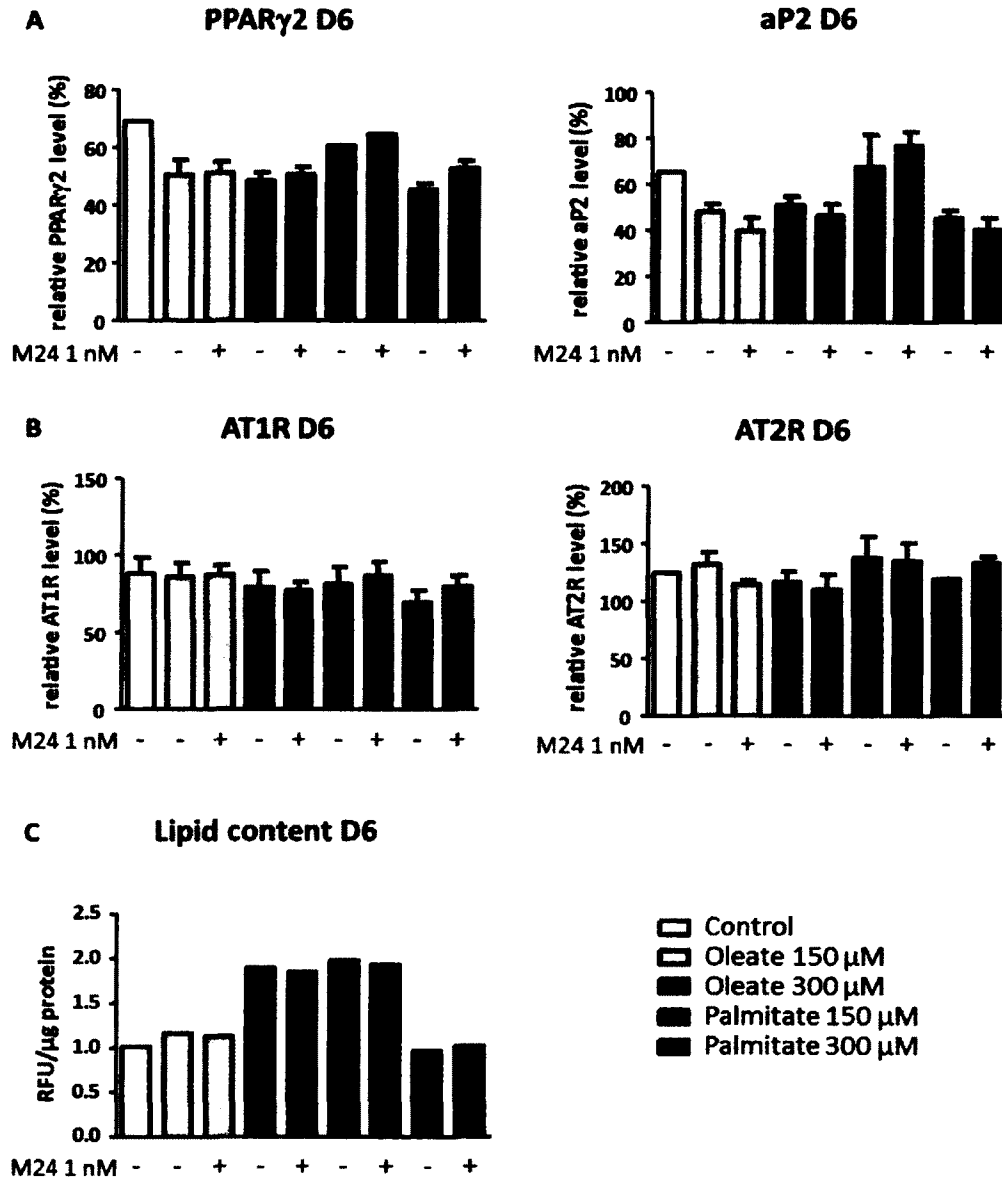
En ce qui concerne les récepteurs de l'Ang II, peu importe le protocole de différenciation et les concentrations utilisées, l'expression protéique des R-AT1 et R-AT2 ne semble pas être modifiée (Figure 37). Les résultats d'analyse Western pour le R-AT2 obtenus avec le protocole 2 varient beaucoup, mais plusieurs conditions ont été testées une seule fois, dû à la difficulté d'obtenir des bandes claires avec l'anticorps contre le R-AT2. L'ARNm du R-AT2 a aussi été mesurée suite à l'utilisation du protocole 2 (Figure 37C). Ce dernier est diminué suite à un traitement à 150 ou 200  $\mu\text{M}$  d'oléate, et augmenté suite à un traitement au palmitate à 200  $\mu\text{M}$ . Par contre, il n'y a que l'augmentation de l'ARNm suite à 200  $\mu\text{M}$  de palmitate qui est statistiquement différente d'une différenciation normale.



**Figure 37: Expression des R-AT1 et R-AT2 en conditions de surcharge lipidique.** Niveaux protéiques du R-AT1 et du R-AT2 à J6 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 en présence d'oléate ou de palmitate. A) Les cellules ont été différenciées selon le protocole 1 ou B) selon le protocole 2. Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 2 expériences indépendantes de Western pour le protocole 1 et d'une expérience pour le protocole 2 sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. C) ARNm du R-AT2 lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 selon le protocole 2. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. \*  $P < 0.05$  en comparaison avec la condition contrôle (différenciation normale à J6) calculées avec un One-Way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

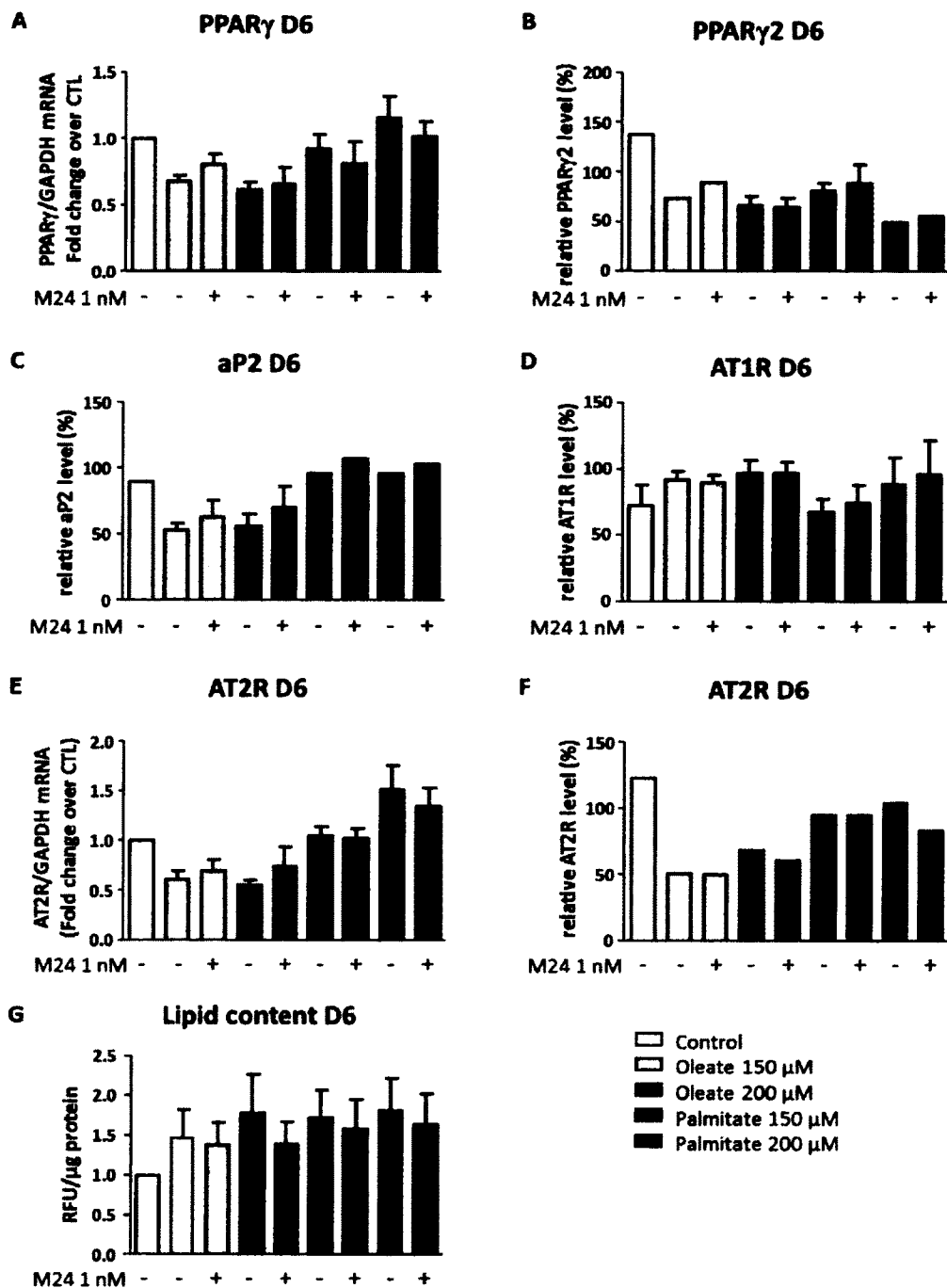
## 4.6 Effet du M24 en conditions de surcharge lipidique

Les effets d'un cotraitement avec le M24 ont été explorés étant donné la possibilité d'un rôle protecteur du R-AT2 dans des conditions pathologiques. Ils ont été observés à J6, puisque des expériences préliminaires suggéraient que le M24 avait des effets plus importants à J6 plutôt qu'à J10. Un cotraitement avec le M24 réalisé avec le protocole 1 ne semble pas modifier la plupart des résultats obtenus en condition de surcharge lipidique, que ce soit au niveau des marqueurs de la différenciation, des récepteurs de l'Ang II, ou de l'accumulation lipidique (Figure 38). Les niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 suite à un cotraitement au M24 et au palmitate à 300  $\mu$ M semblent légèrement supérieurs à ceux obtenus avec 300  $\mu$ M de palmitate seul. Dans un même ordre d'idées, l'expression protéique du R-AT2 suite à un cotraitement au M24 et à l'oléate à 150  $\mu$ M semble plus basse que celle obtenue suite à 150  $\mu$ M d'oléate seul. Par contre ces différences ne sont pas statistiquement significatives.



**Figure 38: Effet du M24 en conditions de surcharge lipidique (cellules différenciées selon le protocole 1).** A) niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2, d'aP2 et B) des récepteurs de l'Ang II suite à un cotraitement au M24 1 nM et à un acide gras (oléate ou palmitate). Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 2 expériences indépendantes d'immunobuvardage de type Western sont présentés en pourcentage relatif comparé à la journée témoin  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. C) Quantification lipidique mesurée à l'aide de l'Adipored suite à un cotraitement au M24 1 nM et à un acide gras. Les deux concentrations d'acides gras utilisées étaient 150 et 300  $\mu$ M. Chaque condition a été mesurée 4 fois et l'expérience a été réalisée 1 fois. Les résultats sont présentés en unité relative de fluorescence (RFU) par  $\mu$ g de protéine. Les différences statistiques entre le cotraitement avec le M24 et la surcharge lipidique seule ont été évaluées avec un t-test non païré, mais aucune différence significative n'a été observée.

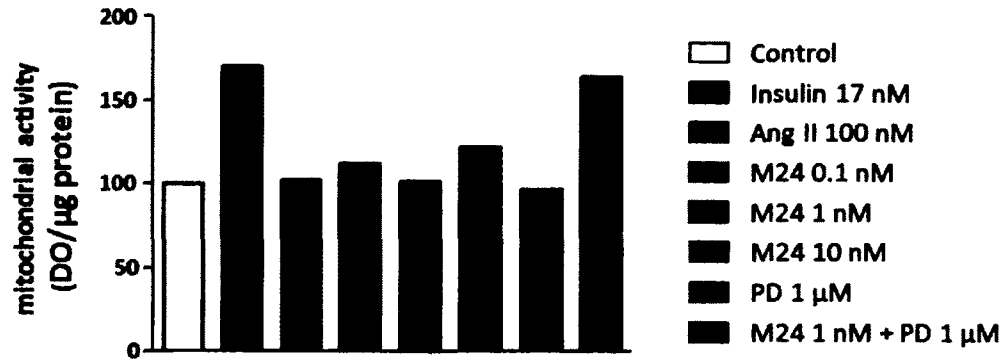
Lorsque les cellules sont différenciées avec le protocole 2, un traitement au M24 semble augmenter légèrement l'expression de PPAR $\gamma$  suite à un traitement à l'oléate à 150  $\mu$ M (Figure 39A et B). Le cotraitement au M24 et au palmitate (150 et 200  $\mu$ M) semble légèrement diminuer l'ARNm en comparaison à la surcharge seule (Figure 39A). Par contre, l'expression protéique d'aP2 et du R-AT1 ne semble pas être modifiée par le M24 de même que les niveaux d'ARNm du R-AT2 (Figure 39B, C, D, et E). D'autre part, l'expression protéique du R-AT2 suite à un cotraitement au M24 et au palmitate à 200  $\mu$ M semble diminuer par rapport à celle de la surcharge seule. Toutes les variations d'ARNm ne sont pas statistiquement significatives et la significativité des niveaux protéiques ne peut pas être évaluée (Figure 39E et F). Finalement, le M24 ne semble pas avoir d'effet sur l'accumulation lipidique (Figure 39G).



**Figure 39: Effet du M24 en conditions de surcharge lipidique (cellules différenciées selon le protocole 2). A) et E) niveaux d'ARNm de PPAR $\gamma$  et du R-AT2. B), C), D), et F) Expression protéique de PPAR $\gamma$ 2, d'aP2, et des récepteurs de l'Ang II en présence d'un cotraitement au M24 1 nM et à un acide gras (oléate ou palmitate). Les résultats d'au moins 3 expériences indépendantes de RT-PCR sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM. Les résultats d'analyses densitométriques d'au moins 1 expérience sont présentés en pourcentage relatif comparé à un témoin  $\pm$  SEM, lorsqu'il y a lieu. G) Quantification lipidique suite à un cotraitement au M24 1 nM et à un acide gras. Les deux concentrations d'acides gras utilisées étaient 150 et 200  $\mu$ M. Chaque condition a été mesurée 4 fois et l'expérience a été réalisée 3 fois. Les résultats sont présentés en unité relative de fluorescence (RFU) par  $\mu$ g de protéine. Les différences statistiques entre un cotraitement avec le M24 et la surcharge lipidique seule ont été évaluées avec un t-test non pairé, mais aucune différence significative n'a été trouvée.**

#### 4.7 Effet de l'activation des R-AT1 et AT2 sur la prolifération cellulaire des préadipocytes

Puisque les résultats obtenus suite à l'étude de l'effet du M24 sur le processus de différenciation n'ont pas été très concluants, nous voulions vérifier si le M24 pouvait avoir un effet sur la prolifération des préadipocytes. Un essai de prolifération avec l'ensemble MTS a été effectué. Cette technique permet d'évaluer la prolifération cellulaire des préadipocytes en mesurant la quantité de formazan produit suite à la dégradation du tétrazolium par NADPH ou NADH. Plusieurs traitements ont été utilisés et l'expérience a été effectuée une seule fois (Figure 40). L'augmentation de l'activité mitochondriale suite à un traitement à l'insuline à 17 nM prouve que l'expérience a fonctionné. D'après les résultats, les différents composés n'auraient pas d'effet sur la prolifération des préadipocytes. Par contre, un cotraitement au M24 1 nM et au PD123319 1  $\mu$ M semble augmenter la prolifération cellulaire, mais cette expérience n'a été réalisé qu'une fois.

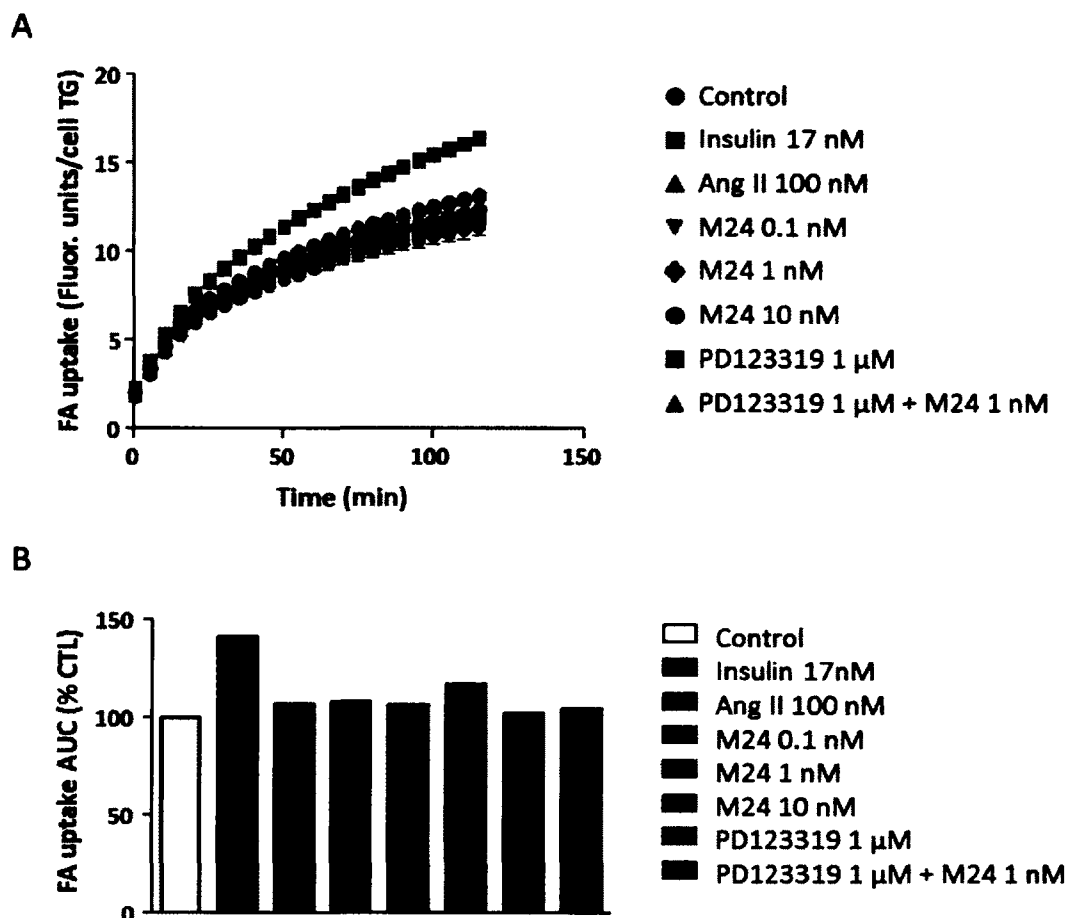


**Figure 40: Activité mitochondriale dans les préadipocytes (essai MTS).** Les cellules 3T3-L1 ont été préalablement traitées pendant 24 h avec différents composés. Les résultats sont présentés en densité optique par µg de protéine et l'expérience a été effectuée une seule fois en triplicata.

#### 4.8 Effet de l'activation des R-AT1 et AT2 sur l'incorporation des acides gras

La captation des acides gras par les adipocytes est une de leurs principales fonctions. Par conséquent, nous voulions vérifier si l'activation des récepteurs de l'Ang II influençait ce processus. Pour ce faire, la captation et l'incorporation des triglycérides a été mesurée par la technique de Bodipy (Figure 41). L'expérience a fonctionné puisque l'insuline stimule l'incorporation des acides gras dans les adipocytes matures. Par contre, les différents traitements effectués ne semblent pas avoir d'effet sur l'incorporation des acides gras. Il est certain que l'expérience a été réalisée qu'une seule fois, donc pour valider l'effet de l'activation du R-AT1 ou R-AT2, il faudrait la répéter.





**Figure 41: Captation et incorporation des triglycérides dans les adipocytes matures.**  
 A) Incorporation des acides gras pendant 120 min dans des adipocytes matures, suite à différents traitements, mesurée à l'aide de la technique de Bodipy. Les résultats sont présentés en unité de fluorescence et ils ont été normalisés sur le contenu en triglycérides des cellules B) Aire sous la courbe de l'incorporation des acides gras dans les adipocytes matures. Les adipocytes matures ont été traités avec les différents composés pendant 1 h et ensuite l'incorporation des acides gras a été mesurée. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle et l'expérience a été effectuée une seule fois en duplicata.

## Chapitre 5 : Discussion

### 5.1 Choix du modèle cellulaire

Les cellules 3T3-L1 sont utilisées depuis longtemps afin d'étudier les fonctions des adipocytes. Puisque c'est une lignée cellulaire, leur culture permet d'obtenir des cellules homogènes, ce qui rend l'interprétation des résultats plus uniformes en réduisant la variabilité. De plus, ces derniers peuvent être attribués à un seul type cellulaire (Otto et Lane, 2005). Les expériences peuvent aussi être refaites assez facilement. Ces cellules ont été isolées de fibroblastes de souris embryonnaires en 1963 et depuis, plusieurs études ont été réalisées pour caractériser le modèle (White et Stephens, 2010). Il a été établi que ces cellules possédaient les mêmes caractéristiques principales que les adipocytes *in vivo*. Elles ont la capacité de stocker des lipides, sont sensibles à l'insuline, et ce sont des cellules endocrines (Gregoire *et al.*, 1998). Elles ont été très utilisées pour étudier notamment les gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, l'implication des facteurs de croissance et des cytokines dans la fonction des adipocytes, la résistance à l'insuline, et la régulation du glucose (Lin et Lane, 1994; Oishi *et al.*, 2005; Schupp *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). De plus, les différentes étapes du processus de différenciation de ces cellules sont bien connues. Pour toutes ces raisons, les cellules 3T3-L1 ont été utilisées comme modèle cellulaire lors de cette étude. D'autre part, ces cellules ont l'avantage d'être transfectables, ce qui était nécessaire pour ce projet de recherche. Par contre, le principal inconvénient est qu'elles ne peuvent pas être associées à un type d'adipocytes particuliers, donc les résultats obtenus ne peuvent pas être extrapolés et associés à des caractéristiques spécifiques aux cellules adipeuses viscérales ou sous-cutanées. De plus, elles nécessitent la surconfluence pour se différencier, donc certaines expériences comme l'analyse de la taille des adipocytes n'ont pu être effectuées. Pour les études pharmacologiques effectuées il aurait peut-être été préférable d'utiliser des adipocytes du tissu adipeux sous-cutané ou viscéral, ce qui aurait permis d'associer les résultats obtenus à un type cellulaire particulier comme

dans l'étude de Shum et al. (Shum *et al.*, 2013). Des cellules humaines ou de rats auraient pu être utilisées, puisque ces études devront de toute façon être refaites avec ce type de cellules afin d'avoir une portée clinique.

## 5.2 Choix et validation du protocole de différenciation

Plusieurs protocoles de différenciation sont présentés dans la littérature (Jones *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2007; Sakuma *et al.*, 2010; Miegueu *et al.*, 2012). Certains, permettent une différenciation adipocytaire maximale et plus rapide des cellules 3T3-L1. Trois composés sont principalement utilisés afin de différencier ces cellules : l'insuline, qui active certains gènes importants pour la différenciation et favorise la translocation du transporteur du glucose GLUT 4 à la membrane, l'IBMX, un inhibiteur des phosphodiésterases qui augmente l'AMPc intracellulaire, et la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse qui active le récepteur des glucocorticoïdes. Ces trois composés sont généralement ajoutés au milieu de culture pour une période de 48 h après que les cellules aient atteint la confluence depuis deux jours. Par la suite, deux protocoles principaux ressortent de la littérature. Le premier implique la présence d'insuline durant tout le processus de différenciation et lors du maintien des adipocytes matures, tandis que l'autre propose d'ajouter de l'insuline pour un autre 48 h, mais de l'enlever par la suite. Le protocole utilisé depuis longtemps dans notre laboratoire et qui a donc été employé pour la majeure partie de ce projet est le premier protocole. Les concentrations des différents composés utilisés varient d'étude en étude mais celles utilisées ont été déterminées d'après l'article de Picard en 2004, un collègue de l'université Laval.

Un autre aspect qui varie dans la littérature est le protocole de culture des préadipocytes. Dans notre laboratoire, les préadipocytes ont été maintenus dans du milieu de culture enrichi avec 10 % de BCS et lors de la différenciation le sérum a été remplacé par du FBS. Certaines études n'emploient pas de BCS et maintiennent les

préadipocytes dans du FBS. Par contre, dans notre laboratoire, lorsque les préadipocytes étaient cultivés dans du FBS, ils semblaient moins bien se différencier. Cela pourrait s'expliquer en partie par les facteurs de croissance présents en plus grande quantité dans le FBS, qui semble stimuler l'adipogenèse (PAA, cell culture company). Par contre, pour que les cellules 3T3-L1 se différencient bien, elles ont besoin d'avoir atteint la confluence, ce qui va arrêter leur prolifération, avant d'être stimulées pour la différenciation (Otto et Lane, 2005).

Afin de s'assurer que les conditions de culture qui ont été utilisées étaient adéquates et que les résultats présentés dans la littérature pouvaient être répétés, nous avons différencié les cellules 3T3-L1 et vérifié l'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2, ainsi que l'accumulation progressive de gouttelettes lipidiques intracellulaires, ce qui se produit environ quatre jours après l'induction. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Liao *et al.*, 2007; Saiki *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010).

### 5.3 Expression des récepteurs de l'Ang II lors de l'adipogenèse

Nos résultats suggèrent que le R-AT2 n'est pas exprimé dans les préadipocytes, mais que son expression augmente au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1. Ces résultats ont été mis en évidence par des études de RT-PCR et de liaison hormone-récepteur. Par contre, lorsque nous avons voulu valider avec des expériences d'analyses Western, les résultats ont été différents: les protéines du R-AT2 ont été détectées à J0 et aucune variation d'expression significative n'a été obtenue au cours de la différenciation. Pour ce qui est du R-AT1, les expériences de RT-PCR ont montré que le R-AT1a n'est pas présent dans les préadipocytes, mais que son expression augmente légèrement au cours de la différenciation. Cependant, les études de liaison hormone-récepteur n'ont pas permis de détecter de R-AT1 autant dans les préadipocytes que dans les adipocytes. Il est donc possible que le R-AT1 ne soit pas exprimé à la membrane plasmique. D'un autre côté, les analyses Western suggèrent que le R-AT1 est présent

dans les préadipocytes et les adipocytes, mais que son expression ne varie pas au cours de la différenciation, ce qui ne concorde pas avec les expériences précédentes. Une autre étude a obtenu des résultats différents entre les niveaux d'ARNm et de protéines du R-AT2 dans des adipocytes (Shum *et al.*, 2013). Les résultats discordants obtenus avec les analyses Western pourraient s'expliquer par le fait que les R-AT1 et R-AT2 sont des RCPG. Les anticorps commerciaux contre les RCPG ne sont pas très fiables et manquent souvent de spécificité (Michel *et al.*, 2009; Verdonk *et al.*, 2012). De plus, des modifications post-traductionnelles telles des acétylations, des méthylation, et des phosphorylations peuvent modifier le poids moléculaire des protéines, ce qui peut altérer la hauteur et l'intensité des bandes à mesurer. Finalement, des études ont montré que les niveaux d'ARNm ne corrôlaient pas toujours avec la quantité de protéines (Vogel et Marcotte, 2012).

L'étude de Weiland et Verspohl réalisée sur les cellules 3T3-L1 suggèrent que les deux récepteurs de l'Ang II sont présents dans les préadipocytes, mais que seul le R-AT1 est présent dans les adipocytes matures (Weiland et Verspohl, 2008). Ces résultats ont été montrés par des études de liaison hormone-récepteur. Néanmoins, nos résultats effectués avec la même technique sont différents. Aucun récepteur n'a été trouvé dans les préadipocytes et seul le R-AT2 est présent dans les adipocytes matures. Une différence majeure existe entre nos études, celle de Weiland et Verspohl a utilisé uniquement l'Ang II et le CGP42112A pour déterminer l'expression des récepteurs. La présence du R-AT1 dans les préadipocytes a été extrapolée suite aux résultats obtenus avec le CGP42112A. Par contre, dans notre étude nous avons utilisé un ligand sélectif du R-AT1 (losartan), qui a la propriété de déplacer l'hormone marquée liée au R-AT1, si ce dernier est présent. Nos résultats concordent plus avec ceux de l'étude de Jones *et al.* publié en 1997, où le losartan ne déplace pas l'Ang II radiomarkée tandis que l'agoniste du R-AT2 (P-186) la déplace (Jones *et al.*, 1997). Les analyses Western de Mallow et Löffler concordent avec les résultats de Weiland et Verspohl. Cependant, à notre avis, ce type d'analyse est moins fiable que les études de RT-PCR et de liaison hormone-

récepteur pour les raisons citées précédemment. À notre connaissance, aucune étude n'a validé la présence des récepteurs de l'Ang II dans les cellules 3T3-L1 à l'aide de RT-PCR. Par contre, l'ARNm des R-AT1 et R-AT2 a été mesuré dans les préadipocytes et les adipocytes humains du tissu adipeux sous-cutané (Janke *et al.*, 2002). Cette étude suggère que l'ARNm du R-AT2 ne varie pas au cours de la différenciation, contrairement à celui du R-AT1 qui augmente. Dans notre étude, nos résultats montrent que l'ARNm des deux récepteurs augmente au cours de l'adipogenèse. Cette différence peut être associée à la nature des modèles cellulaires. Il est aussi possible que les fonctions des adipocytes provenant d'une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires, comme les cellules 3T3-L1, ne soient pas les mêmes que celles des adipocytes provenant du tissu adipeux sous-cutané humain, d'où la différence entre l'expression de certains récepteurs. D'autre part, l'ARNm du R-AT2 a été mesuré dans des cultures primaires d'adipocytes de rat du tissu adipeux sous-cutané et rétropéritonéal (Shum *et al.*, 2013). Ils ont obtenu une augmentation de l'expression du R-AT2 dans le TA sous-cutané au cours de la différenciation, ce qui concorde avec nos résultats. Cependant, ils ont observé une diminution dans le TA rétropéritonéal. Il est possible que le type cellulaire utilisé dans notre étude se rapproche plus des adipocytes présents dans le TA sous-cutané que ceux retrouvés dans le TA rétropéritonéal.

## 5.4 L'invalidation du R-AT2

Deux groupes de recherche ont utilisé des souris invalidés pour le R-AT2 afin de caractériser ses rôles dans le tissu adipeux, mais ils ne sont pas arrivés aux mêmes conclusions (Yvan-Charvet *et al.*, 2005; Iwai *et al.*, 2009). L'un considère que le R-AT2 est bénéfique pour le tissu adipeux (Iwai *et al.*, 2009) tandis que l'autre suggère qu'il est néfaste (Yvan-Charvet *et al.*, 2005), et ce, même si dans les deux cas, les marqueurs de la différenciation fonctionnelle sont diminués. Dans notre cas, nous avons choisi une autre méthode pour invalider le R-AT2 dans les cellules 3T3-L1. L'inactivation du R-AT2 à l'aide d'infection lentivirale contenant un shRNA contre le R-AT2 était une technique

prometteuse. La séquence D préalablement choisie diminuait de façon importante la différenciation adipocytaire, puisque très peu d'adipocytes matures étaient observés à J8. L'expression de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2, nous a confirmé la diminution de la différenciation puisque les niveaux protéiques étaient très faibles, ce qui était attendu. Ces résultats suggéraient que le R-AT2, même s'il n'est pas présent dans les préadipocytes, est nécessaire au processus de différenciation. Lors d'une différenciation normale, l'ARNm du R-AT2 apparaît dès le jour 2. Puisque les cellules 3T3-L1 ont besoin d'une phase de prolifération de 48 h suivant l'induction de la différenciation, il est normal que le R-AT2, qui est connu pour favoriser la différenciation, apparaisse après la phase de prolifération. Par contre, lorsque nous avons voulu confirmer l'inactivation du R-AT2 par RT-PCR, nous avons obtenu une augmentation importante de l'ARNm suite à l'utilisation des shRNA. Ce résultat est tout à fait inattendu et aucune explication n'a pu être trouvée. Même la compagnie qui a fourni les séquences de shRNA n'a pas d'explication. Quelques hypothèses ont été suggérées. Il est possible que l'effet observé soit un effet «*off-target*», c'est-à-dire que la diminution de la différenciation serait due à l'utilisation des lentivirus et non à l'inactivation du R-AT2. Par contre, lorsque nous avons utilisé des lentivirus contrôles contenant un vecteur vide, les cellules se sont bien différenciées. Cette hypothèse a par conséquent été écartée. Une autre possibilité est que ce soit l'activation du complexe RISC qui diminue la différenciation adipocytaire et non le shRNA. Les lentivirus contenant le vecteur vide n'activent pas le complexe RISC (*Getting start with shRNA*, Sigma). Cependant, nous avons reçu 5 séquences de shRNA contre le R-AT2 et nous les avons toutes testées. Les infections réalisées avec la séquence C, qui active le complexe RISC, n'ont pas diminué la différenciation adipocytaire et n'ont pas été toxiques pour les cellules, écartant de ce fait cette autre hypothèse.

D'autre part, lorsque d'autres expériences ont voulu être réalisées, les infections lentivirales ont cessé de fonctionner puisque les cellules se différenciaient et l'ARNm du R-AT2 n'était plus augmenté. L'efficacité de transfection a été testée avec un vecteur contenant une séquence GFP et les résultats ont montré que la transfection fonctionnait

bien. Les lentivirus sont produits dans des cellules HEK-293T à partir de vecteurs purifiés produits dans des bactéries *E. Coli*. Il est possible que les bactéries contenant les vecteurs contre le R-AT2 aient rejeté l'ADN. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait faire séquencer les vecteurs produits par les bactéries ou encore les digérer et les faire migrer sur un gel d'agarose pour vérifier si l'insert est encore présent. Finalement, la concentration de lentivirus à utiliser a été déterminée par l'efficacité de transfection évaluée à l'aide du vecteur GFP. Il serait possible de titrer la suspension lentivirale avec un kit commercial afin de connaître exactement le MOI (multiplicity of infection) et ainsi s'assurer que la quantité de lentivirus soit suffisante.

## 5.5 Implication de l'Ang II et du M24 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 en conditions normales

### 5.5.1 Effet de l'Ang II et du M24 sur l'expression des marqueurs de l'adipogenèse

Nos résultats suggèrent qu'en présence constante d'insuline (protocole 1), l'Ang II et le M24 n'ont pas d'effet sur l'expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1. Une étude a montré que l'Ang II diminuait l'ARNm de PPAR $\gamma$ , mais elle a été réalisée sur des cellules 3T3-L1 matures (à J15) et le traitement a seulement duré 24 h (Lee *et al.*, 2008). De plus, il est difficile de comparer les niveaux d'expression d'ARNm et de protéines, puisque leurs niveaux ne corrèlent pas toujours. Une des raisons est qu'il existe des modifications post-traductionnelles qui peuvent influencer les niveaux protéiques. Une autre étude a aussi montré que l'Ang II semblait diminuer l'expression génique de PPAR $\gamma$  (Janke *et al.*, 2002). Cette étude a été réalisée sur des préadipocytes humains du tissu adipeux sous-cutané et l'expression de PPAR $\gamma$  a été vérifiée 8 jours après l'induction de la différenciation. Plusieurs conditions diffèrent entre notre étude et cette dernière, ce qui pourrait expliquer la différence entre nos résultats. Tout d'abord, le modèle cellulaire est différent (préadipocytes humains).



Ensuite, la concentration d'Ang II utilisée (10  $\mu$ M) dans cette étude est beaucoup plus élevée que celle que nous avons utilisée (100 nM), ce qui peut mener à des effets différents. Finalement, les conditions d'induction utilisées pour différencier les cellules 3T3-L1 dans le protocole stimulent de manière importante la différenciation contrairement à celles utilisées pour différencier les préadipocytes humains. L'utilisation de l'IBMX dans mon mélange d'induction peut avoir masqué l'effet de l'Ang II. L'étude réalisée par Schling et Löffler montre que l'effet inhibiteur de l'Ang II sur la différenciation des préadipocytes humains est inhibé par l'IBMX, probablement parce qu'il augmente fortement les concentrations de calcium intracellulaire (Schling et Löffler, 2001).

Pour ce qui est du M24, deux études viennent d'être publiées qui montrent un effet de ce composé sur les marqueurs de l'adipogenèse (Shum *et al.*, 2013; Ohshima *et al.*, 2012). La première étude provient de notre groupe et montre qu'un traitement au M24 augmente l'expression de PPAR $\gamma$  dans des cultures primaires d'adipocytes de rat du TAB sous-cutané et rétropéritonéal (Shum *et al.*, 2013). La différence entre nos résultats peut s'expliquer encore une fois par le fait que les cellules 3T3-L1 sont fortement stimulées suite au mélange d'induction utilisé comparativement aux conditions utilisées pour différencier les adipocytes de rat. L'autre étude a mesuré l'expression de PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux rétropéritonéal et épидидymal de souris génétiquement résistante à l'insuline ayant reçu ou non un traitement au M24 pendant 2 semaines et ils ont obtenus une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  suite à un traitement au M24 (Ohshima *et al.*, 2012). La différence avec nos résultats peut s'expliquer par le fait qu'ils ont mesuré l'expression de PPAR $\gamma$  dans un tissu complet, tandis que nous avons utilisé uniquement des adipocytes. Nous pouvons aussi comparer nos résultats à ceux obtenus avec des souris invalidées pour le R-AT2. Une étude d'Yvan-Charvet montre que les souris invalidées pour le R-AT2 présentent une diminution significative de l'ARNm de PPAR $\gamma$  et d'aP2 (Yvan-Charvet *et al.*, 2005). Par conséquent, on aurait pu s'attendre à ce qu'une activation du R-AT2 soit associée à une

augmentation de ces marqueurs. Par contre, l'absence d'effet du M24 sur la différenciation normale des cellules 3T3-L1 peut être interprétée de la façon suivante : le R-AT2 est connu pour avoir une activité intrinsèque, par conséquent, son inactivation au niveau génique va empêcher toute formation du récepteur ainsi que toute activité (Funke-Kaiser *et al.*, 2010). Avec un traitement pharmacologique, comme le M24, les seuls récepteurs qui sont ciblés sont ceux présents à la membrane plasmique, donc il se peut qu'en conditions normales, il y ait peu de R-AT2 à la membrane, d'où l'absence d'effet du M24. Une autre possibilité serait que les récepteurs présents à la surface membranaire et ceux présents dans le cytoplasme n'ont pas les mêmes effets au niveau génique, possiblement dû aux protéines partenaires qui y sont liés comme ATIP et PLZF (Porrello *et al.*, 2009). Il serait aussi possible de comparer nos résultats avec des études montrant les effets de l'Ang II et d'un BRA (bloqueur du R-AT1), puisque plusieurs groupes suggèrent que les effets des BRA sont en partie dus à une plus grande activation du R-AT2 par l'Ang II (Goossens *et al.*, 2007; Lemarié et Schiffrin, 2010). L'étude de Lee *et al.* réalisée sur les cellules 3T3-L1 suggère que l'utilisation d'un BRA (L158809) et d'Ang II ne modifie pas l'expression de PPAR $\gamma$  (Lee *et al.*, 2008). Ce qui est en accord avec nos résultats. Il est à noter que les comparaisons effectuées à partir des résultats obtenus à l'aide d'un cotraitement Ang II et BRA doivent être interprétées avec précaution puisqu'il existe des métabolites de l'Ang II qui peuvent aussi avoir des effets biologiques sur les paramètres étudiés (de Gasparo *et al.*, 2000; Schmieder *et al.*, 2007).

### 5.5.2 Effet de l'Ang II et du M24 sur l'expression des récepteurs de l'Ang II

Dans la littérature, quelques études suggèrent que l'Ang II, *via* le R-AT2, diminue l'expression du R-AT1 (Lassègue *et al.*, 1995; Nickenig et Murphy, 1996; Ishihata *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2002; Funke-Kaiser *et al.*, 2010). Nos résultats suggèrent que l'Ang II et le M24 ne modifient pas l'expression des R-AT1 et R-AT2. La différence majeure entre notre étude et ces dernières, est la nature des cellules utilisée (cellules provenant du

rein et des glandes surrénales, cellules vasculaires lisses). Il est fort possible que le R-AT1 n'ait pas la même implication dans ces cellules que dans les adipocytes.

D'autre part, il est bien connu que l'Ang II, *via* le R-AT1, induit une résistance à l'insuline en affectant les voies de signalisation de cette dernière (Morisco *et al.*, 2006; Olivares-Reyes *et al.*, 2009). Par contre, l'effet de l'insuline sur l'expression du R-AT1 est moins connu. Cependant, une étude suggère que l'insuline augmente l'expression du R-AT1 dans les cellules vasculaires lisses (Nickenig et Murphy, 1996). Comme il y a de l'insuline dans notre milieu de culture, il est possible que celle-ci affecte l'expression du R-AT1, donc l'effet potentiel de l'Ang II sur l'expression du R-AT1 serait masqué par l'insuline. En ce qui concerne le R-AT2, quelques travaux montrent l'influence de l'Ang II sur l'expression du R-AT2 (Shibata *et al.*, 1997; Volpe *et al.*, 2003; Funke-Kaiser *et al.*, 2010). De plus, une étude montre que l'activation du R-AT2 par le M24 augmente l'expression de ce récepteur (Reinemund *et al.*, 2009). Cette étude a été réalisée sur des fibroblastes de souris embryonnaires invalidées pour le gène PARP-1 qui présente une expression plus élevée de R-AT2, ce qui pourrait expliquer la différence entre nos résultats et les leurs. Cependant, une autre étude réalisée sur des souris diabétiques de type 2 montre qu'un traitement au M24 ne modifie pas l'ARNm des R-AT1 et R-AT2 dans le tissu adipeux blanc, ce qui concorde avec mes résultats (Ohshima *et al.*, 2012). De plus, l'étude de Shum *et al.* provenant de notre laboratoire montre que le M24 n'affecte pas l'expression protéique du R-AT2 chez des rats Wistar sous diète normale ou riche en gras et en sucre (Shum *et al.*, 2013).

### 5.5.3 Effet de l'Ang II et du M24 sur l'accumulation lipidique

Nos résultats montrent que l'Ang II et le M24 n'ont pas d'effet sur l'accumulation lipidique dans les cellules 3T3-L1 à J8. Mes résultats diffèrent de ceux de Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2008) qui observent une diminution de l'accumulation lipidique dans les cellules 3T3-L1 suite à un traitement à l'Ang II. Par contre, leurs expériences ont été effectuées à

J15 avec un traitement de 48 h. De plus, nous avons utilisé l'Adipored pour mesurer l'accumulation des lipides intracellulaires tandis que l'étude de Lee *et al.* a utilisé l'huile rouge. Cette méthode consiste à extraire l'huile rouge des adipocytes après une coloration en effectuant une extraction à l'isopropyl. Par la suite, le colorant est quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre à 510 nM (Lee *et al.*, 2008). Avec cette méthode, l'huile rouge qui est restée collée au plastique des pétris est aussi extraite et quantifiée, ce qui peut amener un biais. De notre laboratoire, le *Nile Red*, l'agent actif de l'Adipored, fluoresce à une longueur d'onde spécifique lorsqu'il se retrouve dans les gouttelettes lipidiques, donc les résultats obtenus sont directement proportionnels à la quantité de lipides intracellulaires. D'autre part, les adipocytes à J15 sont souvent très hypertrophiés et décollent plus facilement, ce qui peut amener une source de variabilité supplémentaire. Ces raisons peuvent expliquer la différence entre nos résultats. D'un autre côté, nos résultats diffèrent aussi de ceux de Janke *et al.* qui montrent une diminution de l'accumulation lipidique suite à un traitement à l'Ang II (Janke *et al.*, 2002). Cependant, leur modèle cellulaire est différent et ils ont utilisé une concentration d'Ang II 100 fois plus élevée que celle utilisée dans notre laboratoire (soit 10  $\mu$ M au lieu de 100 nM), ce qui peut expliquer la différence entre nos résultats.

Les études réalisées *in vivo*, indiquent que des traitements avec des BRA diminuent la taille des adipocytes (Furuhashi *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2007; Munoz *et al.*, 2009). Par contre, une seule des trois études discute du volume du tissu adipeux (Furuhashi *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent que le BRA utilisé (l'olmésartan) ne diminue pas le volume du tissu adipeux, même s'il diminue la taille des adipocytes. Ce qui peut concorder avec nos résultats qui suggèrent que la quantité totale de lipides n'est pas affectée ni par l'Ang II ni par le M24. Par contre, il est à noter que le tissu adipeux ne contient pas uniquement des adipocytes, mais aussi d'autres types cellulaires comme des macrophages, des cellules stromales et des fibroblastes, donc les résultats des études *in vivo* réalisées sur le tissu adipeux entier ne peuvent pas être imputé uniquement aux adipocytes (Sethi et Vidal-Puig, 2007). Il aurait été intéressant

de regarder la taille des adipocytes, mais avec le modèle cellulaire utilisé, il était impossible d'effectuer de telles mesures. Les cellules doivent avoir atteint la surconfluence pour se différencier, à ce moment-là, elles forment des multi-couches, ce qui rend l'analyse de la taille individuelle des cellules très difficile. Pour ce genre d'étude, il aurait été intéressant d'utiliser des cellules de culture primaire qui ne nécessitent pas la confluence pour se différencier.

Dans l'étude de Shum *et al.* (Shum *et al.*, 2013), un traitement au M24 favorise l'accumulation lipidique chez les préadipocytes du TAB sous-cutané, mais pas chez ceux du TAB rétropéritonéal. Ils ont étudié l'accumulation lipidique à 75 % de l'accumulation maximale de lipides (à J12 pour ces cellules), ce qui peut être comparé à une durée de 8 jours pour les cellules 3T3-L1. Puisque les cellules 3T3-L1 ne peuvent pas être associées à un type d'adipocyte particulier (sous-cutané ou viscéral), c'est peut-être un mélange des deux types cellulaires, ce qui expliquerait l'absence d'effet du M24 sur l'accumulation lipidique. Il est aussi possible de comparer les traitements avec le M24 à des travaux réalisés chez des souris invalidées pour le R-AT2 (Yvan-Charvet *et al.*, 2005; Iwai *et al.*, 2009). Dans les études d'Iwai *et al.*, le poids du tissu adipeux des souris invalidées pour l'apolipoprotéine E (apo E) et le R-AT2 est identique à celui des souris invalidées uniquement pour l'apo E (Iwai *et al.*, 2009). Ce qui pourrait concorder avec nos résultats qui suggèrent qu'un traitement au M24 ne modifie pas l'accumulation lipidique. Par contre, cette étude a utilisé le tissu adipeux complet avec tous ses types cellulaires. Dans l'étude d'Yvan-Charvet, les adipocytes des souris invalidées pour le R-AT2 sont de plus petite taille et de poids inférieur à ceux des souris sauvages, ce qui pourrait suggérer que le R-AT2 favorise l'accumulation lipidique (Yvan-Charvet *et al.*, 2005). Ils ont évalué le poids moyen des adipocytes à l'aide d'un logiciel qui mesurait le diamètre des cellules, tandis que nous avons mesuré directement les lipides présents dans les adipocytes, ce qui est potentiellement plus proportionnel à la quantité de lipides intracellulaires. D'autre part, le poids du tissu adipeux des souris invalidées est le même que celui des souris sauvages. Par conséquent, les résultats de cette recherche

indiqueraient plutôt que le R-AT2 est essentiel au stockage des lipides, puisque son invalidation empêche l'hypertrophie cellulaire, et ce, même si le poids du tissu adipeux n'est pas modifié. De plus, il faut garder à l'esprit qu'ils ont extrait les adipocytes du tissu adipeux épидидymal (tissu adipeux viscéral) de souris et que nos cellules proviennent d'une lignée cellulaire.

## 5.6 Implication du M24 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 différenciées en conditions de surcharges lipidiques

Puisque le M24 ne semblait pas avoir d'effet en conditions normales lorsque les cellules étaient différenciées avec le protocole 1 et que le R-AT2 est connu pour être réexprimé lors de pathologies ou de perturbations de l'homéostasie, l'oléate et le palmitate ont été choisis pour induire une surcharge lipidique. L'oléate est un acide gras monoinsaturé et le palmitate est un acide gras saturé. Les acides gras saturés sont connus pour avoir des effets plus néfastes sur la santé, d'où le choix d'étudier ces 2 acides gras. Ils sont associés à de la résistance à l'insuline et à une réponse inflammatoire plus élevée (Coll *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2008; Chakrabarti *et al.*, 2009). Nos résultats montrent que l'oléate favorise l'accumulation des lipides, et ce, de façon dose-dépendante. Le palmitate, pour sa part, favorise l'accumulation lipidique, mais jusqu'à l'atteinte d'un plateau à 150  $\mu\text{M}$ . Avec le premier protocole de différenciation, les concentrations plus élevées de palmitate (200 et 300  $\mu\text{M}$ ) occasionnent une baisse des niveaux de lipides intracellulaires et une toxicité. Les concentrations de 150 et 300  $\mu\text{M}$  d'acide gras ont été choisies lors de l'utilisation du protocole 1. Nous voulions savoir si l'oléate et le palmitate affectaient le processus de différenciation et vérifier comment le M24 pouvait éventuellement annuler les effets négatifs potentiels d'une surcharge lipidique, en favorisant notamment la différenciation adipocytaire.

### 5.6.1 Effet d'une surcharge lipidique sur l'expression des marqueurs de l'adipogenèse

Un traitement à l'oléate diminue les niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 à J6, peu importe la concentration utilisée. L'oléate n'est pas connu pour affecter l'expression de PPAR $\gamma$ , mais c'est possible qu'il ralentisse la différenciation adipocytaire, ce qui serait associé à une diminution de PPAR $\gamma$ 2 à J6. Lorsque nous avons vérifié si l'oléate avait le même effet sur PPAR $\gamma$ 2 à J10, aucune diminution de PPAR $\gamma$ 2 n'a été observée, ce qui suggère que l'oléate ralentit la différenciation, mais les adipocytes sont tout de même en mesure de se différencier complètement.

Avec le protocole 1, un traitement au palmitate à 150  $\mu$ M n'est pas associé à une variation de l'expression de PPAR $\gamma$ 2, tandis que celui à 300  $\mu$ M diminue son expression. Cette diminution peut s'expliquer par la toxicité induite par cet acide gras. Puisqu'il y avait de la mort cellulaire, donc moins de cellules qui pouvaient exprimer PPAR $\gamma$ 2, il est normal que nous ayons obtenu des niveaux de PPAR $\gamma$ 2 plus bas. Le palmitate est connu pour augmenter l'expression de PPAR $\gamma$  dans les cellules 3T3-L1 (Guo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Par conséquent, ce marqueur de la différenciation adipocytaire n'était peut-être pas le meilleur choix pour évaluer l'effet du palmitate sur ce processus. Même si la différenciation adipocytaire est ralentie ou diminuée par le palmitate, ce qui devrait être associé à une diminution de PPAR $\gamma$ 2, cet effet ne sera certainement pas visible, puisque l'expression de PPAR $\gamma$ 2 sera directement augmentée par l'acide gras. Il aurait donc été préférable de choisir un marqueur qui ne soit pas influencé par le palmitate, même si PPAR $\gamma$  est le plus couramment utilisé pour évaluer la différenciation (Janke *et al.*, 2006; Blouin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Étant donné que le palmitate augmente l'expression de PPAR $\gamma$ , on aurait pu s'attendre à une augmentation significative de ce marqueur suite à un traitement à 150  $\mu$ M de palmitate. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'avec le protocole de différenciation utilisé, il y avait de l'insuline dans le milieu de culture durant toute la durée de l'expérience. Une étude a montré qu'un traitement à l'insuline

(100 nM) pendant 4 h augmente de manière très importante l'ARNm de PPAR $\gamma$  dans les cellules 3T3-L1 (Yang *et al.*, 2007). Cette augmentation était plus élevée que celle obtenue suite à un traitement au 2-bromo-palmitate (100 nM). Il est donc fort possible que l'effet du palmitate soit masqué par l'insuline.

En ce qui concerne aP2, son expression semble suivre le même patron d'expression que celui de PPAR $\gamma$ 2, soit une diminution suite à un traitement à l'oléate ou à 300  $\mu$ M de palmitate et pas de différence suite à 150  $\mu$ M de palmitate. Aucun test statistique n'a été effectué étant donné le nombre d'échantillon trop faible, mais la diminution de l'expression d'aP2 lors d'un traitement à l'oléate pourrait être associée à un ralentissement de la différenciation. La diminution observée après 300  $\mu$ M de palmitate pourrait, quant à elle, être associée à la diminution du nombre d'adipocytes due à la toxicité du palmitate à cette concentration. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus avec le deuxième protocole puisqu'un traitement à 200  $\mu$ M de palmitate ne diminue pas l'expression d'aP2. D'autre part, le palmitate augmente l'expression d'aP2 dans les préadipocytes (Grimaldi *et al.*, 1992). Par contre, puisque son expression est très stimulée par la différenciation adipocytaire, il n'est pas étonnant de n'obtenir aucun effet additionnel suite à une surcharge lipidique.

Pour les analyses Western, la significativité des différences n'a pu être évaluée puisque certaines expériences n'ont pu être analysées. Les expériences de surcharge lipidique réalisées avec le protocole 1 ont été faites quatre fois pour chaque condition, mais dû à la difficulté d'obtenir des beaux résultats analysables, seulement 1 ou 2 expériences ont été compilées. La technique d'immunobuvardage de type Western est un bon outil pour vérifier l'expression protéique. Cependant, les anticorps disponibles manquent parfois de spécificité et de stabilité. De plus, la quantité de protéine peut être une limitation.



### 5.6.2 Effet d'une surcharge lipidique sur l'expression des récepteurs de l'Ang II

Ce paramètre a été étudié seulement pour s'assurer que l'oléate et le palmitate n'influençaient pas l'expression des R-AT1 et R-AT2. Si tel avait été le cas, cela aurait pu expliquer d'autres résultats obtenus comme l'accumulation lipidique ou encore l'expression de PPAR $\gamma$ . Un traitement à l'oléate ou au palmitate ne semble pas influencer l'expression des récepteurs de l'Ang II. On aurait pu s'attendre à ce que l'expression du R-AT2 soit augmentée suite à un traitement au palmitate puisqu'il a été montré que celle-ci est stimulée lors de pathologies ou d'un déséquilibre de l'homéostasie. Par contre, comme le protocole utilisé semble masquer les effets du palmitate, il est fort possible que les cellules ne considèrent pas la surcharge lipidique induite par le palmitate comme un déséquilibre de l'homéostasie.

### 5.6.3 Effet d'un cotraitement au M24 sur les différents paramètres étudiés

Les cotraitements lipides-M24 ont été effectués en supposant que les surcharges affectaient la différenciation adipocytaire notamment en modifiant l'expression de PPAR $\gamma$  et l'accumulation lipidique et que le M24 allait inhiber ses effets. Par contre, les expériences de surcharges lipidiques n'ont pas affecté ces deux paramètres. Il n'est donc pas étonnant qu'un traitement au M24 dans des conditions de surcharges lipidiques n'influence ni l'accumulation lipidique ni l'expression des marqueurs de l'adipogenèse et des récepteurs de l'Ang II. Cependant, quelques petites différences ont été observées, comme une légère augmentation de PPAR $\gamma$ 2 suite à un cotraitement au M24 et au palmitate à 300  $\mu$ M comparé à la surcharge seule. De plus, l'expression protéique du R-AT2 suite à un cotraitement au M24 et à l'oléate à 150  $\mu$ M semble légèrement plus basse que celle obtenue suite à 150  $\mu$ M d'oléate seul. Par contre, ces deux différences ne sont pas significatives. Finalement, puisque les effets des deux acides gras sont certainement masqués par l'insuline présente dans le milieu, on peut donc s'attendre à ce que les effets potentiels du M24 le soient tout autant.

## 5.7 Changement du protocole de différenciation

À la lumière des résultats obtenus avec le premier protocole de différenciation, nous avons décidé de changer le protocole de culture et d'utiliser le deuxième protocole de différenciation, qui consiste à enlever l'insuline du milieu de culture après 4 jours. Avec ce changement nous espérions que les effets d'une surcharge lipidique seraient plus marqués et donc qu'un effet potentiel du M24 serait peut-être observé, ce qui ne fut pas le cas. Un autre changement qui aurait pu être effectué, aurait été d'enlever l'IBMX. L'IBMX masque les effets inhibiteurs de l'Ang II sur la différenciation des adipocytes humains du TA sous-cutané (Schling et Löffler, 2001). Par contre, la majorité des études utilise l'IBMX pour différencier les cellules 3T3-L1 (Kershaw *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Sakuma *et al.*, 2010). De plus, certains collègues ont été en mesure d'obtenir des effets de leurs composés sur la différenciation des 3T3-L1 seulement en modifiant la posologie de l'insuline. Par conséquent, nous avons décidé de garder l'IBMX pour induire les cellules 3T3-L1 et d'utiliser l'insuline uniquement les quatre premiers jours.

## 5.8 Comparaison des résultats obtenus avec les protocoles 1 et 2

Les études précédentes sur l'expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et des récepteurs de l'Ang II ont été répétées avec le second protocole. Les résultats sont très semblables. Le M24 ne modifie pas l'expression protéique de PPAR $\gamma$ 2, du R-AT1, et du R-AT2 lors d'une différenciation en conditions normales. Aucune analyse statistique n'a été effectuée pour les analyses Western étant donné le petit nombre d'expériences analysées. La plupart des résultats obtenus en protéines ont été confirmés en ARNm et les conclusions sont les mêmes. C'est-à-dire qu'un traitement au M24 au cours de la différenciation adipocytaire, en conditions normales, n'affecte pas de manière significative l'expression de PPAR $\gamma$  et du R-AT2.

Pour les conditions de surcharges lipidiques, nous avons utilisé des concentrations de 150  $\mu\text{M}$  et de 200  $\mu\text{M}$  d'acide gras, puisqu'avec le premier protocole, les doses de 300  $\mu\text{M}$  de palmitate était associé à de la mort cellulaire et l'accumulation lipidique observée à 200  $\mu\text{M}$  était semblable à celle observée à 300  $\mu\text{M}$ . Par contre, lorsque l'expérience de quantification lipidique a été refaite avec le protocole 2, le palmitate à des concentrations élevées n'était plus toxique pour les cellules. Cela suggère que c'était la combinaison d'insuline et de concentrations élevées de palmitate qui était toxique pour les cellules 3T3-L1.

Les résultats des conditions de surcharges lipidiques obtenus avec le protocole 2 sont semblables à ceux obtenus avec le protocole 1, mise à part quelques différences. L'oléate et le palmitate à 150 ou 200  $\mu\text{M}$  semblent diminuer l'expression de PPAR $\gamma$ 2 à J6, tandis qu'avec le protocole 1 le palmitate à 150  $\mu\text{M}$  ne diminuait pas l'expression de ce marqueur. Par contre, aucune analyse statistique n'a pu être faite dû au nombre d'expérience trop faible. Cependant, ces diminutions semblent plus importantes qu'avec le protocole 1, ce qui pourrait suggérer que l'insuline ne masque plus les effets des acides gras. Avec ce protocole, il aurait été intéressant de regarder les niveaux protéiques plus tard dans le processus de différenciation (à J10 par exemple), ce qui aurait peut-être permis de voir des différences plus importantes. En regardant les résultats de RT-PCR, il est possible de constater que l'ARNm de PPAR $\gamma$  est diminué suite à un traitement à l'oléate. Par contre, cette diminution est statistiquement différente seulement avec 200  $\mu\text{M}$  d'oléate. Ces résultats concordent avec les résultats des analyses Western qui suggèrent que l'oléate ralentit la différenciation. Par contre, contrairement aux résultats obtenus avec les analyses Western, le palmitate ne modifie pas l'ARNm de PPAR $\gamma$ . Cela pourrait s'expliquer par le fait que même si le palmitate diminue la différenciation, ce dernier stimule tout de même l'expression de PPAR $\gamma$  (Guo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Les niveaux d'aP2 semblent diminuer suite à un traitement à l'oléate, mais ne semble pas modifiés par le palmitate. Ces résultats sont très semblables à ceux obtenus avec le protocole 1, excepté pour le traitement au

palmitate à 300  $\mu$ M. Par contre, avec ce protocole il y avait de la toxicité à cette concentration, tandis qu'avec le protocole 2 il n'y a pas de toxicité à 200  $\mu$ M, ce qui pourrait expliquer cette différence.

Les résultats obtenus avec le protocole 2 pour l'expression protéique des récepteurs de l'Ang II sont difficilement analysables, puisque le nombre d'expériences analysées est trop faible. Il semble y avoir une différence entre la différenciation normale et les traitements, mais étant donné les difficultés rencontrées avec l'anticorps dirigé contre le R-AT2, on ne peut rien conclure. Les résultats de RT-PCR pour le R-AT2 sont plus concluants. L'unique condition de surcharge lipidique qui affecte significativement l'expression du R-AT2 est un traitement à 200  $\mu$ M de palmitate. Il se pourrait qu'avec l'utilisation du protocole 2, le palmitate à 200  $\mu$ M entraîne un déséquilibre de l'homéostasie, donc le R-AT2 serait augmenté. Ce qui concorderait avec les différentes études qui montrent que le R-AT2 est réexprimé lors de perturbations physiologiques ou de pathologies (Unger et Sandmann, 2000; Uemura *et al.*, 2008; Steckelings *et al.*, 2011). D'autre part, l'oléate semble diminuer l'expression du R-AT2, mais cette différence n'est pas significative.

Un traitement au M24 dans des conditions de surcharge lipidique, lorsque les cellules sont différenciées selon le deuxième protocole, ne semble pas avoir beaucoup plus d'effet. Le M24 semble légèrement augmenter l'ARNm de PPAR $\gamma$  suite à la diminution observée avec un traitement à l'oléate à 150  $\mu$ M. Il semble aussi légèrement diminuer cet ARNm suite à l'augmentation observée avec des traitements au palmitate. Par contre, il n'y a aucune différence significative dans ces résultats et les variations sont très faibles. Les niveaux protéiques de PPAR $\gamma$ 2 et d'aP2 ne sont pas modifiés par le M24, de même que l'expression des R-AT1 et R-AT2. Finalement, l'accumulation lipidique n'est pas non plus influencée de manière significative par le traitement au M24. Comme suggéré précédemment, en regardant l'ARNm de PPAR $\gamma$  plus tard dans le processus de différenciation, il aurait peut-être été possible de voir un effet significatif du M24.

Ces résultats suggèrent que le M24 ne favorise pas la différenciation adipocytaire en conditions de surcharges lipidiques. Par contre, une surcharge lipidique induite dans les cellules 3T3-L1 par un traitement à l'oléate ou au palmitate ne semble pas très délétère pour ces cellules lorsqu'on regarde l'accumulation lipidique ou l'expression de PPAR $\gamma$ . Par conséquent, si l'homéostasie n'a pas été très affectée, il n'est pas surprenant de ne pas observer d'effet bénéfique du M24. De plus, ces deux paramètres n'étaient pas nécessairement les meilleurs à regarder dans nos études, même si ce sont ceux qui sont généralement utilisés afin d'évaluer la différenciation (Matsushita *et al.*, 2006; Blouin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Tout d'abord, l'accumulation lipidique est plus importante suite à une surcharge lipidique, donc les cellules étaient nécessairement plus volumineuses et elles accumulaient plus rapidement les lipides. Des études morphologiques ont été effectuées à J6 suite à une coloration à l'huile rouge, mais comme il y avait beaucoup de cellules différenciées et qu'elles formaient des multicouches, il n'était pas possible de conclure si les traitements induisant une surcharge lipidique affectaient le nombre de cellules différenciées. Il aurait été possible de mesurer l'activité de G3PDH, l'enzyme qui catalyse la production de triglycérides dans les adipocytes, afin d'évaluer l'adipogenèse (Schling et Löffler, 2001; Fuentes *et al.*, 2010). D'autre part, comme l'expression de PPAR $\gamma$  est modulée par le palmitate, il aurait fallu vérifier l'expression d'autres facteurs impliqués dans la différenciation adipocytaire comme le facteur de transcription C-EBP $\alpha$ . Ce facteur de transcription stimule l'expression de PPAR $\gamma$  (Otto et Lane, 2005). Par contre, il est lui aussi affecté par le palmitate (Guo *et al.*, 2007). Nous aurions pu étudier aussi la famille des KLF (Krüppel-like factors), des STAT (signal transducers and activators of transcription), ou les facteurs C-EBP $\delta$  ou  $\beta$  et choisir ceux qui ne sont pas affectés par cet acide gras. Par contre l'expression de ces deux derniers marqueurs est transitoire et très précoce (Gregoire *et al.*, 1998). Comme le R-AT2 n'a pas été détecté dans les préadipocytes, il est fort probable que l'expression de ces deux marqueurs ne soit pas influencée par une activation du R-AT2.

Il est aussi possible que le R-AT2 n'ait pas vraiment d'influence sur le processus de la différenciation, mais que son rôle soit plus important au niveau du maintien du phénotype différencié. Pour valider cette hypothèse, il aurait fallu regarder les effets d'un cotraitement avec le M24 plutôt sur des adipocytes matures, donc autour de J10 ou J12. De plus, il ne faut pas oublier que le modèle utilisé est une lignée cellulaire. Ce n'était peut-être pas le meilleur choix pour effectuer ces études, sachant que ce modèle ne peut être associé à un type d'adipocytes spécifiques, donc les résultats obtenus ne peuvent être extrapolés aux situations *in vivo*. Cette hypothèse est appuyée par l'article de Shum et al. qui suggère que le R-AT2 est nécessaire à la différenciation d'adipocytes de rat (Shum *et al.*, 2013).

## 5.9 Expériences complémentaires réalisées : effet du M24 sur la prolifération des préadipocytes et sur l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes matures

Même si nous n'avons pas observé la présence du R-AT2 dans les préadipocytes (ni en RT-PCR ni par des études de liaison hormone-récepteur), nous avons tout de même voulu vérifier l'effet potentiel du M24 sur la prolifération des préadipocytes, puisque d'après nos expériences de Western et certaines études (Mallow *et al.*, 2000; Weiland et Verspohl, 2008), les préadipocytes des cellules 3T3-L1 possèdent ce récepteur. Les résultats du test de prolifération réalisé à l'aide d'un essai MTS suggèrent que les agonistes ou les antagonistes des R-AT1 et R-AT2 n'ont pas d'effet sur la prolifération des préadipocytes. Ce résultat n'est pas étonnant puisque nous n'avons pas détecté de R-AT1 ni de R-AT2 dans les préadipocytes, excepté en protéine. Le seul traitement qui semble avoir favorisé la prolifération est une combinaison PD123319 et M24. Ce résultat est surprenant étant donné l'absence d'effet lorsque chaque

traitement est administré seul. Puisque l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, aucune conclusion ne peut être tirée.

L'incorporation des acides gras dans les adipocytes matures a aussi été réalisée afin de déterminer l'effet potentiel de l'activation du R-AT1 ou du R-AT2. Nos résultats d'incorporation de triglycérides dans les adipocytes suggèrent que l'activation du R-AT1 ou du R-AT2 n'ont pas d'effet, excepté peut-être un traitement au M24 à 10 nM. Ce résultat est intéressant mais il faudrait refaire l'expérience pour le valider. Il serait aussi intéressant de refaire cette expérience en conditions de surcharges lipidiques, puisque ce processus est peut-être influencé dans ces conditions. Si tel est le cas et qu'une surcharge lipidique diminue l'efficacité des adipocytes à incorporer des lipides, peut-être que l'activation du R-AT2 pourrait renverser cet effet.

Il serait intéressant de poursuivre ce projet, mais sur des cellules du tissu adipeux humains. Il faudrait commencer par montrer la présence des récepteurs de l'Ang II dans les adipocytes des différents types de tissu adipeux humain (sous-cutané et viscéral). S'ils sont présents, on pourrait vérifier leur niveau d'expression durant le processus de différenciation. Ensuite, on pourrait observer l'effet de l'inactivation, à l'aide de lentivirus, ou de l'activation, à l'aide du M24, du R-AT2 dans ces types cellulaires au cours du processus de différenciation normale et en conditions de surcharges lipidiques. Cela permettrait d'améliorer notre compréhension du rôle du R-AT2 dans les adipocytes aussi bien en conditions physiologiques que lors d'une perturbation de l'homéostasie.

## Chapitre 6 : Conclusion

Lors de cette étude nous avons tout à bord vérifié l'expression des récepteurs de l'Ang II lors de la différenciation des cellules 3T3-L1, un modèle d'adipogenèse bien caractérisé. Nous avons montré, à l'aide de RT-PCR et d'études de liaison hormone-récepteur, que les R-AT1 et R-AT2 ne sont pas présents dans les préadipocytes, mais que leur expression augmente au cours de la différenciation. Le R-AT2 est aussi présent dans les adipocytes matures à J10, tandis que le R-AT1 n'a pas été détecté, et ce, même si l'ARNm l'a été. Par contre, l'activation du R-AT2, par le M24, dans des conditions normales n'influence pas la différenciation adipocytaire. Cela a été évalué en regardant l'expression de deux marqueurs de la différenciation fonctionnelle, PPAR $\gamma$  et aP2, et l'accumulation lipidique. Par contre, l'inactivation du R-AT2 à l'aide de lentivirus semble diminuer la différenciation adipocytaire. Ce résultat reste cependant à valider, mais suggère tout de même un rôle du R-AT2 dans l'adipogenèse.

Puisque le R-AT2 est connu pour être réexprimé et avoir des effets bénéfiques lors d'un désordre de l'homéostasie, nous avons vérifié son implication en conditions de surcharge lipidique. L'oléate et le palmitate ont été choisis pour induire la surcharge lipidique. Les conditions de surcharges lipidiques n'ont généralement pas influencé les paramètres étudiés, et ce, même avec deux protocoles de différenciation différents. Le premier protocole utilisé, dans lequel les cellules étaient toujours exposées à l'insuline, semble stimuler de manière maximale la différenciation des adipocytes. Donc, le protocole a été changé et l'insuline a été ajoutée au milieu de culture uniquement les 4 premiers jours suivant l'induction de la différenciation. Les seuls résultats significativement différents par rapport à une différenciation normale sont une diminution de l'expression génique de PPAR $\gamma$  suite à une stimulation avec 200  $\mu$ M d'oléate et une augmentation de l'expression génique du R-AT2 suite à une exposition avec 300  $\mu$ M de palmitate. Le cotraitement avec le M24 ne modifie pas les résultats



obtenus en conditions de surcharges lipidiques, que ce soit au niveau de l'accumulation lipidique ou au niveau de l'expression génique et protéique des marqueurs de la différenciation et des récepteurs de l'Ang II.

Les paramètres choisis pour évaluer la différenciation adipocytaire en conditions de surcharge lipidique n'étaient peut-être pas optimaux, même s'ils sont couramment utilisés dans la littérature. En effet, l'oléate et le palmitate augmentent les lipides intracellulaires et le palmitate stimule l'expression de PPAR $\gamma$ . Par conséquent, la diminution potentielle de la différenciation adipocytaire suite à un traitement au palmitate ainsi que l'amélioration potentielle de cette différenciation suite à un cotraitement avec le M24 n'ont pu être observées. Par conséquent, afin de vérifier l'effet de l'activation du R-AT2 sur la différenciation adipocytaire en conditions de surcharge lipidique, il faudrait revoir non seulement le protocole expérimental et les paramètres à regarder, mais probablement le modèle cellulaire lui-même. Les cellules 3T3-L1 sont une lignée très proliférative et elles poussent en multi-couches. Il est donc difficile d'évaluer la taille des adipocytes et des gouttelettes lipidiques, qui aurait été des paramètres intéressants à mesurer.

D'autre part, des résultats préliminaires évaluant les effets de l'activation du R-AT2 sur la prolifération des préadipocytes et sur l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes matures ont été obtenues. Les résultats suggèrent que l'activation du R-AT2 n'influence pas la prolifération des préadipocytes ni l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes matures.

Finalement, les recherches effectuées dans le cadre de ce projet de maîtrise suggèrent fortement que le R-AT2 est présent dans les adipocytes matures et au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1. Par contre, la nature du modèle expérimental et les protocoles de différenciation qui ont dû être utilisés n'ont pas permis de

déterminer si le R-AT2 a une implication dans la différenciation et la fonctionnalité de ces cellules. Par conséquent, l'importance du R-AT2 dans le processus de différenciation et dans le maintien des adipocytes matures demeure à déterminer.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directrices de recherche, les Prs Nicole Gallo-Payet et Marie-France Langlois, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Grâce à vous, j'ai beaucoup appris et progressé durant mes années de maîtrise. Merci d'avoir partagé vos connaissances, de m'avoir fait confiance, et pour votre compréhension durant ses années où j'ai grandi en tant que scientifique, mais aussi en tant que personne. Je remercie également les membres du laboratoire, Marie-Odile, pour son soutien technique et moral. Merci à Lucie C., Lucie B., et Sandra pour leurs conseils et leur présence. Merci aussi au Pr. Pedro Geraldès pour son expertise technique et pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Je remercie également les membres de son laboratoire pour leurs discussions scientifiques et moins scientifiques. Je tiens aussi à remercier Audrey et Michaël qui ont été présents au début de ma maîtrise et qui m'ont aidé à débiter mon projet.

Un merci particulier à ma belle et grande famille. Merci à mes parents qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont encouragé à poursuivre mes rêves. Merci à mes frères et sœurs, qui chacun à leur façon, sont présents dans ma vie et m'apportent beaucoup. Nous sommes une grande famille, mais très unie malgré les épreuves que nous avons dû surmonter ces dernières années. Merci aussi à mes beaux-frères et mes belles-sœurs. Nos réunions familiales sont souvent bruyantes et mouvementées, mais c'est ce que j'aime et sans vous ce serait différent. Je tiens aussi à remercier mes amis qui m'ont changé les idées et qui ont été présents durant mon parcours.

Finalement, un merci énorme à Michel, mon conjoint et père de notre petit garçon, qui est rentré dans ma vie il y a déjà 5 ans. Merci d'avoir été là dans les moments heureux comme les moments plus difficiles et de m'avoir acceptée telle que je suis. Ton soutien et ton amour me sont indispensables. Merci de m'avoir permis de concilier études, sport d'excellence, et vie de couple, ce qui n'a certainement pas toujours été évident.

## Bibliographie

- (2012). WHO launches the World Health Statistics 2012. *Euro Surveillance* **17**(20).
- Abassi, Z., J. Winaver et G. Feuerstein (2009). The biochemical pharmacology of renin inhibitors: implications for translational medicine in hypertension, diabetic nephropathy and heart failure: expectations and reality. *Biochemical pharmacology* **78**(8): 933-940.
- Aplin, M., G. T. Christensen et H. J.L. (2008). Pharmacologic perspectives of functional selectivity by the angiotensin II type 1 receptor. *Trends in cardiovascular medicine* **18**(8): 305-312.
- Arner, E., P. Westermark, K. Spalding, T. Britton, M. Rydén, J. Frisén, S. Bernard et P. Arner (2010). Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* **59**(1): 105-109.
- Arsenault, B., E. Beaumont, J.-P. Després et E. Larose (2011). Mapping body fat distribution: A key step towards the identification of the vulnerable patient? *Annals of medicine* **44**(8): 758-772.
- Avila, M., J. Morgan et X. Yan (2011). Genetically modified mouse models used for studying the role of the AT2 receptor in cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**: 1-5.
- Blouin, K., M. Nadeau, M. Perreault, A. Veilleux, R. Drolet, P. Marceau, J. Mailloux, V. Luu-The et A. Tchernof (2010). Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose tissue explant metabolism in men and women. *Clinical endocrinology* **72**(2): 176-188.
- Bosnyak, S., E. Jones, A. Christopoulos, M.-I. Aguilar, W. Thomas et R. Widdop (2010). Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clinical science (London, England : 1979)* **121**(7): 297-303.
- Carey, R., N. Howell, X. Jin et H. Siragy (2001). Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension* **38**(6): 1272-1277.
- Chakrabarti, S., B. Cole, Y. Wen, S. Keller et J. Nadler (2009). 12/15-lipoxygenase products induce inflammation and impair insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **17**(9): 1657-1663.
- Chehab, F., M. Lim et R. Lu (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature genetics* **12**(3): 318-320.
- Chiu, A. T., J. V. Duncia, D. E. McCall, P. C. Wong, W. A. Price, Jr., M. J. Thoolen, D. J. Carini, A. L. Johnson et P. B. Timmermans (1989). Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. III. Structure-function studies. *J Pharmacol Exp Ther* **250**(3): 867-874.
- Clasen, R., M. Schupp, A. Foryst-Ludwig, C. Sprang, M. Clemenz, M. Krikov, C. Thöne-Reineke, T. Unger et U. Kintscher (2005). PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* **46**(1): 137-143.
- Cole, B., S. Keller, R. Wu, J. Carter, J. Nadler et C. Nunemaker (2010). Valsartan protects pancreatic islets and adipose tissue from the inflammatory and metabolic consequences of a high-fat diet in mice. *Hypertension* **55**(3): 715-721.
- Coll, T., M. Jové, R. Rodríguez-Calvo, E. Eyre, X. Palomer, R. Sánchez, M. Merlos, J. Laguna et M. Vázquez-Carrera (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* **55**(10): 2779-2787.
- Crandall, D., D. Armellino, D. Busler, B. McHendry-Rinde et J. Kral (1999). Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology* **140**(1): 154-158.

- D'Amore, A., M. Black et W. Thomas (2005). The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension* **46**(6): 1347-1354.
- de Gasparo, M., K. Catt, T. Inagami, J. Wright et T. Unger (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* **52**(3): 415-472.
- de Kloet, A., E. Krause et S. Woods (2010). The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & behavior* **100**(5): 525-534.
- Deshayes, F. et C. Nahmias (2005). Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **16**(7): 293-299.
- Després, J.-P. et I. Lemieux (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**(7121): 881-887.
- Di Filippo, C., E. Lampa, E. Tufariello, P. Petronella, F. Freda, A. Capuano et M. D'Amico (2005). Effects of irbesartan on the growth and differentiation of adipocytes in obese Zucker rats. *Obesity research* **13**(11): 1909-1914.
- Drolet, R., C. Richard, A. Sniderman, J. Mailloux, M. Fortier, C. Huot, C. Rhéaume et A. Tchernof (2008). Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *International journal of obesity (2005)* **32**(2): 283-291.
- Eckel, R., D. York, S. Rössner, V. Hubbard, I. Caterson, S. St Jeor, L. Hayman, R. Mullis, S. Blair et A. American Heart (2004). Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary. *Circulation* **110**(18): 2968-2975.
- Elbaz, N., K. Bedecs, M. Masson, M. Sutren, A. Strosberg et C. Nahmias (2000). Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **14**(6): 795-804.
- Engeli, S., J. Bohnke, K. Gorzelniak, J. Janke, P. Schling, M. Bader, F. C. Luft et A. M. Sharma (2005). Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* **45**(3): 356-362.
- Engeli, S., P. Schling, K. Gorzelniak, M. Boschmann, J. Janke, G. Ailhaud, M. Teboul, F. Massiera et A. M. Sharma (2003). The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry*: 807-825.
- Fasshauer, M., R. Paschke et M. Stumvoll (2004). Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie* **86**(11): 779-784.
- Frühbeck, G., F. Gómez-Ambrosi, J. Muruzábal et M. A. Burrell (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **280**(6): 827-847.
- Fuentes, P., M. Acuna, M. Cifuentes et C. Rojas (2010). The anti-adipogenic effect of angiotensin II on human preadipose cells involves ERK1,2 activation and PPAR $\gamma$  phosphorylation. *The Journal of endocrinology* **206**(1): 75-83.
- Funke-Kaiser, H., J. Reinemund, U. Steckelings et T. Unger (2010). Adapter proteins and promoter regulation of the angiotensin AT2 receptor-implications for cardiac pathophysiology. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **11**(1): 7-17.
- Furuhashi, M., N. Ura, H. Takizawa, D. Yoshida, N. Moniwa, H. Murakami, K. Higashiura et K. Shimamoto (2004). Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *Journal of hypertension* **22**(10): 1977-1982.
- Gallo-Payet, N., M.-O. Guimond, L. Bilodeau, C. Wallinder, M. Alterman et A. Hallberg (2012). Angiotensin II, a Neuropeptide at the Frontier between Endocrinology and

- Neuroscience: Is There a Link between the Angiotensin II Type 2 Receptor and Alzheimer's Disease? *Frontiers in endocrinology* **2**(17): 1-10.
- Gallo-Payet, N., M. Shum, J.-P. Baillargeon, M.-F. Langlois, M. Alterman, A. Hallberg et A. C. Carpentier (2012). AT2 receptor agonists: Exploiting the beneficial arm of Ang II signaling. *Current Hypertension Reviews* **8**: 47-59.
- Gao, L. et I. Zucker (2011). AT2 receptor signaling and sympathetic regulation. *Current opinion in pharmacology* **11**(2): 124-130.
- Gelosa, P., A. Pignieri, L. Fändriks, M. de Gasparo, A. Hallberg, C. Banfi, L. Castiglioni, L. Turolo, U. Guerrini, E. Tremoli et L. Sironi (2009). Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *Journal of hypertension* **27**(12): 2444-2451.
- Gendron, L., M. Payet et N. Gallo-Payet (2003). The angiotensin type 2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: from observations to mechanisms. *Journal of molecular endocrinology* **31**(3): 359-372.
- Gesta, S., Y.-H. Tseng et C. Kahn (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**(2): 242-256.
- Giacca, A., C. Xiao, A. Oprescu, A. Carpentier et G. Lewis (2011). Lipid-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction: focus on in vivo studies. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **300**(2): 255-262.
- Giacchetti, G., E. Faloi, B. Mariniello, C. Sardu, C. Gatti, M. A. Camilloni, M. Guerrieri et F. Mantero (2002). Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* **15**(5): 381-388.
- Gohlke, P., C. Pees et T. Unger (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* **31**(1 Pt 2): 349-355.
- Goossens, G., E. Blaak, P. Arner, W. Saris et M. van Baak (2007). Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. *International journal of obesity (2005)* **31**(2): 382-384.
- Goossens, G., E. Blaak et M. van Baak (2003). Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **4**(1): 43-55.
- Gorzelnik, K., S. Engeli, J. Janke, F. C. Luft et A. M. Sharma (2002). Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens* **20**(5): 965-973.
- Green, H. et O. Kehinde (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**(1): 19-27.
- Gregoire, F., C. Smas et H. Sul (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews* **78**(3): 783-809.
- Grimaldi, P., S. Knobel, R. Whitesell et N. Abumrad (1992). Induction of aP2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(22): 10930-10934.
- Guilherme, A., J. Virbasius, V. Puri et M. Czech (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**(5): 367-377.
- Guimond, M.-O. et N. Gallo-Payet (2012). How does angiotensin AT(2) receptor activation help neuronal differentiation and improve neuronal pathological situations? *Frontiers in endocrinology* **3**(164): 1-12.

- Guimond, M. O., C. Wallinder, M. Alterman, A. Hallberg et N. Gallo-Payet (2012). Comparative functional properties of two structurally similar selective nonpeptide drug-like ligands for the angiotensin II type-2 (AT<sub>2</sub>) receptor. Effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Europe Journal of Pharmacology*: 1-36.
- Guo, W., S. Wong, W. Xie, T. Lei et Z. Luo (2007). Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**(2): 576-586.
- Horiuchi, M., W. Hayashida, T. Kambe, T. Yamada et V. Dzau (1997). Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **272**(30): 19022-19026.
- Hunyady, L. et K. Catt (2006). Pleiotropic AT<sub>1</sub> receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **20**(5): 953-970.
- Ibrahim, M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **11**(1): 11-18.
- Ishihata, A., S. Uno, D. Guo, Y. Katano et T. Inagami (1998). Inhibition of the expression of the gene for the angiotensin AT<sub>1</sub> receptor by angiotensin II in the rat adrenal gland. *European journal of pharmacology* **350**(1): 129-139.
- Iwai, M. et M. Horiuchi (2009). Role of renin-angiotensin system in adipose tissue dysfunction. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **32**(6): 425-427.
- Iwai, M., Y. Tomono, S. Inaba, H. Kanno, I. Senba, M. Mogi et M. Horiuchi (2009). AT<sub>2</sub> receptor deficiency attenuates adipocyte differentiation and decreases adipocyte number in atherosclerotic mice. *American journal of hypertension* **22**(7): 784-791.
- Janke, J., S. Engeli, K. Gorzelniak, F. Luft et A. M. Sharma (2002). Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* **51**(6): 1699-1707.
- Janke, J., M. Schupp, S. Engeli, K. Gorzelniak, M. Boschmann, L. Sauma, F. Nystrom, J. Jordan, F. Luft et A. Sharma (2006). Angiotensin type 1 receptor antagonists induce human in-vitro adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Journal of hypertension* **24**(9): 1809-1816.
- Jehle, A., Y. Xu, J. Dimaria, B. French, F. Epstein, S. Berr, R. Roy, B. Kemp, R. Carey et C. Kramer (2012). A nonpeptide angiotensin II type 2 receptor agonist does not attenuate postmyocardial infarction left ventricular remodeling in mice. *Journal of cardiovascular pharmacology* **59**(4): 363-368.
- Jin, X.-Q., N. Fukuda, J.-Z. Su, Y.-M. Lai, R. Suzuki, Y. Tahira, H. Takagi, Y. Ikeda, K. Kanmatsuse et H. Miyazaki (2002). Angiotensin II type 2 receptor gene transfer downregulates angiotensin II type 1a receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **39**(5): 1021-1027.
- Jing, F., M. Mogi et M. Horiuchi (2012). Role of renin-angiotensin-aldosterone system in adipose tissue dysfunction. *Molecular and cellular endocrinology*: 1-6.
- Jones, B., M. Standridge et N. Moustaid (1997). Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* **138**(4): 1512-1519.
- Kalupahana, N. et N. Moustaid-Moussa (2012). The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **47**(4): 379-390.

- Kaschina, E., A. Grzesiak, J. Li, A. Foryst-Ludwig, M. Timm, F. Rompe, M. Sommerfeld, U. Kemnitz, C. Curato, P. Namsolleck, C. Tschpe, A. Hallberg, M. Alterman, T. Hucko, I. Paetsch, T. Dietrich, B. Schnackenburg, K. Graf, B. Dahlöf, U. Kintscher, T. Unger et U. Steckelings (2008). Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* **118**(24): 2523-2532.
- Katzmarzyk, P. T. et I. Janssen (2004). The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update. *Can J Appl Physiol* **29**(1): 90-115.
- Kershaw, E., M. Schupp, H.-P. Guan, N. Gardner, M. Lazar et J. Flier (2007). PPARgamma regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**(6): 1736-1745.
- Kilian, P., S. Campbell, L. Bilodeau, M.-O. Guimond, C. Roberge, N. Gallo-Payet et M. Payet (2008). Angiotensin II type 2 receptor stimulation increases the rate of NG108-15 cell migration via actin depolymerization. *Endocrinology* **149**(6): 2923-2933.
- Kim, S.-p., J. Ha, S. Yun, E. Kim, S. Chung, K. Hong, C. Kim et S. Bae (2010). Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* **399**(1): 55-59.
- Kintscher, U., N. Marx, P. Martus, M. Stoppelhaar, J. Schimkus, A. Schneider, D. Walcher, A. Kümmel, R. Winkler, K. Kappert, Y. Dörffel, J. Scholze et T. Unger (2010). Effect of high-dose valsartan on inflammatory and lipid parameters in patients with Type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes research and clinical practice* **89**(3): 209-215.
- Koutsari, C., D. Dumesic, B. Patterson, S. Votruba et M. Jensen (2008). Plasma free fatty acid storage in subcutaneous and visceral adipose tissue in postabsorptive women. *Diabetes* **57**(5): 1186-1194.
- Kouyama, R., T. Suganami, J. Nishida, M. Tanaka, T. Toyoda, M. Kiso, T. Chiwata, Y. Miyamoto, Y. Yoshimasa, A. Fukamizu, M. Horiuchi, Y. Hirata et Y. Ogawa (2005). Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* **146**(8): 3481-3489.
- Lassègue, B., R. Alexander, G. Nickenig, M. Clark, T. Murphy et K. Griendling (1995). Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Molecular pharmacology* **48**(4): 601-609.
- Lee, M.-J., Y. Wu et S. Fried (2012). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular aspects of medicine* **34**: 1-11.
- Lee, M., H. Song, G. Ko, Y. Kang, S. Han, K. Han, H. Kim, J. Han et D. Cha (2008). Angiotensin receptor blockers improve insulin resistance in type 2 diabetic rats by modulating adipose tissue. *Kidney international* **74**(7): 890-900.
- Lemarié, C. et E. Schiffrin (2010). The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **11**(1): 19-31.
- Lenz, O. et A. Fornoni (2008). Renin-angiotensin system blockade and diabetes: moving the adipose organ from the periphery to the center. *Kidney international* **74**(7): 851-853.
- Li, J.-M., M. Mogi, K. Tsukuda, H. Tomochika, J. Iwanami, L.-J. Min, C. Nahmias, M. Iwai et M. Horiuchi (2007). Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **21**(2): 499-511.



- Liao, W., M. Nguyen, T. Yoshizaki, S. Favelyukis, D. Patsouris, T. Imamura, I. Verma et J. Olefsky (2007). Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**(1): 219-227.
- Lin, F. et M. Lane (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(19): 8757-8761.
- Liu, L., H. Gu, J. Yang, S. Ma, F. Yu, Y. Ren et L. An (2010). Adipogenic differentiation is not influenced by lentivirus-mediated shRNA targeting the SOCS3 gene in adipose-derived stromal cells. *Molecular biology reports* **37**(5): 2455-2462.
- Livak, K. et T. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**(4): 402-408.
- Lumeng, C., J. Bodzin et A. Saltiel (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* **117**(1): 175-184.
- Mallow, H., A. Trindl et G. Loffler (2000). Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res* **32**(11-12): 500-503.
- Manolopoulos, K., F. Karpe et K. Frayn (2010). Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *International journal of obesity (2005)* **34**(6): 949-959.
- Martin, M. et M. Jensen (1991). Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *The Journal of clinical investigation* **88**(2): 609-613.
- Marx, J. (2003). Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science (New York, N.Y.)* **299**(5608): 846-849.
- Matsushita, K., Y. Wu, Y. Okamoto, R. Pratt et V. Dzau (2006). Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension* **48**(6): 1095-1102.
- McLaughlin, T., C. Lamendola, A. Liu et F. Abbasi (2011). Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**(11): 1756-1760.
- Michel, M., T. Wieland et G. Tsujimoto (2009). How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **379**(4): 385-388.
- Miegueu, P., K. Cianflone, D. Richard et D. St-Pierre (2012). Effect of secretin on preadipocyte, differentiating and mature adipocyte functions. *International journal of obesity*: 1-9.
- Mogi, M., J.-M. Li, J. Iwanami, L.-J. Min, K. Tsukuda, M. Iwai et M. Horiuchi (2006). Angiotensin II type-2 receptor stimulation prevents neural damage by transcriptional activation of methyl methanesulfonate sensitive 2. *Hypertension* **48**(1): 141-148.
- Mori, Y., Y. Itoh et N. Tajima (2007). Angiotensin II receptor blockers downsize adipocytes in spontaneously type 2 diabetic rats with visceral fat obesity. *American journal of hypertension* **20**(4): 431-436.
- Morisco, C., G. Lembo et B. Trimarco (2006). Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends in cardiovascular medicine* **16**(6): 183-188.
- Müller, G., S. Wied, S. Over et W. Frick (2008). Inhibition of lipolysis by palmitate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the sulfonylurea drug, glimepiride, in rat adipocytes depends on cAMP degradation by lipid droplets. *Biochemistry* **47**(5): 1259-1273.

- Munoz, M., J. Giani, V. Burghi, M. Mayer, A. Carranza, C. Taira et F. Dominici (2012). The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7). *Regulatory peptides* **177**(1-3): 1-11.
- Munoz, M., J. Giani, F. Dominici, D. Turyn et J. Toblli (2009). Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats. *Journal of hypertension* **27**(12): 2409-2420.
- Murugaiah, A., X. Wu, C. Wallinder, A. Mahalingam, Y. Wan, C. Sköld, M. Botros, M.-O. Guimond, A. Joshi, F. Nyberg, N. Gallo-Payet, A. Hallberg et M. Alterman (2012). From the first selective non-peptide AT(2) receptor agonist to structurally related antagonists. *Journal of medicinal chemistry* **55**(5): 2265-2278.
- Newton, R., C. Bouchard, G. Bray, F. Greenway, W. Johnson, E. Ravussin, D. Ryan et P. Katzmarzyk (2011). Abdominal adiposity depots are correlates of adverse cardiometabolic risk factors in Caucasian and African-American adults. *Nutrition & diabetes* **1**: 1-8
- Nickenig, G. et T. Murphy (1996). Enhanced angiotensin receptor type 1 mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology* **50**(4): 743-751.
- Ohshima, K., M. Mogi, F. Jing, J. Iwanami, K. Tsukuda, L.-J. Min, A. Ogimoto, B. Dahlöf, U. Steckelings, T. Unger, J. Higaki et M. Horiuchi (2012). Direct Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Ameliorates Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mice with PPAR $\gamma$  Activation. *PloS one* **7**(11): 1-10.
- Oishi, Y., I. Manabe, K. Tobe, K. Tsushima, T. Shindo, K. Fujiu, G. Nishimura, K. Maemura, T. Yamauchi, N. Kubota, R. Suzuki, T. Kitamura, S. Akira, T. Kadowaki et R. Nagai (2005). Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell metabolism* **1**(1): 27-39.
- Olivares-Reyes, J., A. Arellano-Plancarte et J. Castillo-Hernandez (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Molecular and cellular endocrinology* **302**(2): 128-139.
- Otto, T. et M. Lane (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **40**(4): 229-242.
- Ouellet, V., S. Labbé, D. Blondin, S. Phoenix, B. Guérin, F. Haman, E. Turcotte, D. Richard et A. Carpentier (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *The Journal of clinical investigation* **122**(2): 545-552.
- Palou, M., T. Priego, J. Sánchez, A. Rodríguez, A. Palou et C. Picó (2009). Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologic features. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **24**(5-6): 547-556.
- Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. McBurney et L. Guarente (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature* **429**(6993): 771-776.
- Porrello, E., L. Delbridge et W. Thomas (2009). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **14**: 958-972.
- Rajala, M. et P. Scherer (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**(9): 3765-3773.

- Rebuffé-Scrive, M., B. Anderson, L. Olbe et P. Björntorp (1990). Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots in severely obese men and women. *Metabolism: clinical and experimental* **39**(10): 1021-1025.
- Rehman, A., A. Leibowitz, N. Yamamoto, Y. Rautureau, P. Paradis et E. Schiffrin (2012). Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **59**(2): 291-299.
- Reinemund, J., K. Seidel, U. Steckelings, D. Zaade, S. Klare, F. Rompe, M. Katerbaum, J. Schacherl, Y. Li, M. Menk, J. Schemke, P. Goldin-Lang, C. Szabo, G. Olah, T. Unger et H. Funke-Kaiser (2009). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes. *Biochemical pharmacology* **77**(12): 1795-1805.
- Reudelhuber, T. (2005). The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension* **46**(6): 1261-1262.
- Richard, D., A. Carpentier, G. Doré, V. Ouellet et F. Picard (2010). Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *International journal of obesity (2005)* **34**(2): 59-66.
- Roberge, C., A. Carpentier, M.-F. Langlois, J.-P. Baillargeon, J.-L. Ardilouze, P. Maheux et N. Gallo-Payet (2007). Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**(6): 1465-1478.
- Rompe, F., M. Artuc, A. Hallberg, M. Alterman, K. Ströder, C. Thöne-Reineke, A. Reichenbach, J. Schacherl, B. Dahlöf, M. Bader, N. Alenina, M. Schwaninger, T. Zuberbier, H. Funke-Kaiser, C. Schmidt, W.-H. Schunck, T. Unger et U. Steckelings (2010). Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* **55**(4): 924-931.
- Rosen, E. et O. MacDougald (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**(12): 885-896.
- Rubinson, D., C. Dillon, A. Kwiatkowski, C. Sievers, L. Yang, J. Kopinja, D. Rooney, M. Zhang, M. Ihrig, M. McManus, F. Gertler, M. Scott et L. Van Parijs (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature genetics* **33**(3): 401-406.
- Safonova, I., J. Aubert, R. Negrel et G. Ailhaud (1997). Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *The Biochemical journal* **322**(1): 235-239.
- Saiki, A., N. Koide, F. Watanabe, T. Murano, Y. Miyashita et K. Shirai (2008). Suppression of lipoprotein lipase expression in 3T3-L1 cells by inhibition of adipogenic differentiation through activation of the renin-angiotensin system. *Metabolism: clinical and experimental* **57**(8): 1093-1100.
- Saint-Marc, P., L. Kozak, G. Ailhaud, C. Darimont et R. Negrel (2001). Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology* **142**(1): 487-492.
- Sakuma, S., Y. Nishioka, R. Imanishi, K. Nishikawa, H. Sakamoto, J. Fujisawa, K. Wada, Y. Kamisaki et Y. Fujimoto (2010). cis9, trans11-Conjugated Linoleic Acid Differentiates Mouse 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Small Adipocytes through Induction of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ . *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **47**(2): 167-173.

- Santos, R., A. Ferreira et A. Simoes E Silva (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental physiology* **93**(5): 519-527.
- Savage, D. (2005). PPAR gamma as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert reviews in molecular medicine* **7**(1): 1-16.
- Savoia, C., T. Ebrahimian, Y. He, J. P. Gratton, E. L. Schiffrin et R. M. Touyz (2006). Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens* **24**(12): 2417-2422.
- Savoia, C., R. Touyz, M. Volpe et E. Schiffrin (2007). Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. *Hypertension* **49**(2): 341-346.
- Schling, P. (2002). Expression of angiotensin II receptors type 1 and type 2 in human preadipose cells during differentiation. *Hormone and metabolic research* **34**(11-12): 709-715.
- Schling, P. et G. Löffler (2001). Effects of angiotensin II on adipose conversion and expression of genes of the renin-angiotensin system in human preadipocytes. *Hormone and metabolic research* **33**(4): 189-195.
- Schmieder, R., K. Hilgers, M. Schlaich et B. Schmidt (2007). Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* **369**(9568): 1208-1219.
- Schupp, M., M. Clemenz, R. Gineste, H. Witt, J. Janke, S. Helleboid, N. Hennuyer, P. Ruiz, T. Unger, B. Staels et U. Kintscher (2005). Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* **54**(12): 3442-3452.
- Schwenk, R., G. Holloway, J. Luiken, A. Bonen et J. Glatz (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **82**(4-6): 149-154.
- Searles, C. et D. Harrison (1999). The interaction of nitric oxide, bradykinin, and the angiotensin II type 2 receptor: lessons learned from transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* **104**(8): 1013-1014.
- Sell, H., Y. Deshaies et D. Richard (2004). The brown adipocyte: update on its metabolic role. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**(11): 2098-2104.
- Sera for cell culture, Highest Quality, Consistency, total trust. PAA, the cell culture company. 1-20
- Sethi, J. et A. Vidal-Puig (2007). Targeting fat to prevent diabetes. *Cell metabolism* **5**(5): 323-325.
- Sethi, J. K. et A. J. Vidal-Puig (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* **48**(6): 1253-1262.
- Shadid, S. et M. Jensen (2003). Effects of pioglitazone versus diet and exercise on metabolic health and fat distribution in upper body obesity. *Diabetes care* **26**(11): 3148-3152.
- Shibasaki, Y., H. Matsubara, Y. Nozawa, Y. Mori, H. Masaki, A. Kosaki, Y. Tsutsumi, Y. Uchiyama, S. Fujiyama, A. Nose, O. Iba, E. Tateishi, T. Hasegawa, M. Horiuchi, C. Nahmias et T. Iwasaka (2001). Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Hypertension* **38**(3): 367-372.
- Shibata, K., I. Makino, H. Shibaguchi, M. Niwa, T. Katsuragi et T. Furukawa (1997). Up-regulation of angiotensin type 2 receptor mRNA by angiotensin II in rat cortical cells. *Biochemical and biophysical research communications* **239**(2): 633-637.
- Shum, M., S. Pinard, M.-O. Guimond, S. M. Labbé, C. Roberge, J.-P. Baillargeon, M.-F. Langlois, M. Alterman, C. Wallinder, A. Hallberg, A. C. Carpentier et N. Gallo-Payet (2013). Angiotensin II Type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores

- adipocyte size in high fat/high fructose diet-induced insulin resistance in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **304**: 197-210
- Sigma-Aldrich (2010). Mission shRNA. In <http://www.sigmaaldrich.com/lifescience/functional-genomics-and-rnai/shrna.html>
- Siragy, H. M. (2009). The angiotensin II type 2 receptor and the kidney. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **11**(1): 260-262.
- Skurk, T., V. van Harmelen et H. Hauner (2004). Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(7): 1199-1203.
- Steckelings, U., E. Kaschina et T. Unger (2005). The AT2 receptor-a matter of love and hate. *Peptides* **26**(8): 1401-1409.
- Steckelings, U., M. Larhed, A. Hallberg, R. Widdop, E. Jones, C. Wallinder, P. Namsolleck, B. Dahlöf et T. Unger (2011). Non-peptide AT2-receptor agonists. *Current opinion in pharmacology* **11**(2): 187-192.
- Steckelings, U., F. Rompe, E. Kaschina, P. Namsolleck, A. Grzesiak, H. Funke-Kaiser, M. Bader et T. Unger (2010). The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **11**(1): 67-73.
- Steckelings, U., F. Rompe, E. Kaschina et T. Unger (2009). The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundamental & clinical pharmacology* **23**(6): 693-703.
- Steckelings, U. et T. Unger (2012). Angiotensin II type 2 receptor agonists--where should they be applied? *Expert opinion on investigational drugs* **21**(6): 763-766.
- Takahashi, K., S. Yamaguchi, T. Shimoyama, H. Seki, K. Miyokawa, H. Katsuta, T. Tanaka, K. Yoshimoto, H. Ohno, S. Nagamatsu et H. Ishida (2008). JNK-and I kappaB-dependent pathways regulate MCP-1 but not adiponectin release from artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes preloaded with palmitate in vitro. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **294**(5): 898-909.
- Tan, C. et A. Vidal-Puig (2008). Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochemical Society transactions* **36**(5): 935-940.
- Tang, Q.-Q., T. Otto et M. Lane (2003). Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(1): 44-49.
- Tchoukalova, Y., S. Votruba, T. Tchkonina, N. Giorgadze, J. Kirkland et M. Jensen (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(42): 18226-18231.
- Tomono, Y., M. Iwai, S. Inaba, M. Mogi et M. Horiuchi (2008). Blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *American journal of hypertension* **21**(2): 206-212.
- Touyz, R. et E. Schiffrin (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* **52**(4): 639-672.
- Uemura, H., H. Ishiguro et Y. Kubota (2008). Pharmacology and new perspectives of angiotensin II receptor blocker in prostate cancer treatment. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* **15**(1): 19-26.
- Unger, T. et B. Dahlöf (2010). Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT2): implications for AT2 receptor research and

- therapeutic potential. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **11**(1): 75-77.
- Unger, T., A. Jakobsen, J. Heroy, A. Ralph, T. Rees et M. Shaw (2008). Targeting cardiovascular protection: the concept of dual renin-angiotensin system control. *Medscape J Med* **10**.
- Unger, T. et S. Sandmann (2000). Angiotensin receptor blocker selectivity at the AT1- and AT2-receptors: conceptual and clinical effects. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **1**(Suppl 2): 6-9.
- Vázquez-Vela, M., N. Torres et A. Tovar (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of medical research* **39**(8): 715-728.
- Verdonk, K., A. Danser et J. van Esch (2012). Angiotensin II type 2 receptor agonists: where should they be applied? *Expert opinion on investigational drugs* **21**(4): 501-513.
- Vogel, C. et E. Marcotte (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics* **13**(4): 227-232.
- Volpe, M., B. Musumeci, P. De Paolis, C. Savoia et A. Morganti (2003). Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens* **21**(8): 1429-1443.
- Wajchenberg, B. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews* **21**(6): 697-738.
- Wan, Y., C. Wallinder, B. Plouffe, H. Beaudry, A. K. Mahalingam, X. Wu, B. Johansson, M. Holm, M. Botoros, A. Karlén, A. Pettersson, F. Nyberg, F. L., N. Gallo-Payet, A. Hallberg et M. Alterman (2004). Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry* **47**: 5995-6008.
- Weiland, F. et E. Verspohl (2008). Variety of angiotensin receptors in 3T3-L1 preadipose cells and differentiated adipocytes. *Hormone and metabolic research* **40**(11): 760-766.
- Wen, Y., H. Wang, R. MacLaren, J. Wu, H. Lu et K. Cianflone (2008). Palmitate and oleate induction of acylation stimulating protein resistance in 3T3-L1 adipocytes and preadipocytes. *Journal of cellular biochemistry* **104**(2): 391-401.
- White, U. et J. Stephens (2010). Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology* **318**(1-2): 10-14.
- Widdop, R., E. Jones, R. Hannan et T. Gaspari (2003). Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *British journal of pharmacology* **140**(5): 809-824.
- Yang, Y., M. Chen, T. Loux et C. Harmon (2007). Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatric surgery international* **23**(7): 675-683.
- Ye, Z. W., X. M. Wu et J. G. Jiang (2010). Knockdown of angiotensinogen by shRNA-mediated RNA interference inhibits human visceral preadipocytes differentiation. *International journal of obesity (2005)* **34**(1): 157-164.
- Yim, J.-E., S. Heshka, J. Albu, S. Heymsfield et D. Gallagher (2008). Femoral-gluteal subcutaneous and intermuscular adipose tissues have independent and opposing relationships with CVD risk. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **104**(3): 700-707.
- Yu, L., C. Shao et L. Gao (2012). Developmental expression patterns for angiotensin receptors in mouse skin and brain. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*: 1-11.
- Yu, L., M. Zheng, W. Wang, G. Rozanski, I. Zucker et L. Gao (2010). Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **11**(4): 214-221.
- Yvan-Charvet, L., P. Even, M. Bloch-Faure, M. Guerre-Millo, N. Moustaid-Moussa, P. Ferre et A. Quignard-Boulange (2005). Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces

- adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **54**(4): 991-999.
- Yvan-Charvet, L., F. Massiéra, N. Lamandé, G. Ailhaud, M. Teboul, N. Moustaid-Moussa, J.-M. Gasc et A. Quignard-Boulangé (2009). Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. *Endocrinology* **150**(3): 1421-1428.
- Yvan-Charvet, L. et A. Quignard-Boulangé (2010). Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney international* **79**(2): 162-168.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold et J. M. Friedman (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**(6505): 425-432.
- Zhu, W., K. Cheng, P. Vanhoutte, K. Lam et A. Xu (2008). Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clinical science (London, England : 1979)* **114**(5): 361-374.
- Zorad, S., J.-t. Dou, J. Benicky, D. Hutanu, K. Tybitanclova, J. Zhou et J. Saavedra (2006). Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *European journal of pharmacology* **552**(1-3): 112-122.